UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ETUDE DE LIPIDES D'EPONGES MARINES : PHOSPHOLIPIDES, ACIDES GRAS, STEROLS

IDENTIFICATION ET EVALUATION PHARMACOLOGIQUE DE METABOLITES SECONDAIRES

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE - BIOLOGIE
Mention Sciences de la Vie et de la Santé
Discipline : Chimie
Spécialité : Substances naturelles d'origine marine

présentée
et soutenue publiquement par

VELOSAOTSY Nambinina Eliezer

le 31 mai 2005, devant le jury ci-dessous

Président	**M. POUCHUS Yves-François, Professeur, Université de Nantes**
Rapporteurs	**M. GAYDOU Emile Marcel, Professeur, Université d'Aix-Marseille III**
	M. MARTY Yanic, Ingénieur CNRS, Université de Bretagne Occidentale
Examinateurs	**M. BARNATHAN Gilles, Professeur, Université de Nantes**
	M. BERGE Jean-Pascal, Chef de projet, Ifremer, Nantes
	M. KORNPROBST Jean-Michel, Professeur émérite, Université de Nantes

Tome 1 et 2

Directeurs de thèse : M. BARNATHAN Gilles
M. KORNPROBST Jean-Michel

Pour les schémas illisibles dans cette version électronique, consulter la thèse papier

SOMMAIRE

Tome 1

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

A- Les éponges 1

A-1. Généralités sur le phylum des Spongiaires 1

A-2. Eléments du squelette et bases de la classification des éponges 3

B- Les phospholipides 3

B-1. Rappels sur la nomenclature des acides gras 3

B-2. Généralités et répartition en classes 5

B-3. Acides gras non fonctionnalisés des phospholipides d'éponges 7

B-3.1. Acides gras saturés

B-3.1.1 - Acides ramifiés

B-3.1.2 - Acides isoprénoïques

B-3.2. Acides gras monoinsaturés Δ5 et Δ9

B-3.3. Acides gras di- et polyinsaturés

B-3.3.1 - Etude bibliographique des acides gras Δ5,9 d'organismes marins

B-3.3.2 - Acides gras insaturés à enchaînements maloniques

B-3.3.3 - Autres acides gras insaturés à enchaînements non maloniques autres que Δ5,9

B-4. Acides gras fonctionnalisés des phospholipides d'éponges 20

B-4.1. Acides 2-*O*-substitués

B-4.1.1. - Acides 2-hydroxylés

B-4.1.2 - Acides 2-méthoxylés

B-4.1.3 - Acides 2-acétoxylés

B-4.2. Acides 3-*O*-substitués

B-5. Origines des acides gras des phospholipides d'éponges 23

B-5,1. Généralités et biosynthèses

B-5.2. Acides gras des phospholipides d'origines alimentaire et symbiotique

B-6. Activités biologiques des acides Δ5,9 26

C– Les glycolipides d'invertébrés marins comme antitumoraux et antipaludiques potentiels .. 27

D- Les stérols 28

D-1. Stérols conventionnels

D-2. *nor*-19 et *nor*-A stérols, *nor*-A stanols

D-3. Biosynthèses des stérols

D-4. Propriétés biologiques des stérols
E- Les terpènes 35
E-1. Généralités
E-2. Exemples de terpènes selon l'ordre des Démosponges étudiées
E-2.1. Exemples de terpènes des Astrophorida
E-2.2. Exemples de terpènes des Halichondrida
E-2.3. Exemples de terpènes des Haplosclerida
E-2.4. Exemples de terpènes des Poecilosclerida
E-2.5. Exemples de terpènes des Spirophorida
F– Les dérivés azotés 44

METHODES EXPERIMENTALES APPLIQUEES AU DOMAINE DES LIPIDES

G– Classification et généralités sur l'extraction des lipides 47
G-1. Classification selon le caractère de la chaîne acyle
G-2. Classification en lipides neutres et en lipides polaires
G-3. Problèmes posés par l'extraction des lipides des tissus et matrices biologiques
G-4. Précautions à prendre lors des extractions et pour le stockage
H- Méthodes chromatographiques 48
H-1. Séparation des lipides en classes
H-2. Les acides gras des phospholipides d'éponges
H-2.1. Définition et finalités de l'étude
H-2.2. Isolement des acides gras des phospholipides
H-3. Chromatographie sur couche mince préparative (CCMp) 50
H-4. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)
H-5. Chromatographie en phase gazeuse couplée à une méthode spectrométrique (CPG/SM ou CPG/IR).
H-5.1. Généralités
H-5.2. Dérivés exploitables en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)
H-5.2.1. Les dérivés des acides gras des phospholipides
H-5.2.1.1. Esters méthyliques (EMAG)
H-5.2.1.2. Dérivés N-acyl-pyrrolidides (NAP)
H-5.2.2. Acétates de stérols
H-5.3. Longueur de chaîne équivalente (LCE) et analyse des mélanges d'acides gras

H-5.3.1. Détermination des LCE à partir des spectres de masse des EMAG et des NAP de *Stylissa carteri* récoltée le 05/01/2000 à Djeddah.
H-5.3.1.1. Détermination à partir des LCE
H-5.3.1.2. Détermination à partir des NAP
H-5.4. Identification des acides gras des phospholipides par couplage CPG/SM
H-5.4.1. Esters méthyliques
H-5.4.1.1. Intérêt chromatographique
H-5.4.1.2. Séparation des EMAG par CPG
H-5.4.1.3. Identification des EMAG par la SM
H-5.4.2. Dérivés *n*-acyl-pyrrolidides
H-6. Les stérols 63
H-6.1. Détermination du nombre des insaturations
H-6.2. Localisation des insaturations
H-6.3. Pics de base des stérols indiqués dans la littérature
H-6.4. Principaux ions-fragments donnés dans la littérature

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I- Positions taxonomiques des éponges étudiées 67
I-1. *Myrmekioderma dendyi* (Vanuatu)
I-2. *Stylissa carteri* (mer Rouge)
I-3. *Cinachyrella alloclada* et *C. kükenthali* (Sénégal)
I-4. *Chalinula saudiensis* (mer Rouge)
I-5. *Geodia* sp. (Atlantique nord)
I-6. *Axinyssa djiferi* (Sénégal)
I-7. *Trikentrion laeve* (Sénégal)
I-8. *Aaptos papillata* (Méditerranée)
J- Lipides totaux et phospholipides des éponges étudiées 75
K- Etude de la compositions en acides gras des phospholipides d'éponges 77
K-1. *Myrmekioderma dendyi* 77
K-1.1. Considérations générales sur la composition en acides gras des phospholipides
K-1.2. Acides gras saturés
K-1.3. Acides gras insaturés
K-1.3.1. Acides monoinsaturés
K-1.3.2. Acides di-insaturés
K-2. *Stylissa carteri* 88
K-2.1. Considérations générales

K-2.2. Acides gras saturés
K-2.3. Acides gras monoinsaturés
K-2.4. Acides gras polyinsaturés
K-2.5. Acides gras α-méthoxylés
K-2.6. Acides gras α-hydroxylés
K-3. *Chalinula saudiensis* 98
K-4. *Cinachyrella alloclada* et *C. kükenthali* 102
K-4.1. Acides gras saturés
K-4.2. Acides gras insaturés – acides démospongiques Δ5,9
K-5. *Geodia* sp. 107
K-5.1. Acides gras saturés
K-5.2. Acides gras insaturés
K-6. *Axinyssa djiferi* 111
K-6.1. Acides gras saturés
K-6.2. Acides gras insaturés
K-7. *Trikentrion laeve* 114
K-8. *Aaptos papillatus* 116
L– Etude de la composition en stérols
L-1. Isolement, purification, et analyse par couplage CPG/SM 118
L-2. *Myrmekioderma dendyi* 118
L-3. *Stylissa carteri* 122
L-3.1. Composition en *nor*-A-stérols
L-3.2. Composition en stérols conventionnels
L-4. *Cinachyrella alloclada* et *C. kükenthali* 129
L-5. *Chalinula saudiensis* 132
L-6. *Geodia* sp. 133
L-7. *Axinyssa djiferi* 134
L-8. *Trikentrion laeve* 135
L-9. *Aaptos papillata* 136

M- Etudes de deux terpènes de *Myrmekioderma dendyi* 137
M-1 - Extraction et isolement des terpènes
M-2. Caractérisation structurale de la fraction D5-4
M-3. Caractérisation structurale de la fraction D5-3

M-4. mécanismes de fragmentation des composés D5-3 et D5-4

M-5 - Evaluation neuroactive de deux terpènes

PARTIE EXPERIMENTALE

N - Collecte et description des éponges 146

N-1. Collectes des éponges 146

N-1.1. L'éponge du Pacifique sud : *Myrmekioderma dendyi*

N-1.2. Les éponges de mer Rouge

N-1.2.1. *Stylissa carteri*

N-1.2.2. *Chalinula saudiensis*

N-1.2.3. *Cinachyrella* sp.

N-1.3. Les éponges de l'Atlantique

N-1.3.1. *Geodia* sp.

N-1.3.2. *Axinyssa djiferi*

N-1.3.3. *Trikentrion laeve*

N-1,4. L'éponge de Méditerranée : *Aaptos papillata*

N-2. Description et identification des éponges 147

N-2,1. Méthode générale d'identification de l'éponge

N2,2. Description et identification des éponges collectées

O- Etude expérimentale de la composition chimique des éponges 148

O-1. Extraction des lipides totaux

O-2. Séparation des lipides en classes

O-3. Séparation de chaque classe de lipides

O-4. Techniques d'analyse et d'élucidation structurale

O-4.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

O-4.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

O-5. Etude chimique des acides gras des phospholipides

O-5.1. Acides gras des phospholipides

O-5.1.1. Préparation et conditions CPG/SM des EMAG

O-5.1.2. Préparation et conditions CPG/SM des NAP

O-5.2 Etude des stérols

O-5.2.1. Acétylation et conditions CPG/SM pour les stérols

O-6. Etude des terpènes de *Myrmekioderma dendyi* 152

O-6.1. Analyse par CCM des fractions dichlorométhane

O-6.2. Conditions de la séparation par CLHP

O-6.3. Spectrométrie de masse à impact électronique (SMIE)
O-6.4. Spectrométrie de masse à haute Résolution (SMHR)
O-6.5. Analyse des terpènes par infra-rouge
O-6.6. Analyse par RMN
O-6.7. Détermination du pouvoir rotatoire
P -Tests d'activité neurotoxique sur larves de diptères 154

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 155

BIBLIOGRAPHIE 157

Tome 2

SOMMAIRE

Sites et dates des récoltes 1
Répartition des phospholipides en classes 2

Acides gras des phospholipides
Myrmekodierma dendyi

Courant ionique (C.I.) total 70 eV des esters méthyliques des acides gras (EMAG) 3
Spectres de masse (SM) des EMAG *iso*-, *anteiso*- et n-15:0 4
SM des EMAG n-21:0 et n-23:0 5
C.I. *m/z* 113 des *N*-acyl pyrrolidides (NAP) 6
Début du chromatogramme des NAP et SM pour l'*iso*-14:0 7
Identification du 4,8,12-Me_3-13:0 (spectres EMAG et NAP) 8
Spectres de masse(SM) des NAP *iso*-, *anteiso*- et n-15:0 9
Identification du 10,13-Me_2-14:0 (spectres EMAG et NAP) 10
Identification du 10-Me-16:0 (spectres EMAG et NAP) 11
SM du 13,14-Me_2-16:0 (NAP) et du 8,8-Me_2-16:0 (spectres EMAG et NAP) 12
SM du 8-Me-18:0 (NAP) et du 16-Me-20:0 (NAP) 13
SM du 10,16-Me_2-18:0 (NAP) et du 13-Me-22:0 (NAP) 14
SM du 17-Me-24:0 (NAP) et du 21-Me-24:0 (NAP) 15
SM du mélange 22-Me-29:0 et n-Δ5,9-29:2 (NAP) 16
Identification du *iso*-Δ10-17:1 (spectres EMAG et NAP) 17

SM des Δ11-17:1 et Δ11-18:1 (NAP) 18
Identification du *iso*-Δ5,9-17:2 (spectres EMAG et NAP) 19
Identification du *iso*-Δ5,9-18:2 (spectres EMAG et NAP) 20
SM du *iso*-Δ5,9-26:2 (NAP) 21
SM du *iso*-Δ5,9-27:2 (NAP)..... 22
SM du *iso*-Δ5,9-28:2 (EMAG et NAP) 23
SM d'un 5,9,x-29:3 en mélange avec un br-30:0 (EMAG) 24
SM des 4 isomères EMAG 5,9-29:2 25
SM du 25-Me-5,9-28:2 (NAP) 26
SM des *iso*-5,9-29 :2 et *anteiso*-5,9-29 :2 (NAP) 27

Stylissa carteri

C. I. *m/z* 113 des AG (NAP) *S. carteri* de Djeddah-1998 28
C. I. *m/z* 113 (CPG/SM) des NAP (*S. carteri* : Djeddah-2000 et Djibouti-1996) 29
Agrandissements du C.I. *m/z* 113 des NAP de *S. carteri* de Djeddah-1998 30
Extrait terminal du C. I. des EMAG (*S. carteri*, Djeddah-2000) - SM du n-26:0 (EMAG) ... 31
SM de l'acide phytanique, EM et NAP 32
SM des NAP des acides 11,14-Me_2-13-15:1 et 15-21:1 33
SM de l'acide 17-Me-16-22:1 (EM et NAP) 34
SM de l'acide 17-23:1 (EMAG et NAP) 35
SM de l'acide 17-24:1 (NAP) 36
SM de deux AG 24:1 et d'un AG 25:1 (EMAG) 37
SM de l'acide 5-25:1 (NAP) 37
SM (NAP) de l'acide 5-25:1 et du mélange 5-25:1 + 5,18-25:2 (hypoth.) 38
SM de l'acide 9-26:1 (NAP) 39
SM de l'acide 11,15-20:2 (EMAG et NAP) 40
SM du 5,9-24:2 (NAP) 41
SM du 5,9-26:2 42
SM d'isomères 20:3 et standard (EMAG) 43
SM de l'acide 5,9,12-26:3 (EMAG et NAP) 44
SM de l'acide arachidonique 20:4 (n-6) (EMAG et NAP) 45
SM du 2-OMe-16:0 + standard (EMAG) 46
C. I. *m/z* 129 des 2-hydroxyacides α-OH-24:0 et α-OH-25:0 47
SM du 2-OH-22:0 (EMAG et NAP) 48

SM du 2-OH-24:0 (EMAG et NAP) 49
SM du 2-OH-25:0 (EMAG et NAP) 50
SM du 2- OH-26:0 (EMAG et NAP) 51

Chalinula saudiensis

C. I. *m/z* 74 des EMAG 52
C. I. *m/z* 113 des NAP 53
SM du 7-Me-6-16:1 (NAP) 54
SM de l'acide 10,13,16-triméthylheptadéc-11-ynoïque (NAP) 55
SM des 16-26:1 et 19-26:1 (EMAG) 56
SM des 16-26:1 et 19-26:1 (NAP) 57
SM du 5,9-29:2 (EMAG) 58
SM du 6-Br-5,9-28:2 (EMAG et NAP) 59
SM du 22:6 (n-3) ou DHA (NAP) 60

Cinachyrella* cf. *alloclada* et *Cinachyrella* cf. *kükenthali

Courant ionique *m/z* 113 des NAP de *Cinachyrella* cf. *alloclada* 61
Courant ionique *m/z* 113 des NAP de *C.* cf. *kükenthali* 62
Courant ionique *m/z* 113 de *C.* cf. *alloclada* (partie terminale : NAP à longues chaînes) 63
Spectres de masse des AG ramifiés 18-méthylés (NAP) 64
Spectre de masse du 18,24-Me2-26:0 (NAP) 65
Spectres de masse du *iso*-9-17:1 (NAP) 66
Spectre de masse du 5,9-18:2 (NAP) 67
Spectre de masse du 6-Br-5,9-27:2 (NAP) 68
Spectre de masse du 6-Br-5,9-28:2 (EMAG) 69

***Geodia* sp.**

Courant ionique *m/z* 113 des NAP de *Geodia* sp. 70
Spectres de masse des AG ramifiés 9-Me-16:0 et 11-Me-18:0 (NAP) 71
Spectres de masse des AG ramifiés 3-Me-15:0 et 3-Me-14:0 (EMAG) 72
Spectre de masse de l'AG ramifié *ai*-Δ4-15:1 (NAP) 73
Spectres de masses de l'AG ramifié 9-Me-5-18:1 (NAP) 74
Spectres de masses de l'AG Δ5,9-16:2 (NAP) 75

Axinyssa djiferi

Courant ionique *m/z* 113 des NAP d'*Axinyssa djiferi* 76
Extrait du courant ionique *m/z* 113 des NAP d'*Axinyssa djiferi* (25 – 45 mn.) 77
Spectres de masse des acides 16-23:1 et 10,15-18:2 (NAP) 78
Spectre de masse du mélange 4-25:1 et 4,18-25:2 (NAP) 79
Spectres de masse de l'acide démospongique 5,9,19-26:3 (NAP) 80

Trikentrion laeve

Courant ionique *m/z* 113 des NAP de *Trikentrion laeve* 81
Spectres de masse des AG 8-18:1 et 8,13-18:2 (NAP) 82
Spectre de masse de l'acide démospongique 5,9,23-30:3 (NAP) 83
Spectre de masse de l'acide démospongique 5,9,23-30:3 (EMAG) 84

Aaptos papillata

Courant ionique total pour les EMAG d'*Aaptos papillata* (6 - 30 mn.) 85
Courant ionique total pour les EMAG d'*Aaptos papillata* (30 – 50 mn.) 86
Spectre de masse du 4,17-26:2 (NAP) 87
Spectre de masse du 5-27:1 (NAP) 88
Spectre de masse de l'acide démospongique 5,9,19-28:3 (NAP) 89
Spectre de masse de l'acide démospongique 5,9,19-28:3 (EMAG) 90

Stérols

Myrmekioderma dendyi

Chromatogreamme du mélange des stérols acétylés 91
Spectre du 24ξ-*nor*-cholesta-5,22-dièn-3β-ol (acétate) 92
SM des 22(*E*) et 22(*Z*)-déhydrocholestérols 93
SM du cholestérol (libre et acétylé) 94
SM du cholestanol (libre et acétylé) 95
SM du Δ5-C27:2 96
SM du crinostérol/brassicastérol (libre et acétylé) 97
SM de l'acétate du 24-méthylène cholestérol 98
SM du campestérol/22-dihydrobrassicastérol (libre et acétylé) 99
SM du stigmastérol/poriférastérol (libre et acétylé) 100
SM du sitostérol/clionastérol (libre et acétylé) 101
SM des acétates des fucostérol/isofucostérol et 29-Me-fucostérol/29-Me-isofucostérol 102

Stylissa carteri

Chromatogramme du mélange des acétates de stérols 103
SM de 3 *nor*-A stérols 104
SM du 3β-hydroxyméthyl-*nor*-A-5α-cholest-15-ène (libre et acétylé) 105
SM du 3β-hydroxyméthyl-*nor*-A-5α-cholestane (libre et acétylé) 106
SM du 3β-hydroxyméthyl-24ξ-méthyl-*nor*-A-5α-cholest-22-ène (libre et acétylé) 107
SM du 3β–hydroxyméthyl-24ξ-éthyl-*nor*-A-5α-cholest-22-ène (libre et acétylé) 108
SM du 3β-hydroxyméthyl-24ξ-méthyl-*nor*-A-5α-cholestane 109
SM du 3β-hydroxyméthyl-24ξ-éthyl-*nor*-A-5α-cholestane (libre et acétylé) 110
SM du 3β-hydroxyméthyl-*nor*-A-5α-gorgostane (libre et acétylé) 111
Chromatogramme des acétates des stérols conventionnels…….112
SM de l'acétate de l'occélastérol……113
SM du 24-éthylcholestanol…….114

Aaptos papillata

SM d'un *nor*-A-stérol libre non déterminé…….115
SM du 3a-hydroxyméthylcholest-7-ène……..116

Terpènes de *Myrmekioderma dendyi*

Spectres IR des fractions D5-3 et D5-4 117
SM (impact électronique) des fractions D5-3 et D5-4 118
Spectres de RMN ^{13}C des fractions D5-3 et D5-4 119
Spectres de RMN ^{1}H des fractions D5-3 et D5-4 120
SM haute résolution des fractions D5-3 et D5-4 121
Spectres de RMN bidimensionnels des fractions D5-3 et D5-4……122

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide arachidonique
ac. : Acide
AG : Acide gras
AGI : Acides gras insaturés
AGPI : Acide gras polyinsaturé
AGS : Acides gras saturés
CCM : Chromatographie sur couche mince
CCMHP : Chromatographie sur couche mince haute performance
CCMp : Chromatographie sur couche mince préparative
CI_{50} : Concentration inhibitrice à 50 %
C.L. : Chaîne latérale
CLHP : Chromatographie liquide à haute performance
CPG : Chromatographie en phase gazeuse
CPG/IR : Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'infrarouge
CPG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
DEPT : Distortionless enhancement polarization transfer
DHA : Acide (4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*,19*Z*)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexènoïque
diPG : Diphosphatidylglycérol
d.l. : Double liaison
DMAPP : Diméthylallyle diphosphate
DMSO : Diméthylsulfoxide
DXP ou DOXP : Déoxy-D-xylulose-5-phosphate
EMAG : Esters méthyliques des acides gras
EPA : Acide eicosapentaènoïque
EV : Electron Volt
GSL : Glycosphingolipide
VIH ou HIV : Virus de l'Immunodéficience Humaine
HMQC : Heteronuclear multiple quantum correlated transfer
IPP : isopenténylе
IR : Infrarouge
LCE : Longueur de chaîne équivalente
lyso-PC : Lysophosphatidylcholine
MEP : 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate
NAP : *N*-Acyl pyrrolidide
NMI : Non-methylene-interrupted
NMID : Non-methylene interrupted diene
PA : Acide phosphatidique
PC : Phosphatidylcholine
PE : Phosphatidyléthanolamine
PI : Phosphatidylinositol
PG : Phosphatidylglycérol
PS : Phosphatidylsérine
Rf : Rapport frontal
RMN : Résonance magnétique nucléaire
SAM : *S*-adénosylméthionine
SM : Spectrométrie de masse

SMAB : Substances marines à activités biologiques
SMIC : Spectrométrie de masse par ionisation chimique
SMIE : Spectrométrie de masse à impact électronique
SMHR : Spectrométrie de masse à haute résolution
CIT ou TIC : Courant ionique total
TMS : Tétraméthylsilane
TMTD : Triméthyltridécanoïque
TOF : Analyseur à temps de vol
T_R : Temps de rétention
T_{RR} : Temps de rétention relatif
uma : Unité de masse atomique
UV : Ultraviolet

Liste des Figures

Figure 1. Chambres choanocytaires de l'espèce de mer Rouge *Chalinula saudiensis* 2

Figure 2. Matrice de Litchfield pour l'ensemble des organismes vivants, sans les éponges 5

Figure 3. Matrice de Litchfield pour les éponges 6

Figure 4. Schéma général d'une membrane cellulaire 46

Figure 5. Droite et équation de régression linéaire des EMAG saturés normaux pour l'espèce *Stylissa carteri* récoltée à Djeddah 54

Figure 6. Courant ionique total (CIT) des EMAG 55

Figure 7. Droite et équation de régression linéaire des EMAG saturés *iso*, *anteiso*, et normaux de *Stylissa carteri* 56

Figure 8. Droite et équation de régression linéaire des EMAG Δ5,9 saturés normaux et hydroxylés de *Stylissa carteri* 57

Figure 9. Droite et équation de régression linéaire des NAP d'acides saturés normaux de *Stylissa carteri* 58

Figure 10. Réarrangement de Mac Lafferty pour les EMAG 60

Figure 11. Ions-fragments homologues des EMAG 61

Figure 12. Ions-fragments *m/z* = 74 et *m/z* = 87 62

Figure 13. Ions-fragments homologues des *N*-acylpyrrolidides 62

Figure 14. Réarrangement de Mac Lafferty pour les NAP et obtention de l'ion-fragment *m/z* 154 63

Figure 15. Analyse par CCM des fractions dichlorométhane de *Stylissa carteri* 118

Figure 16. Coupure C_{22}/C_{23} selon Mac Lafferty 121

Figure 17. Clivage caractéristique de la Δ15 des noyaux stéroliques montrant la formation du fragment *m/z* 206 124

Figure 18. Formation de l'ion *m/z* 358 par coupure C_{22}/C_{23} , à partir de M^+.....127

Figure 19. Spectre de masse de l'acétate de gorgostéryle 131

Figure 20. Principales étapes de la biosynthèse du gorgostérol 131

Figure 21. Plaque CCM des fractions terpéniques 138

Figure 22. Chromatogramme des deux terpènes de *Myrmekioderma dendyi* 139

Figure 23. Allure du chromatogramme CLHP de la fraction D5 140

Figure 24. Fragmentations des fractions D5-3 et D5-4, sous impact électronique à 70 eV.....144

Figure 25. Coupure de type radicalaire de la 2-hydroxyturménone (D5-4)..... 144

Liste des Planches

Planche 1. Acides isoprénoïques isolés d'éponges .....……8

Planche 2. Allongements et désaturations successives pour les acides gras de *Jaspis stellifera* ..... ……...24

Planche 3. Biosynthèse des acides démospongiques par allongements et désaturations des chaînes chez *Microciona prolifera* et *Aplysina fistularis* ..... ……...24

Planche 4. Hypothèses biosynthétiques pour la formation des acides gras bromés des phospholipides dans les éponges *Agelas* sp. et *Petrosia* sp. .....……...24

Planche 5. Biosynthèse des acides 5,9,19-hexacosatriénoïque, 5,9,21-octacosa-triénoïque, 5,9,23-octacosatriénoïque, 5,9,23-triacontatriénoïque dans les éponges *Trikentrion loeve, Chondrilla nucula* et *Aplysina fistularis* .....……..25

Planche 6. Hypothèses biosynthétiques pour la formation des acides di-, tri- et tétra-ènoïques de l'éponge *Haliclona cinerea* de la mer Noire .....……..25

Planche 7. Biosynthèse de l'acide 4,8,12-triméthyltridécanoïque de l'éponge *Pseudaxinyssa* sp. à partir du phytol .....……...26

Planche 8. Principaux stérols conventionnels rencontrés dans les Démosponges .....…….29

Planche 9. *nor*-19 stanols d'*Axinella polypoides* .....……..30

Planche 10. Exemples de *nor*-A stanols et stérols .....……...31

Planche 11. Biosynthèse du *nor*-19 cholestanol par *Axinella polypoides* .....……...32

Planche 12 . Biosynthèse des *nor*-A stanols et Δ15-*nor*-A stérols .....……...32

Planche 13. Exemples de stérols Δ7 et Δ5,7 isolés d'éponges .....……..33

Planche 14. Biosynthèses des 7-déhydro et 5,7-didéhydrostérols chez les holothuries ... 33

Planche 15. Deux voies possibles de conversion du desmostérol (cholesta-5,24-dièn-3β-ol) en 24(*E*)-propylidènecholestérol (SAM) .....…….....33

Planche 16. Désalkylation des chaînes latérales : biosynthèse des *nor*-ergostanes (C_{27}) et des 24-*nor* stérols (C_{26}) à partir de stérols conventionnels .....……..... 34

Planche 17. Les deux voies connues de biosynthèse des terpènes .....…….36

Planche 18. Exemples de raspacionines .....…….43

Planche 19. Exemples d'alcaloïdes isolés d'éponges du genre *Trikentrion* .....…….....45

Planche 20. Schéma général de fractionnement des lipides .....…….....49

Planche 21. Position taxonomique de l'espèce *Myrmekioderma dendyi* .....……..67

Planche 22. Position taxonomique de l'espèce *Stylissa carteri* .....……68

Planche 23. Position taxonomique des espèces *Cinachyrella alloclada* et *C. kükenthali* .....……69

Planche 24. Position taxonomique de l'espèce *Chalinula saudiensis* .....……70

Planche 25. Position taxonomique de l'espèce *Geodia* sp. .....……71
Planche 26. Position taxonomique de l'espèce *Axinyssa djiferi* .....……..72
Planche 27. Position taxonomique de l'espèce *Trikentrion laeve* .....……..73
Planche 28. Position taxonomique de l'espèce *Aaptos papillatus* (synonyme *papillata*)……..74

Liste des Tableaux

Tableau 1. Rappels sur la nomenclature des acides gras 4
Tableau 2. Exemples de répartitions des principales classes de phospholipides (%) 7
Tableau 3. Acides gras monoinsaturés de quelques Démosponges 9
Tableau 4. Exemples d'acides gras Δ5,9 des phospholipides d'éponges jusqu'à 1992 3
Tableau 5. Exemples d'acides gras Δ5,9 des phospholipides d'éponges et autres organismes marins depuis 1993 14
Tableau 6. Exemples d'acides gras n-3 18
Tableau 7. Exemples d'acides gras n-4 18
Tableau 8. Exemple d'acide gras n-5 18
Tableau 9. Exemples d'acides gras n-6 18
Tableau 10. Exemple d'acide gras n-7 19
Tableau 11. Exemples d'acides gras di et polyinsaturés non maloniques 19
Tableau 12. Présence d'acides 2-*O* substitués dans les démosponges 20
Tableau 13. Exemples d'acides 2-hydroxylés des phospholipides des éponges 21
Tableau 14. Principaux acides 2-méthoxylés des éponges 22
Tableau 15. 2-Acétoxyacides de *Polymastia gleneni* 23
Tableau 16. Variations des structures de glycérophospholipides selon le groupement R 52
Tableau 17. Temps de rétention des EMAG saturés normaux en fonction du nombre de carbones 54
Tableau 18. Longueurs de chaînes équivalentes calculées à partir de l'équation de droite de régression linéaire des EMAG de *Stylissa carteri* (Djeddah) 55
Tableau 19. Longueur de chaîne équivalente calculées à partir de l'équation de la droite de régression linéaire des NAP de *Stylissa carteri* (Djeddah) 58
Tableau 20. Clés d'interprétation des spectres de masses des EMAG 61
Tableau 21. Clés d'interprétation des spectres de masses des NAP 62
Tableau 22. Détermination du nombre de carbones et du nombre d'insaturations à partir des masses moléculaires (*m/z* = M) des stérols libres 64
Tableau 23. Détermination des nombres des insaturations et les nombres des carbones correspondants à partir des pics moléculaires $(M\text{-}AcOH)^+$ des acétates de stérols D^5 64
Tableau 24. Détermination des nombres des insaturations et les nombres des carbones correspondants à partir des masses moléculaires (*m/z* = M) des acétates de stérols autres que Δ^5 64
Tableau 25. Quelques pics de base des stérols 65

Tableau 26. Quelques pics de base des *nor*-A-stérols ..... ……..65
Tableau 27. Ions caractéristiques des stérols et *nor*-A stérols libres et acétylés ..... ……..66
Tableau 28. Teneurs en lipides des éponges étudiées ..... …….75
Tableau 29. Composition des lipides totaux des éponges étudiées ..... ……..75
Tableau 30. Répartition des phospholipides en classes pour les éponges étudiées .....…… 76
Tableau 31. Composition en acides gras des phospholipides de *Myrmekioderma dendyi* ... ……..78
Tableau 32. Composition en acides gras des phospholipides de *Stylissa carteri* ..... ……..88
Tableau 33. Distribution des acides gras (%) des phospholipides de *Stylissa carteri* ..... …….90
Tableau 34. Composition en acides gras des phospholipides de *Chalinula saudiensis* ..... ……..99
Tableau 35. Distribution (%) des acides gras des phospholipides de *Chalinula saudiensis* . ……..99
Tableau 36. Composition en acides gras des phospholipides de *Cinachyrella* cf. *alloclada* et *C.* cf. *kükentali* ..... ……..103
Tableau 37. Composition en acides gras des phospholipides de *Geodia* sp. ..... …….107
Tableau 38. Composition en acides gras des phospholipides d'*Axinyssa djiferi* ..... …….111
Tableau 39. Composition en acides gras des phospholipides de *Trikentrion laeve* .....…….... 114
Tableau 40. Composition en acides gras des phospholipides d'*Aaptos papillata* .....……. 117
Tableau 41. Composition en stérols de *Myrmekioderma dendyi* .....……... 119
Tableau 42. Composition en *nor*-A-stérols de *Stylissa carteri* ..... …….123
Tableau 43. Principaux ions-fragments des *nor*-A-stérols $\Delta^{5,22}$ libres et acétylés ..... ……..126
Tableau 44. Composition en stérols conventionnels de *Stylissa carteri* .....……... 128
Tableau 45. Composition en stérols de *Cinachyrella alloclada* et *C. kükenthali* ..... …….129
Tableau 46. Composition en stérols de *Chalinula saudiensis* .....…… 132
Tableau 47. Les différentes fragmentations des acétates des stérols $\Delta^{5,24(28)}$ ..... …….133
Tableau 48. Principales fragmentations des acétates de stérols $\Delta^{5,22}$..... ……..133
Tableau 49. Composition en stérols de *Geodia* sp. .....…….. 134
Tableau 50. Composition en stérols d'*Axinyssa djiferi* ..... …….135
Tableau 51. Composition en stérols de *Trikentrion laeve* ..... ……136
Tableau 52. Composition en stérols d'*Aaptos papillata* .....……... 136
Tableau 53. Quantités de fractions éluées à l'hexane et au dichlorométhane ..... …….138
Tableau 54. RMN ^{13}C et DEPT 135 à 75 MHz dans $CDCl_3$ .....……141
Tableau 55. RMN ^{1}H (300 MHz) dans $CDCl_3$ ..... …….141
Tableau 56. RMN ^{13}C et DEPT 135 à 75 MHz dans $CDCl_3$ .....……142
Tableau 57. RMN ^{1}H (300 MHz) dans $CDCl_3$ .....……143
Tableau 58. Variation des solvants d'élution et du révélateur en fonction des composés

étudiés ..... …….150

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

A - Les Eponges[1]

A-1. Généralités sur le phylum des spongiaires

Les éponges sont les métazoaires les plus primitifs[2], sans véritables tissus cellulaires ni organes, généralement sans symétrie ou, dans certains cas, avec une symétrie radiale. Ce sont des animaux exclusivement aquatiques, le plus souvent marins, vivant à toutes les profondeurs, du niveau des rivages aux fosses abyssales. Si les formes larvaires sont pélagiques, toutes les éponges adultes sont sessiles (fixées à vie sur un substrat). Il existe plusieurs modes de reproduction des éponges qui sont utilisés comme critères de classification. Les éponges sont considérées comme des individus et non comme des colonies associant plusieurs individus, comme c'est le cas pour les Cnidaires et les Ascidies.

Les éponges se nourrissent en filtrant de manière continue de grandes quantités d'eau de mer d'où elles puisent l'oxygène nécessaire à leur respiration et les nutriments indispensables à leur croissance et à leur métabolisme, et qui permettent l'élimination de leurs déchets. La prise de nourriture, la digestion et l'élimination des déchets s'effectuent à l'intérieur des cellules et non dans une cavité centrale comme c'est le cas pour tous les autres organismes animaux. D'une manière générale, une éponge filtre son propre volume d'eau de mer en moins d'une minute et certaines espèces filtrent jusqu'à 1700 litres d'eau par jour (Vacelet, *in* Grassé, 1973, pp. 512-513). Cette activité de filtration est due à la présence de cellules flagellées caractéristiques des éponges et appelées choanocytes (Figure 1). Ces choanocytes tapissent les parois de minuscules cavités, les chambres choanocytaires (Figure 1), dont le nombre varie de 7000 à 18000 par millimètre cube, chacune de ces cavités filtrant chaque jour environ 1200 fois son propre volume (!).

L'absence d'organes est compensée par la présence de cellules totipotentes, capables d'exercer des fonctions différentes à différents moments de la vie de l'éponge (sécrétion du squelette, reproduction…). Les cellules de la paroi extérieure (exopinacocytes et exopinacoderme ou ectosome) et de la paroi intérieure (endopinacocytes et endopinacoderme, ou choanosome) sont séparées par une « couche » intermédiaire, le mésohyle, dont l'épaisseur est variable mais qui contient toujours des cellules mobiles et des éléments du squelette, l'ensemble étant noyé dans du collagène (Lévi *in* Grassé, 1973, pp. 577-631 ; De Vos *et al*., 1991). Le « squelette » des éponges est constitué d'éléments minéraux (silice et/ou carbonate de calcium) et d'éléments organiques (fibres de nature protéique constituées de spongine). Toutefois, la présence d'éléments minéraux n'est pas systématique, certaines éponges ne contenant que des fibres de spongine et quelques autres étant complètement dépourvues de squelette.

---

[1] Cette introduction reprend en partie les données biologiques et taxonomiques des publications de Hooper, 2000 et de Hooper & Van Soest, 2002.

[2] Les éponges les plus anciennes connues sont attestées du Cambrien inférieur, environ 550 millions d'années, et sont responsables de la formation des premiers « récifs », donc avant les récifs coralliens. La plupart des genres et des espèces actuelles datent du Crétacé, environ 150 millions d'années.

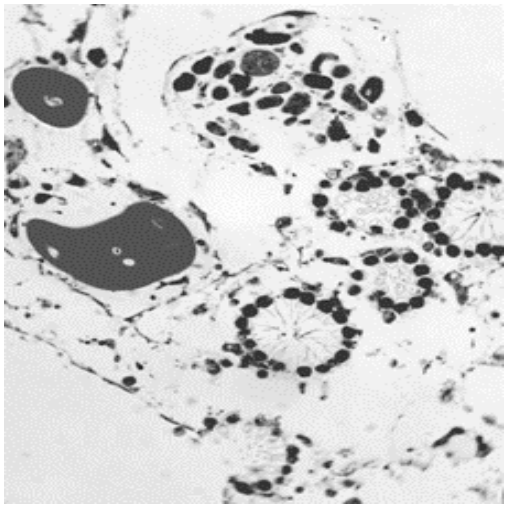


Figure 1. Chambres choanocytaires de l'espèce de mer Rouge *Chalinula saudiensis* (Vacelet *et al*., 2001)

Quelques éponges, en particulier celles qui sont fixées sur des coraux, vivent en symbiose avec des cyanobactéries. Ces symbioses sont uniques et caractéristiques des éponges car de telles symbioses n'existent pour aucun autre animal. En supplément des nutriments récupérés par l'activité de filtration, les cyanobactéries apportent à l'éponge les produits de la photosynthèse que cette dernière est incapable de mettre en oeuvre. Ces substances supplémentaires favorisent la croissance de l'éponge et lui assurent les moyens de vivre en compétition avec les autres organismes du système corallien.

L'activité de filtration des éponges permet également à l'éponge d'éliminer ou de transformer, pour les réutiliser à son profit, les substances toxiques produites par les autres organismes vivant à proximité, comme des microorganismes, des algues, des Cnidaires. Plusieurs de ces substances, modifiées par l'éponge, sont elles-mêmes toxiques pour d'autres organismes prédateurs (mollusques, crustacés, poissons), ainsi que pour l'homme. Cependant, les activités biologiques peuvent être mises à profit pour une finalité thérapeutique (anti-inflammatoires, antibactériens, antitumoraux, antiviraux…). La littérature sur les applications pharmacologiques et biomédicales des organismes marins en général et des éponges en particulier est très abondante, surtout depuis les années 1990 (Bongiorni & Pietra, 1996 ; König & Wright, 1996 ; Dumdei *et al*., 1998 ; Kerr & Kerr, 1999 ; El Sayed *et al.*, 2000 ; Blunden, 2001 ; Mayer & Hammann, 2002 ; Biard, 2004 ; Kornprobst, 2005 ; Bourguet-Kondracki & Kornprobst, 2005).

Les éponges sont immobiles et dépourvues de défense mécanique, à l'exception de la présence de spicules minéraux, et ont donc développé des moyens de défense chimique contre les prédateurs, et pour limiter ou empêcher la formation des épibioses. La présence fréquente de petits animaux (crustacés, vers, échinodermes) vivant à l'intérieur des éponges pourrait également contribuer à sa défense contre les agressions bactériennes.

Le nombre d'espèces d'éponges fait encore l'objet de controverses, de 5000 (Brusca & Brusca, 2002) à 10000 (Lecointre & Le Guyader, 2001), le chiffre moyen de 7000 correspond aux espèces « valides » (Hooper, 2000).

A-2. Eléments du squelette et bases de la classification des éponges

La classification des éponges a subi de profonds remaniements au cours des trente dernières années dont les principales modifications, et avec prise en compte globale, ont été apportées successivement par Lévi, 1973, Bergquist, 1978 et Hooper & Van Soest, 2002. Cette classification repose essentiellement sur deux types de critères : le mode de reproduction d'une part (éponges ovipares ou vivipares) et les éléments du squelette d'autre part (nature, morphologie, et arrangement spatial des spicules et/ou fibres de spongine).

Nous nous limiterons aux aspects les plus généraux de la dernière classification de Hooper & Van Soest, 2002, intitulée *Systema Porifera* et qui constitue la référence actuelle en la matière.

Le phylum des spongiaires comprend trois classes :

* Les éponges calcaires, ou Calcarea, dont les spicules minéraux ne sont constitués que de calcaire.

* Les éponges Hexactinellides, ou Hexactinellida, dont les spicules de silice ont une symétrie 6.

* Les Démosponges, ou Demospongiae, dont le squelette est constitué de spicules de silice de symétrie 4 et/ou de fibres de spongine. Cette classe des Démosponges regroupe de 80 à 95 % des éponges actuelles. Sa définition est la suivante (Hooper & Van Soest, 2002).

« Demospongiae Sollas, 1885 - *Eponges dotées d'un squelette composé de spicules siliceux et/ou fibreux, ou occasionnellement dépourvues de squelette. Les spicules peuvent être monaxones (monactines ou diactines) ou tétraxones (tétractines), jamais triactines. Le filament axial est encastré dans une cavité triangulaire ou hexagonale.* »

Dans *Systema Porifera*, les références aux modes de reproduction des Démosponges et leurs conséquences sur la répartition en sous-classes restent d'actualité mais ne sont plus considérées comme de véritables critères. Les mentions de ces sous-classes qui ont été très utilisées à partir de 1973 (Lévi) tendent à disparaître des publications mais il est utile d'en rappeler les principaux aspects.

* Sous-classe des Homoscleromorpha. Eponges vivipares avec spicules siliceux sans différences de tailles, de l'ordre de 100 μm.

* Sous-classe des Tetractinomorpha. Eponges majoritairement ovipares. Les spicules siliceux comprennent des mégasclères monaxones et tétraxones et des microsclères exclusivement de type aster. Le squelette est majoritairement de type radial.

* Sous-classe des Ceractinomorpha. Éponges majoritairement vivipares avec un squelette composé de spicules, tétraxones et les microsclères ne sont jamais de type aster.

B - Les phospholipides

B-1. Rappels sur la nomenclature des acides gras

Les acides gras (AG) des phospholipides des éponges sont en général composés de plusieurs types d'acides gras et il faut pouvoir les nommer et en décrire la structure de manière simple et compréhensible.

1. Conformément à la réglementation internationale, la position de la première double liaison (d.l.) est indiquée par la notation **(n-x)**, en comptant **x** à partir du méthyle terminal (la chaîne acyle possède **n** carbones).

Par exemple : 18:4 (n-3) identifie un AG avec 18 atomes de carbone et 4 d.l., la première étant située après le 3ème carbone. Une autre notation, très prisée par les biochimistes, remplace (n-3) par ω3 : on notera ainsi 18:4 ω3 ce même AG. C'est la notation largement adoptée par les nutritionnistes et qui s'est souvent répandue jusque dans la population. Cette nomenclature est en premier lieu utilisée par les biochimistes et les physiologistes qui ont affaire le plus souvent à des acides gras polyinsaturés classiques et intégrés dans ces séries.

2. Une nomenclature alternative localise les doubles liaisons (d.l.) à partir du carbone C-1 (groupe carboxyle) fonctionnel, ainsi 18:4(n-3) est désigné par Δ6,9,12,15,18-18:4 (le delta est souvent considéré facultatif). Cette dernière nomenclature est très utilisée pour les AG dont les doubles liaisons ne sont plus séparées par un seul groupe CH_2 (en anglais : non-methylene-interrupted fatty acids ou NMI, tel que le 7,13,17-20:3.

La configuration des d.l., très généralement *cis* (*Z*) dans les composés naturels, doit être précisée dans le cas d'une d.l. *trans* (*E*). La position d'une ramification ("branch" en anglais – dans la quasi totalité des cas un méthyle CH_3 – mais il peut s'agir aussi d'un halogène, un groupe OMe_3 voire OAc…) est indiquée par le numéro du carbone sur lequel elle est fixée. Exemples : acide 10-méthylhexadécanoïque ou 10-Me-16:0, acide 2-hydroxydocosanoïque ou 2-OH-22:0 (ou encore α-OH-22:0), acide 6-bromo-5,9-heptacosadiènoïque ou 6-bromo-5,9-27:2.

Il existe bien sûr une manière usuelle de désigner les AG qui fait référence à l'organisme où il a été identifié pour la première fois et/ou il se trouve particulièrement concentré. Ainsi, l'acide *cis*-5,8,11,14-eicosatétraènoïque est connu sous le nom d'acide arachidonique. Les acides ubiquistes n-14:0, n-16:0 et n-18:0 sont les acides myristique, palmitique et stéarique. Le "n" signifie que la chaîne est "normale" c'est-à-dire linéaire sans ramification.

Quelques autres exemples d'acides gras communs sont répertoriés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Exemples de nomenclature de quelques acides gras communs

Nom usuel	Nom systématique	Désignation
ac. laurique	dodécanoïque	12:0
ac. myristique	tétradécanoïque	14:0
ac. palmitoléïque	hexadéc-9-ènoïque	9-16:1
ac. phytanique	3,7,11,15-tétraméthylhexanoïque	3,7,11,15-Me_4-16:0
ac. linoléïque	octadéca-9,12-diènoïque	9,12-18:2
ac. oléïque	octadéc-9-ènoïque	9-18:1
ac. stéarique	octadécanoïque	18:0
ac. arachidonique	(5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*) icosa-5,8,11,14-tétraènoïque	5,8,11,14-20:4
EPA	eicosapentènoïque (ou icosapentaènoïque)	5,8,11,14,17-20:5
ac. arachidique	icosanoïque (ou eicosanoïque)	20:0
DHA	(4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*,19*Z*)-docosa-4,7,10,13, 16,19-hexaènoïque	4,7,10,13,16,19-22:6
ac. lignocérique	tétracosanoïque	24:0
ac. cérébronique	α-hydroxytétracosanoïque	2-OH-24:0

B-2. Généralités et répartition en classes

Constituants fondamentaux des membranes cellulaires des organismes vivants, les phospholipides sont des dérivés amphiphiles dans lesquels la partie hydrophile est un ester phosphorique et la partie hydrophobe une chaîne grasse.

Les phospholipides d'éponges diffèrent profondément des phospholipides des autres organismes par la présence du mode d'estérification aux positions 1 et 2 du glycérol et par la présence d'acides gras particuliers appelés acides « démospongiques »[3] (Litchfield & Morales,

[3] Depuis les travaux pionniers de Litchfield (1976-1980), des acides « démospongiques » ont été trouvés dans des éponges calcaires comme dans des Hexactinellida, il s'agirait donc plutôt d'acides « spongiques ».

1976). Ce sont des acides à très longues chaînes (de 24 à 34 carbones) et dotés d'insaturations inhabituelles[4], en particulier les systèmes diénique 5,9 et triénique 5,9,x qui sont très fréquents, ainsi que d'éléments structuraux inconnus ou très rares dans les autres phylums comme la présence de brome en position vinylique (C-6), de groupes méthoxy et acétoxy, de ramifications en milieu de chaînes, de triples liaisons, de cyclopropanes, d'acides isopréniques.

Les premiers travaux de Litchfield sur une vingtaine d'espèces, et en particulier *Microciona prolifera*, *Chondrilla nucula* et *Cliona celata*, ont montré la présence constante, et à des pourcentages très élevés (34 à 79% des acides totaux) d'acides polyinsaturés ayant de 24 à 30 atomes de carbones, jusqu'alors inconnus (Litchfield *et al*., 1979, 1980 ; Morales & Litchfield, 1976, 1977). Ces travaux originaux ont conduit Litchfield à proposer un tableau, appelé matrice de Litchfield (Figure 2), organisé de la façon suivante : « Si l'on représente dans une matrice toutes les combinaisons possibles entre les atomes de carbone et les doubles liaisons selon la nomenclature simplifiée, et si l'on introduit dans cette matrice les acides gras trouvés dans les membranes cellulaires des organismes vivants, on observe une répartition régulière de ces derniers (Litchfield & Morales, 1976).

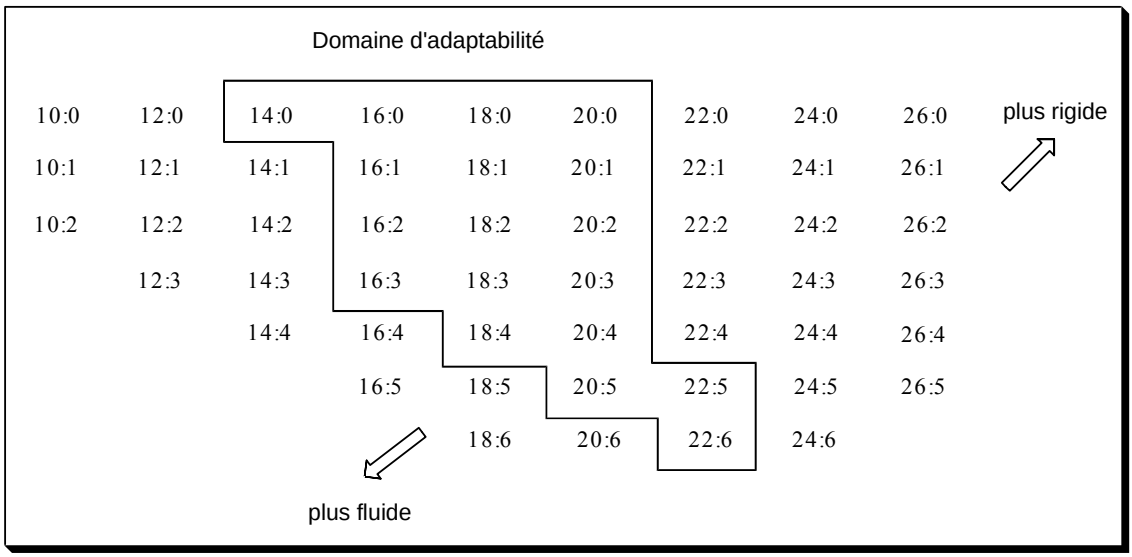


Figure 2. Matrice de Litchfield pour l'ensemble des organismes vivants, sans les éponges

Cette matrice fait apparaître une zone centrale encadrée comprenant les acides gras majoritaires des membranes cellulaires (% > 5). Les acides compris dans cette zone sont corrélés avec les propriétés physico-chimiques de la membrane et cette zone correspond au domaine de meilleure adaptabilité aux variations du milieu environnant. La présence d'acides situés à gauche et vers le bas de cette zone rend la membrane plus « fluide » et celle d'acides situés à droite et vers le haut de la zone centrale augmente la rigidité des membranes. L'intérêt de cette représentation est qu'elle s'applique à l'ensemble des organismes étudiés par Litchfield *et al*. – microorganismes, plantes et animaux, mais pas aux éponges. La matrice de Litchfield pour les éponges, et compte tenu du développement des études dans ce domaine depuis les années 1980, est représentée dans la Figure 3 pour de nombreuses Démosponges et quelques Hexactinellides. Cette nouvelle matrice fait apparaître une nouvelle zone renfermant des acides de 24 à 34 atomes de carbone, valeurs impaires comprises, et pouvant atteindre des pourcentages très élevés, supérieurs à 30 % des acides gras totaux. Ceci étant, beaucoup d'éponges possèdent également des acides « courts » de 14 à 20 carbones et avec des pourcentages supérieurs à 5% mais ils sont rarement majoritaires.

[4] Dans lesquelles les doubles liaisons successives ne sont plus séparées par un méthylène (acides NMI, non-methylene interrupted).

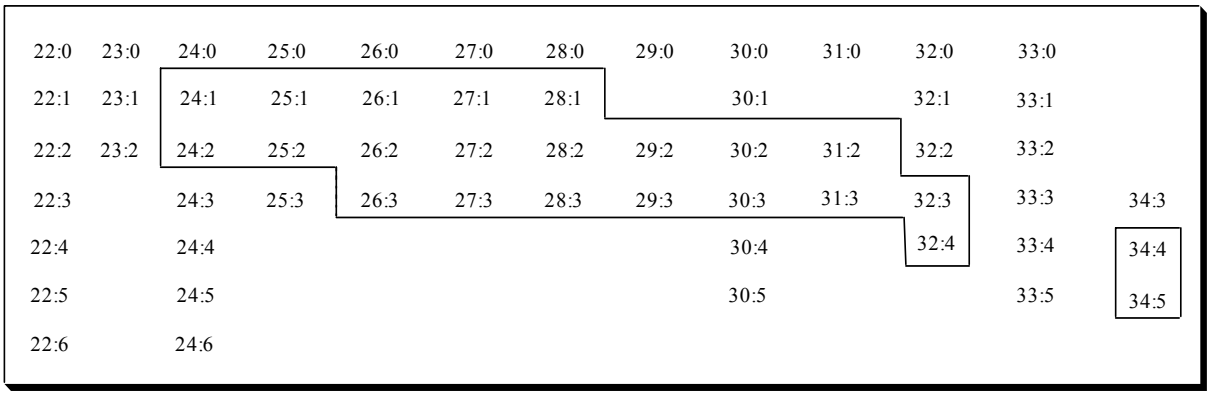


Figure 3. Matrice de Litchield pour les éponges

Bien qu'il y ait peu de travaux faisant état de la répartition des classes de lipides les unes par rapport aux autres, les publications montrent que celles-ci se présentent en général dans l'ordre suivant : % lipides neutres> % glycolipides ~ % phospholipides avec des valeurs moyennes respectives de 55 à 65 %, et de 10 à 30 % de la fraction lipidique totale mais il y a encore trop peu de résultats disponibles pour confirmer une telle distribution.

L'extrait lipidique total est très variable selon les espèces et varie globalement de 0,5 à 10 % du poids sec de l'éponge. Cet effort a été mené sur une dizaine d'éponges (Barnathan, 1993, partie expérimentale). Dans cette évaluation, la fraction acétonique n'est supposée contenir que des glycoconjugués et la fraction méthanolique n'est supposée contenir ni glycolipides ni d'autres composés polaires. Abordée par Litchfield dès 1975, la répartition des phospholipides entre les cinq classes principales (phosphatidylcholine PC, phosphatidyl-glycérol PG, phosphatidylinositol PI, phosphatidyléthanolamine PE, et phosphatidylsérine PS), n'a été étudiée avec précision qu'à partir des années 1980 par l'équipe de Djerassi en séparant les classes par chromatographie sur couche mince préparative (Walkup *et al*., 1981).

Les phospholipides d'éponges présentent une autre caractéristique structurale qui les distingue nettement des autres phospholipides d'animaux. Dans ces derniers, les groupes acyl sur les carbones 1 et 2 du glycérol sont différents : l'acide lié au carbone 1 est saturé et celui lié au carbone 2 est insaturé. Dans les phospholipides d'éponges, les deux acides en 1 et en 2 sont identiques et en général démospongiques. Ces derniers sont par ailleurs répartis de manières différentes à l'intérieur des classes de phospholipides, les acides démospongiques à longues chaînes sont majoritaires dans les classes PC et PS, alors que les acides gras « courts » (de 12 à 18 C) sont surtout présents dans la classe PC (Djerassi & Lam, 1991). Cette répartition varie globalement de 30 à 60 % pour (PE + PS), de 20 à 50 % pour PC et de 5 à 20 % pour PI. Toutefois, des valeurs très élevées, de l'ordre de 60 % en PC et en PI ont été observées au laboratoire pour certaines Démosponges où la teneur en PI est très souvent supérieure à celle de la PE, les pourcentages ayant été déterminés par densitométrie des spots CCM (Genin, 2002). Le Tableau 2 donne quelques exemples de ces pourcentages relatifs des classes de phospholipides, incluant quelques valeurs atypiques.

Tableau 2. Exemples de répartitions des principales classes de phospholipides (%)

Espèces	PE	PG	PC	PS	PI	Références
Aaptos papillata	-	28,6	11,6	-	56,2	Genin, 2002
Stylissa carteri	-	16,0	52,5	6,0	23,2	Genin, 2002
Aplysina fistularis	12,0	15,0	32,0	7,0	14,0	Walkup *et al*., 1981
Axinyssa djiferi	-	3,5	44,5	8,5	12,5	Genin, 2002 (1)

Baicalospongia bacillifera[5]	9,5	-	21,0	10,1	5,7	Dembitsky *et al*., 1993
Baicalospongia intermedia	13,7	-	25,0	9,5	5,2	Dembitsky *et al*., 1993
Callyspongia sp.	-	-	21,6	-	59,5	Genin, 2002 (2)
Cinachyrella alloclada	6,7	12,0	48,0	8,5	17,0	Barnathan *et al*., 2003
Euryspongia rosea	45,0	-	35,0	20,0	-	Carballeira & Maldonado, 1989a
Higginsia tethyoides	31,0	24,0	-	26,0	5,0	Ayanoglu *et al*., 1983a,b
Leucetta sp.	10,0	2,3	46,0	-	17,2	Genin, 2002 (3)
Lubomirskia baicalensis	23,5	-	25,0	5,9	7,1	Dembitsky *et al*., 1994
Microciona prolifera	27,6	-	40,3	10,7	-	Dasgupta *et al*., 1986
Myrmekioderma dendyi	8,2	5,0	54,5	-	24,8	Genin, 2002
Oceanapia sp.	6,0	11,0	56,0	-	24,5	Genin, 2002
Parasperella psila	28,9	31,4	-	25,5	-	Dasgupta *et al*., 1986
Petrosia ficiformis	28,0	14,0	21,0	12,0	7,0	Ayanoglu *et al*., 1982
Ptilocaulis spiculifer	3,0	3,5	56,0	-	37,0	Genin, 2002
Strongylophora durissima	21,0	14,0	21,0	24,0		Dasgupta *et al*., 1984
Suberites sp.	-	6,4	45,5	13,1	35,0	Genin, 2002
Thymosiopsis conglomerans	4,4	-	65,8	-	15,8	Genin, 2002
Trikentrion loeve	28,6	-	7,7	41,6	13,2	Genin, 2002

(1) Cette démosponge du Sénégal contient 23 % de *lyso*-PC ; (2) Cette démosponge du Qatar contient 19 % de *lyso*-PC ; (3) Cette éponge calcaire du Qatar contient 18,2 % de *lyso*-PC.

B-3. Acides gras non fonctionnalisés des phospholipides d'éponges

B-3.1. Acides gras saturés

B-3.1.1. Acides ramifiés

Dans la plupart des éponges étudiées, on trouve des quantités importantes des acides ubiquistes 14:0 (myristique), 16:0 (palmitique) et 18:0 (stéarique), associés à des acides à nombre impair d'atomes de carbone, en particulier les acides 15:0 et 17:0. Dans ce groupe d'acides gras courts, l'acide à chaîne normale se trouve souvent accompagné de ses isomères à chaîne ramifiée en position n-1 (*iso*) et n-2 (*anteiso*). Les acides gras *iso* et *anteiso* 14:0, 16:0 et 18:0 sont plus rares. Ces acides ramifiés *iso* et *anteiso* courts sont connus comme acides typiquement bactériens. Il en est de même de l'acide 10-Me-16:0 plutôt rare dans la nature mais rencontré quelquefois dans les éponges. La présence d'acides courts, ramifiés et impairs, est ainsi considérée comme un indicateur biologique de symbioses bactériennes (Gillan *et al*., 1988).

B-3.1.2. Acides isoprénoïques

Les acides isoprénoïques représentent une autre catégorie d'acides ramifiés et il est admis qu'ils proviennent de la transformation du phytol par l'éponge, celui-ci provenant directement de symbiontes chlorophylliens. Cette hypothèse est confortée par le fait que ces acides n'ont actuellement été isolés que dans des éponges récoltées à moins de 50 mètres de profondeur, donc dans la zone photique, mais toutes les éponges récoltées dans cette zone ne contiennent pas d'acides isoprénoïques. Deux acides sont particulièrement fréquents : l'acide 3,7,11,15-

[5] Les deux orthographes *Baicalospongia* et *Baikalospongia* ont été utilisées bien que le terme correct soit *Baikalospongia* (éponges d'eau douce).

tétraméthylhexadécanoïque (phytanique) et l'acide 4,8,12-triméthyltridécanoïque (4,8,12-TMTD), un homo-sesquiterpène qui pourrait provenir d'une dégradation de l'acide phytanique et qui est fréquent dans les éponges Clionidae (désormais Clionaidae) et Spirastrellidae (Carballeira *et al*., 1989). L'homologue du TMTD, l'acide 5,9,13-triméthyltétradécanoïque, découvert dans les espèces sénégalaises du genre *Cinachyrella* et aussi dans *Cinachyrella* aff. *schulzei* du Pacifique Sud (Barnathan, 1993) pourrait également provenir de l'acide phytanique (Barnathan *et al*., 1992, 1993a ; Barnathan & Kornprobst, 1998). Il en est probablement de même de l'acide farnésanique (3,7,11-triméthyl-dodécanoïque) mais cet acide rarissime ne semble avoir été signalé qu'une seule fois[6], dans l'espèce *Xestospongia muta*, avec une teneur de 3,3 % (Carballeira & Maldonado, 1988). Deux autres acides isoprénoïques très rares ne semblent avoir été isolés qu'une seule fois dans une éponge et dans la nature : le 4,8-diméthyldécanoïque dans *Suberites massa*[7] (0,4%, Barnathan *et al*., 1993b) et surtout le 2,6,10-triméthyltétradécèn-5-oïque qui est le premier exemple connu d'un acide isoprénoïque insaturé isolé d'une éponge. Cet acide a été identifié dans *Aplysina fistularis* (0,7%) (Walkup *et al*., 1981 ; Carballeira *et al*., 1992a) (Planche 1).

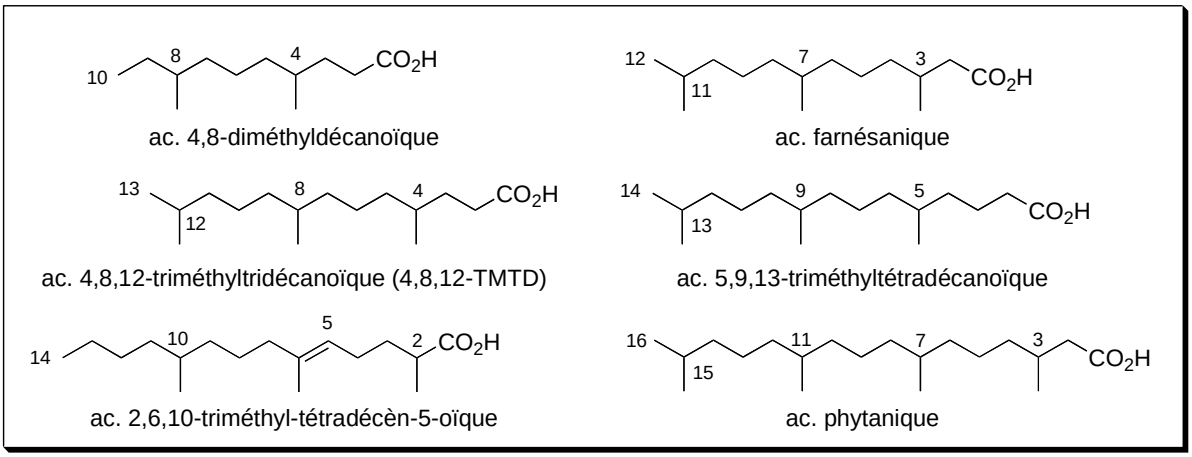


Planche 1. Acides isoprénoïques isolés d'éponges

Parmi ces acides, le 4,8,12-TMTD est à la fois le plus répandu et le plus abondant, ses teneurs moyennes sont comprises entre 5 et 10% de la fraction acides totaux des phospholipides et peut dépasser 20% (23% dans *Spheciospongia vesparium*, de 20 à 25% dans *Cinachyrella kükenthali*, de 14 à 36% dans *Cinachyrella alloclada*) mais sa teneur maximale de 54% (!) a été observée dans *Pseudaxinyssa* sp. (Gillan, *et al*., 1988). Par comparaison, l'acide phytanique est sensiblement moins abondant, avec des teneurs moyennes comprises entre 5 et 10%, mais presque aussi fréquent que le 4,8,12-TMTD, enfin il est constaté que ces deux acides sont très rarement présents simultanément (Carballeira *et al*., 1987 ; Barnathan & Kornprobst, 1998). L'ensemble de ces observations confirmerait ainsi l'hypothèse selon laquelle l'accumulation d'acide phytanique dans certaines éponges proviendrait d'une déficience de l'activité α-oxydase[8] transformant ce dernier en acide pristanique, puis en 4,8,12-TMTD par β-oxydation. Une activité α-oxydase « normale » réalise cette dernière transformation et c'est le 4,8,12-TMTD qui s'accumule dans l'éponge (Planche 1). La formation du 5,9,13-triméthyltétradécanoïque reste inconnue, ainsi que celle de l'acide farnésanique, bien que ce dernier dérive formellement d'une α-oxydation du précédent.

B-3.2. Acides gras mono-insaturés Δ5 et Δ9

[6] Une seule fois dans une éponge, mais il avait déjà été identifié dans des sédiments de l'époque Eocène, dans le Colorado (Carballeira & Maldonado, 1988).

[7] Cette observation est néanmoins curieuse car il n'existe pas de symbionte chlorophyllien connu pour cette espèce.

[8] En biologie humaine, cette déficience se traduit par le syndrome de Refsum. Pour une revue récente sur le métabolisme des acides phytanique et pristanique, voir Verhoeven & Jakobs, 2001 ; Kahlert *et al*., 2005.

Ces deux séries d'acides gras présentent un intérêt particulier dans la mesure où ils sont susceptibles de représenter des intermédiaires métaboliques des acides Δ5,9, particulièrement fréquents dans les éponges sans être cependant spécifiques de ce phylum (*vide infra* et Barnathan, 1993).

Les acides de la série Δ5 sont très rares et seuls quelques exemples sont connus : 5-18:1 et 5-22:1 (respectivement à 0,2% et à l'état de trace), dans *Microciona prolifera* (Morales & Litchfield, 1976), 5-25:1 (0,7%) dans *Pseudaxinella* cf. *Lunaecharta* (Barnathan *et al*., 1996), 5-28:1 (0 ,6%) dans *Cinachyrella* aff. *Schulzei* (Barnathan *et al*., 1994). Les deux autres acides 5-16:1 et 5-20:1 n'ont été signalés qu'à l'état de traces (% <0,1) dans la même espèce *Microciona prolifera* (Morales & Litchfield, 1976).

Les acides de la série Δ9 sont plus fréquents et ont été identifiés, du 9-16:1 (palmitoléïque) au 9-28:1, avec quelques acides à nombre impair de carbones. Le Tableau 3 présente l'état actuel des connaissances pour ces acides.

Tableau 3. Acides gras mono-insaturés de quelques Démosponges

Acides	%	Espèces	Références
		Δ5 (Z)	
5-14:1 (n-9)	0,1	*Callyspongia fallax*	Carballeira & Pagan, 2001
5-15:1 (n-10)	0,1	*Callyspongia fallax*	Carballeira & Pagan, 2001
i-5-16:1 (n-11)	0,1	*Callyspongia fallax*	Carballeira & Pagan, 2001
5-16:1 (n-11)	0,1	*Dysidea fragilis*	Christie *et al*., 1992
	0,6	*Haliclona cinerea*	Joh *et al.*, 1997
	0,1	*Baicalospongia intermedia* *	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	*Baicalospongia bacillifera* *	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	*Lubomirskia baicalensis* *	Dembitsky *et al*., 1994
2-MeO-5-16:1 (n-11)	0,5	*Amphimedon compressa*	Carballeira *et al*., 1992b
	0,6	*Mycale laevis*	Carballeira *et al*., 1992b
14-Me-5-17:1 (n-12)	0,1	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
i-5-17:1 (n-12)	0,2	*Callyspongia fallax*	Carballeira & Pagan, 2001
5-18:1 (n-13)	0,2	*Microciona prolifera*	Morales & Litchfield, 1976
	0,2	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,2	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,3	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
5-20:1 (n-15)	0,1	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,3	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
5-22:1 (n-17)	0,3	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,3	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,3	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
5-25:1 (n-20)	0,7	*Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*	Barnathan *et al.,* 1996
19-Me-5-25:1 (n-20)	5,0	*Strongylophora durissima*	Dasgupta *et al*., 1984
5-26:1 (n-21)	0,1	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
19-Me-5-26:1 (n-21)	19,3	*Strongylophora durissima*	Dasgupta *et al*., 1984
5-28:1 (n-23)	0,6	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al*., 1994
19-Me-5-27:1 (n-22)	12,3	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al*., 1994
		Δ9 (Z)	

9-14:1 (n-5)	0,6	*Pseudaxinyssa* sp.	Gillan *et al*., 1988
	0,2	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,2	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,2	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
i-9-15:1 (n-6)	0,1	*Callyspongia fallax*	Carballeira & Pagan, 2001
i-9-16:1 (n-7)	0,2	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
9-16:1 (n-7)	16,7	*Phyllospongia papyracea*	Gillan *et al*., 1988
	3,8	*Haliclona cinerea*	Joh *et al.*, 1997
	2,4	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al*., 1994
	2,6	*Suberites massa*	Barnathan *et al.*, 1993b
	7,6	*Pseudaxinella* cf.	Barnathan *et al.*, 1996
	6,9	*lunaecharta*	Carballeira *et al*., 1993
	0,9	*Chondrosia remiformis*	Carballeira *et al*., 1993
	1,9	*Myrmekioderma styx*	Dembitsky *et al*., 1993
	1,7	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	2,1	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1994
	4,0	*Lubomirskia baicalensis*	Carballeira & Pagan, 2001
	0,5	*Callyspongia fallax*	Carballeira *et al.*, 1998a
	4,2	*Calyx podatypa*	Carballeira & Shalabi, 1993
	5,8	*Petrosia* sp.	Nechev *et al*., 2004
	6,5	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
	7,3	*Hymeniacidon sanguinea*	Dembitsky & Rezanka, 1996
	5,5	*Cortispongilla barroisi*	Dembitsky & Rezanka, 1996
	6,2	*Ephydatia syriaca* *	Dembitsky & Rezanka, 1996
		Nudospongilla sp. *	Barnathan, 1993
		(nombreuses autres espèces)	
i-9-17:1 (n-8)	0,1	*Callyspongia fallax*	Carballeira & Pagan, 2001
	3,0	*Calyx podatypa*	Carballeira *et al.*, 1998a
	7,7	*Petrosia* sp.	Carballeira & Shalabi, 1993
	0,1	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
9-17:1 (n-8)	1,0	*Pseudaxinella* cf.	Barnathan *et al.*, 1996
	0,3	*lunaecharta*	Joh *et al.*, 1997
	0,5	*Haliclona cinerea*	Barnathan *et al.*, 1996
	0,2	*Trikentrion loeve*	Dembitsky *et al*., 1994
	0,5	*Lubomirskia baicalensis*	Carballeira *et al.*, 1998a
	0,3	*Calyx podatypa*	Carballeira & Shalabi, 1993
	1,3	*Petrosia* sp.	Nechev *et al*., 2004
	0,2	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
		Hymeniacidon sanguinea	
9-18:1 (n-9)	3,0	*Amphimedon complanata*	Carballeira & Restituyo, 1991
	1,6	*Pseudosuberites* sp.	Barnathan *et al.*, 1993b
	1,4	*Suberites massa*	Barnathan *et al.*, 1993b
	1,2	*Haliclona cinerea*	Joh *et al.*, 1997
	2,1	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al*., 1994
	4,4	*Trikentrion loeve*	Barnathan *et al.*, 1996
	1,1	*Pseudaxinella* cf.	Barnathan *et al.*, 1996
	0,6	*lunaecharta*	Carballeira *et al.*, 1993
	7,4	*Myrmekioderma styx*	Dembitsky *et al*., 1993
	8,1	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	4,5	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1994
	0,7	*Lubomirskia baicalensis*	Martinez *et al*., 1997

	1,9	*Ircinia felix*	Carballeira & Pagan, 2001
	1,0	*Callyspongia fallax*	Carballeira *et al.,* 1998a
	5,1	*Calyx podatypa*	Nechev *et al*., 2004
	3,0	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
	9,4	*Hymeniacidon sanguinea*	Dembitsky & Rezanka, 1996
	7,7	*Cortispongilla barroisi* *	Dembitsky & Rezanka, 1996
	9,4	*Ephydatia syriaca* *	Dembitsky & Rezanka, 1996
		Nudospongilla sp. *	
9-20:1 (n-11)	0,1	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
9-22:1 (n-13)	0,3	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,3	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,3	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
9-24:1 (n-15)	0,1	*Microciona prolifera*	Morales & Litchfield, 1976
	0,1	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
	1,1	*Calyx podatypa*	Carballeira *et al.,* 1998a
9-25 :1 (n-16)	0,1	*Dysidea fragilis*	Christie *et al*., 1992
	0,1	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
9-26:1 (n-17)	0,6	*Microciona prolifera*	Morales & Litchfield, 1976
	0,5	*Myrmekioderma styx*	Carballeira *et al*., 1993
	0,1	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
	0,3	*Hymeniacidon sanguinea*	Nechev *et al*., 2004
	0,2	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
9-27:1 (n-18)	0,2	*Myrmekioderma styx*	Carballeira *et al*., 1993
9-28:1 (n-19)	2,4	*Petrosia pellasarca*	Carballeira & Reyes, 1990a

* Eponges d'eau douce ; de nombreux acides ont également été trouvés à l'état de traces, en particulier dans les éponges d'eau douce du lac Baïkal, par exemple les acides : 9,13,17-Me_3-5-18:1 ; 11,15,19-Me_3-5-20:1 ; 13,17,21-Me_3-5-22:1 ; 9,13,17,21-Me_4-5-22:1 ; 5-23: 1 ; 11,15,19,23-Me_4-5-24:1 ; 13,17,21,25-Me_4-5-26:1 pour les Δ5, et 9-15:1 ; *ai*-9-17:1 pour les Δ9.

B-3.3. Acides gras di- et polyinsaturés

B-3.3.1. Etude bibliographique des acides gras Δ5,9 d'organismes marins

Les acides gras des phospholipides d'éponges comprennent, en faibles proportions ou pas du tout, des acides gras poly-insaturés classiques à doubles liaisons séparées par un méthylène. Mais ces compositions en AG se caractérisent par de fortes proportions d'acides à très longues chaînes (C_{23} à C_{34}, jusqu'à environ 80%) appelés acides "démospongiques". C'est en tout premier lieu le cas des acides à système d'insaturation Δ5,9 qui ont souvent de très longues chaînes, parfois une troisième double liaison près de l'extrémité hydrocarbonée, exceptionnellement avec quatre doubles liaisons (Djerassi & Lam, 1991 ; Carballeira *et al*., 1993 ; Barnathan *et al*., 1994, 1996 ; Carballeira, 1997 ; Carballeira *et al*., 2001 ; Barnathan *et al*., 2003). De tels acides gras peuvent aussi porter un atome de brome en position vinylique C-6.

Ceux-ci n'ont pas de contrepartie terrestre, exceptés quelques acides Δ5,9 à courtes chaînes présents dans les pins, dont les plus fréquents sont l'acide taxoléique (5*Z*,9*Z*-18:2), l'acide pinolénique (5*Z*,9*Z*,12*Z*-18:3) et l'acide columbinique (5*E*,9*Z*,11*Z*-18:3) (Imbs & Pham, 1996 ; Wolff *et al*., 2000). Une étude récente suggère que l'acide pinolénique peut avoir la propriété d'abaisser le niveau de lipoprotéines hépatiques[9] (Lee *et al*., 2004). Enfin, les phospholipides isolés des fleurs de l'Apocynaceae *Allamanda cathartica* et de la Malvaceae *Malvaviscus arboreus* contiennent les acides 17-méthyl-5,9-18:2, 16-méthyl-5,9-18:2, et 5,9-19:2 (Carballeira & Cruz, 1998).

Chaque mélange d'acides gras de phospholipides contient en moyenne de 50 à 70 AG. Quelques éponges contiennent jusqu'à 15 acides gras Δ5,9 dans leurs phospholipides et il arrive que l'un d'entre eux représente plus de 50% du mélange total (Barnathan *et al.*, 2003). Les acides démospongiques Δ5,9 sont synthétisés par les éponges à partir d'acides précurseurs insaturés courts, principalement l'acide exogène Δ9-16:1 (Djerassi & Lam, 1991). Les acides gras des lipides totaux de *Halichondria panicea* comprennent l'acide Δ5,9,19-26:3 comme composant majeur (33%), et six autres acides gras Δ5,9 (Imbs & Rodkina, 2004). Plusieurs acides gras polyinsaturés (AGPI) classiques appartenant aux séries n-3 et n-6 sont présents dans cette éponge, par exemple l'acide arachidonique (AA), l'EPA et le DHA.

Il convient cependant de remarquer que les éponges ne sont pas la seule source marine des acides gras Δ5,9 puisque quelques reports concernent d'autres invertébrés : zoanthides et anémones de mer (Carballeira & Medina, 1994 ; Carballeira & Reyes, 1995), gorgones (Carballeira *et al.*, 1997, Carballeira, 1997). Par exemple, les nouveaux acides *iso*-5,9-pentadécadiènoïque, isolé de *Eunicea succinea* puis préparé par synthèse chimique, et 6-bromo-5,9-eicosadiènoïque, identifié dans une anémone et un zoanthide (Carballeira & Reyes, 1995).

Depuis que Morales & Litchfield (1976) ont mis en évidence l'existence des acides Δ5,9 à 24, 25 et 26 carbones dans l'éponge *Microciona prolifera*, l'équipe de Djerassi (Djerassi & Lam, 1991) a dressé un bilan des données de la littérature concernant les acides démo-spongiques. Cette étude a été complétée par Barnathan (1993), dont quelques exemples à système diènique Δ5,9, courts et longs, sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4. Exemples d'acides gras Δ5,9 des phospholipides d'éponges jusqu'à 1992

Acides	% [1]	Espèces	*	**	Références

[9] Ces lipoprotéines sont bien connues du grand public sous les dénominations de LDL (Low Density Lipoproteins) dont l'exemple type est le « mauvais « cholestérol qui contribue à la formation des plaques d'athéromes. Au contraire, les HDL (High Density Lipoproteins) englobent le « bon » cholestérol.

Acides Δ5,9 (*cis*, *cis*-diénoïques) à chaînes normales					
5,9-16:2	12,1	*Chondrilla nucula*			Carballeira & Maldonado, 1986
	10,5	*Xestospongia muta*			*Carballeira & Maldonado, 1988*
5,9-18:2	3,5	*Aplysina fistularis*	*8*	4	Walkup *et al., 1981*
	9,8	*Pseudaxinyssa* sp.			Gillan *et al.,* 1988
	0,5	*Erylus formosus*			Carballeira & Negron, 1991
5,9-20:2	n.m.	*Aplysina fistularis*	*1*	1	Lawson *et al.*, 1988
	8,0	*Erylus formosus*			Carbaleira & Negron, 1991
5,9-24 :2	0,4	*Microciona prolifera*	7	7	Morales & Litchfield, 1976
	8,9	*Ircinia strobilina*			Carballeira & Reyes, 1990a
	0,3	*Mycale laevis*			Carballeira *et al.*, 1990a
5,9-25:2	10,0	*Thalysias juniperina*	12	9	Carballeira *et al.,* 1990b
5,9-26:2	49,6	*Spheciospongia confoederata*	25	28	Ayanoglu *et al*., 1990
	15,0	*Tethya crypta*			Carballeira & Sepulveda, 1992
5,9-27:2	4,1	*Pseudaxinyssa* sp.	5	3	Lawson *et al*., 1988
	0,7	*Spheciospongia confoederata*			Aynoglu *et al*., 1990
5,9-28:2	< 0,4	*Aplysina fistularis*	6	6	Walkup *et al.,* 1981
	4,5	*Pseudaxinyssa* sp.			Zimmermann *et al*., 1989
	0,7	*Aphimedon complanata*			Carballeira *et al*., 1991
5,9-29:2	6,2	*Aplysina archeri.*	2	1	Carballeira *et al*., 1989
	0,8	*Erylus formosus*			Carballeira & Negron, 1991
5,9-30:2	9,4	*Petrosia pellasarca*			Carballeira & Reyes, 1990a
5,9-31:2	< 0,4	*Aplysina fistularis*			Walkup *et al.,* 1981
Acides Δ5,9 (*cis*, *cis*-diénoïques) à chaînes ramifiées					
i-5,9-20:2	1,3	*Erylus formosus*	-	-	Carballeira & Negron, 1991
ai-5,9-20:2	0,5	*Erylus formosus*	-	-	Carballeira & Negron, 1991
i-5,9-26:2	7,1	*Mycale laevis*	6	5	Carballeira *et al*., 1992b
ai-5,9-26:2	2,0	*Cribochalina vasculum*	1	1	Carballeira & Negron, 1990
i-5,9-27:2	8,4	*Petrosia ficiformis*	7	6	Ayanoglu *et al*., 1982
ai-5,9-27:2	18,4	*Petrosia ficiformis*	6	5	Ayanoglu *et al*., 1982
20-Me-5,9-26:2	0,5	*Aplysina fistularis*	-	-	Walkup *et al*., 1981
i-5,9-28:2	2,2	*Cinachyrella alloclada*	2	2	Barnathan *et al.,* 1992
ai-5,9-28:2	3,4	*Ectyoplasia ferox*	1	1	Carballeira & Negron, 1989
22-Me-5,9-28:2	6,1	*Aplysina fistularis*	-	-	Walkup *et al*., 1981
Acides Δ5,9 (*cis*, *cis*-diénoïques) C-6 bromés à chaînes normales et ramifiées					
6-Br-5,9-26:2	12,8	*Hymeniacidonidae*	-	-	Lam *et al*., 1989
6-Br-*i*-5,9-27:2	9,0	*Petrosia hebes*	1	-	Wijekoon *et al*., 1984
6-Br-*ai*-5,9-27:2	9,0	*Petrosia hebes*	-	-	Wijekoon *et al*., 1984
Acides Δ5,9,x (*cis*, *cis*, *cis*-triénoïques)					
5,9,17-26:3	0,7	*Microciona prolifera*	-	-	Morales & Litchfield, 1976
5,9,19-26:3	20,3	*Hymeniacidoniidae*	5	7	Lam *et al*., 1989
5,9,19-27:3	0,1	*Microciona prolifera*			Morales & Litchfield, 1976
5,9,20-27:3	0,2	*Microciona prolifera*			Morales & Litchfield, 1976
5,9,19-28:3	7,4	*Xestospongia muta*	-	-	Carballeira & Maldonado, 1988
5,9,21-28 3	3,8	*Pseudaxinyssa* sp.	2	4	Lawson *et al*., 1988
5,9,23-28:3	0,4	*Aplysina fistularis*	1	2	Walkup *et al*., 1981
5,9,23-29:3	8,2	*Amphimedon compressa*	2	4	Carballeira & Lopez, 1989
5,9,23-30:3	34,2	*Higginsia tethyoides*	6	8	Ayanoglu *et al*., 1983a,b
Acides Δ5,9 diénoïques et Δ5,9,x triénoïques à chaînes normales et ramifiées					
i-5,9-21:2	2,7	*Plakortis halichondroides*	-	-	Carballeira & Shalabi, 1990
ai-5,9-21:2	1,0	*Plakortis halichondroides*	-	-	Carballeira & Shalabi, 1990
i-5*E*,9*E*-22:2	11,2	*Plakortis halichondroides*	-	-	Carballeira & Shalabi, 1990
ai-5*E*,9*E*-22:2	1,4	*Plakortis halichondroides*	-	-	Carballeira & Shalabi, 1990
i-5*E*,9*E*-23:2	n.m	*Plakortis halichondroides*	-	-	Carballeira & Shalabi, 1990
ai-5*E*,9*E*-23:2	n.m	*Plakortis halichondroides*	-	-	Carballeira & Shalabi, 1990

Nous avons donc fait des recherches bibliographiques à partir de la base de données Marinlit (Blunt & Munro, 2004) et par Internet sur *Science@Direct* pour compléter les publications récentes dont nous disposions, de façon à actualiser le Tableau 3. Ces nouvelles données sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5. Exemples d'acides gras Δ5,9 des phospholipides d'éponges et autres organismes marins depuis 1993

Acides	% [1]	Espèces	Références
Acides Δ5,9 (*cis*, *cis*-diènoïques) à chaîne normale			
5,9-16:2	2,1	*Stoichactis helianthus* *	Carballeira & Medina, 1994
	5,9	*Haliclona cinerea*	Joh *et al*., 1997
	3,6	*Chondrosia remiformis*	Carballeira *et al*., 1993
	0,1	*Lubomirskia baicalensis* **	Dembitsky *et al*., 1994
5,9-17:2	0,5	*Haliclona cinerea*	Joh *et al*., 1997
5,9-18:2	9,8	*Pseudaxinyssa* sp.	Gillan *et al.*, 1988
	4,1	*Stoichactis helianthus*	Carballeira & Medina, 1994
	0,5	*Haliclona cinerea*	Joh *et al*., 1997
	0,3	*Calyx podatypa*	Carballeira *et al*., 1998a
5,9-20:2	2,3	*Stoichactis helianthus*	Carballeira & Medina, 1994
5,9-21:2	0,6	*Stoichactis helianthus*	Carballeira & Medina, 1994
5,9-22:2	2,1	*Stoichactis helianthus*	Carballeira & Medina, 1994
	0,2	*Calyx podatypa*	Carballeira *et al*., 1998a
5,9-23:2	0,2	S*toichactis helianthus*	Carballeira & Medina, 1994
	13,7	*Ircinia felix*	Martinez *et al*., 1997
5,9-24 :2	5,6	*Agelas conifera*	Duque *et al*., 1993
	0,8	*Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*	Barnathan *et al*., 1996
	0,2	*Baicalospongia intermedia* **	Dembitsky *et al*., 1993
	0,2	*Baicalospongia bacillifera* **	Dembitsky *et al*., 1993
	0,3	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
5,9-25:2	0,6	*Agelas* sp.	Carballeira & Emiliano, 1993
	17,0	*Agelas conifera*	Duque *et al*., 1993
	0,5	*Pseudosuberites* sp.	Barnathan *et al*., 1993b
	0,9	*Suberites massa*	Barnathan *et al*., 1993b
	0,1	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,2	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
	1,6	*Calyx podatypa*	Carballeira *et al*., 1998a
5,9-26:2	20,5	Agelas conifera	Duque *et al*., 1993
	0,6	Agelas sp.	Carballeira & Emiliano, 1993
	0,7	*Petrosia* sp.	Carballeira & Shalabi, 1993
	2,6	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al.*, 1994
	7,8	*Pseudosuberites* sp.	Barnathan *et al*., 1993b
	21,3	*Suberites massa*	Barnathan *et al*., 1993b
	1,4	*Trikentrion loeve*	Barnathan *et al*., 1996
	20,3	*Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*	Barnathan *et al*., 1996
	0,8	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	1,0	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,8	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
	3,9	*Calyx podatypa*	Carballeira *et al*., 1998a
5,9-27:2	0,6	*Petrosia* sp.	Carballeira & Shalabi, 1993
	2,3	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al.*, 1994
	0,6	*Pseudosuberites* sp.	Barnathan *et al.*, 1993b
	3,3	*Suberites massa*	Barnathan *et al.*, 1993b
	0,4	*Trikentrion loeve*	Barnathan *et al*., 1996
	1,1	*Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*	Barnathan *et al*., 1996
	1,0	*Myrmekioderma styx*	Carballeira *et al*., 1993
	0,2	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,2	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,3	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
5,9-28:2	4,9	*Petrosia* sp.	Carballeira & Shalabi, 1993

	1,6	*Pseudosuberites* sp.	Barnathan *et al.*, 1993b
	2,3	*Trikentrion loeve*	Barnathan *et al*., 1996
	0,2	*Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*	Barnathan *et al*., 1996
	0,2	*Myrmekioderma styx*	Carballeira *et al*., 1993
	0,6	*Chondrosia remiformis*	Carballeira *et al*., 1993
	0,5	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,5	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,5	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
5,9-29:2	1,1	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al.*, 1994
	0,9	*Trikentrion loeve*	Barnathan *et al*., 1996
	0,1	*Myrmekioderma styx*	Carballeira *et al*., 1993
	0,3	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,2	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,3	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
5,9-30:2	0,4	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,4	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,5	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
5,9-31:2	0,1	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
Acides Δ5,9 (cis,cis-diènoïques) à chaîne ramifiées			
i-5,9-17:2	0,7	*Chondrosia remiformis*	Carballeira *et al*., 1993
	2,3	*Myrmekioderma styx*	Carballeira *et al*., 1993
	2,0	*Calyx podatypa*	Carballeira *et al*., 1998a
22-Me-5,9-23:2	7,2	*Ircinia felix*	Martinez *et al.,* 1997
i-5,9-25:2	1,8	*Agelas* sp.	Carballeira & Emiliano, 1993
	0,4	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al.*, 1994
	1,8	*Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*	Barnathan *et al*., 1996
i-5,9-26:2	0,8	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al.*, 1994
	0,5	*Myrmekioderma styx*	Carballeira *et al*., 1993
	0,2	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,2	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,2	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
	0,3	*Calyx podatypa*	Carballeira *et al*., 1998a
ai-5,9-26:2	0,2	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,2	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,3	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
i-5,9-27:2	7,2	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al.*, 1994
	0,4	*Trikentrion loeve*	Barnathan *et al*., 1996
	1,1	*Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*	Barnathan *et al*., 1996
	3,9	*Myrmekioderma styx*	Carballeira *et al*., 1993
	0,1	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	Baicalospongia bacillifera	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
ai-5,9-27:2	1,5	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al.*, 1994
	0,7	*Trikentrion loeve*	Barnathan *et al*., 1996
	0,6	*Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*	Barnathan *et al*., 1996
	1,7	*Myrmekioderma styx*	Carballeira *et al*., 1993
	0,2	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,2	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,2	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
i-5,9-28:2	2,3	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al.*, 1994
	0,2	*Trikentrion loeve*	Barnathan *et al*., 1996
	1,0	*Myrmekioderma styx*	Carballeira *et al*., 1993
	0,8	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,7	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993

	0,7	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
ai-5,9-28:2	1,6	*Pseudosuberites* sp.	Barnathan *et al.*, 1993b
	0,3	*Myrmekioderma styx*	Carballeira *et al*., 1993
	0,1	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
22-Me-5,9-29:2	2,0	*Myrmekioderma styx*	Carballeira *et al*., 1993
i-5,9-29:2	0,5	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al.*, 1994
	0,2	*Trikentrion loeve*	Barnathan *et al*., 1996
	0,1	*Chondrosia remiformis*	Carballeira *et al*., 1993
	0,3	*Myrmekioderma styx*	Carballeira *et al*., 1993
ai-5,9-29:2	0,2	*Trikentrion loeve*	Barnathan *et al*., 1996
	0,1	*Chondrosia remiformis*	Carballeira *et al*., 1993
	0,2	*Myrmekioderma styx*	Carballeira *et al*., 1993
Acides Δ5,9 et Δ5,9,x (dièn oïques et triènöiques) C-6 bromé à chaînes normales et ramifiées			
6-Br-5,9-21:2	0,4	*Stoichactis helianthus*	Carballeira & Medina, 1994
6-Br-5,9-22:2	0,8	*Stoichactis helianthus*	Carballeira & Medina, 1994
6-Br-5,9,x-22:3	tr.	*Stoichactis helianthus*	Carballeira & Medina, 1994
6-Br-5,9-24:2	0,5	*Agelas* sp.	Carballeira & Emiliano, 1993
	0,7	*Amphimedon terpenensis*	Garson *et al*., 1993
6-Br-5,9,x-24:3	tr.	*Stoichactis helianthus*	Carballeira & Medina, 1994
6-Br-5,9-25:2	1,4	*Agelas* sp.	Carballeira & Emiliano, 1993
	2,5	*Amphimedon terpenensis*	Garson *et al*., 1993
6-Br-*i*-5,9-25:2	1,8	*Agelas* sp.	Carballeira & Emiliano, 1993
6-Br-5,9-26:2	0,3	*Agelas* sp.	Carballeira & Emiliano, 1993
	0,6	*Petrosia* sp.	Carballeira & Shalabi, 1993
	1,1	*Amphimedon terpenensis*	Garson *et al*., 1993
6-Br-*i*-5,9-26:2	0,4	*Agelas* sp.	Carballeira & Emiliano, 1993
6-Br-5,9-27:2	0,7	*Petrosia* sp.	Carballeira & Shalabi, 1993
Br-5,9-27:2	0,5	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al.*, 1994
6-Br-5,9-28:2	tr.	*Petrosia* sp.	Carballeira & Shalabi, 1993
		Acides Δ5,9,x -triènoïques	
5,9,13-22:3	0,3	*Stoichactis helianthus*	Carballeira & Medina, 1994
	0,6	*Haliclona cinerea*	Joh *et al*., 1997
5,9,17-26:3	3,8	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	4,1	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	4,1	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
	1,8	*Cortispongilla barroisi* **	Dembitsky & Rezanka, 1996
	3,6	*Ephydatia syriaca* **	Dembitsky & Rezanka, 1996
	3,7	*Nudospongilla* sp. **	Dembitsky & Rezanka, 1996
5,9,19-26:3	0,2	*Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*	Barnathan *et al*., 1996
	0,1	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,1	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	1,4	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
5,9,21-26:3	2,3	*Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*	Barnathan *et al*., 1996
5,9,19-27:3	1,3	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	1,6	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,4	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
5,9,20-27:3	0,4	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,5	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,5	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
5,9,19-28:3	0,4	*Pseudosuberites* sp.	Barnathan *et al.*, 1993b
	11,1	*Suberites massa*	Barnathan *et al.*, 1993b
	0,4	*Trikentrion loeve*	Barnathan *et al*., 1996
	0,9	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	1,4	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993

	1,3	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
5,9,21-28:3	5,8	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al.*, 1994
	0,7	*Suberites massa*	Barnathan *et al.*, 1993b
	0,7	*Trikentrion loeve*	Barnathan *et al*., 1996
	0,6	*Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*	Barnathan *et al*., 1996
	1,3	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	1,6	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	1,3	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
5,9,23-28:3	0,7	*Cinachyrella* aff. *schulzei*	Barnathan *et al.*, 1994
	0,5	*Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*	Barnathan *et al*., 1996
	0,5	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,6	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,5	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
5,9,23-29:3	0,2	*Chondrosia remiformis*	Carballeira *et al*., 1993
	0,4	*Baicalospongia intermedia*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,5	*Baicalospongia bacillifera*	Dembitsky *et al*., 1993
	0,6	*Lubomirskia baicalensis*	Dembitsky *et al*., 1994
5,9,23-30:3	0,3	Petrosia sp.	Carballeira & Shalabi, 1993
	0,9	Cinachyrella aff. schulzei	Barnathan et al., 1994
	14,8	Trikentrion loeve	Barnathan et al., 1996
	0,9	Pseudaxinella cf. lunaecharta	Barnathan et al., 1996
	0,7	Haliclona cinerea	Joh et al., 1997
	29,0	Chondrosia remiformis	Carballeira et al., 1993
	0,5	Baicalospongia intermedia	Dembitsky et al., 1993
	0,5	Baicalospongia bacillifera	Dembitsky et al., 1993
	0,4	Lubomirskia baicalensis	Dembitsky et al., 1994
Barnathan et al., 1996			Joh *et al*., 1997
5,9,24-31:3 0,6 Haliclona cinerea Joh et al., 1997			
5,9,25-32:3 18,9 Haliclona cinerea Joh et al., 1997			
5,9,27-34:3 0,1 Haliclona cinerea Joh et al., 1997			
Acides . □5,9,x,y-tétraènoïques			
5,9,19,23-30:4 1,2 Haliclona cinerea Joh et al., 1997			
5,9,21,25-32:4 5,9,23,27-34:4	7,6	*Haliclona cinerea*	Joh *et al*., 1997

[1] les valeurs indiquées pour les pourcentages sont les plus élevées qui ont été observées. Plusieurs acides ont été trouvés à l'état de traces, en particulier dans les éponges du lac Baïkal, comme les acides : *i*-5,9-21:2 ; *ai*-5,9-21:2 ; 11,15,19-Me_3-5,9-

20:2 ; 13,17,21-Me_3-5,9-22:2 ; 11,15,19,23-Me_4-5,9-24:2 ; 13,17,21,25-Me_4-5,9-26:2. * anémone de mer (Cnidaire), ** éponges d'eau douce.

B-3.3.2. Acides gras insaturés à enchaînements maloniques

Les acides à enchaînements maloniques possèdent des doubles liaisons séparées les unes des autres par un groupe méthylène. On les désigne selon leur appartenance à une série qui dépend de la position de la double liaison comptée à partir du dernier carbone de la chaîne. Les séries les plus importantes pour leurs propriétés physiologiques, nutraceutiques et biomédicales sont les séries n-3 et n-6 mais plusieurs exemples d'acides n-4, n-5, n-7, n-9… ont été caractérisés dans des organismes marins (Dacosta, 2004).

Plusieurs dizaines de ces acides ont été caractérisés dans les phospholipides de Spongiaires mais une grande partie d'entre eux sont probablement d'origine exogène (circuit alimentaire et symbiontes) ou proviennent de transformations réalisées par l'éponge sur certains de ces acides exogènes. Quelques exemples de ces acides di- et polyinsaturés sont présentés dans les Tableaux 6 à 10.

Tableau 6. Exemples d'acides gras n-3

Acides gras	%	Eponges	Références
7,10,13-16:3	0,2	*Dysidea fragilis*	Christie *et al*., 1992
4,7,10,13-16:4	0,6	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
9,12,15-18:3	1,0	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
6,9,12,15-18:4	0,8	*Calyx podatypa*	Carballeira *et al.,* 1998a
	0,4	*Hymeniacidon sanguinea*	Nechev *et al.*, 2004
	0,9	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
3,6,9,12,15-18:5	1,3	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
11,14,17-20:3	0,1	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
8,11,14,17-20:4	1,3	*Petrosia* sp.	Carballeira & Shalabi, 1993
5,8,11,14,17-20:5	2,0	*Calyx podatypa*	Carballeira *et al.,* 1998a
(EPA, eicosapentaènoïque)	0,7	*Hymeniacidon sanguinea*	Nechev *et al.*, 2004
	3,8	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
7,10,13,16,19-22:5	0,8	*Dysidea fragilis*	Christie *et al*., 1992
	0,3	*Hymeniacidon sanguinea*	Nechev *et al.*, 2004
	7,5	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
4,7,10,13,16,19-22:6	19 à 25	*Microciona prolifera*	Hahn *et al*., 1988
(DHA,docosahexaènoïque)	1,8	*Petrosia* sp.	Carballeira & Shalabi, 1993
	0,1	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al*., 1994
15,18,21,24,27-30:5	7,0	*Microciona prolifera*	Litchfield *et al*., 1979
19,22,25,28,31-34:5	12,4	*Petrosia pellasarca*	Carballeira & Reyes, 1990a

Tableau 7. Exemples d'acides gras n-4

Acides gras	%	Eponges	Références
9,12-16:2	0,1	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al.*, 1994
11,14-18:2	tr.	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al.*, 1994

Tableau 8. Exemple d'acide gras n-5

Acide gras	%	Eponge	Référence
6,9,12,15-20:4	6,4	*Ectyoplasia ferox*	Carballeira & Maldonado, 1989b

Tableau 9. Exemples d'acides gras n-6

Acides gras	%	Eponges	Références
4,7,10-16:3	0,2	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al.*, 1994
9,12-18:2	0,3	*Calyx podatypa*	Carballeira *et al.,* 1998a
	1,2	*Trikentrion loeve*	Barnathan *et al*., 1996
	0,3	*Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*	Barnathan *et al*., 1996
	1,6	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al.*, 1994
6,9,12-18:3	0,4	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al.*, 1994
11,14-20:2	0,2	*Hymeniacidon sanguinea*	Nechev *et al.*, 2004
	0,1	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al.*, 1994
8,11,14-20:3	0,2	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al.*, 1994
5,8,11,14-20:4	1,0	*Calyx podatypa*	Carballeira *et al.,* 1998a
(ac. arachidonique)	2,0	*Petrosia* sp.	Carballeira & Shalabi, 1993
	1,1	*Callyspongia fallax*	Carballeira & Pagan, 2001
	3,3	*Agelas* sp.	Carballeira & Emiliano, 1993
	1,3	*Hymeniacidon sanguinea*	Nechev *et al.*, 2004
	2,7	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al.*, 1994
13,16-22:2	tr.	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al.*, 1994
7,13,16-22:3	1,5	*Petrosia ficiformis*	Ayanoglu *et al*., 1982
10,13,16-22:3	0,1	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al.*, 1994
7,10,13,16-22:4	1,1	*Petrosia pellasarca*	Carballeira & Reyes, 1990a
	1,2	*Petrosia* sp.	Carballeira & Shalabi, 1993
	2,4	*Hymeniacidon sanguinea*	Nechev *et al.*, 2004
	0,2	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al.*, 1994
4,7,10,13,16-22:5	0,9	*Hymeniacidon sanguinea*	Christie *et al.*, 1994
15,18,21,24-30:4	3,5	*Microciona prolifera*	Litchfield *et al*., 1979

Tableau 10. Exemple d'acide gras n-7@

Acides gras	%	Eponge	Référence
4,7,10,13-20:4	5 à 6	*Microciona prolifera*	Hahn *et al*., 1988

B-3.3.3. Autres acides gras insaturés à enchaînements non maloniques autres que Δ5,9

Si les acides gras possédant le système diénique Δ5,9 peuvent être considérés comme caractéristiques des éponges[10], leurs phospholipides contiennent également de très nombreux acides à longues chaînes appartenant au type "NMI " (non-methylene interrupted) sans être nécessairement di-insaturés en 5,9. Quelques exemples de ces acides di- et polyinsaturés sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11. Exemples d'acides gras di et polyinsaturés non maloniques

Acides gras	%	Eponges	Références
6,11-18:2	2,0	*Euryspongia rosea*	Carballeira & Maldonado, 1989a
6,11-20:2	9,0	*Euryspongia rosea*	Carballeira & Maldonado, 1989a
11,15-20:2	6,0	*Amphimedon complanata*	Carballeira & Restituyo, 1991
7,13-22:2	1,0	*Petrosia ficiformis*	Ayanoglu *et al*., 1982
7,15-22:2	0,3	*Dysidea fragilis*	Christie *et al*., 1992

[10] Avec la réserve que quelques-uns d'entre eux ont été découverts dans d'autres phylums d'invertébrés marins et certaines plantes terrestres.

9,19-26:2	0,6	*Dysidea fragilis*	Christie *et al*., 1992
17,21-26:2	1,5	*Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*	Barnathan *et al*., 1996
17,21-28:2	0,9	*Haliclona cinerea*	Joh *et al*., 1997
19,23-28:2	1,3	*Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*	Barnathan *et al.*, 1996
9,23-30:2	0,2	*Trikentrion loeve*	Barnathan *et al*., 1996
19,23-30:2	0,1	*Haliclona cinerea*	Joh *et al*., 1997
21,25-32:2	4,2	*Haliclona cinerea*	Joh *et al*., 1997

Les acides gras de *Pseudaxinella* cf. *lunaecharta* sont des homologues, décrits une seule fois et dans ce seul organisme, et qui pourraient être formés par allongement de l'acide hypothétique 5,9-14:2 (Barnathan *et al.*, 1996). Il se formerait ainsi l'acide 11,15-20:2 identifié chez *Amphimedon complanata* (Carballeira & Restituyo, 1991). Les acides 7,13-22:2 et 7,15-22:2 ont été observés chez des mollusques et, tout récemment, chez des raies tropicales (Ould El Kebir *et al*., 2003).

B-4. Acides gras fonctionnalisés des phospholipides d'éponges

B-4.1. Acides 2-*O*-substitués

Trois groupes d'acides 2-*O* substitués : 2-OH, 2-OMe, et 2-OAc ont été mis en évidence dans les phospholipides d'éponges (phosphatidyléthanolamine, PE et phosphatidylsérine, PS) appartenant à plusieurs ordres, il ne s'agit donc pas de composés isolés et une cinquantaine d'entre eux ont été caractérisés. Les dérivés méthoxylés sont les plus répandus et les dérivés acétoxy les plus rares. Le Tableau 12 regroupe les éponges ayant conduit à l'observation de ces acides.

Tableau 12. Présence d'acides 2-*O* substitués dans les démosponges

Ordre	2-OH	2-OMe	2-OAc
		Tetractinomorpha	
Hadromerida	*Pseudosuberites* sp. *Spheciospongia cuspidifera* *Suberites massa*	*Spheciospongia cuspidifera* *Tethya crypta*	*Polymastia gleneni*
		Ceractinomorpha	
Halichondrida	-	*Higginsia tethyoides* *Topsentia roquensis*	-
Haplosclerida	*Callyspongia fallax*	*Amphimedon compressa* *Amphimedon complanata* *Callyspongia fallax* *Petrosia* sp.	-
Poecilosclerida	-	*Mycale laevis* *Mycale laxissima*	-
Verongida	*Aplysina archeri* *Verongula gigantea*	-	-

B-4.1.1. Acides 2-hydroxylés

Les acides 2-hydroxylés forment une série homologue d'acides saturés de 14 à 30 atomes de carbone et sont considérés avoir la configuration (*R*) en C-2, comme tous les acides 2-hydroxylés naturels (Carballeira & Lopez, 1989). Cette même configuration (*R*) a été déterminée pour la plupart des acides 2-OMe et il est probable qu'il en est de même pour les acides 2-OAc (Ayanoglu *et al*., 1983a,b, 1985). Les Tableaux 13 à 15 présentent les principaux de ces acides.

Tableau 13. Exemples d'acides 2-hydroxylés des phospholipides d'éponges*

Acides	Espèces	%	Références
2-OH-14:0	*Pseudosuberites* sp.	0,3	Barnathan *et al*., 1993b
	Suberites massa	0,4	Barnathan *et al*., 1993b
2-OH-15:0	*Pseudosuberites* sp.	0,6	Barnathan *et al*., 1993b
2-OH-*iso* 16:0	*Pseudosuberites* sp.	0,5	Barnathan *et al*., 1993b
2-OH-16:0	*Pseudosuberites* sp.	0,6	Barnathan *et al*., 1993b
	Suberites massa	0,4	Barnathan *et al*., 1993b
2-OH-17:0	*Pseudosuberites* sp.	0,5	Barnathan *et al*., 1993b
2-OH-18:0	*Suberites massa*	0,5	Barnathan *et al*., 1993b
2-OH-20:0	*Aplysina archeri*	0,8	Carballeira *et al*., 1989
	Verongula gigantea	8,5	Carballeira *et al*., 1989
	Chondrosia reformis	0,2	Carballeira *et al*., 1993
2-OH-21:0	*Verongula gigantea*	5,3	Carballeira *et al*., 1989
2-OH-21:0	*Chondrosia reformis*	0,1	Carballeira *et al*., 1993
2-OH-22:0	*Amphimedon compressa*	11,5	Carballeira & Lopez, 1989
	Callyspongia fallax	0,3	Carballeira & Pagán, 2001
	Pseudosuberites sp.	0,5	Barnathan *et al*., 1993b
	Spheciospongia cuspidifera	2,0	Carballeira *et al*., 1992a
	Suberites massa	0,2	Barnathan *et al*., 1993b
	Petrosia sp.	0,6	Carballeira & Shalabi, 1993
	Chondrosia reformis	0,6	Carballeira *et al*., 1993
2-OH-23:0	*Amphimedon compressa*	42,0	Carballeira & Lopez, 1989
	Callyspongia fallax	0,1	Carballeira & Pagán, 2001
	Pseudosuberites sp.	0,9	Barnathan *et al*., 1993b
	Spheciospongia cuspidifera	1,0	Carballeira *et al*., 1992a
	Suberites massa	0,2	Barnathan *et al*., 1993b
2-OH-24:0	*Aplysina archeri*	0,7	Carballeira *et al*., 1989
	Callyspongia fallax	1,2	Carballeira & Pagán, 2001
	Pseudosuberites sp.	9,7	Barnathan *et al*., 1993b
	Spheciospongia cuspidifera	5,0	Carballeira *et al*., 1992a
	Pseudosuberites sp.	9,7	Barnathan *et al*., 1993b
	Verongula gigantea	1,4	Carballeira *et al*., 1989
	Chondrosia reformis	0,5	Carballeira *et al*., 1993
2-OH-25:0	*Aplysina archeri*	1,0	Carballeira *et al*., 1989
	Callyspongia fallax	0,2	Carballeira & Pagán, 2001
	Pseudosuberites sp.	9,2	Barnathan *et al*., 1993b
	Spheciospongia cuspidifera	2,0	Carballeira *et al*., 1992a
	Pseudosuberites sp.	9,2	Barnathan *et al*., 1993b
2-OH-*i*- 25:0	*Aplysina archeri*	1,0	Carballeira *et al*., 1989
2-OH-26:0	*Pseudosuberites* sp.	25,9	Barnathan *et al*., 1993b
	Agelas sp.	0,8	Carballeira & Emiliano, 1993
2-OH-27:0	*Pseudosuberites* sp.	2,7	Barnathan *et al*., 1993b

* Les pourcentages sont exprimés par rapport à la fraction acides totaux.

Certains pourcentages très élevés (53,5% pour *Amphimedon compressa*, 48,7% pour *Pseudosuberites* sp.) montrent que des acides 2-hydroxylés à longues chaînes sont des constituants majeurs des membranes cellulaires de ces éponges.

Quelques acides 2-hydroxylés ont été également identifiés dans l'oursin (Echinodermes), *Tripneustes esculentus* (2-OH-13-22:1, 2-OH-14-23:1, 2-OH-15-24:1, Carballeira *et al*., 1994).

B-4.1.2. Acides 2-méthoxylés

Les acides 2-méthoxylés ont été découverts en 1983 dans les phospholipides de l'éponge sénégalaise *Higginsia tethyoides* (Ayanoglu *et al*., 1983b)[11] puis, ultérieurement, dans plusieurs autres espèces. La composition en acides gras des phospholipides d'*Higginsia tethyoides* est exceptionnelle car c'est actuellement l'espèce qui contient le plus grand nombre et la plus forte teneur en acides 2-méthoxylés à longues chaînes. Par ailleurs, pour cette éponge, trois acides seulement représentent plus de la moitié du total : l'acide arachidonique (10,1%), le 2-OMe,21-28:1 (13,7%) et le 5,9,23-30:3 (34,2%).

Comme pour les acides 2-hydroxylés, les acides 2-méthoxylés se trouvent principalement dans les classes phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine, et certains d'entre eux sont présents avec des teneurs élevées mais, par contre, on rencontre autant d'acides insaturés que d'acides saturés, les doubles liaisons étant (Z). Deux mises au point ont été publiées sur les lipides méthoxylés (Kornprobst & Barnathan, 1998 ; Carballeira, 2002).

Tableau 14. Principaux acides 2-méthoxylés des éponges*

Acides	Espèces	%	Références
	Acides saturés		
2-OMe-14:0	*Callyspongia fallax*	0,2	Carballeira & Pagán, 2001
2-OMe-15:0	*Callyspongia fallax*	0,5	Carballeira & Pagán, 2001
2-OMe-*iso*-15:0**	*Amphimedon complanata*		Carballeira & Alicea, 2001
2-OMe-16:0	*Amphimedon compressa*	0,5	Carballeira *et al*., 1998b
2-OMe-*iso*-16:0	*Amphimedon complanata*		Carballeira & Alicea, 2001
2-OMe-*anteiso*-16:0**	*Amphimedon complanata*		Carballeira & Alicea, 2001
2-OMe-18:0	*Callyspongia fallax*	0,2	Carballeira & Pagán, 2001
2-OMe-19:0	*Higginsia tethyoides*	<0,5	Ayanoglu *et al*., 1983b
2-OMe-20:0	*Higginsia tethyoides*	0,5	Ayanoglu *et al*., 1983b
2-OMe-21:0	*Higginsia tethyoides*	<0,5	Ayanoglu *et al*., 1983b
2-OMe-22:0	*Higginsia tethyoides*	2,2	Ayanoglu *et al*., 1983b
2-OMe-23:0	*Higginsia tethyoides*	0,6	Ayanoglu *et al*., 1983b
2-OMe-24:0	*Higginsia tethyoides*	3,2	Ayanoglu *et al*., 1983b
	Acides insaturés		
2-OMe-6-14:1	*Callyspongia fallax*	0,3	Carballeira & Pagán, 2001
2-OMe-6-15:1	*Callyspongia fallax*	0,3	Carballeira & Pagán, 2001
2-OMe-*iso*-6-15:1**	*Callyspongia fallax*	0,3	Carballeira & Pagán, 2001
2-OMe-5-16:1	*Mycale laxissima*	1,0	Carballeira *et al*., 1992a
	Tethya crypta	2,0	Carballeira & Sepulveda, 1992
2-OMe-6-16:1	*Callyspongia fallax*	0,6	Carballeira & Pagán, 2001
	Spheciospongia cuspidifera	4,0	Carballeira *et al*., 1992a
2-OMe-6-17:1	*Spheciospongia cuspidifera*		Carballeira & Alicea, 2002
2-OMe-6-18:1	*Spheciospongia cuspidifera*		Carballeira & Alicea, 2002
2-OMe-16-23:1	*Higginsia tethyoides*	< 0,5	Ayanoglu *et al*., 1983b
2-OMe-17-24:1	*Higginsia tethyoides*	1,9	Ayanoglu *et al*., 1983b
2-OMe-18-25:1	*Higginsia tethyoides*	0,5	Ayanoglu *et al*., 1983b
2-OMe-19-26:1	*Higginsia tethyoides*	1,3	Ayanoglu *et al*., 1983b
2-OMe-5,9-26:2	*Topsentia roquensis*	3,0	Carballeira *et al*., 1992a

[11] Ces mêmes acides, avec des pourcentages comparables ont été retrouvés dans la même éponge récoltée dix ans après les premières mesures (Barnathan *et al*., résultats non publiés).

2-OMe-5,19-26:2	*Higginsia tethyoides*	2,7	Ayanoglu *et al*., 1983b
2-OMe-20-27:1	*Higginsia tethyoides*	< 0,5	Ayanoglu *et al*., 1983b
2-OMe-21-28:1	*Higginsia tethyoides*	13,7	Ayanoglu *et al*., 1983b
2-OMe-7,21-28:2	*Higginsia tethyoides*	2,7	Ayanoglu *et al*., 1983b

* Les pourcentages sont exprimés par rapport à la fraction acides totaux.
** Premiers exemples connus d'acides □ -méthoxylés ramifiés.

La biosynthèse des acides 2-méthoxylés n'a pas encore été étudiée à l'aide de traceurs mais il est vraisemblable qu'ils proviennent des acides 2-hydroxylés correspondants. Cependant, l'espèce *Callyspongia fallax* est actuellement la seule à contenir ces deux catégories d'acides.

B-4.1.3. Acides 2-acétoxylés

Les acides 2-acétoxy sont particulièrement rares et n'ont actuellement été mis en évidence que dans une seule espèce, *Polymastia gleneni*[12]. Ces acides forment également une série homologue de dérivés saturés de C_{22} à C_{30}. Comme pour les acides □ -méthoxylés, ces 2-acétoxy acides à longues chaînes pourraient provenir des 2-hydroxyacides correspondants (Ayanoglu *et al*., 1985).

Tableau 15. 2-Acétoxyacides de *Polymastia gleneni**

Acides	%	Acides	%	Acides	%
2-OAc-22:0	13,4	2-OAc-25:0	16,5	2-OAc-28:0	0,4
2-OAc-23:0	13,9	2-OAc-26:0	7,5	2-OAc-29:0	1,1
2-OAc-24:0	45,1	2-OAc-27:0	0,6	2-OAc-30:0	0,7

*Les valeurs indiquées sont les pourcentages relatifs dans la fraction 2-acétoxy acides.

B-4.2. Acides 3-*O*-substitués

Actuellement, les acides gras 3-hydroxylés des phospholipides sont très rarement rencontrés dans les éponges, les seuls exemples connus concernent les espèces *Tethya aurantia* (Zimmerman *et al*., 1990) et *Prosuberites* sp. (Barnathan *et al*., 1993b). Tous ces acides sont saturés avec des condensations en carbone égales à 12, 14, 15, 16 et 18 pour *Prosuberites* sp. et uniquement l'acide 3-OH-15:0 pour *Tethya aurantia*. Tous ces acides sont présents avec des pourcentages compris entre 0,1 et 0,6% de la fraction acide totale, ce qui pourrait confirmer leur origine bactérienne.

B-5. Origines des acides gras des phospholipides des éponges

B-5.1. Généralités et biosynthèses

Les éponges marines sont les sources des plusieurs types d'acides gras de phospholipides inhabituels C_{24}-C_{30} (Litchfield *et al*., 1980 ; Gillan *et al.*, 1988 ; Zimmerman *et al*., 1989 ; Carballeira & Shalabi, 1990 ; Carballeira & Reyes, 1990a ; Barnathan *et al*., 1992). Litchfield et son équipe ont observé que pour la plupart des éponges, 34 à 79 % des acides gras ont de 24 à 34 atomes de carbone. Les acides gras des phospholipides d'éponges, comme les stérols, peuvent provenir : de l'éponge elle-même par biosynthèse, de microorganismes retenus par l'activité de filtration, du ou des microorganismes vivant en symbiose avec l'éponge, ou enfin d'une transformation biochimique d'acides gras d'origine exogène (Djerassi, 1981 ; Djerassi & Lam, 1991). Les Planches 2 à 8 résument les différentes voies de biosynthèse étudiées et démontrées par marquage isotopique dans les éponges.

[12] Récoltée dans l'archipel des Glénan (Bretagne sud), cette espèce a été considérée comme rarissime mais il pourrait s'agir de l'espèce *Aaptos papillata*, beaucoup plus commune, en Atlantique comme en Méditerranée.

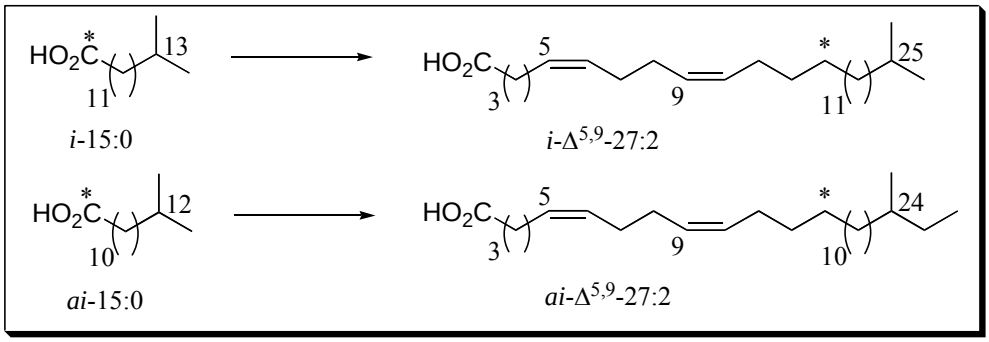


Planche 2. Allongements et désaturations successives pour les acides gras de *Jaspis stellifera* (Djerassi & Lam, 1991, Carballeira *et al.*, 1986)

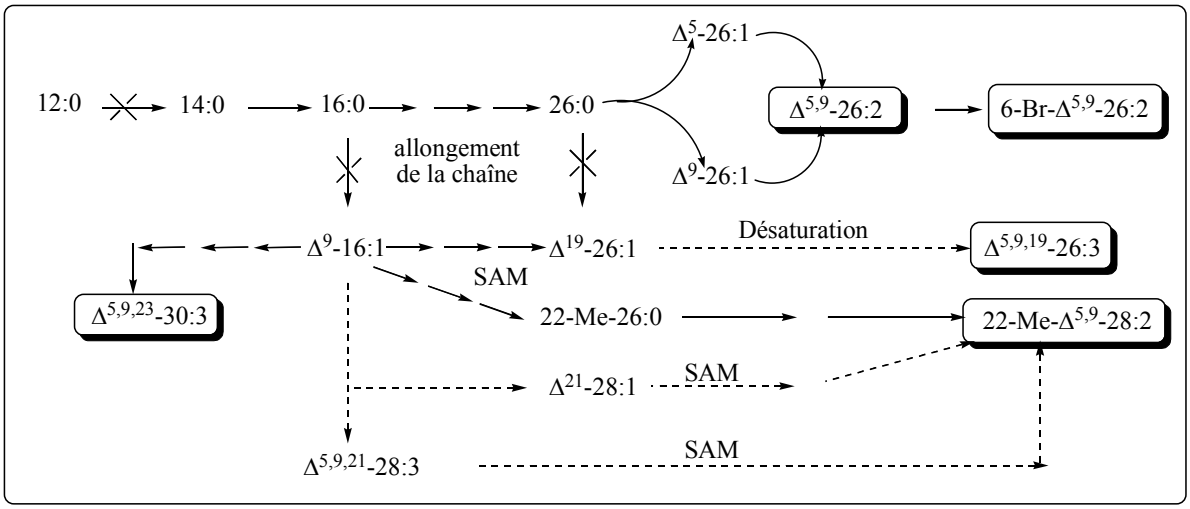


Planche 3. Biosynthèse des acides démospongiques par allongements et désaturations des chaînes chez *Microciona prolifera* et *Aplysina fistularis* (Morales & Litchfield, 1977 ; Raederstorff *et al.*, 1987 ; Hahn *et al.*, 1989 ; Lam *et al*., 1989 ; Djerassi & Lam, 1991)

Cette hypothèse confirme celle de Carballeira & Reyes en 1990, partant de la même hypothèse, pour l'origine de l'acide 23-méthyl-5,9-pentacosadiènoïque et l'acide 22-méthyl-5,9-octacosadiènoïque dans les éponges *Cribrochalina vasculum* et *Aplysina fistularis* (Walkup *et al*., 1981 ; Readerstorff *et al*., 1987 ; Carballeira & Reyes, 1990b). Il s'agit de la même voie de biosynthèse établie pour l'obtention de la 23-Me-Δ5,9-26:2 mais à partir d'un acide *iso*-15:0 jusqu'à l'obtention de l'acide gras *i*-Δ5,9-25:2 ; il en est de même pour les acides *i*-Δ5,9-26:2, *i*-Δ5,9-27:2, *ai*-Δ5,9-27:2, *i*-Δ5,9-28:2 (Walkup *et al*., 1981 ; Ayanoglu *et al*., 1982).

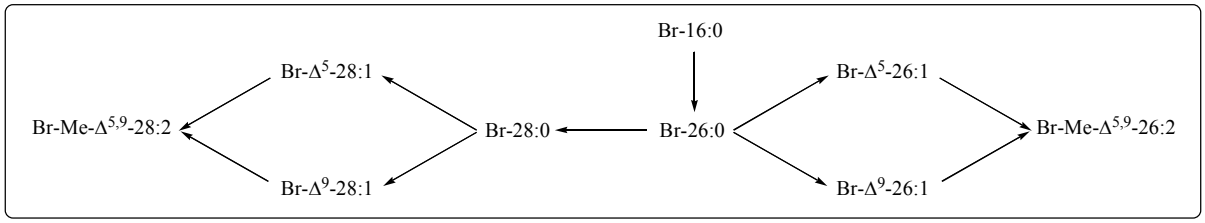


Planche 4. Hypothèses biosynthétiques pour la formation des acides gras bromés des phospholipides dans les éponges *Agelas* sp. et *Petrosia* sp. (Carballeira & Emiliano, 1993 ; Carballeira & Shalabi, 1993)

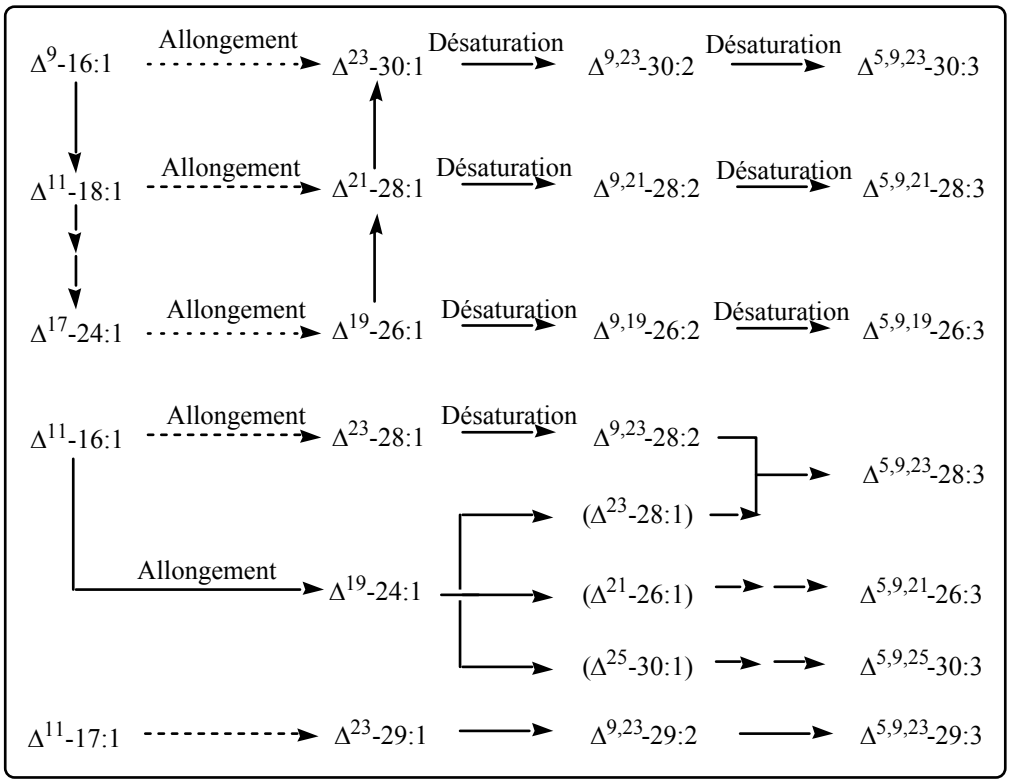


Planche 5. Biosynthèse des acides 5,9,19-hexacosatriénoïque, 5,9,21-octacosatriénoïque, 5,9,23-octacosatriénoïque, 5,9,23-triacontatriénoïque dans les éponges *Trikentrion loeve, Chondrilla nucula* et *Aplysina fistularis* (Litchfield *et al*., 1980 ; Walkup *et al*., 1981 ; Barnathan & Kornprobst, 1992 ; Barnathan *et al.*, 1996)

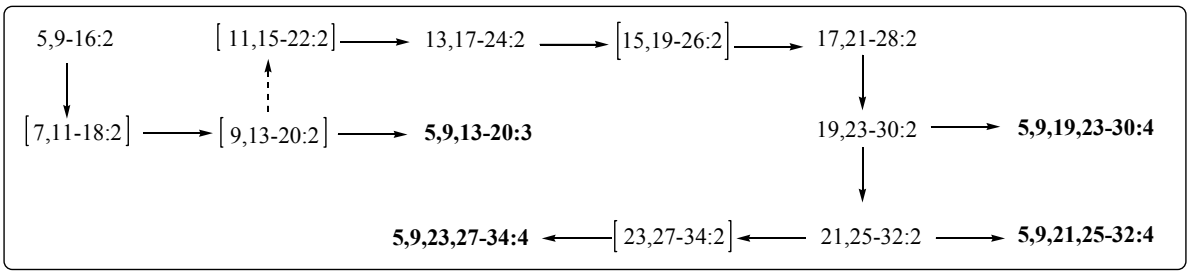


Planche 6. Hypothèses biosynthétiques pour la formation des acides di-, tri- et tétraènoïques de l'éponge *Haliclona cinerea* de la mer Noire (Joh *et al*., 1997)

Ces voies des biosynthèses des acides gras démospongiques, présentées dans les Planches 2 à 7, résument les origines des acides gras des éponges marines. A partir de cela nous pouvons donc déduire les différentes voies des biosynthèses des autres acides gras des éponges. L'origine de l'acide $\Delta^{5,9}$-29:2 (5,9-nonacosadiènoïque), identifié par Carballeira et son équipe dans les éponges *Chondrosia reniformis* et *Myrmekioderma styx* en 1993, a été postulée à partir de l'acide br-17:0 selon l'hypothèse décrite par Djerassi & Lam en 1991 (Carballeira *et al*., 1993).

B-5.2. Acides gras des phospholipides d'origine alimentaire et symbiotique

Les acides gras provenant des autres organismes marins représentent en général des petites quantités dans les éponges, mais il est important de connaître leurs origines pour des raisons taxonomiques. Les planches suivantes rappellent les hypothèses biogénétiques justifiant l'observation de ces acides dans les éponges.

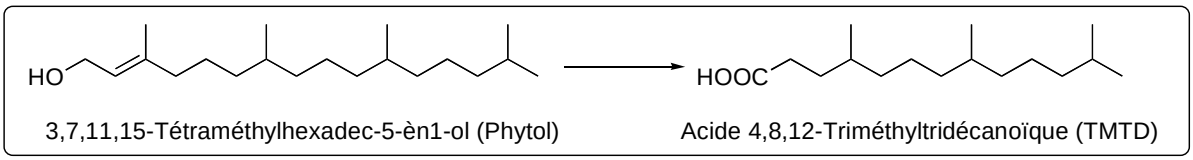


Planche 7. Biosynthèse de l'acide 4,8,12-triméthyltridécanoïque de l'éponge *Pseudaxinyssa* sp. à partir du phytol (tétraméthylhexadéc-5-èn-1-ol, Gillan *et al*., 1988 ; Barnathan *et al*., 1993a)

B-6. Activités biologiques des acides Δ5,9

L'acide 5*Z*,9*Z*-16:2 inhibe la topoisomérase-I humaine à la différence des acides n-16:0 et 5,9-hexadécadiènoïque inactifs. Cela montre que le système Δ5,9 joue un rôle essentiel pour cette activité. L'acide 5*Z*,9*Z*-16:2 exerce une activité antibactérienne contre des bactéries Gram-positif mais pas contre des Gram-négatif. Cette activité antimicrobienne pourrait être due à l'inhibition de la topoisomérase (Carballeira *et al*., 2003a). Il en est de même pour l'acide isomère 14-Me-5*Z*,9*Z*-15:2 (Carballeira *et al*., 2004). L'éponge *Geodinella robusta* s'est avérée très intéressante parce qu'elle contient un taux élevé très inhabituel d'acides gras libres, et surtout de la série Δ5,9, y compris le rare acide *anteiso*-5,9-24:2 (19.5% de la fraction acides gras libres) et le nouveau composé *iso*-5,9-24:2 (30%). Des mélanges de ces derniers acides ont montré une activité cytotoxique contre les cellules du carcinome d'Ehrlich chez la souris (Makarieva *et al.*, 2002). L'ester méthylique de l'acide 5,9,23-triacontatriènoïque, récemment isolé à l'état naturel par fractionnement biodirigé de l'éponge marine *Chondrilla nucula,* est un inhibiteur de l'élastase avec des potentialités thérapeutiques contre certaines maladies comme l'emphysème pulmonaire et la bronchite chronique (Meyer & Guyot, 2002). L'acide démospongique 5,9,21-30:3 a été caractérisé comme inhibiteur de l' ADN-topo-isomérase (Nemoto *et al*., 1997).

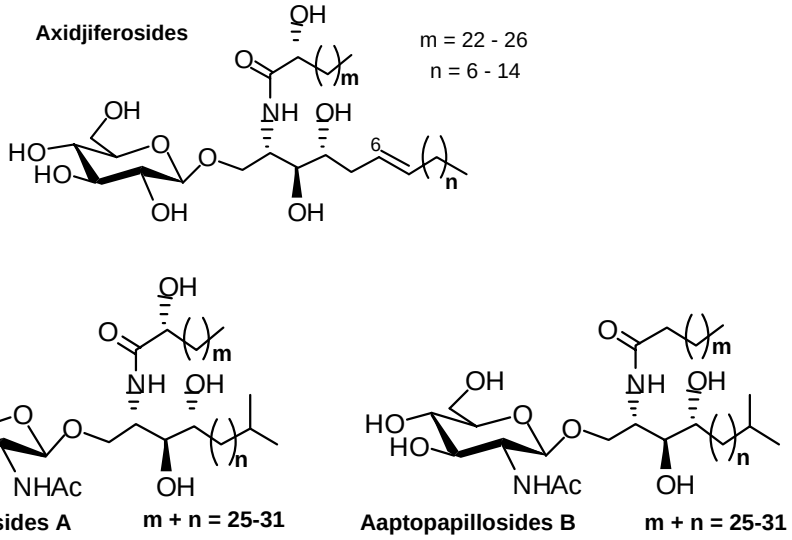
Parmi les derives 2-*O*-substitués, l'acide 2-méthoxy-13-methyltétradécanoïque est cytotoxique pour les leucémies humaines K-562, U-937, et HL-60 (Carballeira *et al*., 2003b).

Les acides gras bromés des invertébrés marins ont fait l'objet d'une mise au point (Carballeira, 1997). Et une mise au point complète a examiné plus généralement les acides gras halogénés des algues et des invertébrés marins (Dembitsky & Srebnik, 2002). Parmi les travaux récents, les acides 6-bromo-5,9,24-27:3 et 6-bromo-5,9,24-28:3 ont été isolés de *Xestospongia* sp. (Li *et al.*, 1995a et b). Il faut noter que ce dernier acide gras, ainsi que l'acide 6-bromo-5,9-heptacosadiènoïque possèdent une certaine activité contre les cellules de leucémie murine L1210 et aussi contre des cellules KB de carcinome humain (Li *et al.*, 1995). Trois acides 6-bromés, dont le nouveau 6-bromo-5,9-nonacosadiènoïque, ont été isolés d'éponges du genre *Cinachyrella* (Barnathan *et al*., 2003).

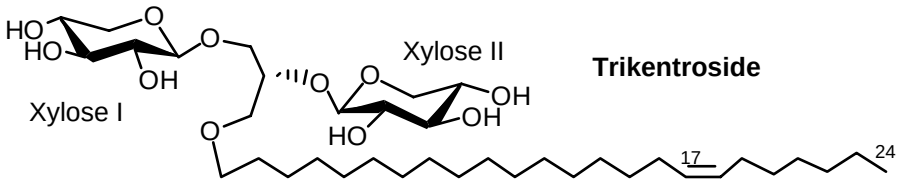
C - Les glycolipides des éponges étudiées dans cette thèse comme anti-tumoraux et antipaludiques potentiels

Depuis les années 1970, les chimistes ont étudié de nombreuses espèces d'éponges à la recherche de métabolites à activité biologique mais un très petit nombre d'espèces d'éponges ont été explorées pour leur potentiel en glycolipides intéressants. Des travaux récents confèrent aux glycolipides d'éponges un intérêt marqué en raison d'activités anti-tumorales et immunomodulatrices *in vivo* prometteuses (Natori *et al*., 1993 ; Natori *et al*., 1994 ; Morita *et al*., 1995 ; Costantino *et al*., 1997 ; Costantino *et al*., 2001). Chez les invertébrés marins, ce sont surtout des glycosphingolipides (GSL) et, pour les plus intéressants, surtout des monoglycosylcéramides (cérébrosides). C'est pourquoi notre laboratoire a entrepris d'identifier et d'évaluer les propriétés pharmacologiques des composés majeurs isolés à partir des fractions acétoniques, et nous résumerons les résultats obtenus concernant les éponges objets d'étude de ce travail.

Les glycolipides totaux d'*Axinyssa djiferi* ont montré une activité antipaludique (*Plasmodium falciparum*, CI_{50} = 3,1 µg/mL) et, parmi ces composés, les axidjiferosides (glycosyl céramides) ont une activité prometteuse (CI_{50} = 0,45 µg/mL) (Genin, 2002 ; Genin *et al.*, 2004). Les aaptosides de *Aaptos papillata* (Méditerranée) comportent, comme c'est souvent le cas, deux types de GSL différant seulement par la présence ou non d'un hydroxyle en alpha sur la chaîne acyle grasse[13]. Les aaptopapillosides présentent une légère activité contre les cellules cancéreuses humaines THP-1.

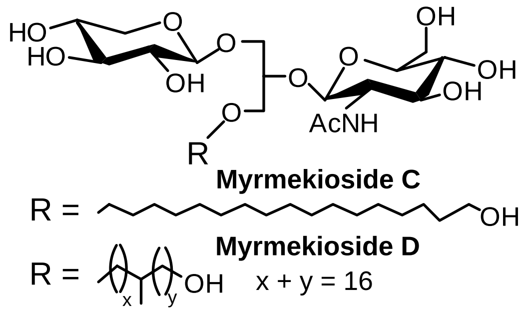


Des glycolipides originaux ont été identifiés à structure d'éthers de glycérol glycosylés à longues chaînes hydrocarbonées montrant une activité anti-tumorale. Ce type de structure rare se rencontre chez l'éponge atlantique tropicale *Trikentrion laeve* (Trikentroside) (Costantino *et al*., 1993), et chez une éponge du Pacifique Sud, *Myrmekioderma dendyi* (Myrmekiosides C et D).

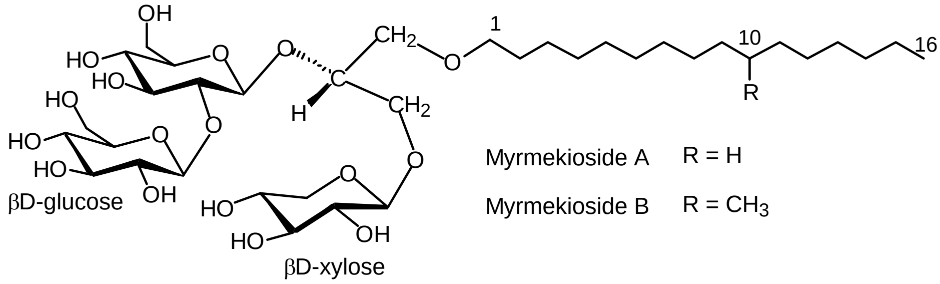


□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□

[13] Wielgosz-Collin G., Njinkoué J.M., Maillard S., Kornprobst J.M., Barnathan G. (résutats non publiés).



Evaluation du Trikentroside : cellules du cancer pulmonaire NSCLC-L16 (CI_{50} = 8,4 µg/mL) et des Myrmekiosides C et D: cellules cancéreuses humaines THP-1 (CI_{50} = 2,1 et 2,6 µg/mL). De plus, une équipe japonaise a isolé, d'une autre éponge *Myrmekioderma*, des glycolipides de structures très proches et actifs contre des cellules de mélanome humain (Aoki *et al.*, 1999).



D - Stérols

Les stérols des invertébrés marins ont été très étudiés dans les trente dernières années et ils ont été bien caractérisés. Il est désormais acquis que les structures stéroliques non conventionnelles sont plus communes chez les invertébrés les plus primitifs, et que le cholestérol est présent dans les proportions les plus élevées chez les organismes les plus avancés (Kerr & Baker, 1991 ; Baker & Kerr, 1993 ; Kanazawa, 2001).

Les éponges ont été ces trente dernières années le gisement le plus fécond de nouveaux stérols (Kanazawa, 2001) et ces découvertes sont étroitement liées aux progrès considérables des technologies d'analyse et de détermination de structures (généralisation des colonnes capillaires et augmentation considérable de la résolution, couplage CPG-SM). La ré-investigation de mélanges stéroliques d'une même éponge a pu conduire à l'identification de nouveaux stérols parfois présents en infimes quantités : stanols à chaîne latérale insaturée (84), 26-méthylcholestérol tel que l'aplystérol et le 24,28-dehydrocholestérol (De Luca *et al.*, 1972 ; De Rosa *et al.*, 1973 ; Carballeira & Shalabi, 1989), stérols à chaînes latérales cyclopropanique et cyclopropénique (Hale *et al.*, 1970 ; Djerassi & Dosss, 1990), *nor*-19 et *nor*-A sterols (Minale & Sodano, 1974a,b).

D-1. Stérols conventionnels

Il est convenu de considérer comme conventionnels les stérols possédant le système tétracyclique Δ5 du cholestérol (3β-OH) et une chaîne latérale ayant au plus deux atomes de carbone supplémentaires, soit un total de 27 à 29 atomes de carbone. Quelques variations sur le nombre et la position des doubles liaisons dans le système cyclique et la chaîne latérale sont néanmoins observées, les plus communes étant Δ0, Δ5, Δ7, Δ5,7, Δ5,22. Ces stérols conventionnels peuvent avoir une triple origine : la synthèse *de novo* par l'éponge selon la voie mévalonique et à partir du squalène, l'apport résultant de l'activité de filtration (circuit alimentaire) avec ou sans modification ultérieure par l'éponge, ou enfin le résultat d'une véritable symbiose avec un microorganisme, le stérol étant produit *de novo* par le symbiote qui peut être un microorganisme

photosynthétique, un champignon, un cilié… (Goad, 1978 ; Djerassi, 1981). La synthèse *de novo* de stérols par les éponges représente environ 70 % des stérols totaux, le reste étant apporté par le régime alimentaire (Silva *et al*., 1991 ; Silva & Djerassi, 1992). Les principaux stérols conventionnels sont regroupés dans la Planche 8.

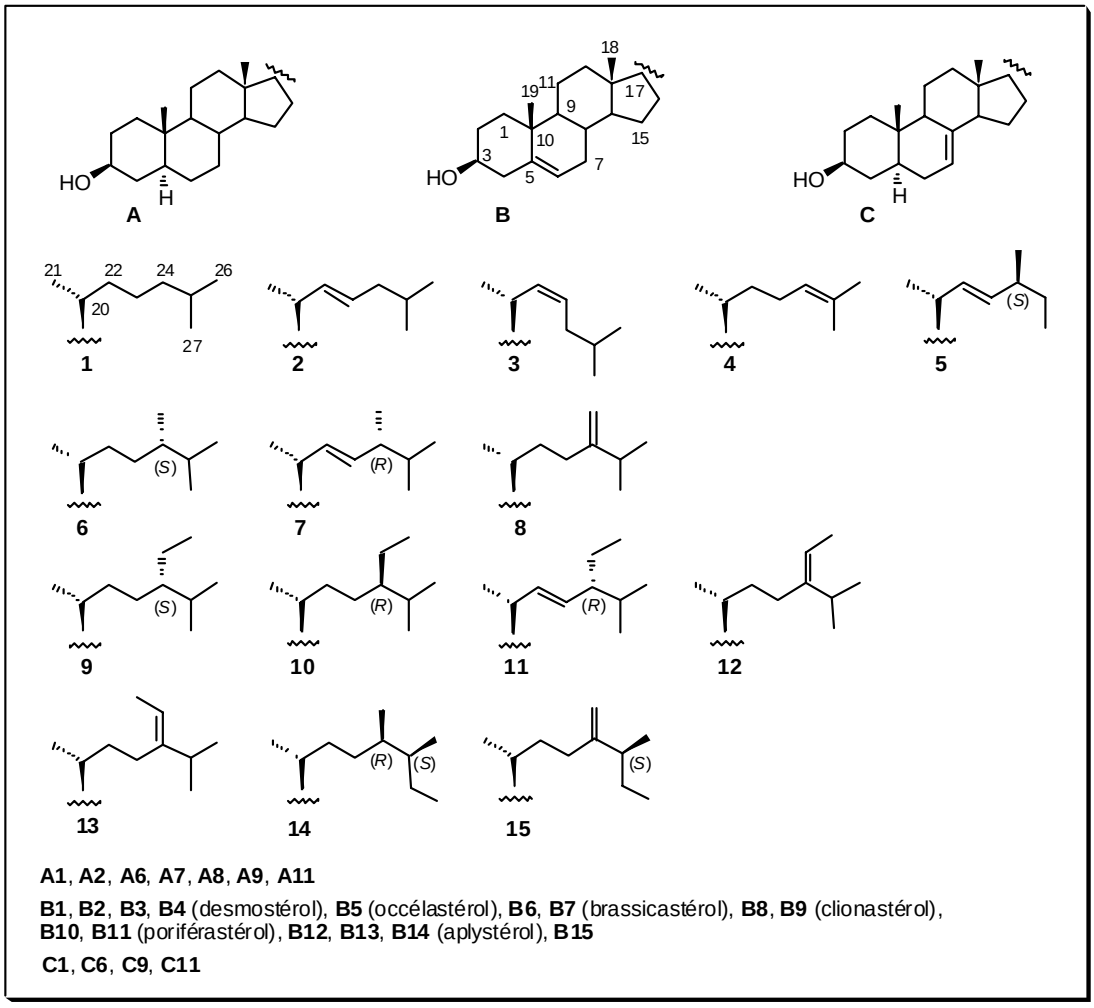


Planche 8. Principaux stérols conventionnels rencontrés dans les Démosponges

D-2. *nor*-19 et *nor*-A stérols, *nor*-A stanols

Les stérols non conventionnels sont un des aspects les plus fascinants de la chimie des Démosponges, à la fois par leur nombre, qui est de l'ordre de la centaine, par leurs structures, par leurs biosynthèse, et surtout par leurs fonctions au sein des membranes cellulaires. Ces stérols non conventionnels se répartissent en deux sous-ensembles distincts : ceux qui résultent d'une modification du système tétracyclique mais qui conservent en général des chaînes latérales « classiques », et ceux qui présentent des chaînes latérales modifiées en conservant le plus souvent un système tétracyclique « normal ». Quelques stérols présentent cependant les deux types de modification. Il se distingue ainsi deux groupes principaux de stérols à « cycles modifiés » : celui des *nor*-19 stanols et celui des *nor*-A stanols dans lesquels est observée soit la perte du méthyle en 19, soit une régression du cycle A en méthylcyclopentane. Un des aspects les plus frappants de ces stérols est qu'ils proviennent presque exclusivement d'espèces de la famille des Axinellidae (Minale & Sodano, 1974a, b). Quelques exemples de ces stérols atypiques sont présentés dans les Planches 9 et 10.

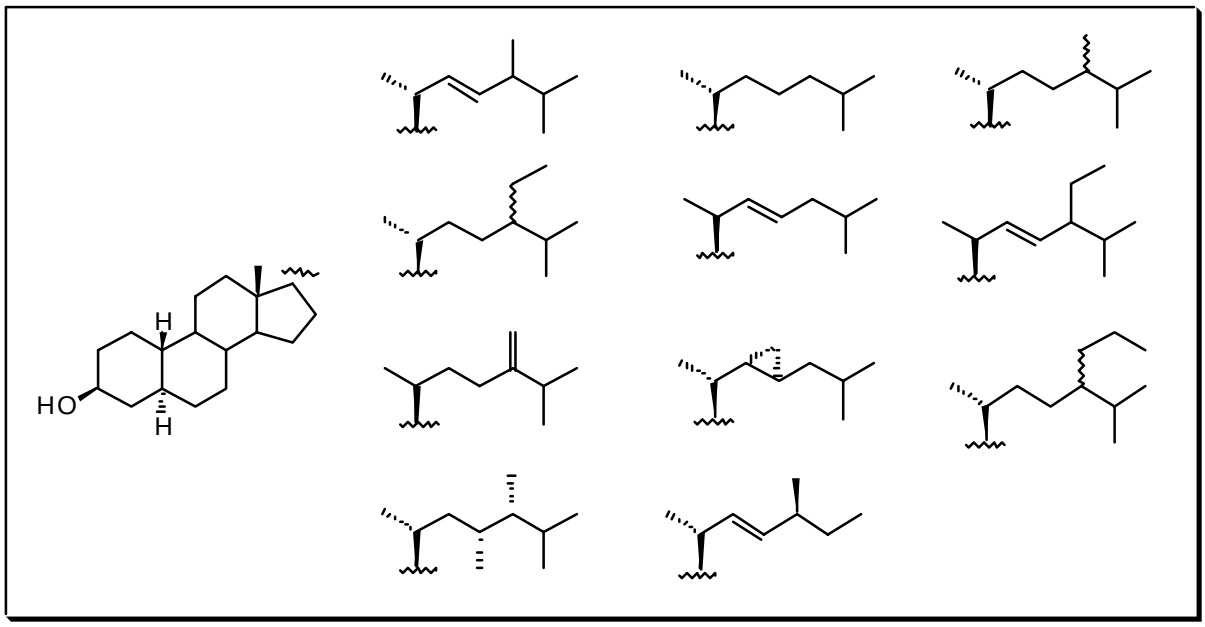


Planche 9. *nor*-19 stanols d'*Axinella polypoides*

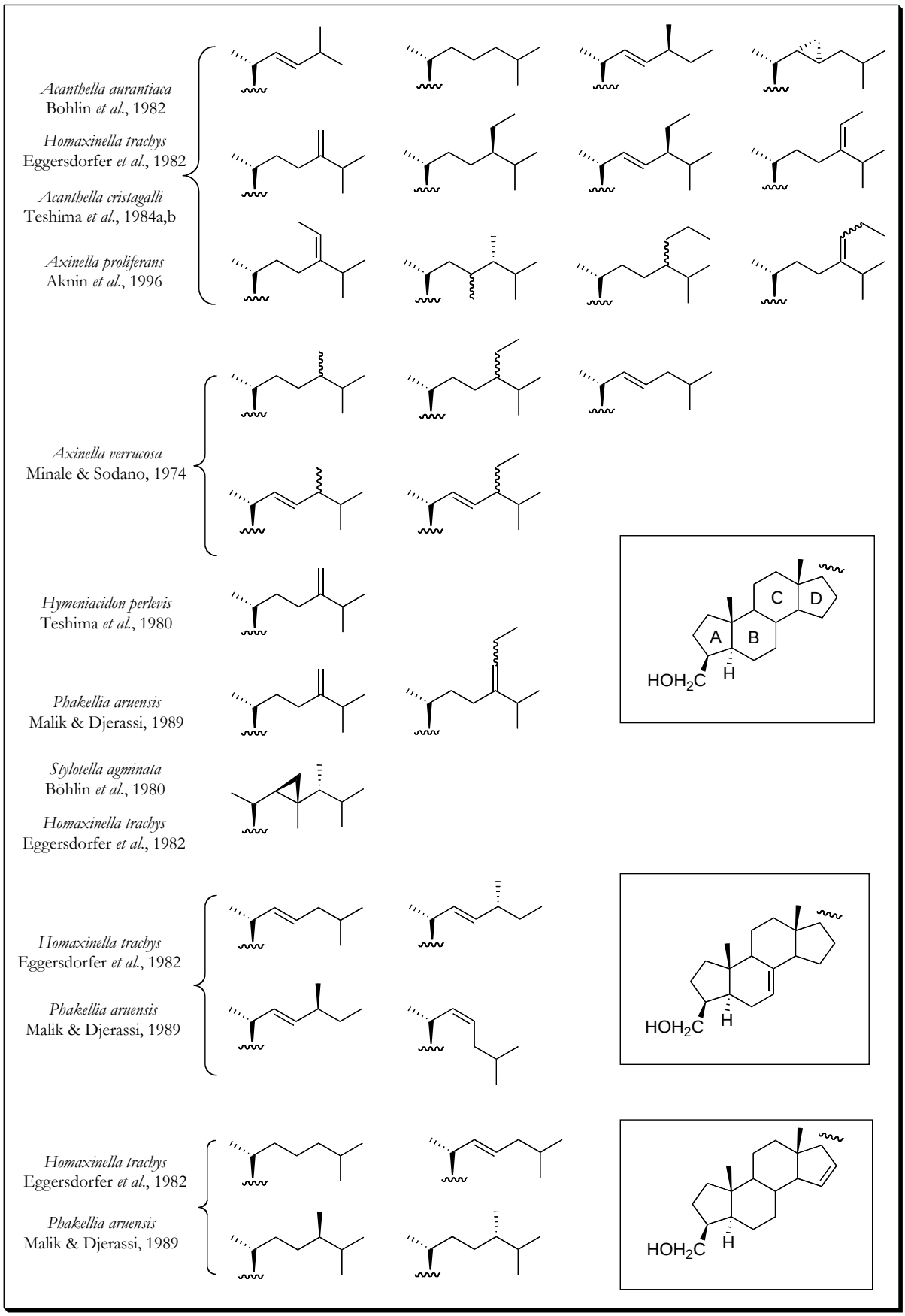


Planche 10. Exemples de *nor*-A stanols et stérols (d'après Kornprobst, 2005)

D-3. Biosynthèses des stérols

A la fin des années 1940, Bergman a mis en évidence l'existence des différentes variétés des stérols dans les éponges marines (Bergmann & Feeney, 1949 ; Bergmann, 1962). Depuis, de nombreuses équipes ont travaillé sur les stérols des éponges pour trouver des nouvelles structures des stérols afin de comprendre leurs origines et leur intérêt taxonomique car leurs présences peuvent être utilisées pour la classification de certaines éponges (classes, genres ou espèces) (Djerassi & Silva, 1991 ; Kerr & Baker, 1991 ; Aiello *et al*., 1999).

Le *nor*-19 cholestérol est un stérol actuellement unique qui n'a été caractérisé que dans une seule espèce, *Axinella polypoides*, par l'équipe de Minale en 1975 (De Rosa *et al*., 1975a ; Minale *et al*., 1979). Dès 1975, il était acquis que la biosynthèse du *nor*-19-cholestanol se faisait à partir du cholestérol (De Rosa *et al*., 1975a ; Minale *et al*., 1979), mais l'utilisation de cholestérol marqué au tritium sur la position 3□□ et au carbone 14 en C-4 a permis d'établir que cette biosynthèse résultait de la décarboxylation de l'acide □4-3-céto-19-carboxylique (Rabinowitz & Djerassi, 1992). Les étapes de cette biosynthèse sont résumées dans la Planche 11.

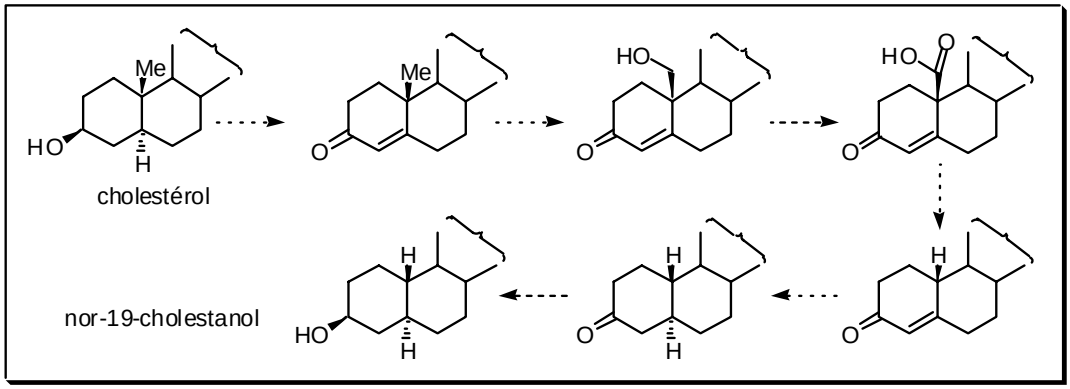


Planche 11. Biosynthèse du *nor*-19 cholestanol par *Axinella polypoides*

La biosynthèse des *nor*-A stérols et *nor*-A stanols reste encore mal connue, mais des expériences réalisées à l'aide de traceurs ont montré que la réduction du cycle A impliquait un intermédiaire 3-céto-Δ4,5. Quant à la formation de la double liaison en 15-16, elle se forme après la réduction du cycle A (De Rosa *et al*., 1975b, 1976 ; Bibolino *et al*., 1978 ; De Stefano & Sodano, 1980 ; Malik *et al*., 1988a, Malik & Djerassi, 1989 ; Djerassi & Silva, 1991). Ces étapes sont résumées sur la Planche 12 dans laquelle C.L. désigne une chaîne latérale « classique » des stérols.

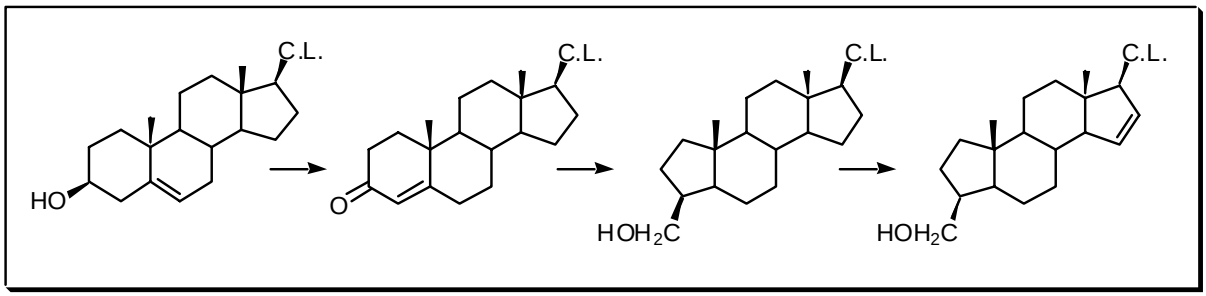


Planche 12 . Biosynthèse des *nor*-A stanols et Δ15-*nor*-A stérols

En plus des stérols conventionnels en Δ5, les éponges contiennent également des stérols Δ7 et Δ5,7 mais la majorité des stérols d'éponges sont Δ5 et bien que plusieurs exemples de stérols Δ7 soient connus, les stérols Δ5,7 sont beaucoup plus rares (Planche 13). C'est surtout dans le phylum des Echinodermes que les stérols Δ7 et Δ5,7 sont présents et leur biosynthèse a été étudiée par l'équipe de Djerassi sur des holothuries. Il est permis de supposer que ces mécanismes de biosynthèse sont les mêmes chez les éponges (Cordeiro *et al*., 1988 ; Cordeiro & Djerassi, 1990) mais il a été démontré que ces biosynthèses se font à partir du lanostérol dont la présence est fréquente chez les holothuries mais

qui ne semble pas encore avoir été identifié dans une éponge (Planche 14). La transformation des stérols Δ7 en Δ5,7 passe probablement par les epidi-5,8-oxystérols (Catalan *et al.*, 1985).

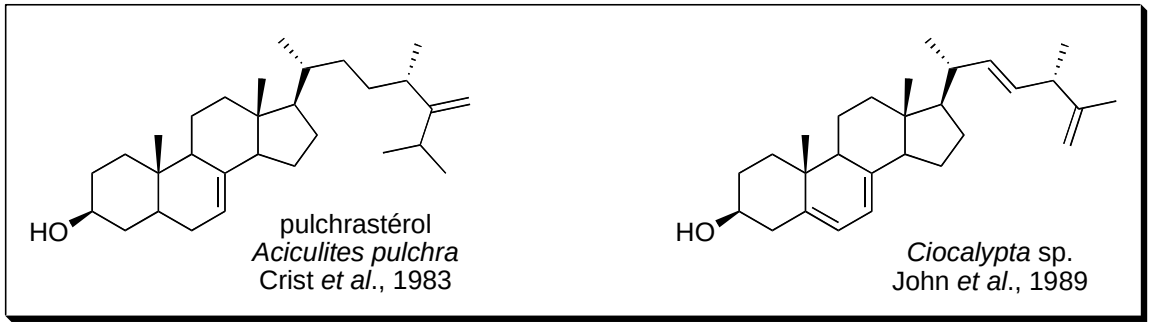


Planche 13. Exemples de stérols Δ7 et Δ5,7 isolés d'éponges

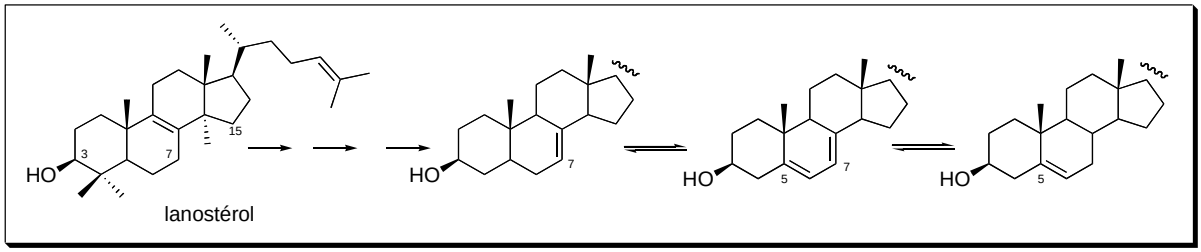


Planche 14. Biosynthèse des 7-déhydro et 5,7-didéhydrostérols chez les holothuries

En général, le profil stérolique des animaux est maintenu sensiblement constant par diverses voies : assimilation des stérols à partir des aliments et des organismes symbiotiques, biosynthèse *de novo*, bioconversion des stérols alimentaires (Goad, 1978). Il y a deux types fondamentaux de bioconversion : alkylation et désalkylation. Seule la première bioconversion intervient habituellement chez les invertébrés marins (Kerr *et al.*, 1992).

Il a été démontré par l'équipe de Djerassi (Kokke *et al.*, 1984) que les polyméthylations des chaînes latérales sont réalisées par des transferts successifs du groupe méthyle de la *S*-adénosylméthionine (SAM). Ces réactions sont schématisées dans la Planche 15 à partir du desmostérol.

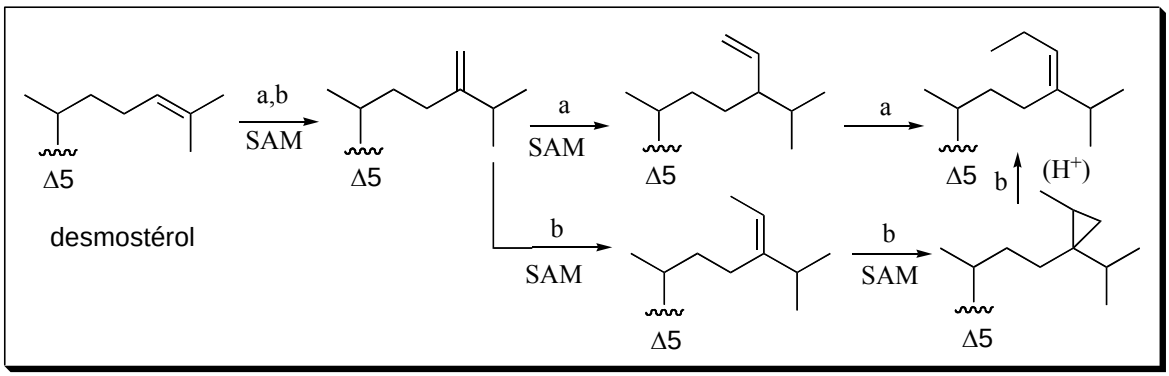


Planche 15. Deux voies possibles de conversion du desmostérol (cholesta-5,24-dièn-3β-ol) en 24(*E*)-propylidènecholestérol (SAM) (Zimmerman & Djerassi, 1991)

Dans les années 1970, quelques équipes de chercheurs ont démontré que certains mollusques (Collignon-Thiennot *et al.*, 1973 ; Khalil & Idler, 1976 ; Teshima *et al.*, 1979) et crustacés (Teshima & Kanazawa, 1971 ; Kanazawa *et al.*, 1976) sont capables de déalkyler les chaînes latérales des stérols (Planche 16). De telles déalkylations ont été démontrées chez les éponges

Phakellia aruensis et *Axinella verrucosa* conduisant ainsi à des stérols en C_{27} et en C_{26} (Planche 16, Malik *et al*., 1988 ; Kerr *et al*., 1990 et 1992).

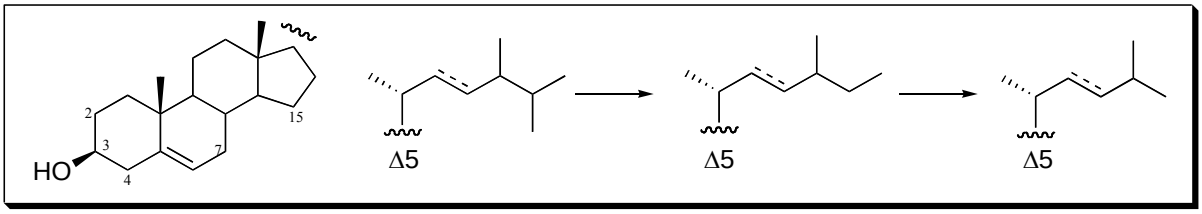


Planche 16. Déalkylation des chaînes latérales : biosynthèse des *nor*-ergostanes (C_{27}) et des 24-*nor* stérols (C_{26}) à partir de stérols conventionnels

D-4. Propriétés biologiques des stérols

Le clionastérol, le β-sitostérol (son épimère en C-24), et l'acétate de clionastérol ont été testés *in vitro* pour leur influence sur la voie classique, et sur la voie alternative, d'activation du système immunologique du complément chez l'homme. Ils sont actifs sur la voie classique seulement. Le clionastérol est considéré comme un inhibiteur efficace de la voie classique (CI_{50} = 4,1 μM), dix fois plus que le β-sitostérol. L'acétylation entraîne une décroissance de l'activité d'un facteur vingt (Cerqueira *et al*., 2003).

Les oestrogènes et leurs dérivés sont connus pour être également des hypocholestérolémiants, cependant les utilisations cliniques sont souvent rendues difficiles à cause de leurs effets secondaires en tant qu'hormones sexuelles. C'est pourquoi de nombreux travaux sont consacrés à la recherche d'hypocholestérolémiants dépourvus d'action hormonale, ce qui est le cas de plusieurs stérols d'origine marine comme le méthylène-24-cholestérol ou le Δ7-cholestérol. Ces deux stérols, isolés de mollusques, réduisent de façon significative le taux de cholestérol dans le sérum sanguin et le foie de rat (Teshima *et al*., 1974). D'autres stérols possèdent d'intéressantes propriétés biologiques : ainsi, certains stanols polyhydroxylés des Cnidaires possèdent des propriétés cytotoxiques (Datta *et al*., 1990), plusieurs stérols sulfatés d'éponges sont antiviraux pour le virus du SIDA (McKee *et al*., 1993, 1994), et de nombreux séco-stérols sont anti-inflammatoires, antiprolifératifs et antiviraux (Sica & Musumeci, 2004).

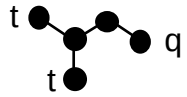
D'une manière générale, il est admis que les phytostérols, proches du cholestérol mais non produits par les animaux et par l'homme, possèdent la propriété d'abaisser le taux de cholestérol dans le sang, réduisant ainsi le risque de maladie cardiovasculaire (Kerr et Baker, 1991 ; Pioronen *et al*., 2000 ;): porifférastérol (éponges), gorgostérol (gorgones, coraux), isofucostérol (algues vertes), stérols conjugués (échinodermes). Des espèces fongiques, des algues, des cyanobactéries contiennent ainsi de nombreux stérols tels que fucostérol, sitostérol ou ergostérol. Il est admis également que la présence de ces stérols dans les microalgues détermine assez largement leur intérêt nutritif (Volkman, 2003).

E - Les Terpènes[14]

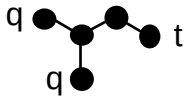
[14] Cette partie de l'introduction a bénéficié des informations prises dans Kornprobst, 2005.

E-1. Généralités

Rappelons que l'unité isoprénique est traditionnellement représentée selon le schéma ci-dessous, avec deux « têtes » et une « queue » bien que certains auteurs adoptent la convention inverse (1 « tête » et 2 « queues »).



Convention couramment utilisée



Convention moins souvent utilisée

Les terpènes, c'est-à-dire tous les composés formés à partir d'unités isopréniques, sont très nombreux dans la nature, leur nombre est estimé à environ 30 000 (Sacchettini & Poulter, 1997 ; Dewick, 2002). Les terpènes restent définis comme produits du métabolisme du diphosphate (ex-pyrophosphate) d'isopentényle, lequel provient de l'acétylcoenzyme-A par une voie métabolique qui a été étudiée avec beaucoup de détails, la voie de l'acide mévalonique. Cette définition est devenue ambiguë depuis 1988, date à laquelle l'équipe de Rohmer a démontré qu'une autre voie de biosynthèse des unités isopréniques biologiques, le diphosphate (ex-pyrophosphate) d'isopentényle (IPP) et le diphosphate (ex-pyrophosphate) de diméthylallyle (DMAPP), était réalisée par certaines Eubactéries à partir d'acide pyruvique et de D-glycéraldéhyde-3-phosphate. La condensation de ces deux précurseurs avec perte d'une molécule de dioxyde de carbone conduit à un intermédiaire à cinq atomes de carbone, le 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP ou DOXP). Ce dernier se transforme ultérieurement en un autre dérivé à 5 carbones, le 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (MEP) qui donnera finalement le pyrophosphate d'isopentényle. Cette nouvelle voie de biosynthèse des terpènes a ainsi été résumée par le sigle DXP/MEP ou encore DOXP/MEP (Dubey *et al*., 2003).

Durant la dernière décennie, cette nouvelle voie biosynthétique a été intensivement étudiée et il est maintenant établi qu'elle ne se limite pas aux Eubactéries (Gram-positif et Gram-négatif) mais qu'elle intervient également pour de nombreux organismes Eucaryotes, monocellulaires et pluricellulaires (Champignons, Plantes, et certains Protozoaires comme *Plasmodium falciparum*, l'agent du paludisme). Plusieurs articles de mise au point sur ces deux voies de biosynthèse des terpènes ont été publiés, en particulier Bochar *et al.*, 1999 ; Rohmer, 1999 ; Dubey *et al*., 2003 et les principaux aspects de ces biosynthèses sont brièvement résumées dans la Planche 17.

Traditionnellement, les terpènes se répartissent en « classes » en fonction du nombre d'unités isopréniques incluses dans leur squelette carboné : monoterpènes, (2 unités, 10 carbones), sesquiterpènes (3 unités, 15 carbones), diterpènes (4 unités, 20 carbones), sesterterpènes (5 unités, 25 carbones), et triterpènes (6 unités, 30 carbones). Parmi les organismes marins, et en particulier pour les Démosponges, toutes les classes de terpènes sont représentées et possèdent souvent des groupes fonctionnels inhabituels contenant de l'azote et/ou du soufre. Comme il n'est pas question ici de présenter toutes les classes de terpènes rencontrées dans les différents ordres de Démosponges, nous nous limiterons à une présentation sélective des principaux terpènes isolés de Démosponges appartenant aux ordres étudiés dans le cadre de cette thèse.

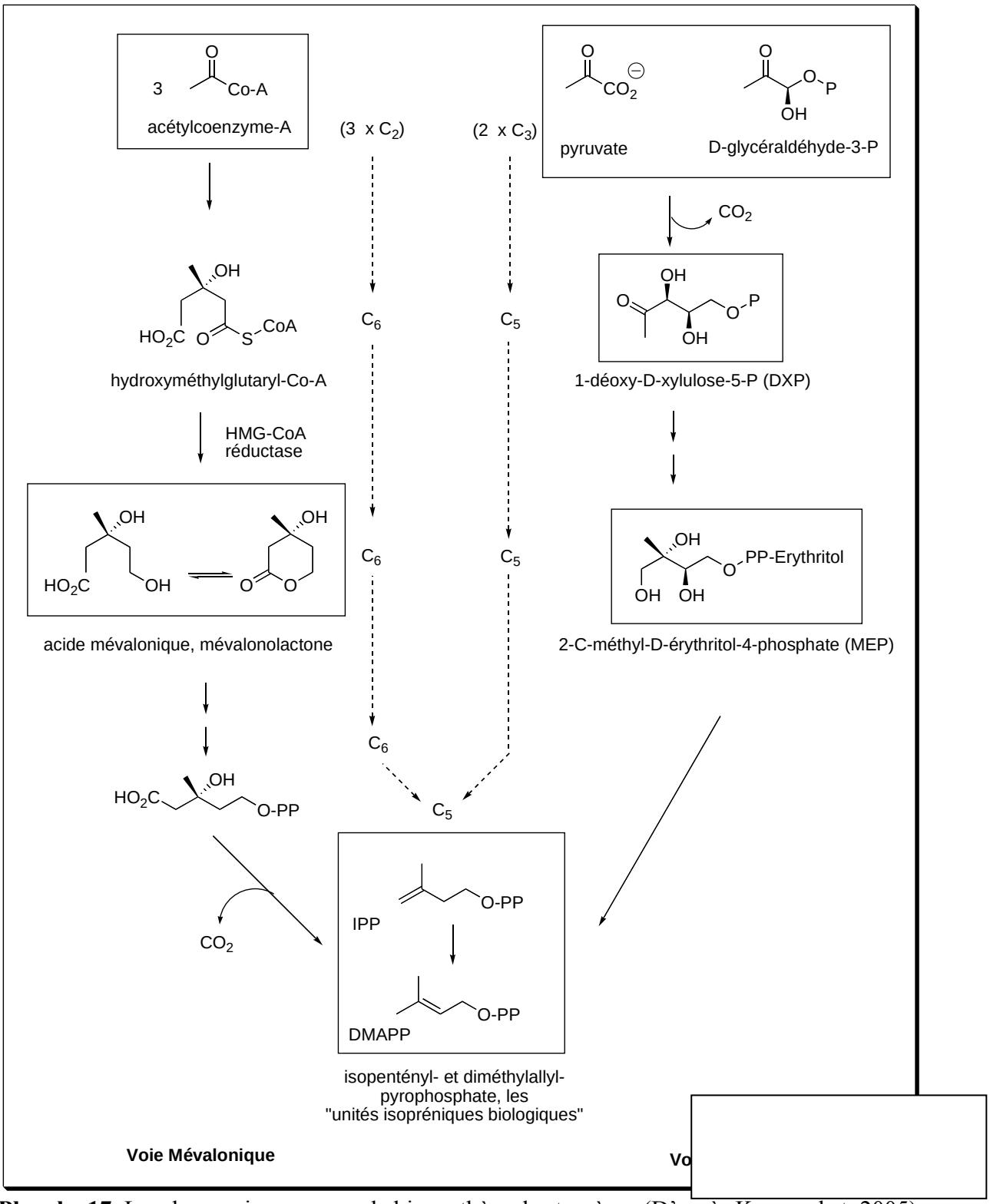
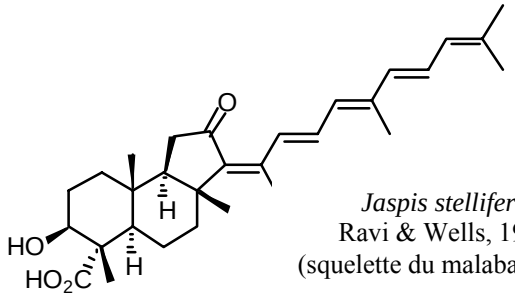


Planche 17. Les deux voies connues de biosynthèse des terpènes (D'après Kornprobst, 2005)

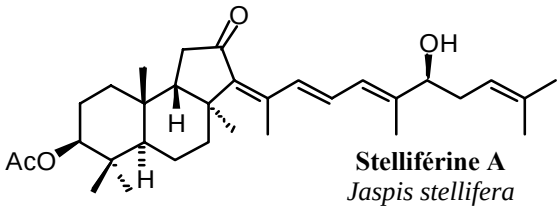
E-2. Exemples de terpènes selon l'ordre des Démosponges étudiées dans cette thèse

E-2.1. Exemples de terpènes des Astrophorida

Cet ordre se caractérise par la présence de triterpènes du malabaricane et de l'iso-malabaricane dans les espèces des genres *Jaspis*, *Rhabdastrella*, et *Stelletta*, et de sesquiterpènes et de *nor*-sesquiterpènes azotés dans les espèces du genre *Poeciloastra* et *Stelletta*. Aucun de ces terpènes n'est porteur d'halogènes.



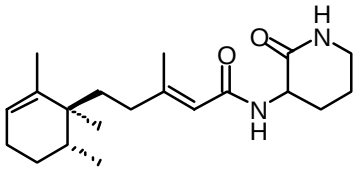
Jaspis stellifera
Ravi & Wells, 1982
(squelette du malabaricane)



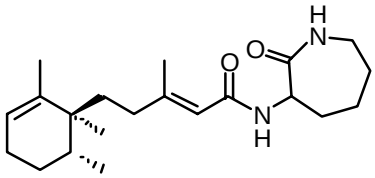
Stelliférine A
Jaspis stellifera
Tsuda *et al*, 1991
(squelette de l'isomalabaricane)

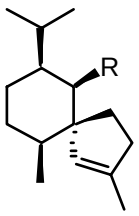
Les deux sesquiterpènes azotés suivants ont été extraits de *Poecillastra sollasi* une éponge profonde des Caraïbes. Les structures irrégulières sont atypiques et leur origine pose le problème de la biosynthèse des terpènes à des profondeurs où la photosynthèse est absente (Killday *et al*., 1993). Ces terpènes sont accompagnés de structures équivalentes non azotées.

L'exiguamide est un aminospirosesquiterpène isolé de *Geodia exigua* qui inhibe le développement des œufs d'oursins (Uy *et al*., 2002). Plusieurs autres dérivés spiro apparentés contenant des groupes azotés, comme l'exicarbamate, l'exigurine et le 10-*epi*-axisonitrile-3 ont été identifiés l'année suivante dans cette même espèce (Uy *et al*., 2003).



Poecillastra sollasi
Killday *et al*., 1993

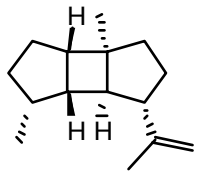




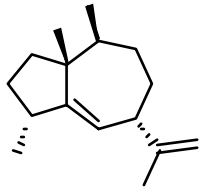
Exiguamide (R = NHCHO)
Exicarbamate (R = $NHCO_2Me$)
Exigurine (R = $NHCOCH_2NMeCO_2Me$
10-*epi*-Axisonitrile-3 (R = NC)
Geodia exigua
Uy *et al*., 2002, 2003

E-2.2. Exemples de terpènes des Halichondrida

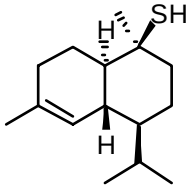
Une des observations importantes concernant l'ordre Halichondrida est l'abondance de terpènes, des sesquiterpènes aux squalénoïdes et aux caroténoïdes aromatiques et, afin d'en clarifier la présentation, nous distinguerons les terpènes conventionnels non azotés des terpènes azotés porteurs des groupes rares isonitrile, isothiocyano, *N*-formylamino qui sont spécifiques de la famille des Axinellidae et de quelques espèces d'Halichondriidae. Ces terpènes conventionnels possèdent le plus souvent des squelettes carbonés connus et les dérivés halogénés sont limités aux dichlorocarbonimides et à quelques chlorhydrines. Les processus de cyclisation induits par des haloperoxidases (ions bromonium) semblent donc absents.



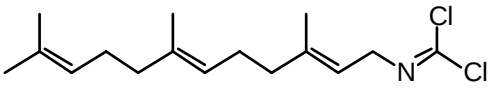
Préspatane
Cymbastela hooperi
König & Wright 1997
(squelette du spatane)



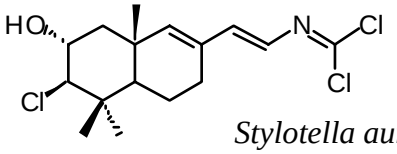
épi-γ-Gurjunène
Cymbastela hooperi
König & Wright 1997
(squelette du guaiane)



T-Cadinthiol
Cymbastela hooperi
König & Wright 1997
(squelette du cadinane)

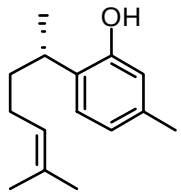


Stylotellane A
Stylotella aurantium
Simpson *et al*., 1997

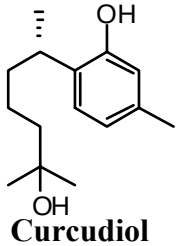


Stylotella aurantium
Musman *et al*., 2001

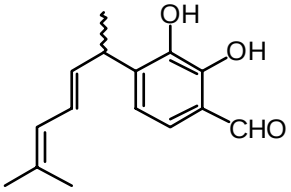
Les familles des Desmoxyidae et des Halichondriidae produisent des sesquiterpènes phénoliques de la famille du bisabolane comme le curcuphénol et le curcudiol qui ont été isolés la même année de *Didiscus flavus* (Desmoxyidae) et d'*Epipolasis* sp. (Halichondriidae) (Wright *et al*., 1987 ; Fusetani *et al*., 1987), ainsi que des dérivés bicycliques ayant le squelette du daucane.



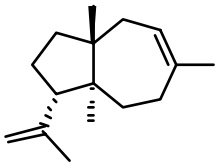
Curcuphénol
Didiscus flavus
Wright *et al*., 1987
Epipolasis sp.
Fusetani *et al*., 1987



Curcudiol
Didiscus flavus
Wright *et al*., 1987
Epipolasis sp.
Fusetani *et al*., 1987

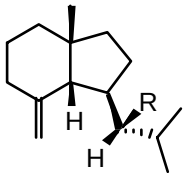


Parahigginsia sp.
Chen *et al*., 1999

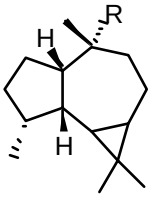


Higginsia sp.
Cassidy & Ghisalberti 1993

Depuis la découverte de l'axisonitrile et de l'axisothiocyanate en 1973 dans *Axinella cannabina* (Cafieri *et al*., 1973), le nombre de molécules portant des groupes isonitrile, isothiocyanate, et *N*-formylamino, n'a cessé d'augmenter et de nouvelles structures ont encore été publiées récemment (Clark *et al*., 2000).



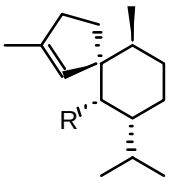
Axisonitrile-1 (R = NC)
Axisothiocyanate-1 (R = NCS)
Axamide-1 (R = NHCHO)
Axinella cannabina
Cafieri *et al*., 1973
Fattorusso *et al*., 1974, 1975



Axisonitrile-2 (R = NC)
Axisothiocyanate-2 (R = NCS)
Axamide-2 (R = NHCHO)
Axinella cannabina
Cafieri *et al*., 1973
Fattorusso *et al*., 1974, 1975

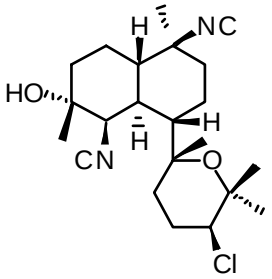
Les questions posées par la biosynthèse de ces dérivés particulièrement atypiques ont été étudiées dès le début des années 1980 et il a été démontré, par incorporation de formiate marqué au carbone 13, que les isonitriles sont formés en premier lieu et conduisent ultérieurement aux isothiocyanates et aux dérivés *N*-formylamino (Hagadone & Scheuer, 1984). Les nombreux travaux consacrés aux isonitriles et dérivés apparentés ont déjà été présentés dans au moins quatre mises au point (Edenborough & Herbert, 1988 ; Scheuer, 1992 ; Chang & Scheuer, 1993 ; Garson *et al*., 2000).

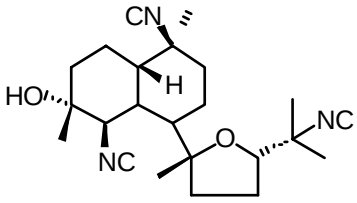
Dès 1992, avec la découverte de l'axisonitrile-3 dans l'espèce *Acanthella klethra*, il est apparu que le groupe isonitrile intervient dans le processus de détoxication de l'hème lors d'une infestation par les *Plasmodium*. Les dérivés isonitriles, en particulier sur des squelettes terpéniques, sont activement étudiés pour leurs propriétés antipaludiques et antifouling (Angerhofer *et al*., 1992 ; Chang & Scheuer, 1993 ; König *et al*., 1996 ; Miyaoka *et al*., 1998 ; Tsukamoto *et al*., 1998 ; Wright *et al*., 2001).



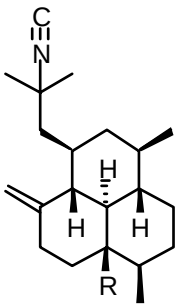
Axisonitrile-3 (R = NC)
Axisothiocyanate-3 (R = NCS)
Axinella cannabina
Di Blasio *et al*., 1976
Acanthella cavernosa
Clark *et al*., 2000

Les diterpènes substitués par des groupes isonitriles et apparentés isolés d'éponges Halichondrida proviennent actuellement des genres *Acanthella* (Axinellida) avec les kalihinols,





Axinella et *Hymeniacidon* (Halichondrida) avec quelques dérivés de l'amphilectane, de l'adociane, et du cycloamphilectane. La trentaine de dérivés du kalihinane, souvent polyfonctionnels, se répartissent en deux séries selon que l'unité isoprénique pendante est cyclisée en tétrahydropyrane (série du kalihinol-A) ou en tétrahydrofurane (série du kalihinol-F).



R = NC, NHCHO
Hymeniacidon amphilecta
Wratten *et al*., 1978

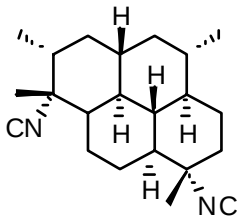
Kalihinol A
Acanthella sp.
Chang *et al*., 1984
Shimomura *et al*., 1999

Kalihinol F
Acanthella sp.
Chang *et al*., 1987

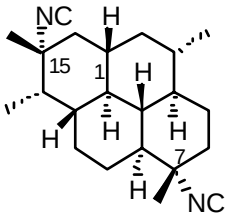
E-2.3. Exemples de terpènes des Haplosclerida

La distribution des terpènes parmi les Haplosclerida est remarquable par le fait qu'il apparaît une répartition très nette entre le type de terpène et les genres concernés, et cela pour plus d'une cinquantaine de molécules différentes. Les sesqui-, les di- et les triterpènes sont présents mais il ne semble pas que des mono ou des sesterterpènes aient encore été isolés. Les carotènes sont également présents et c'est dans une éponge du genre *Reniera* que les premiers exemples de caroténoïdes aromatiques ont été découverts (Kornprobst, 2005). Une autre observation importante est la présence des deux « groupes » de triterpènes : les squalénoïdes, très répandus en milieu terrestre et dans quelques organismes marins comme les Algues Rouges, et les dérivés hexaprénylés

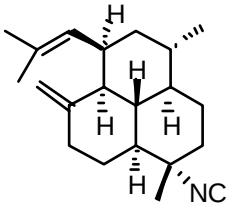
polycycliques qui sont très rares. Enfin, la présence de méroterpènes est constante et la plupart d'entre eux possèdent des groupes sulfates associés à des hydroquinones. Les diterpènes et méroditerpènes sont présents dans plusieurs genres mais trois d'entre eux : *Adocia*, *Amphimedon* et *Cribochalina* contiennent des dérivés isonitrile et isothiocyanate analogues à ceux isolés des éponges Halichondrida. Les squelettes carbonés observés le plus souvent sont ceux de l'adociane et de l'amphilectane (Kornprobst, 2005).



Diisocyanoadociane
Adocia sp.
Baker *et al*., 1976

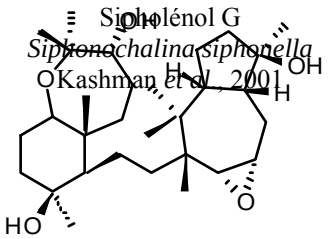


7,15-Diisocyanoadociane
Adocia sp.
Kazlauskas *et al*., 1980

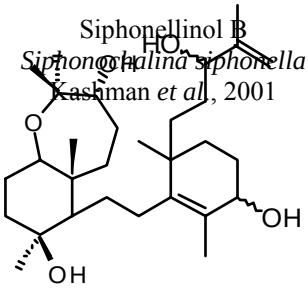


Adocia sp.
Kazlauskas *et al*., 1980

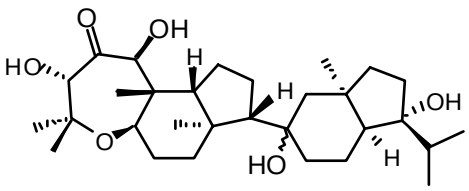
Dans l'ordre des Haplosclerida, les triterpènes de type squalénoïde semblent actuellement spécifiques du genre *Siphonochalina*. Ce genre a conduit à la découverte du groupe des « Sipholanes » qui se subdivise en sipholanes, siphonellines, néviotanes, et dahabanes dont une vingtaine de composés ont été isolés de la seule espèce *Siphonochalina siphonella* récoltée en mer Rouge dans le golfe d'Eilat, au nord, et dans l'archipel des Dahlak, au sud (Carmely & Kashman, 1983 ; Kashman *et al*., 2001). La présence de nombreux exemples de dérivés hexaprénylés polycycliques et de squalénoïdes dans les éponges Haplosclerida implique l'existence de deux voies de biosynthèse différentes mais non simultanément présentes, ou « actives » dans les mêmes espèces. Les dérivés squalénoïdes sont en effet observés dans le genre *Siphonochalina* et les dérivés hexaprénylés dans les genres *Adocia*, *Callyspongia*, *Haliclona*, et *Toxiclona*. Une vingtaine de ces dérivés hexaprénylés ont été identifiés depuis les années 1990, souvent associés à des hydroquinones sulfatées et présentant plusieurs squelettes carbonés. Cependant, aucune structure halogénée n'a encore été isolée, ce qui semble indiquer que les cyclisations concertées correspondantes n'impliquent pas d'ions bromonium, contrairement à ce qui est observé pour les squalénoïdes des algues rouges du genre *Laurencia*.



Siphonélénol G
Siphonochalina siphonella
Kashman *et al*., 2001

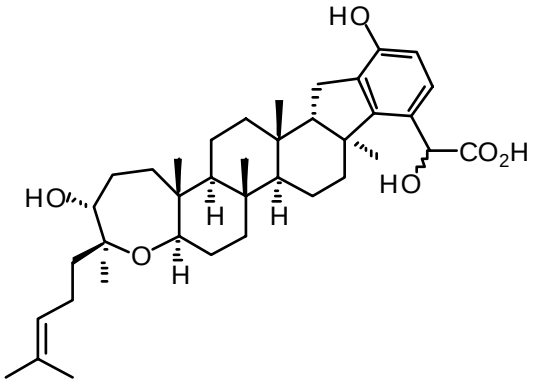


Siphonellinol B
Siphonochalina siphonella
Kashman *et al*., 2001

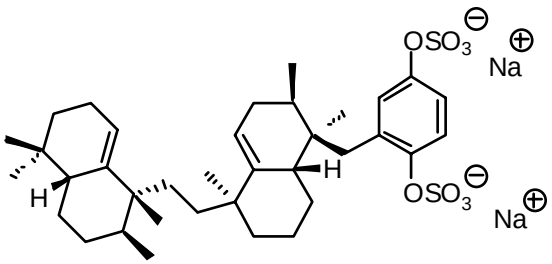


Néviotines A et B
Siphonochalina siphonella
Kashman *et al*., 2001

Exemples de squalénoïdes isolés d'éponges Haplosclerida



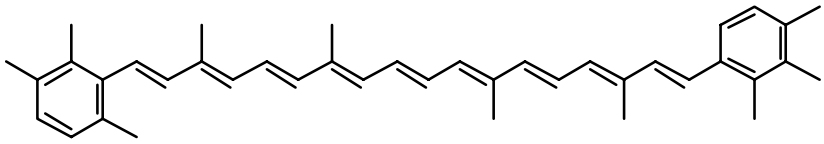
Haliclotriol A
Haliclona sp.
Crews & Harrison, 2000



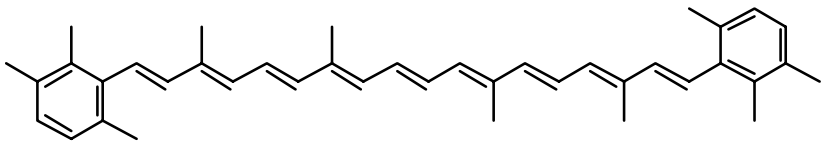
Toxiusol
Toxiclona toxius
Isaacs *et al*., 1993

Exemples de dérivés hexaprénylés isolés d'éponges Haplosclerida

Enfin, c'est dans l'espèce japonaise *Reniera japonica* que les premiers carotènes aromatiques, le réniératène et l'isoréniératène ont été caractérisés en 1957.



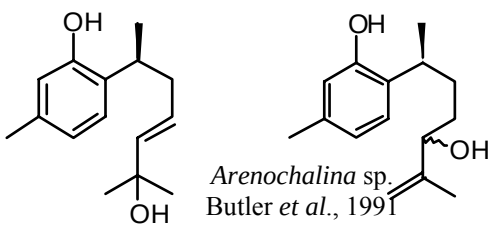
Réniératène
Reniera japonica
Yamaguchi, 1957, 1958



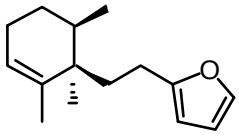
Isoréniératène
Reniera japonica
Yamaguchi, 1958

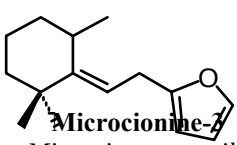
E-2.4. Exemples de terpènes des Poecilosclerida

Les terpènes sont présents dans la plupart des familles de Poecilosclerida, des sesquiterpènes aux carotènes aromatiques avec quelques sesterterpènes mais pas encore de monoterpènes, à l'exception de deux composés qui pourraient être considérés comme des méroterpènes (*vide infra*). La plupart des sesquiterpènes possèdent des squelettes carbonés « classiques », comme le bisabolane ou le squelette isoprénologue du pyronane, avec ou sans transposition. D'une manière générale, il y a peu de squelettes carbonés originaux et il semble qu'il n'existe qu'un diterpène bromé, un des très rares exemples isolés d'une éponge. Jusqu'à présent tous les triterpènes isolés sont de type squalénoïde et les glycosides triterpéniques ont pour aglycones des dérivés du *nor*-lanostane. Certains caroténoïdes, enfin, sont également originaux.



Arenochalina sp.
Butler *et al*., 1991

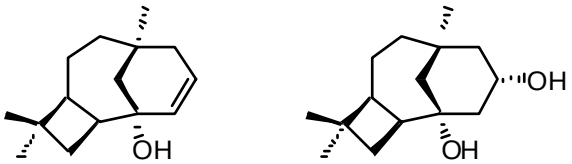




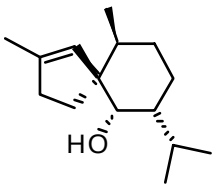
Microcionine-2
Microciona toxystila
Cimino *et al*., 1975

Microcionine-2
Microciona toxystila
Cimino *et al*., 1975

L'espèce néo-zélandaise *Eurypon* sp. a permis d'isoler cinq sesquiterpènes ayant le squelette original du tricyclo[6,3,1,$0^{2,5}$]dodécane (β-caryophyllane) auxquels s'ajoute un dérivé du spiroxane, fréquent chez les Halichondrida (Barrow *et al*., 1988 ; Kernan *et al*., 1990). Aucun de ces squelettes n'est toutefois substitué par un groupe azoté.

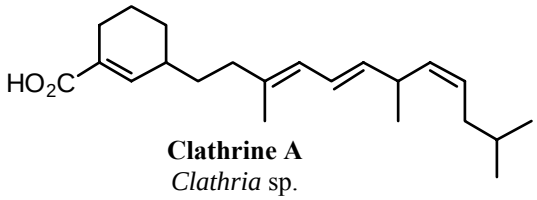


Eurypon sp.
Kernan *et al*., 1990

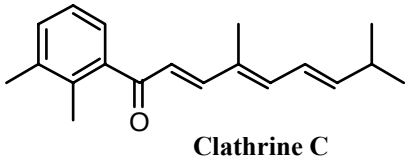


Eurypon sp.
Barrow *et al*., 1988

Plus récemment trois méroterpènes, ou assimilés, ont été isolés d'une espèce australienne du genre *Clathria* et deux d'entre eux, les clathrines B et C, peuvent être considérés comme des méromonoterpènes aromatiques, la clathrine A étant un mérosesquiterpène (Capon *et al*., 2000).

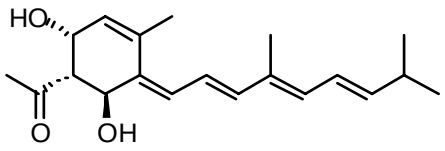


Clathrine A
Clathria sp.
Capon *et al*., 2000

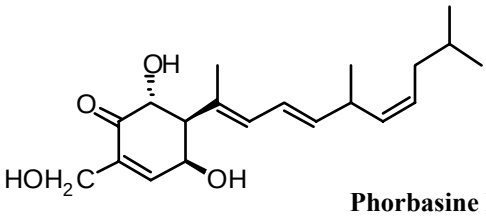


Clathrine C
Clathria sp.
Capon *et al*., 2000

Les diterpènes sont également bien représentés chez les Poecilosclerida mais, comme précédemment, il y a peu de structures originales, les squelettes carbonés étant le plus souvent classiques et largement répandus en milieu terrestre (clérodane, laurenciane, sacculatane). La phorbasine A semble être actuellement le seul diterpène doté d'un squelette carboné original, mais irrégulier, et les phorbasines B et C ont le squelette isoprénologue du bisabolane (le menthane « allongé » de deux unités isopréniques). Ces trois diterpènes ont été isolés d'une espèce australienne du genre *Phorbas* (Vuong & Capon, 2000 ; McNally & Capon, 2001).

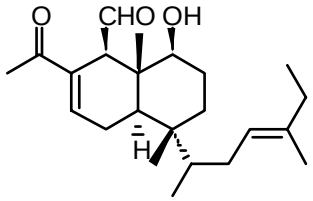


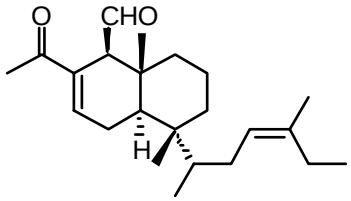
Phorbasine A
Phorbas sp.
Vuong & Capon, 2000

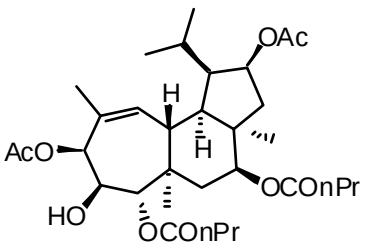


Phorbasine B
Phorbas sp.
McNally & Capon, 2001

Quelques exemples de diterpènes ayant des squelettes carbonés classiques sont présentés ci-dessous. Les durbinals A-C sont cytotoxiques et seraient utilisés par l'éponge comme anti-appétents. Les gagunines A-G forment une série intéressante de diterpènes polyoxygénés qui ont tous le même squelette carboné isomère de celui du verrucosane, bien connu dans certains champignons terrestres.





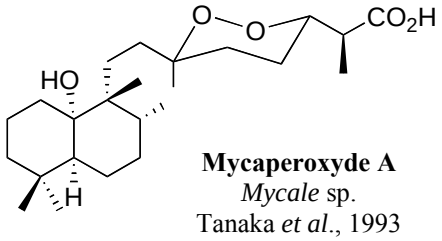


Les quelques exemples de sesterterpènes sont en fait des *nor*-sesterterpènes contenant par ailleurs un peroxyde cyclique, comme les mycaperoxydes A et B, isolés d'une espèce thaïlandaise du genre *Mycale* et l'analogie avec les peroxysesterterpènes des Hadromerida est évidente.

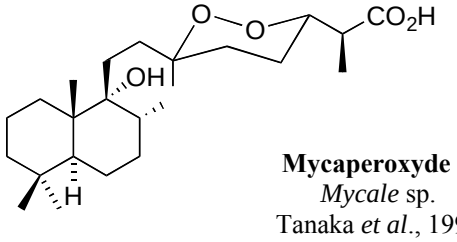
Durinal B
Psammoclemma sp.
Rudi *et al*., 1995

Durinal C
Psammoclemma sp.
Rudi *et al*., 1995

Gagunine G
Phorbas sp.
Rho *et al*., 2002



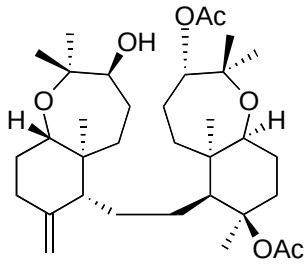
Mycaperoxyde A
Mycale sp.
Tanaka *et al*., 1993



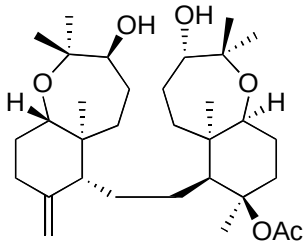
Mycaperoxyde B
Mycale sp.
Tanaka *et al*., 1993

Comme la plupart des dérivés peroxy, les mycaperoxydes A et B sont cytotoxiques et antiviraux *in vitro*. Plusieurs autres dérivés analogues (mycaperoxydes F et G) ont été trouvés ultérieurement dans une autre *Mycale* récoltée en Australie (Capon *et al*., 1998).

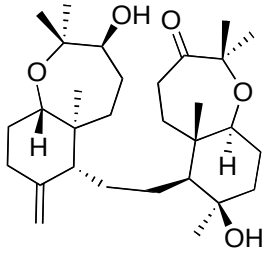
Les raspacionines forment une série de squalénoïdes apparentée au groupe du sipholane et ont toutes été extraites de la même espèce méditerranéenne, *Raspaciona aculeata* (Planche 18). De difficiles problèmes de stéréochimie ont nécessité l'utilisation de plusieurs techniques (diffraction des rayons X, RMN à haute résolution, dichroïsme circulaire).



Raspacionine
Cimino *et al*., 1990
Puliti *et al*., 1991
Cimino *et al*., 1993a



21-Déacétyl-Raspacionine
Cimino *et al*., 1994

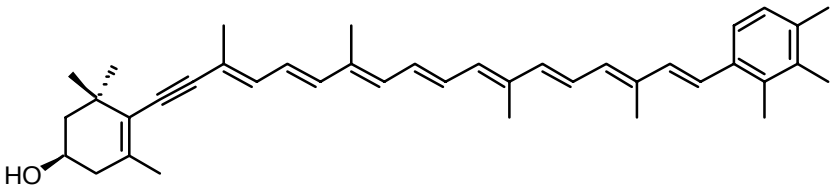


Raspacionine D
Ciavatta *et al*., 2002

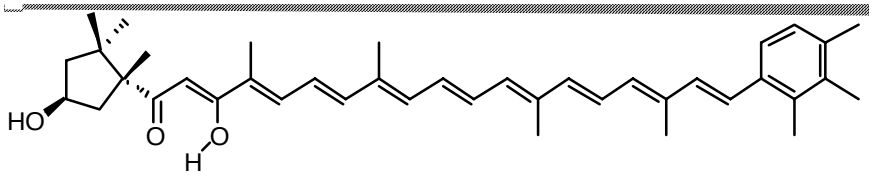
Planche 18. Exemples de raspacionines

Quelques exemples de caroténoïdes et de xanthophylles contenant un noyau aromatique ont été décrits dans plusieurs espèces d'Eponges Poecilosclerida, et certains d'entre eux pourraient être caractéristiques d'une famille ou même d'un genre. La tédaniaxanthine, pigment de *Tedania digitata*, avait déjà été trouvée dans *Microciona prolifera* et appelée allopurpurine (Saxegaard *et al*., 1981).

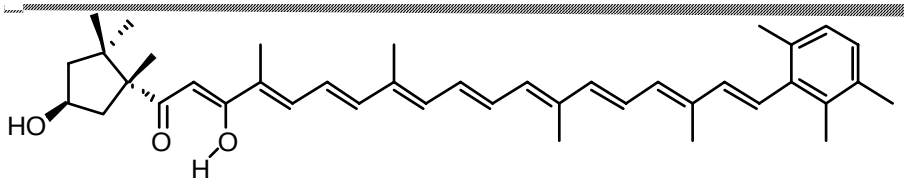
Tétaniaxanthine
Tedania digitata
Saxegaard *et al*., 1981



La trikentriophidine et la trikentriorhodine, sont deux isomères de position d'une xanthophylle modifiée et pourraient être spécifiques de l'ordre des Poecilosclerida.



Trikentriophidine
Trikentrion helium
Aguilar-Martinez &
Liaaen-Jensen, 1974



Trikentriorhodine
Trikentrion helium
Aguilar-Martinez &
Liaaen-Jensen, 1974

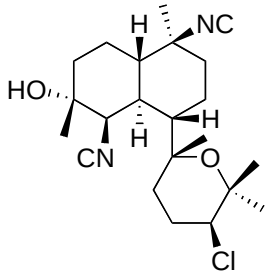
E-2.5. Exemples de terpènes des Spirophorida

Nous n'avons pas trouvé de terpènes dans cet Ordre (bibliographie faite jusqu'en janvier 2005).

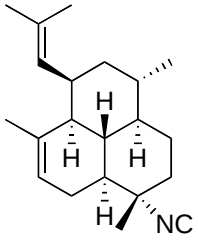
F – Dérives azotés

Le nombre et la diversité des dérivés azotés isolés dans les éponges des ordres étudiés dans cette thèse est considérable et il ne saurait être question de les passer en revue (Kornprobst, 2005). Nous nous limiterons aux ordres des Halichondrida et des Poecilosclerida, et à l'intérieur de ceux-ci aux deux genres *Stylissa* et *Trikentrion* qui ont fait l'objet de recherches dans notre laboratoire. Les genres *Stylissa* et *Acanthella* sont bien connus pour contenir des sesquiterpènes et des diterpènes substitués par des groupes isonitrile, isothiocyanate ou *N*-formylamino. Les dérivés isonitriles sont importants car il a été montré que ce groupe intervient dans le processus de détoxication de l'hème après une infestation par les *Plasmodium*, ce qui justifie l'intérêt de ces terpènes particuliers pour la recherche de nouvelles substances antipaludiques, dont le kalihinol A est l'exemple le plus connu (Angerhofer *et al*., 1992 ; König *et al*., 1996 ; Miyaoka *et al*., 1998 ; Wright *et al*., 2001).

Malgré la découverte récente de dérivés isonitriles dans une espèce du genre *Stylissa* (Mitome *et al*., 2004), nous n'en avons pas trouvé traces dans la *Stylissa carteri* récoltée en mer Rouge (*vide infra*).



Kalihinol A
Acanthella sp.
Chang *et al*., 1984
Shimomura *et al*., 1999



Stylissa sp.
Mitome *et al*., 2004

La deuxième série de dérivés azotés originaux est illustrée par les dérivés indoliques et pyrroliques des *Trikentrion* qui ont mis en évidence une différence de structure très curieuse entre l'espèce australienne *Trikentrion flabelliforme* et l'espèce sénégalaise *Trikentrion loeve*. Dans la première les dérivés indoliques sont exclusivement associés à un cyclopentane et dans la seconde il n'a été caractérisé que des dérivé de l'indène substitué par un pyrrole. Le trikendiol possède des propriétés antivirales vis-à-vis du HIV-1 (Loukaci & Guyot, 1994). Aucun de ces alcaloïdes ne semble cependant avoir de propriétés biologiques notables. La Planche 19 présente quelques-unes de ces structures.

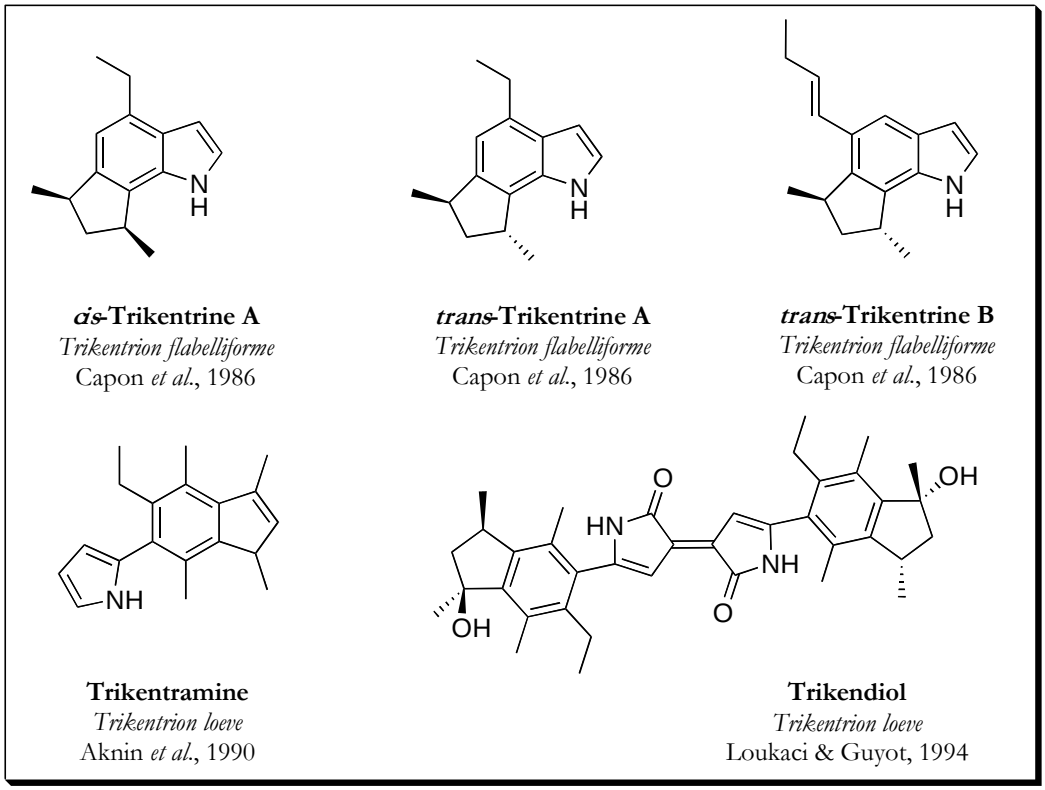


Planche 19. Exemples d'alcaloïdes isolés d'éponges du genre *Trikentrion*

METHODES EXPERIMENTALES
APPLIQUEES AU DOMAINE DES LIPIDES

METHODES EXPERIMENTALES APPLIQUEES AU DOMAINE DES LIPIDES

La première étape de nos études de chimie marine consiste à collecter les spécimens d'organismes. Cette opération peut avoir lieu, à marée basse, en prélevant à la main dans moins d'un mètre d'eau. Le plus souvent, il s'agit de collectes en plongée sous-marine à des profondeurs qui ne dépassent guère 40 m. Mais comment acheminer ces échantillons sans dommage jusqu'au laboratoire où ils seront étudiés ? De nombreuses causes de dégradation sont à craindre, surtout lorsque les récoltes d'organismes s'effectuent loin du laboratoire, le long des côtes du Sénégal, en mer Rouge, dans le golfe Arabo-Persique, ou par dragage en eaux profondes dans les eaux froides de l'Atlantique Nord. S'il n'y a pas de possibilité rapide de lyophiliser les échantillons, ils seront, le plus souvent, plongés dans le méthanol jusqu'au retour au laboratoire. Le méthanol empêche toute dégradation enzymatique. On procédera **alors** à l'extraction habituelle en prenant en compte la solution méthanolique déjà obtenue. Dans ces conditions il est évident que l'on entraîne des quantités importantes d'eau de mer et par conséquent beaucoup de sels minéraux qu'il faudra éliminer.

Pour situer les phospholipides, les acides gras, les stérols, les terpènes, objets de la présente étude, dans un contexte général, il n'est pas inutile de résumer les définitions et classifications des lipides. De fait, à la question "Que sont les lipides ? " il n'y a pas de définition simple, précise et acceptée de tous. Il s'agit d'abord de composés basés sur **la présence de chaînes acyles grasses** (AG), mais il y a aussi des alcools, aminoalcools, aldéhydes, cétones, éthers gras, des hydrocarbures gras, c'est-à-dire porteurs d'une longue chaîne hydrocarbonée (mais les **stérols** par exemple font exception). Les lipides sont des structures moléculaires fortement hydrophobes, solubles dans les solvants organiques (hexane, chloroforme, méthanol...), mais pas dans l'eau (donc séparation aisée d'avec les protéines ou les sucres par exemple). Pour les lipides biologiques importants, il y a les molécules amphiphiles, comportant une partie hydrophobe et une partie hydrophile, telles que les **phospholipides** et les glycolipides. Ce sont des molécules polaires que l'on distingue des lipides neutres. La majorité des lipides rencontrés dérivent cependant des acides gras : lipides acylés, et le groupe acyle confère au lipide son caractère hydrophobe. Les lipides sont des sources majeures d'énergie pour le métabolisme et constituent les matériaux de base de la constitution des membranes cellulaires : la bicouche phospholipidique (Figure 4). La proportion relative et la composition en acides gras des organismes marins dépendent du genre et de l'espèce, et des conditions de l'environnement.

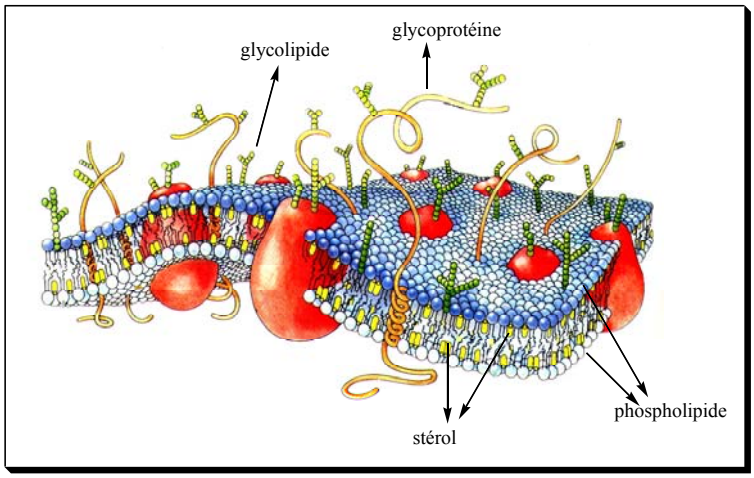


Figure 4. Schéma général d'une membrane cellulaire (d'après Bretscher, 1988). Ce schéma fait apparaître la double couche de phospholipides stabilisée par les stérols et l'existence des glyco-lipides et des glyco-protéines dont la partie osidique apparaît sur la face externe de la membrane.

G. Classification et généralités sur l'extraction des lipides

La classification des lipides peut se faire de deux façons principales.

G-1. Classification selon les caractères de la chaîne acyle

- **Lipides simples (non saponifiables)**. Acides gras libres, stérols, caroténoïdes, terpènes, tocophérols et tocotriènols (vitamine E), quinones isoprèniques (vitamines K)

- **Lipides acylés (saponifiables)**. Mono-, di-, et triacylglycérols (AG, glycérol), phospholipides (AG, glycérol ou sphingosine, acide phosphorique, base azotée), glycolipides (AG, glycérol ou sphingosine, mono- di- ou oligosaccharide), polyalcools acylés (AG, glycérol ou polyalcool), cires (AG et alcool gras), esters de stérols (AG et stérols), céramides (AG et base sphingoïde)

G-2. Classification en lipides neutres et lipides polaires

Neutres	Polaires
Acides gras (>C_{12})	Glycérophospholipides
Mono- di- et triacylglycérols	Glycéroglycolipides
Stérols, esters de stérols	Sphingophospholipides
Caroténoïdes	Sphingoglycolipides
Cires	Gangliosides
Tocophérols, Tocotriènols	
Céramides	

G-3. Problèmes posés par l'extraction des lipides des tissus et matrices biologiques

Les lipides sont présents dans les cellules sous forme d'associations diverses dans lesquelles ils sont liés :

- Par des liaisons faibles : associations hydrophobes (Van der Waals) entre lipides neutres et lipides complexes (et aussi parties hydrophobes des protéines) - liaisons hydrogènes, associations électrostatiques liant des lipides polaires à des protéines.

- Par des liaisons covalentes : acides gras liés à l'état d'esters, amides, glycosides, aux polysaccharides (lipopolysaccharides des parois cellulaires bactériennes).

Choix des solvants d'extraction

- Lipides neutres : des solvants non ou peu polaires conviennent (rupture d'associations hydrophobes).
- Lipides polaires complexes associés dans les membranes : il faut des solvants polaires (alcools) afin de rompre liaisons hydrogène et interactions électrostatiques.
- Lipides liés par liaisons fortes (covalences) : ne peuvent être directement extraits par des solvants ; il faut couper les liaisons par hydrolyse acide ou alcaline.

G-4. Précautions lors des extractions et pour le stockage

Les risques majeurs rencontrés sont la peroxydation des liaisons doubles, les dégradations enzymatiques, et la formation des artéfacts due à des contaminations et à des réactions parasites. Tous les solvants utilisés doivent être fraîchement redistillés et exempts de peroxydes. Une expérimentation sous azote est souvent recommandée. Toute opération sera conduite si possible à température ambiante ou plus basse surtout si l'intérêt se porte sur les lipides polaires (méthodes classiques à l'extracteur Soxhlet à éviter) (Kates, 1986 ; Perkins, 1993).

Le stockage des extraits ne se fait pas à sec mais toujours en présence d'un peu de solvant, et au congélateur –20°C, avec si possible 0,005% de BHT (2,6-di-tertiobutyl-4-méthylphénol).

L'utilisation d'un alcool (méthanol) évitera toute dégradation enzymatique ainsi que nous l'avons dit au début de ce chapitre. Si possible, il vaut mieux analyser un matériel fraîchement préparé. Les contaminants non lipidiques peuvent être éliminés par passage sur colonne de gel Sephadex G25. Les lipides neutres peuvent être extraits par des solvants non ou peu polaires (éther éthylique, dichlorométhane, chloroforme).

La plupart des méthodes d'extraction sont d'ailleurs basées sur les méthodes originales devenues classiques (Folch *et al*., 1957 ; Bligh & Dyer, 1959). Il faut un mélange de solvants non polaire et polaire pour atteindre et entraîner les molécules amphiphiles. C'est la méthode de Bligh et Dyer qui est la plus utilisée, et elle se trouve particulièrement adaptée aux organismes marins car il reste souvent de l'eau de mer dans les échantillons prélevés.

La procédure standard consiste à immerger la biomasse fraîche, découpée en petits fragments, dans le mélange chloroforme/méthanol/eau (2:2:1, v/v/v) puis à agiter énergiquement quelques minutes à température ambiante. Il se forme deux phases après filtration, chacune étant un système ternaire. Les lipides bruts se trouvent dans la phase inférieure. Il n'y a pas plus de 1% de lipides dans la phase aqueuse. Cette méthode a surtout l'avantage de sa rapidité. Une seule étape laisse toutefois de côté 5 à 10 % de lipides.

Afin d'éviter l'usage de quantités importantes de chloroforme qui est toxique (mutagène, carcinogène), nous avons dû renoncer à cette méthode pour pratiquer un épuisement des tissus par des mélanges CH_2Cl_2/MeOH à température ambiante, et à deux reprises. Le poids du résidu délipidifié ajouté à celui de l'extrait fournit une indication sur le poids minimum de biomasse de départ (une valeur déterminée de façon identique pour toutes les études et qui autorise la comparaison).

H. Méthodes chromatographiques.

H-1. Séparation des lipides en classes

Cette méthode de séparation est d'origine simplement empirique. La chromato-graphie d'adsorption sur gel de silice participe à la séparation en association avec d'autres phénomènes (solubilités). Sont utilisés uniquement des solvants purs fraîchement redistillés : successivement l'hexane (facultatif), le dichlorométhane, l'acétone et, enfin, le méthanol (Planche 20). Un solvant laisse place au suivant lorsqu'il n'entraîne plus de produit. Dans ce processus, le seul véritable éluant chromatographique au sens habituel est le dichlorométhane qui va permettre de séparer successivement les hydrocarbures, puis les cires et esters de stéryles, les triglycérides, etc, et cela jusqu'aux stérols et au-delà avec des produits relativement polaires comme les éthers de glycérol. L'acétone peut également jouer un rôle d'éluant au sens classique.

- fractions hexaniques : produits apolaires, pigments

- fractions dichlorométhaniques, produits cités ci-dessus et accès rapide aux stérols libres et aux terpènes

- fractions acétoniques : tous les glycolipides non hydrosolubles et aussi parfois certains alcaloïdes ou polypeptides (contrôle par révélateurs CCM appropriés)

- fraction méthanolique : principalement les phospholipides

Il est évident que cette méthode n'est pas nécessairement la mieux adaptée pour isoler telle ou telle famille de composés, mais c'est une méthode qui permet d'avoir très vite une vision d'ensemble des lipides. Ce n'est pas non plus nécessairement le même expérimentateur qui, au laboratoire, va étudier toutes les fractions.

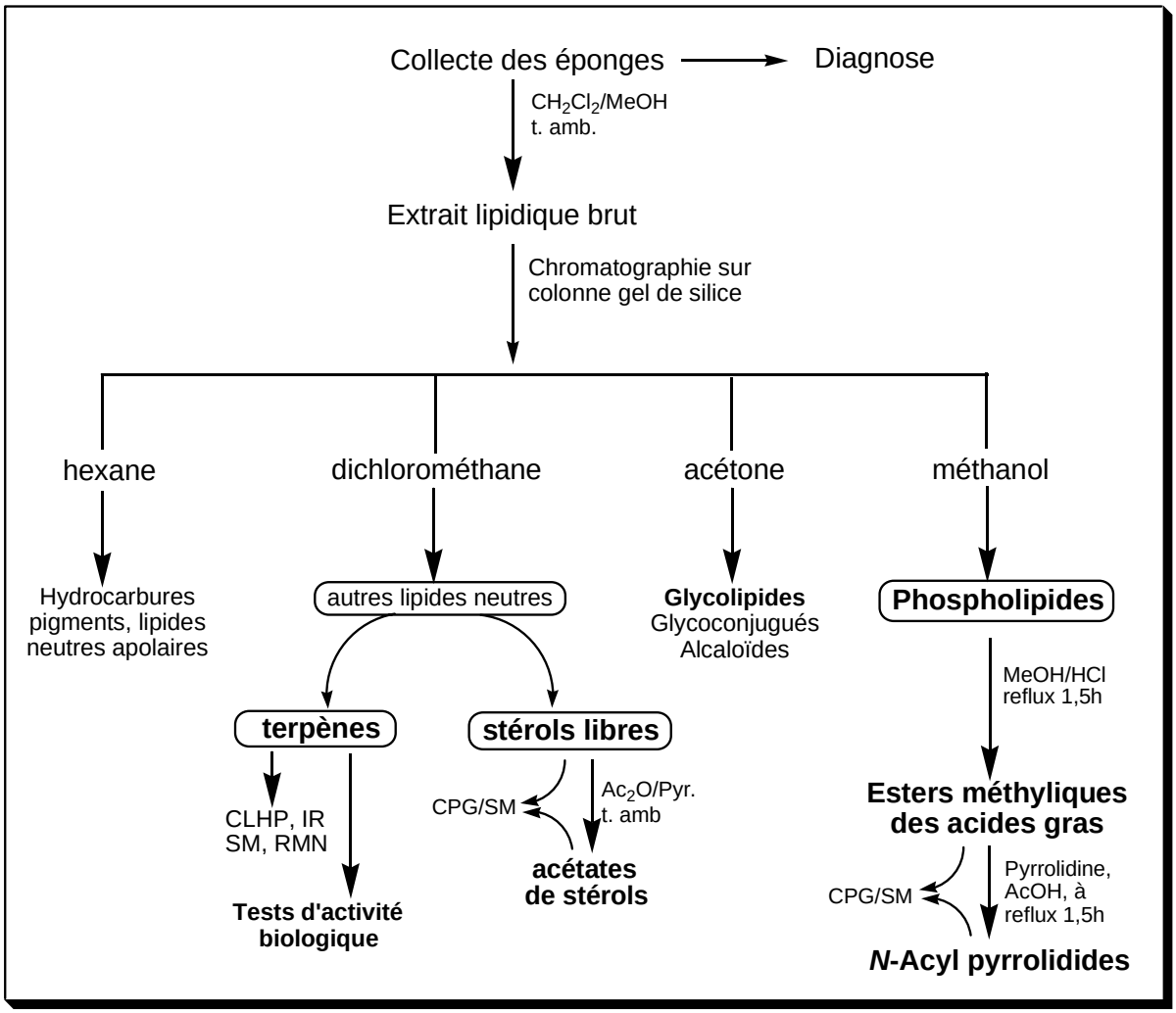


Planche 20. Schéma général de fractionnement des lipides

H-2. Les acides gras des phospholipides d'éponges

H-2.1. Définition et finalités de l'étude

Ces sont les acides carboxyliques à longue chaîne liés sous forme esters à un glycéro-phosphatide ou à un sphingosylphosphatide. Ces deux groupes constituent les phospholipides des membranes cellulaires et peuvent contenir un ou deux esters gras. Les acides gras peuvent être aussi estérifiés par exemple à des stérols ou à des alcools gras, mais de tels composés sont très peu polaires et ne font pas l'objet de la présente étude.

Cette étude a plusieurs finalités:

- établir la composition en acides gras des phospholipides d'éponges d'origines différentes et identifier de nouvelles structures.
- essayer d'en comprendre l'origine la plus probable en distinguant notamment les acides gras d'origine bactérienne de ceux qui pourraient davantage provenir d'associations de l'éponge avec des organismes photosynthétiques (Viracaoundin, 2001).

- essayer de justifier la présence de ces acides gras en tenant compte des mécanismes de biosynthèse connus ou d'hypothétiques nouvelles voies.

- mettre en évidence d'éventuelles spécificités d'intérêt chimiotaxonomique.

C'est ainsi, par exemple, que de précédents travaux du laboratoire ont permis de trouver à l'état naturel des acides gras qui avaient été postulés comme intermédiaires biosynthétiques plusieurs

années auparavant et d'illustrer une nouvelle voie métabolique supposant un allongement en série monoènoïque (n-5) (Barnathan, 1993 ; Barnathan & Kornprobst, 1992 ; Barnathan *et al*., 1996).

H-2.2. Isolement des acides gras des phospholipides

Les acides gras des phospholipides présents dans les fractions méthanoliques sont ensuite libérés par une réaction de saponification avec la potasse alcoolique, puis les acides gras libres sont transformés en esters méthyliques. Une autre méthode plus rapide, la transestérification, permet de transformer directement les acides gras des phospholipides en esters méthyliques mais n'est pas toujours complète. Les dérivés des esters méthyliques se présentent sous forme de mélanges complexes volatils et injectables en CPG/SM. Les fragmentations des spectres de masse individuels obtenus sont exploitables pour déterminer les structures des principaux acides gras saturés. Les autres acides gras (ramifiés autres que *iso* et *anteiso*, isoprénoïques, mono-, di- et polyinsaturés, autres acides gras…) sont identifiables en CPG/SM sous forme de dérivés *N*-acyl pyrrolidides directement obtenus à partir des esters méthyliques.

H-3. Chromatographie sur couche mince préparative (CCMp)

C'est une méthode courante de séparation et d'analyse simple, rapide et sûre qui nécessite quelques précautions. Il s'agir de déposer non plus des spots de solutions de produits mais des bandes, et une plaque 20 x 20 cm et 0,5 mm d'épaisseur de phase peut être chargée avec 60 voire 80 mg environ de mélange suivant la difficulté à priori de la séparation. L'étape délicate est bien sûr le dépôt mais il faut aussi s'assurer que la plaque ne sera exposée à sec dans l'air ambiant et à la lumière que le minimum de temps requis pour les manipulations.

H-4. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

La chromatographie liquide à haute performance permet d'affiner avec performances (efficacité, facteur de résolution) la séparation qui a été faite par chromatographie sur colonne et par chromatographie sur couche mince préparative. Deux types de phases sont à distinguer dans cette séparation : phase normale et phase inverse ou chromatographie hydrophobe. La plupart de nos produits (terpènes, produits actifs dans les fractions acétoniques) ont été séparés en utilisant l'une ou l'autre de ces phases (Partie expérimentale).

H-5. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).

H-5.1. Généralités

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (Arpino *et al.*, 1995). Cette technique permet de séparer des mélanges très complexes. L'appareillage est composé en général d'un injecteur diviseur, d'une colonne capillaire, d'un gaz vecteur (hélium, azote, argon ou hydrogène), et d'un détecteur.

Lorsque cette méthode est couplée à la spectrométrie de masse, c'est-à-dire que ce dernier sert de détecteur, elle permet à la fois de séparer des mélanges de composés et d'analyser les spectres correspondant aux pics séparés. Les composants peuvent être identifiés par comparaison avec des standards (temps de rétention obtenu, conditions de CPG et phase utilisée), ou avec les spectres de référence contenus dans une spectrothèque disponible avec l'appareillage, si les spectres de masse correspondants ressemblent à des composés connus. Autrement dit, le couplage CPG/SM offre en général de multiples possibilités analytiques. Cela signifie que toute substance volatile (jusqu'à 350°C) qui émerge de l'extrémité d'une colonne de chromatographie est détectable par une méthode spectrométrique.

Le couplage CPG/SM utilise l'impact électronique, habituellement à 70 eV mais il est possible de travailler avec une énergie plus faible (25 eV par exemple). La méthode peut être complétée par l'ionisation chimique qui permet l'accès aux ions moléculaires si ceux-ci ne sont pas visibles dans

la première approche. Il faut utiliser des dérivés volatils et qui donnent des clivages riches d'enseignements quant aux caractères structuraux des composants d'un mélange.

La spectrométrie de masse à haute résolution est une méthode particulièrement sensible et précise quant à la détection et l'analyse structurale des molécules et permet d'obtenir les hypothèses les plus probables pour la formule brute.

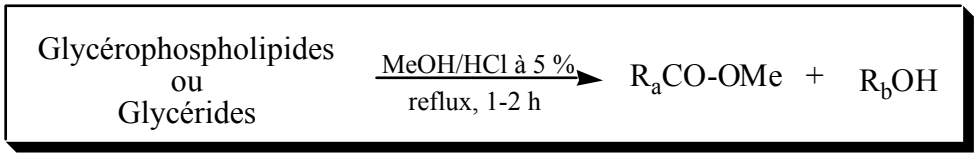
H-5.2. Dérivés exploitables en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

H-5.2.1. Les dérivés des acides gras

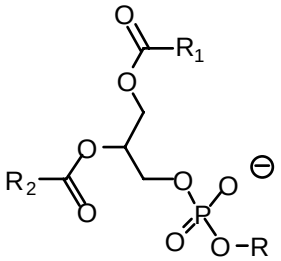
H-5.2.1.1. Esters méthyliques (EMAG)

Les acides gras libres doivent être convertis en dérivés volatils ; les plus courants en première analyse sont les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) (Blau & Halket,1993 ; Perkins, 1993, p. 244-253 ; Barnathan, 1993).

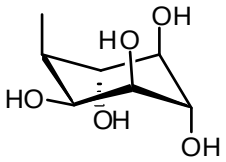
Réaction 1 : Transestérification d'acides gras des phospholipides par le méthanol chlorhydrique.



R_a correspond aux chaînes grasses libérées des phospholipides et R_b aux fonctions restantes des phospholipides.



R_1 et R_2 sont des chaînes grasses
R est un groupe azoté, du glycérol ou de l'inositol



Glycérophospholipides :

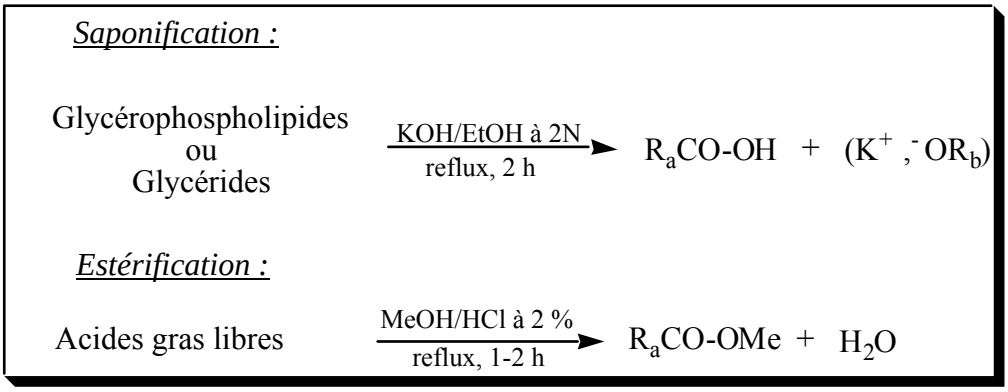
Tableau 16. Variations des structures de glycérophospholipides selon le groupement R

Groupe -R	Noms du groupe phosphatide	Abréviations
- $CH_2CH_2N^+(CH_3)_3$ (choline)	**Phosphatidyl choline (lécithine)**	**PC**
-$CH_2CH_2NH_2$ (éthanolamine)	**Phosphatidyl éthanolamine**	**PE**
-$CH_2CH(NH_2)$-COOH (sérine)	**Phosphatidyl sérine**	**PS**
inositol	**Phosphatidyl inositol**	**PI**

-$CH_2CHOHCH_2OH$	**Phosphatidyl glycérol**	**PG**
-H	**Acide phosphatidique**	**PA**

La saponification permet d'hydrolyser les glycérophospholipides ou les glycérides à l'aide de potasse alcoolique, pour libérer les groupements R_1 et/ou R_2 et/ou R_3 (chaînes grasses). Les acides gras libres sont ensuite estérifiés en EMAG (reflux dans du méthanol chlorhydrique).

Réaction 2 : Libération par saponification des acides gras des phospholipides suivie d'une estérification de l'acide gras libre par le méthanol chlorhydrique à 2 %.

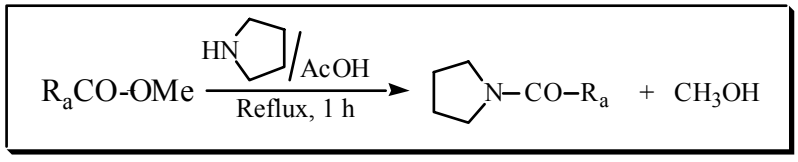


Les EMAG sont faciles à exploiter en couplage CPG/SM puisqu'ils sont très peu polaires et très volatils. De plus, ils répondent aux critères de dérivation exploitable en couplage CPG/SM, tels que :

- la réaction de conversion doit être totale et sélective,
- elle doit pouvoir se faire à l'échelle micropréparative,
- les dérivés doivent être séparables en CPG avec une excellente résolution,
- chaque pic chromatographique peut conduire à des fragmentations spécifiques en SM,
- l'analyse quantitative de chacun des pics peut être faite.

H-5.2.1.2. Dérivés *N*-acyl pyrrolidides (NAP)

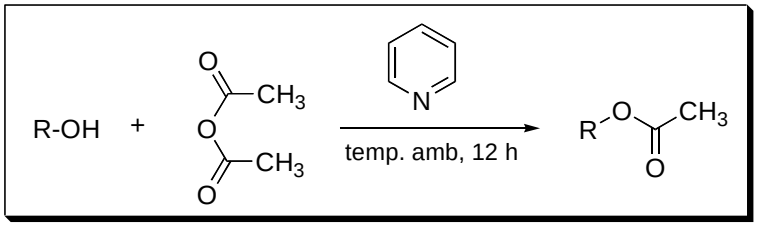
Quelques acides gras sont identifiables en SM-impact électronique à 70 eV au moyen des seuls EMAG tandis que les autres ne sont identifiables qu'à partir des spectres de masse des dérivés des pyrrolidides (NAP). Ces dérivés d'acides ont l'avantage d'être stable sous impact électronique et de produire une série de fragments homologues, à partir du début fonctionnel de la chaîne jusqu'à l'ion moléculaire.



Ce type de dérivés que nous avons choisi pour compléter les identifications des acides gras, à part les EMAG, a été très utilisé au laboratoire (Barnathan *et al*., 1992) en tenant compte des difficultés d'exploitation des acides à très longue chaîne en colonne OV-1 (Rezanka & Mares, 1987 ; Rezanka, 1989). D'autres auteurs comme Yu ont développé les dérivés de 4,4-diméthyloxazoline (DMOX) pour localiser les ramifications des acides (Yu *et al.*, 1988).

H-5.2.2. Acétates des stérols

Ces dérivés sont obtenus de manière quantitative par action de l'anhydride acétique en présence de pyridine à température ambiante pendant une nuit.



R : noyau stérolique avec la chaîne latérale

Cette conversion en acétates rend les stérols plus volatils que les stérols libres et la résolution est nettement améliorée. Nous analysons toujours séparément le mélange des stérols libres et celui des acétates car il y a des fragments diagnostiques pour les deux, mais pas toujours les mêmes, ce qui permet d'utiles recoupements.

H-5.3. Longueur de chaîne équivalente (LCE) et analyse des mélanges d'acides gras

En 1956, James et Martin ont mis en évidence une relation entre le logarithme du *temps de rétention réduit* (Tr) et le *nombre de carbones* n des acides gras saturés à chaîne normale, log Tr = an + b. Cette équation donne une droite de régression linéaire, à partir de points correspondants aux acides gras saturés, laquelle a donné naissance à la notion de *longueur de chaîne équivalente* (LCE) ou *longueur équivalente de chaîne* (LEC) selon Tranchant et Prévôt, dans le « Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse » (Arpino *et al.*, 1995). La longueur de chaîne équivalente *est, par définition, le nombre d'atomes de carbone d'un acide gras fictif à chaîne normale saturée qui aurait le même temps de rétention (Tr) que l'acide gras considéré* (Barnathan, 1993). La valeur de LCE d'un ester méthylique d'acide gras non saturé peut être déterminée par extrapolation d'une droite tracée à partir des temps de rétention des esters méthyliques d'acide gras saturés (Nelson, 1974 ; Christie, 1988 ; Christie, 1989, pp. 92-96).

C'est ainsi que des acides gras qui ont le même nombre de carbones sortent en général dans une fourchette de LCE entre 0 et 1 unité LCE, selon que la chaîne grasse possède des ramifications et/ou des insaturations. Plus la chaîne grasse est ramifiée, plus son temps de rétention est diminué par comparaison avec celui de la chaîne linéaire saturée correspondante. Si cette chaîne est ramifiée par un groupe hydroxyle en position 2 (α), elle est davantage retenue par la colonne et son temps de rétention est supérieur à celui de l'acide saturé normal. D'autre part, plus une chaîne grasse est insaturée, plus son temps de rétention est court et ce temps de rétention va dépendre de la position des doubles liaisons sur la chaîne, en utilisant une colonne capillaire apolaire. La connaissance du temps de rétention de chaque ester méthylique est indispensable pour permettre de calculer sa LCE à partir d'une droite T_R = f(nombre de C) établie avec les points correspondants aux acides gras saturés à chaînes normales (15:0, 16:0, 17:0 …. 20:0, 22:0, 23:0, 25:0 …). Il a été montré que l'utilisation d'une programmation linéaire de température sur l'ensemble de l'analyse, indispensable dans le cas des éponges qui possèdent de 10 à 34 carbones, rend encore possible la détermination des LCE. Le passage des colonnes remplies aux colonnes capillaires n'affecte pas le concept et des valeurs très comparables ont été obtenues. Chacun de ces acides servant à l'étalonnage sort le dernier de la colonne parmi ceux non fonctionnalisés de même nombre de carbones. Il est ensuite possible de calculer toute valeur de LCE connaissant le temps de rétention d'un ester, et enfin d'établir les droites correspondant à des séries homogènes d'acides gras homologues (James et Martin, 1956 ; Nelson, 1974 ; Kates, 1986, p. 265-270 ; Christie, 1988 ; Barnathan, 1993, p. 90-93).

Par conséquent, la transformation des acides gras des phospholipides en EMAG est une étape incontournable pour l'identification, par couplage CPG/SM, de la composition des chaînes grasses des phospholipides. Dans ce cas, une condition de programmation linéaire de température, de 180°C à 310°C (3°C/min), a été mise au point pour séparer les EMAG, après avoir vérifié la validité de la relation de James et Martin (Barnathan, 1993). Dans ces conditions, il existe une relation linéaire entre logT_R et le nombre d'atomes de carbone d'acides saturés normaux. La valeur de LCE

d'un constituant de temps de rétention T_R peut être calculée à partir de l'équation de la courbe log $T_R = f(n_C)$.

Krupcik et Bohov ont montré que la valeur de LCE varie linéairement aussi avec la température selon la relation LCE = a + bT (équation de régression linéaire), en utilisant une colonne capillaire et en effectuant une programmation linéaire de température (Krupcik & Bohov, 1985 ; Barnathan, 1993). Il est donc possible de déterminer graphiquement les LCE, par extrapolation sur une droite de régression $T_R/T_{16:0} = f(n_c)$. La connaissance de la masse moléculaire et la valeur des LCE, permettent de déduire si l'acide gras est saturé ou non, et porte ou non des ramifications. Un écart à la linéarité pour les premiers dérivés élués est souvent constaté, jusqu'à l'acide n-15:0.

H-5.3.1. Détermination des LCE à partir des spectres de masse des EMAG, de *Stylissa carteri* récoltée le 05/01/00 à Djeddah

Nous avons choisi cette éponge parmi d'autres pour être l'exemple type de la méthode de détermination de la composition en AG des phospholipides d'une éponge. Après avoir isolé et rassemblé les fractions méthanoliques d'une colonne chromatographique, les AG des phospholipides de *S. carteri* (Djeddah, 25/01/00) sont transformés en esters méthyliques d'acides gras (EMAG) puis ces derniers sont convertis en *N*-acyl pyrrolidides (NAP). Les deux dérivés sont injectés individuellement en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La procédure décrite ci-dessus a été appliquée et on a rassemblé ci-après les données concernant les esters saturés linéaires qui permettent de tracer la droite (Tableau 17).

Tableau 17. Temps de rétention des EMAG saturés normaux en fonction du nombre de carbones

n_C (LCE)	16,00	17,00	18,00	19,00	20,00	21,00	24,00	26,00
t_R (min)	5,95	7,83	10,45	12,37	15,02	16,35	24,67	29,35

LCE = a + bT qui vérifie la validité de la relation de James et Martin (1956), log $T_R = a.n_C + b$, où T_R est le temps de rétention et n_C correspond au nombre de carbones (Figure 5).

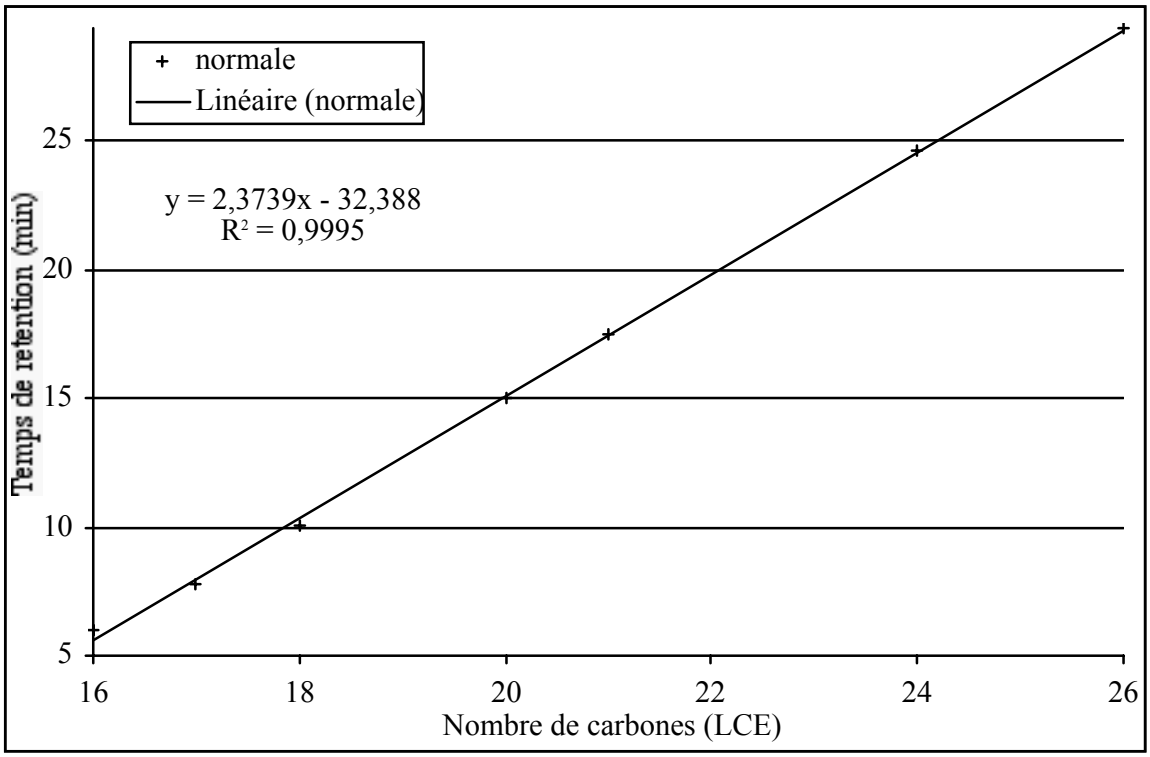
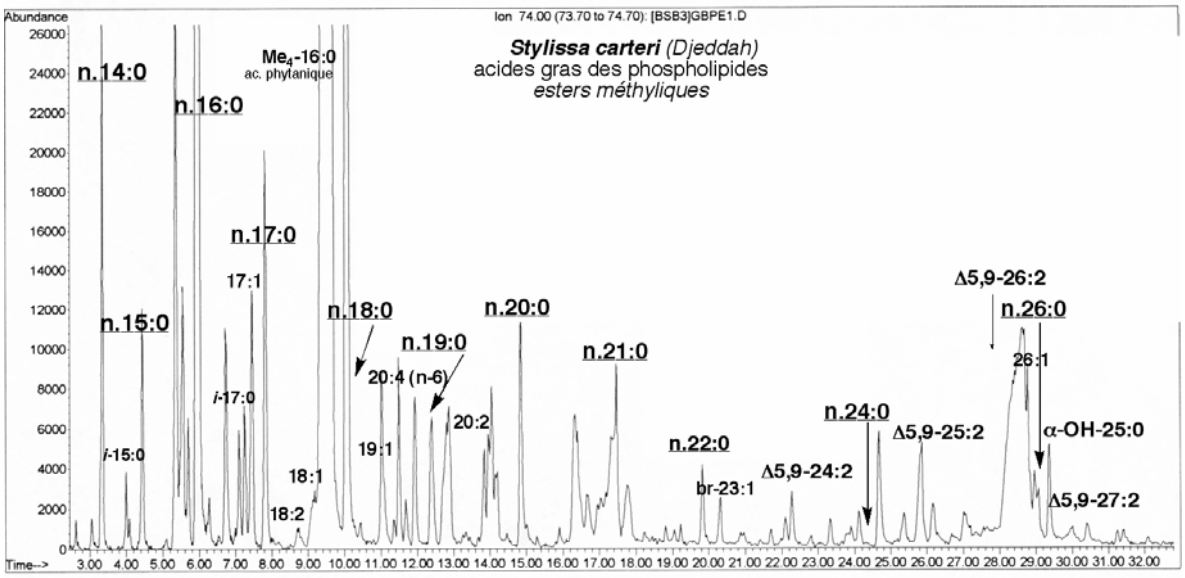


Figure 5. Droite et équation de régression linéaire des EMAG saturés normaux pour l'espèce *Stylissa carteri* récoltée à Djeddah.

L'équation de cette droite est donc T_R = 2,3739 x (LCE) - 32,388 (avec R2 = 0,9995). Connaissant les valeurs des temps de rétention de chaque pic de courant ionique total (CIT) de l'ion 74 (Figure 6) qui correspond à un spectre de masse des EMAG, dans ce cas, nous pouvons déterminer leurs longueurs de chaîne équivalence (LCE), selon la relation LCE = (T_R + 32,388) / 2,3739.

Figure 6. Courant ionique calé sur *m/z* 74 des EMAG



Nous pouvons dresser un Tableau provisoire (Tableau 18) permettant d'identifier déjà quelques acides gras, comme les AG ramifiés de la série *iso* et *anteiso*, les AG insaturés à positions 5 et 9 (Δ5,9) et les AG hydroxylés (Figure 8, p. 57).

Tableau 18. Longueurs de chaînes équivalentes calculées à partir de l'équation de droite de régression linéaire des EMAG de *Stylissa carteri* (Djeddah, 05/01/00), en phase en utilisant une phase apolaire (DB-1)

Acides	LCE	Acides	LCE	Acides	LCE
n-15:0	15,00	n-18:0	18,00	22:3	21,34
i-16:0	15,65	br-19:0	18,49	2-OH-22:0	23,25
ai-16:0	15,74	*i*-19:0	18,60	5,9-24:2	23,47
16:1	15,82	*ai*-19:0	19,75	24:1	23,72
16:1	15,89	20:4	19,06	n-24:0	24,00
n-16:0	16,00	20:3	19,23	br-5,9-25:2	24,32
br-17:1	16,28	20:2	19,47	br-5,9-25:2	24,41
br-17:0	16,48	20:1	19,56	5,9-25:2	24,52
i-17:0	16,65	20:1	19,63	br-5,9-26:2	25,17
ai-17:0	16,70	*ai*-20:0	19,75	2-OH-24:0	25,28
17:1	16,80	n-20:0	20,00	5,9-26:2	25,51
n-17:0	17,00	*i*-21:0	20,60	26:1	25,82
2-OMe-16:0	17,11	*ai*-21:0	20,75	n-26:0	26,00

18:2	17,38	n-21:0	21,00	2-OH-25:0	26,27
18:2	17,52	22:4	21,13	5,9-27:2	26,46
3,7,11,15-Me$_4$-16:0	17,68	22:4	21,16	2-OH-26:0	27,27

Grâce aux spectres de masse des EMAG associés aux valeurs de LCE, cette identification a été possible. Les AG ramifiés de la série *iso* et *anteiso*, par exemple, sont reconnaissables, d'abord, par son ordre d'élution, dans une colonne capillaire. Ainsi, les acides *iso* sortent toujours devant les acides *anteiso* lesquels sont immédiatement des AG saturés normaux. Cette hypothèse est confirmée par les valeurs de la partie décimale, respective de leurs LCE : entre 0,62-0,67 pour les *iso* et 0,70-0,75 pour les *anteiso*. En outre, si les attributions des AG *iso* et *anteiso* sont exactes, nous devrons avoir, pour chaque série, une droite de régression parallèle à celle de la série normale en traçant T_R(*iso*) = f(LCE) et T_R(*anteiso*) = f(LCE) (Figure 7). Si un des points correspondant à un AG ramifié attribué s'éloigne de la droite *iso* ou *anteiso*, cela signifie que cet AG n'est ni *iso*, ni *anteiso*.

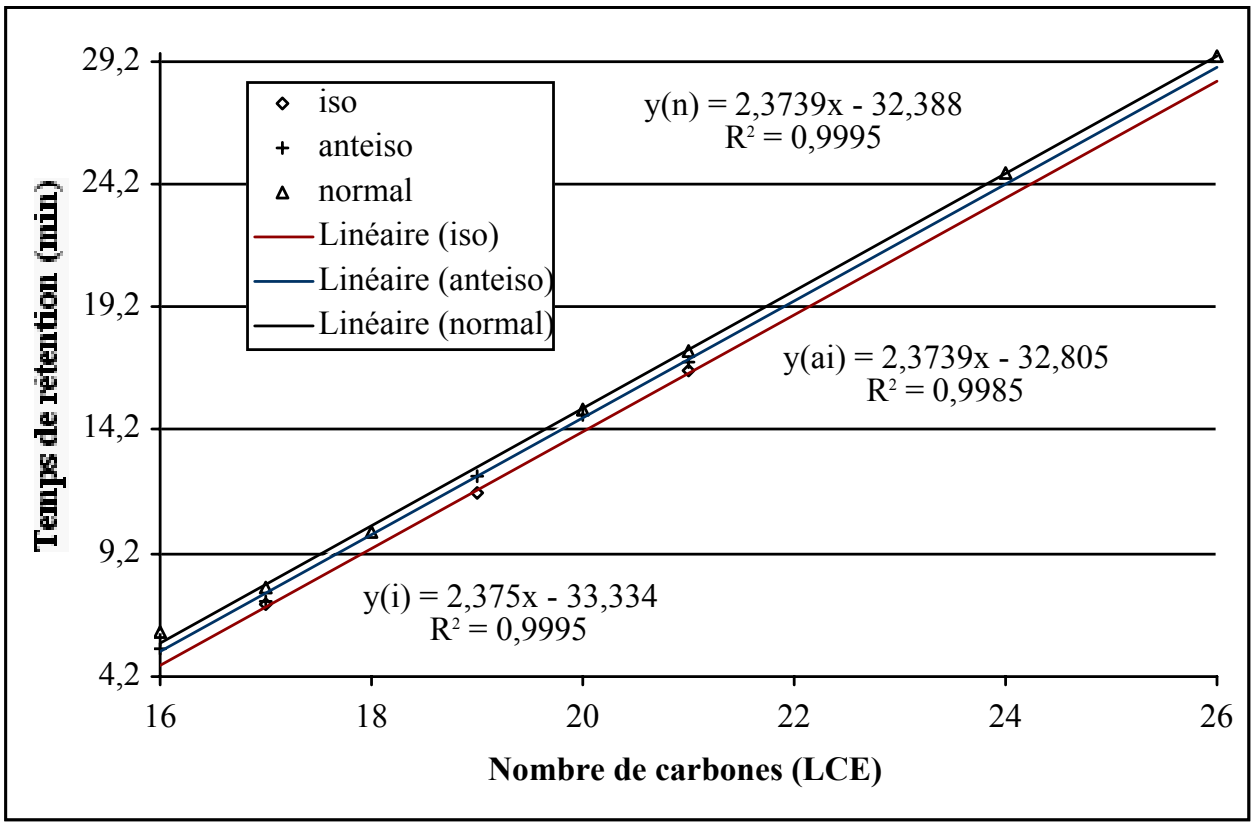


Figure 7. Droites et équations de régression linéaires des EMAG saturés *iso*, *anteiso* et normaux de *Stylissa carteri* (Djeddah, 05/01/00)

Quant aux acides Δ5,9 et aux acides hydroxylés, ils ont des valeurs de parties décimales de LCE d'environ à 0,50 et 0,27 respectivement. Ces structures sont confirmées par la présence d'un pic de base à *m/z* 81 pour le premier et de trois pics caractéristiques, tels que *m/z* 90 (Mac Lafferty), *m/z* 103 (fragmentation en position C_3 de la chaîne alkyle des EMAG) et *m/z* $[M-59]^+$ (perte d'un radical CH_3-O-CO dû à l'attraction de la paire d'électrons par l'atome de l'oxygène de la fonction cétone), pour les acides hydroxylés. En traçant les droites $T_R(5,9) = f(n_C)$ et $T_R(OH) = f(n_C)$, comme nous avons fait précédemment avec les *iso* et les *anteiso,* nous avons de nouveau deux droites de régression linéaire parallèles à celle des acides saturés normaux (Figure 8).

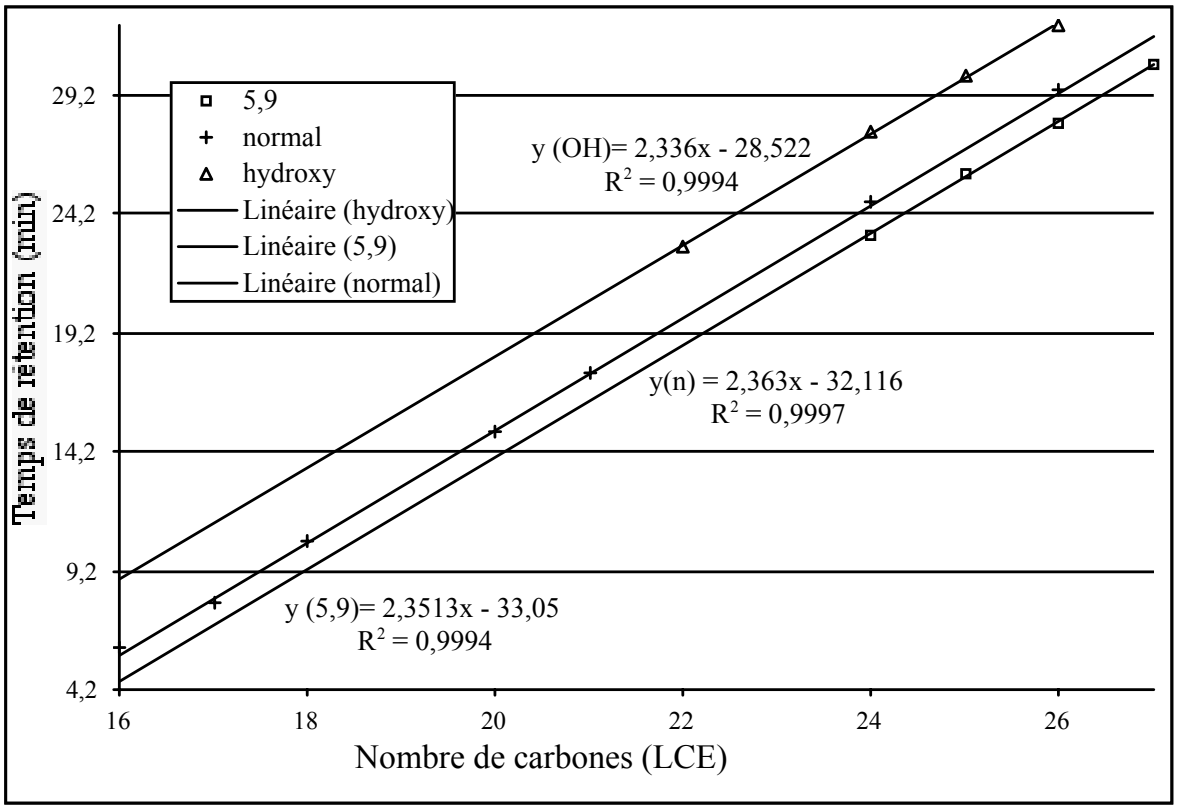


Figure 8. Droites et équations de régression linéaire des EMAG Δ5,9 normaux et hydroxylés de *Stylissa carteri* (Djeddah, 05/01/00)

H-5.3.2. Détermination des LCE à partir des spectres de masse des NAP.

Cette étape consiste à analyser principalement chaque spectre de masse des dérivées des NAP. Dans ce cas, nous établissons, de nouveau, à partir d'une droite de régression linéaire (Figure 9), les relations entre les temps de rétention des spectres et les nombres de carbones (LCE), comme l'on a procédé avec les EMAG, afin de compléter les structures non déterminées et de confirmer à celles que nous avons déjà trouvées à partir des EMAG.

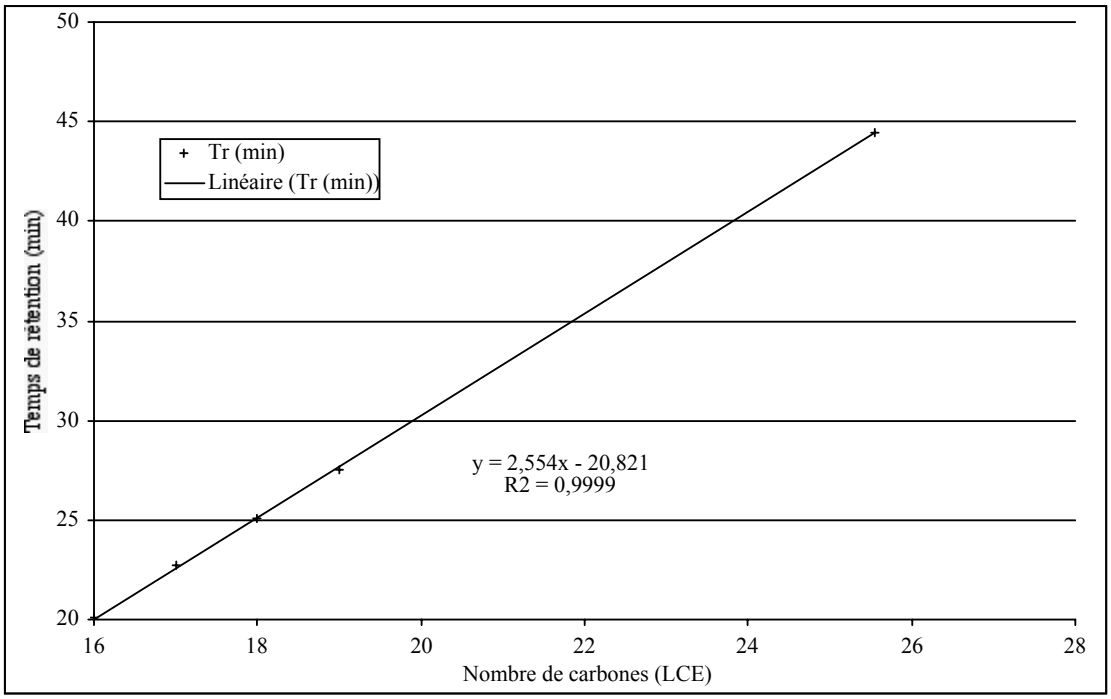


Figure 9. Droite et équation de régression linéaire des NAP d'acides saturés normaux de *Sylissa carteri* (Djeddah, 05/01/2000)

Cette droite de régression linéaire T_R = 2,554 x (LCE) + 20,821 permet de calculer les LCE des dérivées NAP. Les valeurs de LCE et les structures des acides correspondants sont identifiées à partir des analyses de *Stylissa carteri* récoltée à Djeddah en octobre 1998 et en janvier 2000 (Tableau 19).

Tableau 19. Longueurs de chaînes équivalentes calculées à partir de l'équation de la droite de régression linéaire des NAP de *Stylissa carteri* (Djeddah, 05/01/2000)

Acides	LCE	Acides	LCE	Acides	LCE
14:0	14,00	11-18:1	17,74	n-23:0	23,00
n-15:0	15,00	n-18:0	18,00	2-OH-22:0	23,15
i-16:0	15,65	*i*-19:0	18,60	5,9-24:2	23,56
9-16:1	16,72	20:4 (n-6)	18,79	n-24:0	24,00
10-16:1	15,76	n-19:0	19,00	5,9-25:2	24,47
11-16:1	15,87	11,15-20:2	19,48	5,9,12-26:3	25,09
n-16:0	16,00	11-20:1	19,56	2-OH-24:0	25,17
i-17:0	16,67	13-20:1	19,63	5,9-26:2	25,52
ai-17:0	16,73	n-20:0	20,00	9-26:1	25,80
10-17:1	16,82	17-Me-20:0	20,42	n-26:0	26,00
n-17:0	17,00	22:5 (n-6)	20,45	2-OH-25:0	26,10
3,7,11,15-Me_4-16:0	17,23	22:6 (n-3)	20,48	*i*-5,9-27:2	26,21
9,12-18:2	17,57	22:4 (n-6)	20,71	5,9-27:2	26,50
9-18:1	17,63	22:4 (n-3)	20,79	2-OH-26:0	26,10
10-18:1	17,65	17-Me-16-22:1	22,20	5,9-28:2	27,33

H-5.4. Identification des acides gras des phospholipides par couplage CPG/SM

H-5.4.1 - Esters méthyliques

H-5.4.1.1 Intérêt chromatographique

La transformation des acides gras en esters méthyliques (EMAG) joue un rôle important pour l'identification des AG. Les EMAG permettent à la fois d'obtenir une séparation correcte des mélanges d'acides par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonne capillaire et de disposer d'ions-fragments diagnostiques en couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (Le Quere *et al*., 1989 ; Barnathan, 1993).

H-5.4.1.2. Séparation des EMAG par CPG

La séparation des EMAG par la CPG n'est efficace que si la programmation linéaire de température est optimale. Les difficultés dans l'exploitation analytique de la CPG sont surtout constatées au tout début et vers la fin du déroulement chromatographique. Au début, le débit et l'élution des produits ne sont pas encore bien stabilisés et les produits paraissent souvent sortir très vite (et se trouvent ainsi hors de la linéarité). Vers la fin du processus, les difficultés proviennent de ce que l'on se rapproche des limites de température de tolérance de la phase et il n'est pas certain que tous les dérivés d'acides gras très longs et/ou très lourds (brome) soient observables. De plus, la phase risque de s'abîmer et de relarguer dans la colonne des composés siliconés (« bleeding ») qui peuvent alors gêner l'interprétation spectrale. Cette programmation linéaire de température des EMAG, 180°C à 310°C (3°C/min) (température limite pour la phase utilisée), a été déjà optimisée par Barnathan (1993) en vérifiant la validité de la relation de James et Martin pour les acides gras à 20 carbones au plus et en relativisant la détermination des LCE dans ce cas (Barnathan, 1993 ; Krupcik & Bohov, 1985).

H-5.4.1.3. Identification des EMAG par la SM

L'identification des EMAG passe d'abord par la vérification qu'à chaque pic du chromatogramme (courant ionique total, CIT) correspond bien un spectre de masse exploitable. Il est évident que la programmation linéaire, très pratique pour l'exploitation chromatographique de l'ensemble des composés, n'est pas forcément performante en toute situation. Pour enregistrer des spectres corrects, nous sommes amenés parfois à changer le pas de la programmation de température, voire à adopter un palier isotherme dans un certain intervalle de temps.

Le spectromètre de masse (impact électronique) sert de détecteur pour la CPG. C'est pourquoi à chaque pic du chromatogramme correspond un spectre de masse. La préparation des EMAG à partir des phospholipides est sélective, et nous ne devrions obtenir, en principe, que des spectres de masse d'EMAG. En fait, d'autres composés sont présents car entraînés par exemple par les solvants (pourtant fraîchement redistillés) comme des phtalates, des fragments siliconés, des hydrocarbures, des aldéhydes et des diméthyl acétals provenant des plasmalogènes existant parfois dans les phospholipides. Les fragments siliconés de la phase dégradée et les phtalates donnent respectivement des fragments les plus abondants, impairs *m/z* 133, 147, 207, 281, 429 pour l'un (Barnathan, 1993, pp. 97) et *m/z* 149 (pic de base), 167, 279 pour l'autre (Mai *et al.*, 1980).

Les progrès de la technologie et de l'électronique ont permis d'apporter une solution à cette difficulté. Il est en effet possible d'enregistrer le courant ionique total (chromatogramme reconstitué), d'en faire l'étude, puis d'en extraire le courant correspondant à ceux des composants qui donnent un ion particulier dans leur spectre. Dans le cas des esters méthyliques, on choisit l'ion *m/z* 74 qui est souvent un ion majeur, parfois pic de base, résultant du réarrangement de Mac Lafferty, pair à la différence des ions voisins (captation d'un proton en γ de la fonction par un échange électronique concerté à six centres (Figure 10).

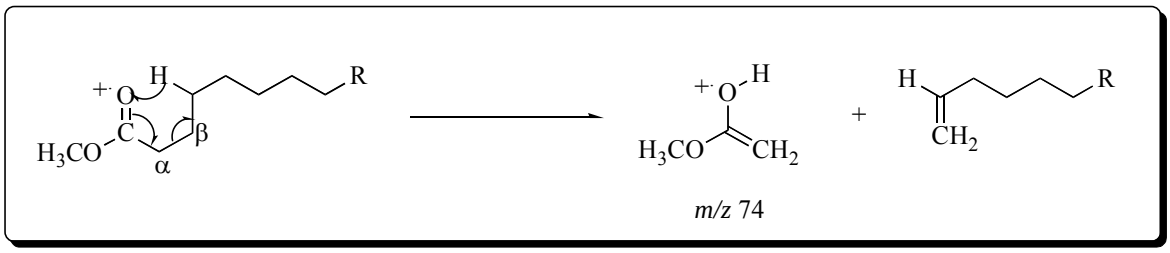


Figure 10. Réarrangement de Mac Lafferty pour les EMAG.

L'étude des spectres de masse des EMAG consiste donc dans un premier temps à ranger les spectres selon l'ordre où ils sont sortis (par ordre croissant des temps de rétention) de la colonne chromatographique. C'est à partir de cette base que sont repérés leurs ions moléculaires qui permettront de déterminer la condensation en carbones de la chaîne grasse ainsi que le nombre des insaturations et la présence de ramifications. Ces relations, ainsi que les fragmentations d'une chaîne linéaire saturée, sont rappelées dans le Tableau 20 et la Figure 11.

Tableau 20. Clés d'interprétation des spectres de masse des EMAG

Nb. C	M (EMAG)	Nb. C	M (EMAG)	Nb. C	M (EMAG	Nb. C	M (EMAG)
12	214	13	228	14	242	15	256
16	270	17	284	18	298	19	312
20	326	21	340	22	354	23	368
24	382	25	396	26	410	27	424
28	438	29	452	30	466	31	480

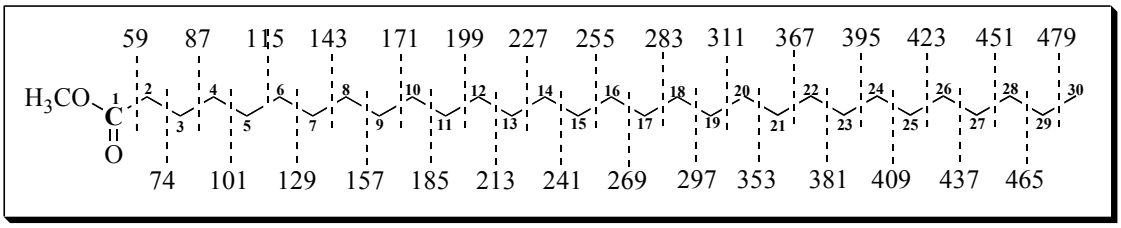


Figure 11. Ions-fragments homologues des EMAG

Le Tableau 20 permet de déduire rapidement la formule brute la plus probable de l'EMAG étudié. Comme il s'agit de tracer une droite de temps de rétention des EMAG saturés à chaîne normale en fonction de longueur de chaîne équivalente (LCE), il est nécessaire d'identifier rapidement et efficacement au moins trois des spectres des EMAG saturés à chaîne normale. La droite de régression linéaire des EMAG saturés à chaîne normale est tracée en utilisant le nombre de carbones en abscisse et le temps de rétention en ordonnée. Un certain nombre de déductions peuvent alors être faites.

Quelques acides gras (EMAG) sont correctement identifiables par leur seul spectre de masse (en accord avec la valeur de LCE). Les spectres de masse des EMAG à chaîne normale sont reconnaissables par leur ion moléculaire $M^{\cdot+}$ accompagné par des pics $[M-31]^{+}$ (absent ou faible lorsque la longueur des chaînes est supérieure à 24 carbones) et $[M-43]^{+}$ **,** correspondant respectivement à la perte du radical méthoxy et d'un fragment C_3. D'autres fragments de la série $[CH_3COO(CH_2)_n]^{+}$, où n correspond au nombre de carbones, sont présents dans le spectre, notamment les pics *m/z* 87, 143 et 199 en raison leurs fragmentations respectivement favorables (Figure 12).

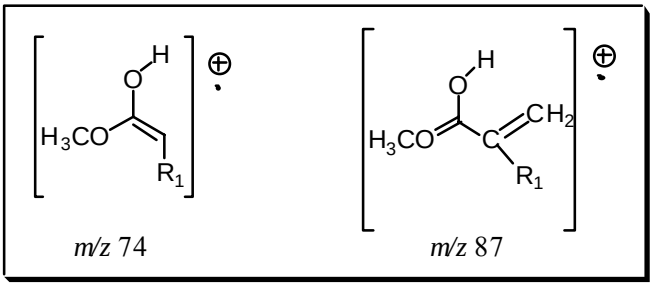


Figure 12. Ions-fragments *m/z* = 74 et *m/z* = 87 (R_1=H)

B-5.4.2. Dérivés ***N***-acylpyrrolidides

Les spectres de ces dérivés permettent d'identifier à la fois des acides gras fonctionnalisés (α-hydroxylés, β-hydroxylés) ou non (acides gras saturés ou non) en utilisant le Tableau 21 pour une première approche rapide.

Tableau 21. Clés d'interprétation des spectres de masse des *N*-acylpyrrolidides

Nb. C	M (NAP)	Nb. C	M (NAP)	Nb. C	M (NAP)
12	253	13	267	14	281
15	295	16	309	17	323
18	337	19	351	20	365
21	379	22	393	23	407
24	421	25	435	26	449
27	463	28	477	29	491
30	505	31	519	32	533

Contrairement aux EMAG, les masses moléculaires des *N*-acylpyrrolidides sont impaires (un atome d'azote). Un constat remarquable est qu'il est encore possible de procéder comme pour les esters méthyliques, en prenant les points correspondant aux acides saturés à chaîne normale (qui « ferment la marche » d'une série d'acides à même nombre de carbones), et en traçant la droite d'étalonnage qui va permettre d'accéder aux LCE, par calcul ($T_R = A.n_C + B$).

À partir de cette droite, les valeurs des LCE de chaque composé, correspondant à un temps de rétention donné, peuvent être déduites facilement. L'identification structurale repose sur la considération simultanée des éléments diagnostiques du spectre et de la valeur de la LCE.

Les EMAG se fractionnent aussi bien à partir de l'extrémité fonctionnelle que de l'extrémité hydrocarbonée. Il s'ensuit que l'on dispose de très peu d'ions diagnostiques. Contrairement aux esters méthyliques, les pyrrolidides conservent l'énergie acquise au moment de l'impact principalement sur la tête polaire de la molécule et l'ion $M^{+\cdot}$ va se fragmenter quasi uniquement à partir de l'extrémité fonctionnelle. Ainsi, une série d'ions-fragments espacés de 14 uma (CH_2) est obtenue (Figure 13).

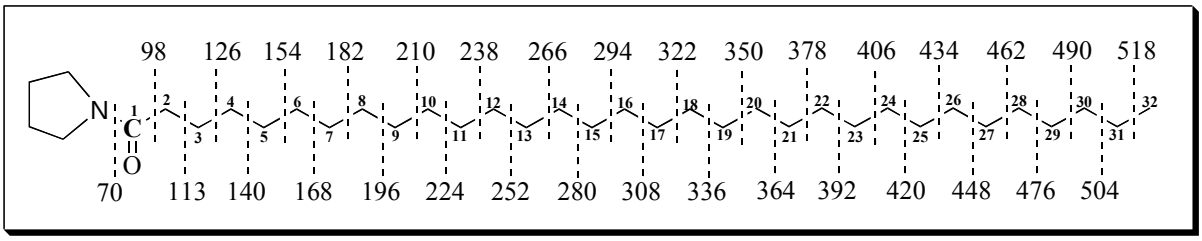
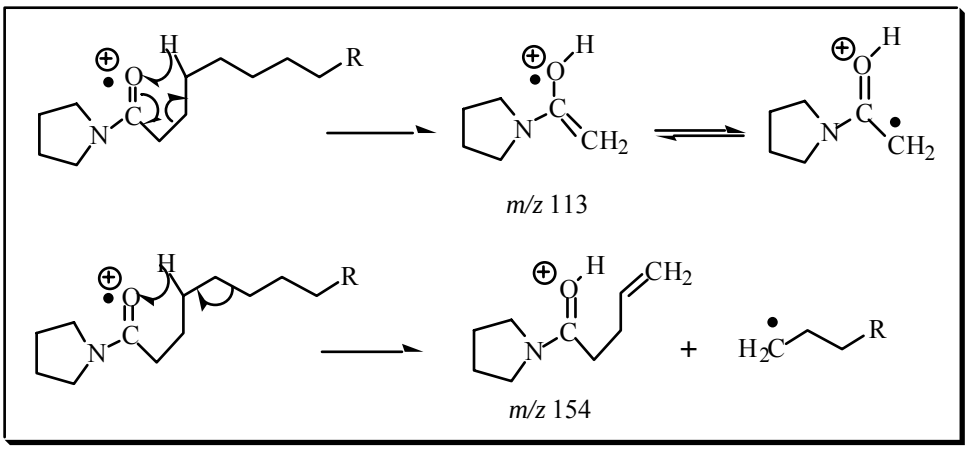


Figure 13. Ions-fragments homologues des *N*-acyl pyrrolidides

La position d'une ramification (chez les acides gras, il s'agit du groupe méthyle, sauf exception rarissime) est déterminé par le fait que l'ion homologue correspondant à cette partie de molécule est abaissé très nettement, voire disparaît, tandis que les ions homologues voisins (± 14 uma) apparaissent plutôt d'intensité élevée, relativement au moins. L'identification d'un acide gras repose donc finalement sur l'examen des spectres de masse de l'ester méthylique et du pyrrolidide, et sur la position du pic chromatographique. La localisation d'une double liaison s'effectue par la présence d'un écart de 12 au lieu de 14 uma entre deux ions-fragments homologues successifs. L'identification d'un acide gras repose donc finalement sur l'examen des spectres de masse de l'ester méthylique et du pyrrolidide, et sur la position du pic chromatographique.

Redisons-le, il est très utile aussi d'observer l'incidence sur la valeur de LCE qu'entraîne la présence d'une double liaison ou d'une ramification : diminution de 0,25 à 0,50 suivant la position, plus ou moins éloignée de la fonction. Dans le but d'attribuer la position d'une fonction supplémentaire, la valeur de l'ion moléculaire est notée, ce qui permet de soupçonner une autre fonction ou à défaut un ion quasi moléculaire (perte d'un méthyle, d'une petite molécule surtout dans le cas où cela offre un indice de cette présence fonctionnelle) et les ions homologues attendus sont examinés avec soin pour repérer si certains ne sont pas modifiés, révélant la présence à une position précise d'un groupe, un hydroxyle par exemple. Ainsi, la présence d'un hydroxyle en C-2 est révélée par le Mac Lafferty des EMAG à *m/z* 90 au lieu de 74 (74 + OH). Ainsi, tous les acides gras saturés (NAP) ont des fragments espacés d'un méthylène (14 uma) à partir de l'ion fragment *m/z* 126 jusqu'à l'ion moléculaire. De plus, le pic *m/z* 154 est souvent faible à cause de sa concurrence avec le fragment Mac Lafferty *m/z* 113 (pic de base), il est donc moins favorisé (Figure 14). Si cette monotonie des intervalles des fragments est rompue sur un spectre de masse des NAP, c'est que l'acide gras correspondant est insaturé. En outre, si certains pics ont des intensités très faibles ou sont absents, on peut déduire que l'acide possède des ramifications.

Figure 14. Réarrangement de Mac Lafferty pour les NAP et obtention du pic *m/z* 154



H-6. Stérols

H-6.1. Détermination des nombres des insaturations

L'ion moléculaire ou un ion quasi moléculaire peut être visible dans le SM. Les Tableaux 22 à 24 permettent de déterminer les nombres des carbones et les nombres des insaturations à partir des SM des stérols libres et des SM de leurs acétates. Ces tableaux mettent en évidence l'influence d'une double liaison en 5 ou en 7 sur la présence ou non du pic moléculaire des acétates de stérols. Ce pic est presque toujours présent pour les stérols libres mais n'apparaît sur les acétates que pour les stérols n'ayant pas d'insaturation Δ5. Pour ceux-là, souvent les plus fréquents, c'est le du pic $[M\text{-}AcOH]^+$, soit $[M\text{-}60]^+$, qui est observé (Goad & Akihisa, 1992).

Tableau 22. Détermination du nombre de carbones et du nombre d'insaturations à partir des masses moléculaires (*m/z* = M) des stérols libres

nb C nb dl	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
0	304	318	332	346	360	374	388	402	416	430	444
1	302	316	330	344	358	372	386	400	414	428	442
2	300	314	328	342	356	370	384	398	412	426	440
3	298	312	326	340	354	368	382	396	410	424	438
4	296	310	324	338	352	366	380	394	408	422	436

Tableau 23. Détermination des nombres d'insaturations et des nombres de carbones correspondant à partir des pics moléculaires $[M\text{-}AcOH]^+$ des acétates de stérols Δ^5

nb C nb dl	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1	284	298	312	326	340	354	368	382	396	410	424
2	282	296	310	324	338	352	366	380	394	408	422
3	280	294	308	322	336	350	364	378	392	406	420
4	278	292	306	320	334	348	362	376	390	404	418

Tableau 24. Détermination des nombres d'insaturations et des nombres de carbones correspondant à partir des masses moléculaires (*m/z* = M) des acétates de stérols autres que Δ^5

nb C nb dl	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
0	346	360	374	388	402	416	430	444	458	472	486
1	344	358	372	386	400	414	428	442	456	470	484
2	342	356	370	384	398	412	426	440	454	468	482
3	340	354	368	382	396	410	424	438	452	466	480
4	338	352	366	380	394	408	422	436	450	464	478

H-6.2. Localisation des insaturations.

S'il est possible de déterminer, d'une part le nombre de carbones du stérol et d'autre part le nombre des insaturations que le stérol possède, la localisation de ces dernières entre le noyau tétracyclique du stérol et sa chaîne latérale est une autre étape pour la détermination complète de la structure. Pour cela, quelques pics caractéristiques des spectres de masse permettent d'y parvenir. Ainsi, un pic de forte intensité à :

- *m/z* 215 (pic de base) correspond à un stanol avec noyau tétracyclique saturé mais qui peut posséder des insaturations dans la chaîne latérale.
- *m/z* 213 correspond à un stérol Δ^5, Δ^7, Δ^8, $\Delta^{9(11)}$… ayant une double liaison dans le système tétracyclique.
- *m/z* 211 correspond à un stérol possédant deux doubles liaisons dans les cycles ($\Delta^{5,7}$, $\Delta^{5,8}$…).
- *m/z* 209 caractérise un stérol possédant trois doubles liaisons ($\Delta^{5,7,9(11)}$…).

H-6.3. Pics de base des stérols indiqués dans la littérature.

Plusieurs pics caractéristiques d'insaturations particulières sont signalés dans la littérature (Goad & Akihisa, 1997). Les Tableaux 25 à 27 regroupent quelques pics de bases caractéristiques des formes libres et acétylées de stérols et de *nor*-A stérols.

Tableau 25. Quelques pics de base des stérols

Ions *m/z* à 100%	Insaturations	Ions *m/z* à 100%	Insaturations

Stérols libres	Stérols acétylés*		Stérols libres	Stérols acétylés	
233	215	Δ^{0}	314	$[M\text{-}AcOH]^{+}$	$\Delta^{5,24(28)(Z\ ou\ E)}$
255	255	Δ^{7}(24-Me-β)	$[M\text{-}Me\text{-}H_2O]^{+}$	$[M\text{-}AcOH]^{+}$	$\Delta^{5,7}$
255	255	Δ^{7}(24-Et-β)	$[M\text{-}Me\text{-}ROH]^{+}$	$[M\text{-}Me\text{-}ROH]^{+}$	$\Delta^{5,8}$
255	$[M\text{-}AcOH]^{+}$	$\Delta^{5,22}$	M^{+}	55	Δ^{7}
255	$[M\text{-}AcOH]^{+}$	$\Delta^{5,22}$ (24-Me-β)	M^{+}	$[M\text{-}AcOH]^{+}$	Δ^{5} (24-Me-α)
271	55	$\Delta^{7,22}$(24-Et-β)	M^{+}	$[M\text{-}AcOH]^{+}$	$\Delta^{5,22}$ (24-Me-α)
271	313	$\Delta^{7,24(28)}$	M^{+}	$[M\text{-}AcOH]^{+}$	$\Delta^{5,25}$ (24-Et-α)
271	313	$\Delta^{7,22}$(24-Me-α/β)	M^{+}	$[M\text{-}AcOH]^{+}$	Δ^{5} (24-Et-α/β)
271	313	$\Delta^{7,22}$(24-Et-α)	M^{+}	M^{+}	Δ^{5} (24-Me-β)
271	313	$\Delta^{7,25}$(24-Et-α)	M^{+}	M^{+}	Δ^{7}(24-Me-α)
271	313	$\Delta^{7,22,25}$(24-Et-α)	M^{+}	M^{+}	Δ^{7}(24-Et-α)
271	366	$\Delta^{5,24(25)}$	M^{+}	M^{+}	Δ^{8}
275	$[M\text{-}AcOH]^{+}$	Δ^{5}	M^{+}	M^{+}	$\Delta^{8(14)}$

* 60 = AcOH

Tableau 26. Quelques pics de base des *nor*-A-stérols

Pic de base (*m/z* 100%)		Insaturations	Références
nor-A-stérols libres	*nor*-A-stérols acétylés		
M^{+}	n.m.	$\Delta^{0,22(Z)}$(24*S*-Me)	De Nanteuil, *et al*., 1985
217	215 $[M\text{-}AcOH]^{+}$	Δ^{0}	Minale & Sodano, 1974b Teshima *et al*., 1984b De Nanteuil, *et al*., 1985
233	215	Δ^{0} (24 *R/S*-Me)	Minale & Sodano, 1974b
273	255	Δ^{15}	Teshima *et al*., 1984b De Nanteuil, *et al*., 1985
n.m.	257	$\Delta^{0,22(E)}$ (*n*or-A patinostérol)	Bohlin *et al.*, 1981 Teshima *et al*., 1984b
273	257	$\Delta^{0,22(E)}$	Minale & Sodano, 1974b Teshima *et al*., 1984b De Nanteuil, *et al*., 1985
n.m.	358	$\Delta^{0,24(28)}$	Teshima *et al*., 1984a Teshima *et al*., 1984b
n.m.	M^{+}	Δ^{7}	Teshima *et al*., 1984b

H-6.4. Principaux ions-fragments donnés dans la littérature

Quelques éléments de structure sont rapidement attribuables grâce à leurs pics caractéristiques qui ont été regroupés dans le Tableau 27 pour faciliter les discussions présentées dans les pages suivantes.

Tableau 27. Ions caractéristiques des stérols et *nor*-A stérols libres et acétylés

m/z		Insaturations	Références
Stérols libres	Stérols acétylés		

206 (66%)	Δ^{15}	Goad & Akihisa, 1992
246 (n.m.)	Δ^{7}	Bohlin *et al*., 1982

m/z		Insaturations	Références
nor-A-Stérols libres	*nor*-A-Stérols acétylés		
206 (37%)	93 (100%)	Δ^{15}	Teshima *et al*., 1984b
	206 (55%)		Goad & Akihisa, 1992
			Santalova *et al*., 2004
273	69 (100%)	$\Delta^{0,22(E)}$	Minale & Sodano, 1974b
			Teshima *et al*., 1984b
			De Nanteuil, *et al*., 1985
			Santalova *et al*., 2004
n.m.	413 (10%)	Δ^{7}	Teshima *et al*., 1984b

RESULTATS ET DISCUSSIONS

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Positions taxonomiques des Démosponges étudiées

Nous présentons sous forme des Tableaux la position taxonomique des Démosponges étudiées selon *Systema Porifera*, qui représente ce qu'il y a de plus récent en matière de classification des éponges (Hooper & Van Soest, 2002).

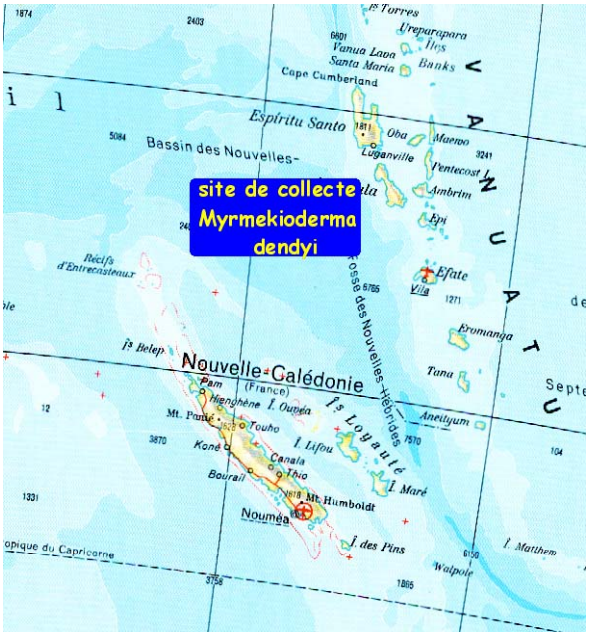
I-1. *Myrmekioderma dendyi*. Eponge récoltée au Vanuatu (anciennement Nouvelles-Hébrides) par l'équipe de plongeurs de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) dans le cadre du programme européen Marine Science and Technology (MAST III, 1994-1998).

Phylum	Classe	Ordres	Familles	Genres	Espèces
				Acanthoclada	
				Didiscus	
		Spirophorida		*Halicnemia*	
		Astrophorida		*Heteroxya*	
		Hadromerida		*Higginsia*	
		Chondrosida	Axinellidae	*Julavis*	
		Poecilosclerida	Bubaridae	*Microxistyla*	
Porifera	**Demospongiae**	**Halichondrida**	**Desmoxyidae**	***Myrmekioderma***	***dendyi***
		Agelasida	Dictyonellidae	*Negombo*	*styx*
		Haplosclerida	Halichondriidae	*Parahigginsia*	sp.
		Dictyoceratida			
		Dendroceratida			
		Halisarcida			
		Verongida			

Planche 21. Position taxonomique de l'espèce *Myrmekioderma dendyi*



Cliché J-L. Menou



I-2. *Stylissa carteri.* Cette éponge a été récoltée en plongée autonome au large de la Station marine d'Obhur, au nord de Djeddah (Arabie Saoudite) par le Pr. J.M. Kornprobst et dans la région de Djibouti par le Professeur J.F. Biard.

Phylum	Classe	Ordres	Familles	Genres	Espèces
Porifera	**Demospongiae**	Spirophorida Astrophorida Hadromerida Chondrosida Poecilosclerida **Halichondrida** Agelasida Haplosclerida Dictyoceratida Dendroceratida Halisarcida Verongida	Axinellidae Bubaridae Desmoxyidae **Dictyonellidae** Halichondriidae	*Acanthella* *Dictyonella* *Liosina* *Lipastrotethya* *Phakettia* *Raphoxya* *Scopalina* ***Stylissa*** *Svenza* *Tethyspira*	*caraibica* ***carteri*** *massa*

Planche 22. Position taxonomique de l'espèce *Stylissa carteri*



Cliché J. Vacelet.
Profondeur 20 mètres



Figure . Localisation des sites de récolte de *Stylissa carteri*

I-3. *Cinachyrella alloclada* et *C. kükenthalli*. Ces éponges ont été récoltées en Arabie Saoudite à environ 150 km au nord de Djeddah, sur fond sablo-vaseux à une profondeur d'environ 3 mètres (Pr. J.M. Kornprobst), et au Sénégal à la Pointe Senti (80 km au sud de Dakar) au niveau du rivage (Pr. G. Barnathan), et aux îles des Madeleines sur fond sableux entre 10 et 15 mètres de profondeur (Pr. J.M. Kornprobst).

Phylum	Classe	Ordres	Familles	Genres	Espèces
Porifera	**Demospongiae**	**Spirophorida** Astrophorida Hadromerida Chondrosida Poecilosclerida Halichondrida Agelasida Haplosclerida Dictyoceratida Dendroceratida Halisarcida Verongida	Samidae Spirasigmidae **Tetillidae**	*Acanthotetilla* *Amphitethya* *Cinachyra* ***Cinachyrella*** *Craniella* *Fangophilina* *Paratetilla* *Tetilla*	aff. *schulzei* ***alloclada*** *apion* ***kükenthali*** *voeltzkowi* sp.

Planche 23. Position taxonomique des espèces *Cinachyrella alloclada* et *C. kükenthali*.



Sites de récoltes des éponges du Sénégal (x)



Cliché G. Barnathan
Cinachyrella alloclada
Pointe Senti (Sénégal).

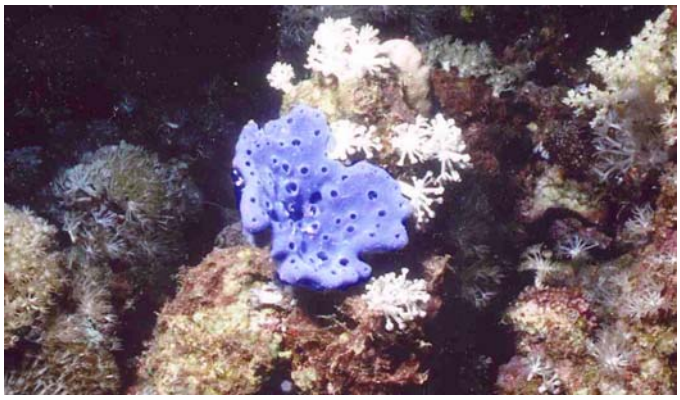


Cliché J.M. Kornprobst
Cinachyrella kükenthali (- 10-15 m)
îles Madeleine (Sénégal).

I-4. *Chalinula saudiensis*. Cette éponge a été découverte en 1998 en plongée autonome au large de la Station marine d'Obhur, au nord de Djeddah (Arabie Saoudite) par le Pr. J.M. Kornprobst. Elle a été décrite en 2001 (Vacelet *et al*., 2001).

Phylum	Classe	Ordres	Sous-Ordres	Familles	Genres	Espèce
		Spirophorida				
		Astrophorida				
		Hadromerida				
		Chondrosida				
		Poecilosclerida				
		Halichondrida				
		Agelasida		Cammyspongiidae		
Porifera	**Demospongiae**	**Haplosclerida**	**Haplosclerina**	**Chalinidae**	***Chalinula***	***saudiensis***
		Dictyoceratida	Petrosina	Niphatidae	*Cladocroce*	
		Dendroceratida			*Dendroxea*	
		Halisarcida			*Haliclona*	
		Verongida				

Planche 24. Position taxonomique de l'espèce *Chalinula saudiensis*



Cliché J. Vacelet.
Profondeur 15 mètres

I-5. *Geodia* sp. Cette éponge provient de la Campagne « Talus 99 » de l'Ifremer dans l'Atlantique nord, au large de l'Irlande. Ces éponges ont été récoltées par dragage profond à environ 1200 mètres. La détermination taxonomique a été réalisée par J. Vacelet et cette *Geodia* est proche des espèces *G. barretti*, *G. cydonium* et *G. megastrella*.

Phylum	Classe	Ordres	Familles	Genres	Espèces
Porifera	**Demospongiae**	Spirophorida **Astrophorida** Hadromerida Chondrosida Poecilosclerida Halichondrida Agelasida Haplosclerida Dictyoceratida Dendroceratida Halisarcida Verongida	Ancorinidae Calthropellidae **Geodiidae** Pachastrellidae	*Caminus* *Erylus* ***Geodia*** *Isops* *Pachymatisma* *Sidonops*	*barretti* *corticostylifera* *crustosa* *cydonium* *exigua* *gibberosa* *gigas* *globostellifera* *japonica* *macandrewii* *megastrella* *mesotriaeria* *mulleri* *neptuni* **sp.**

Planche 25. Position taxonomique de l'espèce *Geodia* sp.



Cliché G. Barnathan
Photographie prise au laboratoire



I-6. *Axinyssa djiferi* (nouvelle espèce). Cette éponge a été récoltée sur des racines de palétuviers dans la mangrove du Siné-Saloum (Sénégal), à proximité du village de Djifer (cf. carte p. 64) par les Pr. G. Barnathan et J.M. Kornprobst.

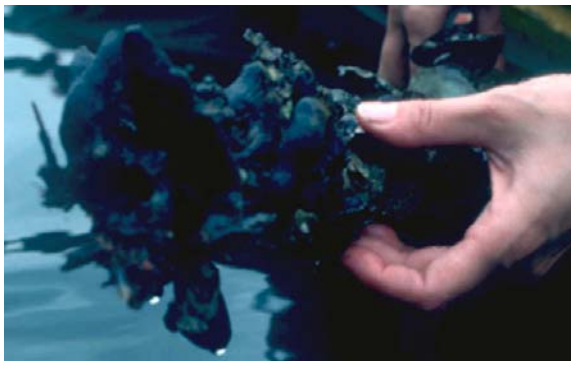
Phylum	Classe	Ordres	Familles	Genres	Espèces
Porifera	**Demospongiae**	Spirophorida Astrophorida Hadromerida Chondrosida Poecilosclerida **Halichondrida** Agelasida Haplosclerida Dictyoceratida Dendroceratida Halisarcida Verongida	Axinellidae Bubaridae Desmoxyidae Dictyonellidae **Halichondriidae**	*Amorphinopsis* ***Axinyssa*** *Ciocalapata* *Ciocalypta* *Epipolasis* *Halichondria* *Hymeniacidon* *Laminospongia* *Spongosorites* *Topsentia* *Vosmaeria*	*ambrosia* *aplysinoides* ***djiferi*** *terpenensis* *terpnis* sp.

Planche 26. Position taxonomique de l'espèce *Axinyssa djiferi*



Cliché J.M. Kornprobst
Emilie Genin dans la mangrove de Djifer
Profondeur inférieure à 1 mètre

Découverte en 1984 lors d'une mission d'inventaire de la flore et de la faune benthique du plateau continental sénégambien, cette nouvelle espèce a été décrite en 2002 (Boury-Esnault *et al*., 2002).



Cliché J.M. Kornprobst

I-7 *Trikentrion loeve*. Eponge récoltée à une quarantaine de mètres de profondeur au

large de Dakar (site Grand Thiouri-Ba, cf. carte p. 64) par le Pr. J.M. Kornprobst.

Phylum	Classe	Ordres	Sous-Ordres	Familles	Genres	Espèces
					Amphinomia *Aulospongus* *Axechina* *Cantabrina* *Ceratopsion* *Cyamon* *Echinodictyum* *Ectyoplasia* *Endectyon* *Eurypon* *Hymeraphia* *Lithplocamia* *Plocamione* *Raspaciona* *Raspailia*	
Porifera	**Demospongiae**	Spirophorida Astrophorida Hadromerida Chondrosida **Poecilosclerida** Halichondrida Agelasida Haplosclerida Dictyoceratida Dendroceratida Halisarcida Verongida	**Microcionina** Myxillina Mycalina Latrunculina	Acarnidae Microcionidae **Raspailiidae**	*Rhabdeurypon* *Thrinacophora* ***Trikentrion*** *Waltherarndtia*	*flabelliforme* *helium* ***laeve*** **(= *loeve*)**

Planche

27. Position taxonomique de l'espèce *Trikentrion laeve*

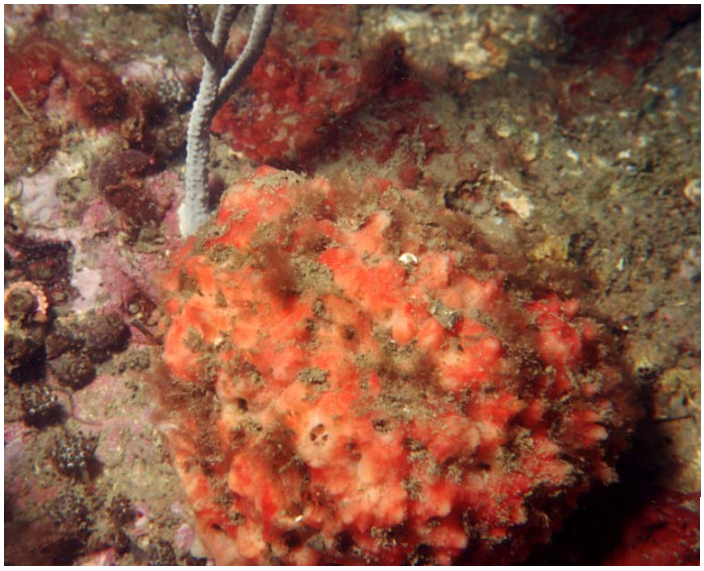


Cliché J.M. Kornprobst
Profondeur : 35 à 40 mètres

I-8. *Aaptos papillatus*. Espèce récoltée dans le golfe du Lion, au large du Grau du Roi à une vingtaine de mètres de profondeur par M. P. Petit de Voize.

Phylum	Classe	Ordres	Familles	Genres	Espèces
Porifera	**Demospongiae**	Spirophorida Astrophorida **Hadromerida** Chondrosida Poecilosclerida Halichondrida Agelasida Haplosclerida Dictyoceratida Dendroceratida Halisarcida Verongida	Acanthochaetetidae Alectonidae Clionaidae Hemiasterellidae Placospongiidae Polymastiidae Solesellidae Spirastrellidae Stylocordylidae **Suberitidae** Tethyidae Timeidae Trachcladidae	***Aaptos*** *caulospongia* *Homaxinella* *Pticatellopsis* *Prosuberites* *Protosuberites* *Pseudospongosorites* *Pseudosuberites* *Rhizaxinella* *Suberites* *Terpios*	*aaptos* ***papillatus***

Planche 28. Position taxonomique de l'espèce *Aaptos papillatus* (synonyme *papillata)*



Cliché P. Petit de Voize
Profondeur 10 mètres.

J - Lipides totaux et phospholipides des éponges étudiées

Les lipides totaux ont été obtenus à partir des éponges qui ont été immergées dans du méthanol ou chloroforme/méthanol (1/1, v/v), sur le site de la récolte (souvent à bord d'un navire), ou bien dans du mélange dicholorométhane/méthanol (1/1, v/v), au Laboratoire de Chimie Marine de Nantes (LCM-SMAB). Il n'a donc été possible de déterminer les teneurs en lipides totaux, à partir des éponges fraîches, qu'avec les éponges que nous avons traitées et extraites au LCM (Tableau 28). Les extractions à l'aide de chloroforme ont été réalisées à la Station Marine d'Obhur (Université de Djeddah) où ce solvant est couramment utilisé. A Nantes, nous l'avons remplacé par le dichlorométhane, moins toxique.

Tableau 28. Teneurs en lipides des éponges étudiées

Eponges traitées au LCM			
Familles/Espèces	Lipides totaux (g)	Poids sec (g)	% en lipides
Myrmekioderma dendyi	39,7	500	7,3
Stylissa carteri (Djibouti)	7,6	132	5,5
Geodia sp.	2,3	228	1
Axinyssa djiferi	14	688	2
Trikentrion laeve	7,2	114	6
Aaptos papillata	4,6	134,6	3,4

Le Tableau 29 présente les pourcentages relatifs en lipides neutres, glycolipides et phospholipides de la fraction lipides totaux, et le Tableau 30 présente la répartition par classes de phospholipides pour chacune des éponges étudiées.

Tableau 29. Composition des lipides totaux des éponges étudiées*

Eponges	Lipides neutres			Glycolipides	Phospholipides
	H	D	Σ	A	M
Myrmekioderma dendyi	4,2	66,2	70,4	14,1	15,5
Stylissa carteri (Djeddah)	33,4	25,8	59,2	15,8	25,0
Stylissa carteri (Djibouti)	54,6	9,3	63,9	9,4	26,7
Cinachyrella alloclada	40,0	43,6	83,6	8,4	8,0
Cinachyrella kükenthali	37,9	36,5	74,4	16,9	8,7
Chalinula saudiensis	12,3	77,3	89,6	3,4	7,0
Geodia sp.	5,0	44,2	49,2	11,9	39,0
Axinyssa djiferi	27,6	43,1	70,7	17,0	12,3
Trikentrion laeve	9,1	66,1	75,2	13,6	11,2
Aaptos papillata	12,2	58,4	70,6	11,1	18,1

* les valeurs indiquées représentent les pourcentages relatifs des fractions éluées. Les rendements chromatographiques (total récupéré en bas de colonne/lipides totaux introduits) sont donnés pour chaque éponge dans la partie Résultats et discussions. H : hexane, D : dichlorométhane, A : acétone, M : méthanol.

Pour l'ensemble des éponges étudiées, la répartition des lipides totaux est globalement constante, avec une forte proportion de lipides neutres, en moyenne de 70 % mais avec des

variations allant de 60 à 90%, et des proportions sensiblement équivalentes de glycolipides et de phospholipides qui varient de 10 à 25%. Toutefois, l'espèce *Geodia* sp. récoltée par dragage à plus de 1000 mètres de profondeur présente une composition en lipides complètement différente avec 50% de lipides neutres, près de 40% de phospho-lipides et à peine plus de 10% de glycolipides. L'espèce de mer Rouge *Chalinula saudiensis* présente également une particularité avec une teneur considérable en lipides neutres proche de 90%, et un taux de glycolipides anormalement faible (3,4%). Bien que récoltées au même endroit et souvent côte à côte, les deux espèces du genre *Cinachyrella* présentent des différences significatives pour leurs teneurs en lipides neutres et en glycolipides mais avec des pourcentages identiques en phospholipides. La même observation est à signaler pour l'espèce *Stylissa carteri* récoltée en mer Rouge à plus de 1000 km de distance. La teneur en phospholipides peut être considérée comme constante (25 et 26,7%), mais si les pourcentages de lipides neutres sont similaires, les fractions respectivement éluées à l'hexane et au dichlorométhane présentent des variations importantes (33,4 et 25,8 pour l'espèce de Djeddah, 54,6 et 9,3 pour l'espèce de Djibouti). Enfin, les teneurs en glycolipides sont presque dans un rapport de 1 à 2 (15,8 et 9,4 pour Djeddah et Djibouti).

Tableau 30. Répartition des phospholipides en classes (%) pour les éponges étudiées*

Eponges	*lyso*-PC	PC	PE	PI	PG	PS	diPG
Myrmekioderma dendyi	2,2	54,5	8,2	24,8	4,9	-	5,4
Stylissa carteri (Djeddah)	-	52,5	-	23,2	16,0	5,9	2,4
Cinachyrella alloclada	2,6	48,0	6,7	17,0	12,1	8,5	5,1
Cinachyrella kükenthali	-	44,5	14,9	19,1	13,5	8,0	-
Geodia sp.	-	19,2	-	52,9	28,0	-	-
Axinyssa djferi	23,1	44,7	-	12,6	3,8	8,5	7,3
Trikentrion laeve	8,5	7,7	28,6	13,6	-	41,6	-
Aaptos papillata	-	11,6	-	56,2	28,6	-	3,7

* A l'exception de *Chalinula saudiensis.*

Les répartitions observées font apparaître des différences parfois très importantes selon les espèces. Les phosphatidylcholines sont largement majoritaires (de 44 à 54%) pour cinq espèces tropicales : *Myrmekioderma dendyi, Stylissa carteri*, les deux *Cinachyrella* et *Axinyssa djiferi*, alors que les phosphatidylinositols sont fortement majoritaires (de 52 à 56%) pour les deux espèces de mers tempérées à froides, *Geodia* sp. et *Aaptos papillata.* Les phosphatidylsérines ne sont majoritaires (41%) que dans *Trikentrion laeve* qui est une espèce tropicale mais qui vit à une profondeur où la température dépasse rarement 20°C.

K - Etude de la composition en acides gras des phospholipides d'éponges

K-1. *Myrmekioderma dendyi*.

K-1.1. Considérations générales sur la composition en acides gras des phospholipides

Une soixantaine d'acides gras (AG) sont identifiés à l'état d'esters méthyliques (EMAG) et de *N*-acyl pyrrolidides (NAP). Le courant ionique total enregistré pour les esters méthyliques ne montre pas d'acides gras fonctionnalisés (par exemple substitués en C-2) parmi la soixantaine d'esters séparés. Ce courant ionique est présenté au début du Tome 2 (**Tome 2, p. 3)**. Le chromatogramme reconstitué à partir du courant ionique calé sur l'ion *m/z* 74 (réarrangement de Mac Lafferty des EMAG) a été ensuite extrait. Les composants du mélange d'esters sortent de la colonne de 4 min à près de 40 min. Le courant ionique des EMAG permet de distinguer trois zones. Une zone concentrée en AG courts (≤ 22 C), une zone comportant peu de composés, et à des taux faibles, une zone concentrant les AG longs (≥ 23 C).

A titre d'exemples, des spectres d'EMAG saturés communs sont montrés : *iso*-15:0, *anteiso*-15:0 et n-15:0 **(Tome 2, p. 4)**, n-21:0 et n-23:0 **(Tome 2, p. 5**). Le pic de base est toujours le *m/z* 74, accompagné du pic intense *m/z* 87, et l'ion moléculaire est toujours présent.

Quelques diméthylacétals sont présents, repérés par le pic de base *m/z* 75 pour l'extrémité - $CH(OCH_3)_2$: ils proviennent de la réaction d'aldéhydes en milieu MeOH/HCl, les aldéhydes provenant eux-mêmes de l'hydrolyse des plasmalogènes. Cela signifie donc que les phospholipides de *M. dendyi* contiennent en faible proportion des éthers vinyliques gras.

L'examen conjoint des analyses CPG-SM des mélanges des deux types de dérivés conduit aux observations qui suivent. Il n'y a pas d'acides gras poly-insaturés excepté un acide de type 20:3 (détectable dans le mélange des NAP) et un acide 5,9,x-29:3 (détectable dans le mélange des EMAG), à l'état de traces. **Une quinzaine d'acides gras à système Δ5,9 sont présents** dans ces phospholipides, dont deux à chaînes courtes (17 et 18 carbones). C'est le nombre maximum de ces acides, observé jusqu'à présent dans une éponge (Barnathan *et al*., 1996). Les spectres enregistrés montrent des séries d'isomères : par exemple cinq acides 17:0, 5 acides 18:0, quatre acides 25:0, trois acides 25:0, trois acides Δ5,9-27:2, trois acides Δ5,9-28:2, quatre acides Δ5,9-29:2. Les acides gras des phospholipides de *M. dendyi* sont donc **caractérisés par un nombre élevé d'acides ramifiés**. Plusieurs d'entre eux sont des AG nouveaux ou très rares. Le nouvel acide 17-Me-24:0 (que nous avons en fait d'abord observé chez *Cinachyrella* cf. *kükenthali*), se trouve à plus de 12% du total. En général, tous ces composés sont observés dans le courant ionique des NAP, et dans celui des EMAG mais il y a quelques exceptions. Les proportions relatives des différents acides gras seront essentiellement déterminées à partir du chromatogramme des dérivés NAP où les composés sont bien identifiés.

De la même façon que pour les EMAG, le courant ionique total des *N*-acyl pyrrolidides a d'abord été enregistré pour s'assurer qu'il n'y a pas d'acides fonctionnalisés en position C-2 par exemple, tels que les acides 2-hydroxylés. Nous en extrayons ensuite le courant ionique des dérivés comportant l'ion-fragment *m/z* 113 **(Tome 2, p. 6)**, pic de base des NAP dans le cas général, produit par un réarrangement de Mac Lafferty. Ce procédé permet ainsi d'éliminer aussi des impuretés, des esters méthyliques encore présents si la conversion n'a pas été complète, ou des composés autres que des dérivés d'acides gras.

Une remarque s'impose : **l'aspect de ce courant ionique est typique de ce qui est généralement obtenu pour les acides gras d'éponges** (Walkup *et al*., 1981 ; Barnathan, 1993) en ce qu'il peut être considéré en trois parties distinctes **(Tome 2, p. 6)**. Dans les conditions où nous avons opéré (phase apolaire et programmation linéaire de température), nous avons :

- jusqu'à 22 min environ : de nombreux AG courts (≤ 22 carbones) dont plusieurs à des niveaux élevés.
- de 22 à 30 min environ : une partie de chromatogramme avec peu de composés et à des niveaux très faibles.
- de 30 à 41 min : AG à 23 carbones et plus à des taux parfois élevés. Cette partie représente près de 50 % du total du courant *m/z* 113.

Le Tableau 31 ci-dessous rassemble les acides gras identifiés avec les proportions relatives (en % du mélange total, en masse) et les valeurs de longueur de chaîne équivalente (LCE). Près de 40 % des AG sont insaturés et il s'agit majoritairement d'acides typiques des éponges ("démospongiques") à insaturation Δ5,9 (Djerassi et Lam, 1991). Près de la moitié des AG sont à longue chaîne (≥ 23C) . Les AG saturés sont en majeure partie ramifiés.

Tableau 31. Composition en acides gras des phospholipides de *Myrmekioderma dendyi*

Noms	Structures	LCE	% massiques
Tétradécanoïque	14:0	14,00	1,4
4,8,12-triméthylhexadécanoïque	4,8,12-Me_3-13:0	14,52	0,4
13-Méthyltétradécanoïque	*i*-15:0	14,61	5,3
12-Méthyltétradécanoïque	*ai*-15:0	14,71	2,1
Pentadécanoïque	15:0	15,00	1,2
10,13-Diméthyltétradécanoïque*	10,13-Me_2-14:0	15,22	0,5
Hexadéc-9-ènoïque	9-16:1	15,75	0,9
15-Méthylhexadéca-5,9-dièn oïque*	*i*-5,9-17:2	15,95	2,1
Hexadécanoïque	16:0	16,00	6,2
15-Méthylhexadéc-10-ènoïque*	*i*-10-17:1	16,33	1,7
10-Méthylhexadécanoïque	10-Me-16:0	16,42	4,2
8,8-Diméthylhexadécanoïque*	8,8-Me_2-16 :0	16,52	0,5
15-Méthylhexadécanoïque	*i*-17:0	16,61	2,2
14-Méthylhexadécanoïque	*ai*-17:0	16,71	0,9
Heptadécanoïque	17:0	17,00	1,1
13,14-Diméthylhexadécanoïque*	13,14-Me_2-16:0	17,08	0,6
16-Méthylheptadéca-5,9-dièn oïque*	*i*-5,9-18:2	17,20	0,7
10-Méthylheptadécanoïque	10-Me-17:0	17,38	0,3
Octadéc-9-ènoïque	9-18:1	17,65	1,2
Octadéc-10-ènoïque	10-18:1	17,73	0,3
Octadéc-11-ènoïque	11-18 :1	17,79	0,5
Octadécanoïque	18:0	18,00	4,6
8-Méthyloctadécanoïque*	8-Me-18:0	18,38	6,8
10,16-Diméthyloctadécanoïque*	10,16-Me_2-18:0	18,54	0,6
17-Méthyloctadécanoïque	*i*-19:0	18,63	1,5
Nonadéc-9-ènoïque	9-19:1	18,75	1,2
18-Méthylnonadécanoïque	*i*-20:0	19,62	0,2
18-Méthylicosanoïque	*ai*-21:0	20,74	0,7
17-Méthyltétracosanoïque*	17-Me-24:0	24,38	13,7
Pentacosa-5,9-dièn oïque	5,9-25:2	24,48	0,3
21-Méthyltétracosanoïque*	21-Me-24:0	24,52	1,1
Pentacosanoïque	25:0	25,00	1,0
24-Méthylpentacosa-5,9-dièn oïque	*i*-5,9-26:2	25,07	1,1
Hexacosa-5,9-dièn oïque	5,9-26:2	25,40	3,7

25-Méthylhexacosa-5,9-dièn oïque	*i*-5,9-27:2	26,08[1]	6,2
24-Méthylhexacosa-5,9-dièn oïque	*ai*-5,9-27:2	26,20[1]	5,6
Heptacosa-5,9-dièn oïque	5,9-27:2	26,45[1]	0,6
26-Méthylheptacosa-5,9-dièn oïque	*i*-5,9-28:2	27,10[1]	0,6
26-Méthylheptacosa-5,9-dièn oïque	*ai*-5,9-28:2	27,20[1]	0,5
Octacosa-5,9-dièn oïque	5,9-28:2	27,42[1]	3,2
Nonacosa-5,9,x-trièn oïque	5,9,x-29:3	27,69[1]	0,3
25-Méthyloctacosa-5,9-diénoïque*	25-Me-5,9-28:2	27,91[1]	5,5
27-Méthyloctacosa-5,9-dièn oïque	*i*-5,9-29:2	28,05[1]	0,4
26-Méthyloctacosa-5,9-dièn oïque	*ai*-5,9-29:2	28,16[1]	2,1
Nonacosa–5,9–dièn oïque	5,9-29:2	28,50	1,2
22-Méthylnonacosanoïque (tent.)	*br*-30:0	28,50	0,6
Σ AGS			57,7
Σ AGI			40,2
Σ Δ5,9			34,4
Σ acides à longues chaînes (≥ 24 C)			48,0

* AG nouveaux ou rares. [1] Valeurs obtenues à partir des EMAG.
Acides mineurs (< 0,2%) : *i*-14:0 ; *i*-16:0 ; *ai*-16:0 ; 10-17:1 ; *i*-18:0 ; 9,12-18:2 ; br-19:1 ; *ai*-19:0 ; 20:0 ; 20:3 ; 16-Me-20:0* ; 22:0 ; 13-Me-22:0* ; *ai*-23:0 ; 23:0 ; 18-Me-23:0* ; *i*-24:0 ; 24:0 ; 25:1 ; 18-Me-25:0* ; 26:1.

La page suivante **(Tome 2, p.7)** présente un extrait du début du chromatogramme, ainsi que le spectre de masse (SM) du pyrrolidide de l'acide *iso*-14:0. Celui-ci est facilement identifié sur la base de sa valeur de LCE (13,63) et de son spectre avec le pic de base *m/z* 113, l'ion moléculaire à *m/z* 281 (structure d'acide gras 14:0), et l'ion *m/z* 252 (12:0) très faible, flanqué des homologues majeurs à *m/z* 238 et *m/z* 266. Le spectre de l'EMAG correspondant est caractéristique d'un acide saturé 14:0 : ion moléculaire à *m/z* 242, pic de base à *m/z* 74 et son homologue normal impair *m/z* 87, des ions importants à *m/z* 199 ($C_{11:0}$). La valeur de LCE de 13,63 permet de conclure à une structure *iso*-14 :0. Le spectre de l'EMAG de l'acide n-14:0 est pratiquement identique à celui-ci. La sortie de colonne des dérivés NAP saturés n-14:0 à *iso*-16:0 se produit normalement **(Tome 2, p. 7).** L'identification est conforme à ce qu'indique l'analyse des EMAG. La présence des acides ramifiés 4,8,12-triméthyl-tridécanoïque est connue chez les invertébrés marins (Barnathan, 1993 ; Barnathan & Kornprobst, 1998), et 10,13-diméthyltétradécanoïque, un acide gras rare qui sera commenté ci-après.

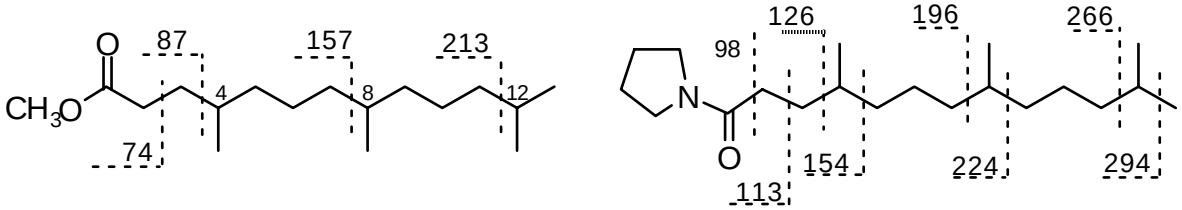
K-1.2. Acides gras saturés

Identification du 4,8,12-triméthyltridécanoïque **(Tome 2, p. 8)**

En couplage CPG/SM des EMAG, cet acide possède 16 carbones (M = 270 uma) et sort après l'acide myristique (LCE = 14,52) : il est donc très ramifié. Comme nous pouvons le voir sur le spectre, le pic de base n'est pas le *m/z* 74 mais le *m/z* 87 et il y a deux ions relativement dominants à *m/z* 157 ($C_{8:0}$) et *m/z* 213 ($C_{12:0}$). Ces données permettent de conclure qu'il s'agit de l'acide 4,8,12-triméthyltridécanoïque.

Cette identification est confirmée par l'analyse du spectre du dérivé NAP (même valeur LCE =14,52) : ion moléculaire à *m/z* 309 (16:0), l'ion *m/z* 140 anormalement faible, et le *m/z* 154

anormalement intense, indiquent un méthyle fixé sur la position C-4. L'ion attendu à *m/z* 210 ($C_{9:0}$) est quasi absent et flanqué d'homologues nets à *m/z* 196 et 224 : d'où un méthyle en C-8. Enfin, l'ion 280 est très faible surtout comparé au *m/z* 294 : méthyle en C-12 (c'est-à-dire ramification *iso*).

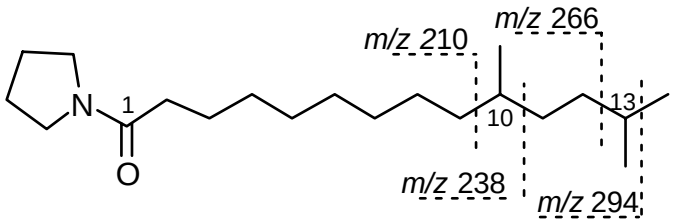


La page suivante **(Tome 2, p. 9)** montre les spectres des NAP isomères *iso*-, *anteiso*- et n-15:0. Ils ont même valeur de M (295 uma). L'ion $(M\text{-}CH_3)^+$ de l'isomère normal est très faible. Le composé *iso* est vite caractérisé par sa valeur typique de LCE (14,63) et par la quasi inexistence de l'ion *m/z* 266. Le composé *anteiso* est vite caractérisé par sa valeur typique de LCE (14,72) et par un ion *m/z* 252 de moindre intensité comparé à ses voisins immédiats. La même séquence est observée avec les EMAG, et avec quasiment les mêmes valeurs de LCE.

Identification de l'acide rare 10,13-diméthyltétradécanoïque **(Tome 2, p. 10)**

Sortant de la colonne peu après l'EMAG n-15:0, un EMAG a un spectre d'AG saturé avec des ions majeurs à *m/z* 74 (pic de base, réarrangement de Mac Lafferty), et *m/z* 87. L'ion moléculaire est à *m/z* 270 (16:0). La valeur 15,22 de LCE est faible et suggère la présence de deux ramifications. Nous remarquons deux ions fragments anormalement importants à *m/z* 199 (11:0) et à *m/z* 227 (13:0), et donc nous pouvons former l'hypothèse d'un méthyle sur C-10 et l'autre sur C-13.

Le dérivé NAP correspondant, saturé à 16 carbones, est élué de la colonne aussitôt après l'acide n-15:0 et, avec une valeur LCE de 15,13, confirme qu'il devrait comporter deux ramifications. Le spectre de masse montre le pic de base à *m/z* 113 (Mac Lafferty), l'ion moléculaire à *m/z* 309 (16:0). La présence d'un méthyle en C-14 (ramification *iso*) est prouvée par un ion *m/z* 280 très faible, flanqué de deux homologues intenses à *m/z* 266 et *m/z* 294. D'autre part, l'ion *m/z* 224 est faible comparé à ces voisins homologues *m/z* 210 et *m/z* 238 : ceci indique la présence d'un méthyle en C-10.



Nous avons donc identifié un acide gras rare, le 10,13-diméthyltétradécanoïque. Ce composé a été identifié chez *Cinachyrella* cf. *kükenthali* (Barnathan *et al*., 2003 : Carballeira et Maldonado, 1989).

Un léger écart est constaté entre les valeurs de LCE pour le NAP et pour l'EMAG. Il a été montré par notre équipe que **les valeurs de LCE pouvaient être déterminées indifféremment sur l'un ou l'autre des dérivés, sauf quand il y a au moins trois des ramifications** (Mirallès *et al*., 1995). C'est particulièrement net pour l'acide phytanique 3,7,11,15-tétraméthyl-16:0 avec LCE= 17,72 pour l'EMAG et 17,23 pour le NAP, ou même pour le 4,8,12-triméthy-13:0, LCE = 14,53 pour l'EMAG et 14,32 pour le NAP (ces valeurs avaient été déterminées sur phase apolaire DB-1).

Nous avons donc identifié un acide gras rare, le 10,13-diméthyltétradécanoïque.

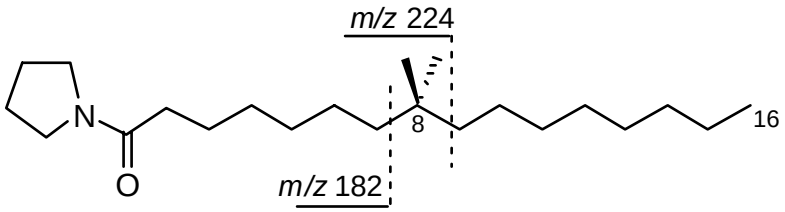
Identification des acides 10-méthylhexadécanoïque **(Tome 2, p. 11)** et 10-méthyl-hepta-décanoïque

Sortant après l'EMAG de l'acide palmitique 16:0 (valeur de LCE = 16,42), un ester présente un SM typique d'acide saturé à 17 carbones (M^+ à *m/z* 270) : il est donc ramifié mais ni *iso* ni

anteiso. Le spectre du dérivé NAP (LCE = 16,43) a un ion moléculaire à *m/z* 323 (17:0) et un ion *m/z* 224 faible vis-à-vis de ses voisins homologues *m/z* 210 et 238, ce qui implique un méthyle sur la position C-10. Il s'agit donc de l'acide 10-méthylhexanoïque déjà rencontré chez les invertébrés marins. De la même manière est identifié l'acide 10-méthylheptadécanoïque : M^+ à *m/z* 337 (18:0), LCE = 17,41 pour l'EMAG et 17,38 pour le NAP, ion *m/z* 224 très faible, le seul ion fragment d'intensité nettement plus faible que tous les autres ions homologues y compris le *m/z* 154.

Identification du nouvel acide 8,8-diméthylhexadécanoïque 8,8-Me_2-16 :0 **(Tome 2, p. 12)**

Un autre AG 18:0 ramifié (pyrrolidide : M = 337 uma) a une LCE particulièrement basse de 16,52 qui laisse supposer deux voire trois ramifications. Tous les ions homologues sont bien des fragments saturés. Dans cette séquence de couplage CPG-SM, l'ion *m/z* 210 apparaît assez faible, sauf dans le cas des acides 10-méthylés, et on n'a pas soustrait ici la phase (ion *m/z* 207). Le SM du pyrrolidide (celui de l'EMAG n'est pas nettement observé) présente alors un aspect remarquable avec deux pics intenses à *m/z* 182 et 224 et des ions *m/z* 196 et 211 très faibles. Cet écart de 40 uma fait penser à un groupe éthyle ou à deux CH_3 fixés sur le même carbone C-8. Une telle situation structurale a déjà été rencontrée et étudiée dans les huiles de poisson (Ratnayake *et al*., 1989). On peut aussi penser à une ramification éthyle. Dans le cas, exceptionnel chez les acides gras, d'un groupe éthyle, deux types de clivage peuvent se produire concomitamment et l'un deux élimine une molécule d'éthylène en formant un ion net $(M-28)^+$. Nous n'observons rien de tel dans les spectres. On en déduit que ce nouvel acide gras est bien l'acide 8,8-diméthylhexadécanoïque, présenté ci-dessous.

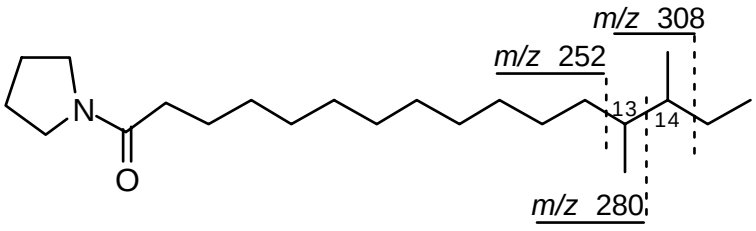


Plusieurs exemples d'identification d'acides gras mono-, di- et triramifiés de divers types ont été décrits par CPG-SM, sur la base simultanée de la valeur de LCE et des ions diagnostiques du SM des 4,4-diméthyloxazolines, ce qui autorise d'utiles comparaisons (Yu *et al.,* 1988).

Caractérisation du nouvel acide 13,14-diméthylhexadécanoïque **(Tome 2, p. 12)**

Un EMAG saturé de structure 18:0 sort aussitôt après l'acide n-17:0 pour lequel LCE = 17,09, pic de base à *m/z* 74, ion intense à *m/z* 87, M^+ à *m/z* 298. Ces données laissent supposer la présence de deux ramifications CH_3. Et même, avec une LCE aussi basse, une configuration particulière des CH_3 peut être soupçonnée

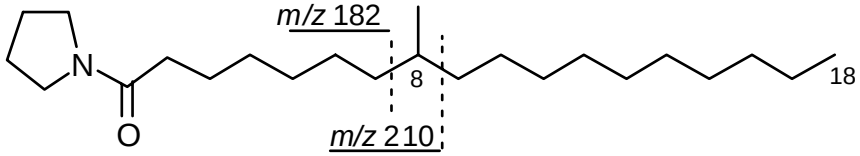
L'examen du SM du dérivé pyrrolidide correspondant (LCE = 17,08) confirme une structure 18:0 ramifiée (M^+ à *m/z* 337). La position des méthyles est repérée comme suit : L'ion *m/z* 266 est d'intensité nettement plus faible que celle de ses voisins immédiats (*m/z* 252 et 280) et permet de conclure à une ramification en C-13. De plus, l'ion *m/z* 294, de faible intensité à comparer avec ses voisins ± 14 uma, indique une extrémité ramifiée de type *anteiso*. Il s'agit donc d'un nouvel acide gras : le 13,14-diméthylhexadécanoïque dont la structure, et les principaux clivages en SM sont représentés ci-dessous.



Une étude détaillée d'AG ramifiés isolés des huiles de poissons (Ratnayake *et al*., 1989) décrit, à titre de comparaison pour notre propre résultat, le nouvel acide 7,8-DM-16:0, un autre acide à ramifications portées par des carbones adjacents, ce qui est une configuration très rare dans le monde marin. Les auteurs identifient même deux diastéréoisomères de LCE encore plus basses que pour notre composé : 16,63 et 16,82 (phase non polaire SPB-1). Nous observons aussi un ester 18:0 très proche, de LCE = 17,26 et de SM quasi identique. Malheureusement, le spectre du NAP correspondant n'est pas disponible. Cet acide diméthylé a été décrit dans des éponges et synthétisé compte tenu de son intérêt comme agent antimicrobien potentiel (Carballeira & Maldonado, 1989 ; Carballeira & Pagan, 2000)

Autres acides saturés ramifiés identifiés chez *Myrmekiodema dendyi* (**Tome 2, p. 13**)

Le **nouvel acide 8-méthyloctanoïque** (6,8%) est identifié à l'état de pyrrolidide sur la base de la LCE = 18,41 (l'EMAG montre un SM d'ester saturé avec un ion moléculaire à *m/z* 312, donc 19:0, et une LCE de 18,42), une masse moléculaire de 351 uma, et un pic diminué à *m/z* 196 pour $C_{8:0}$.



Les acides rares **15-Me-20:0**, **16-Me-20:0**, **13-Me-22:0** et **18-Me-23:0** sont rapidement identifiés, à l'état de traces. Par exemple (**Tome 2, p. 13 et 14**), les 16-Me-20:0 et 13-Me-22:0 ont respectivement les valeurs suivantes : ions moléculaires à *m/z* 279 (structure 21:0) et 407 (structure 23:0), LCE de 20,35 et 22,32. La position C-16 de la ramification est démontrée par la très faible intensité de l'ion *m/z* 308 comparé à ses voisins *m/z* 294 et 322. La ramification en C-13 est attribuée sur le constat d'un ion *m/z* 266 de très faible intensité.

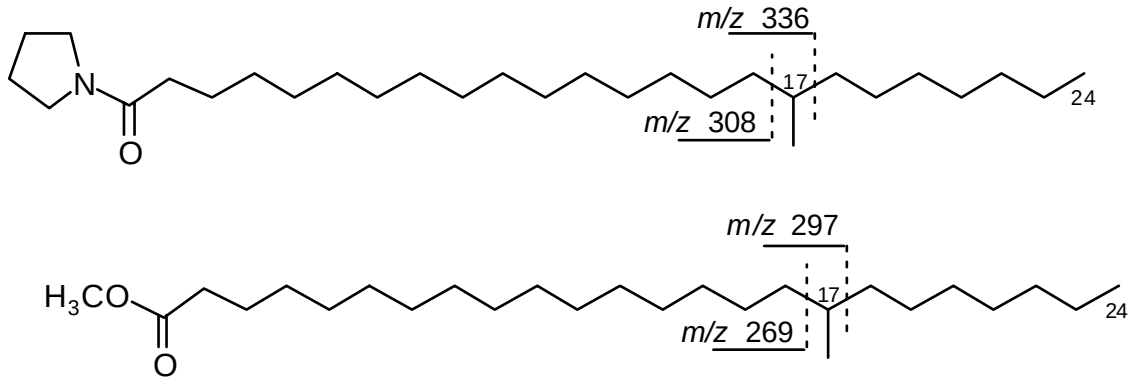
Les EMAG correspondants ont des SM typiques d'esters saturés. Par exemple, un EMAG de LCE = 20,40 correspond au 16-Me-20:0, un autre au 13-Me-22:0 (LCE = 22,40). Un EMAG saturé 26:0 - ions nets pour M^+ à *m/z* 410, $(M-43)^+$ à *m/z* 367 – admet une LCE de 25,33. Le spectre montre un pic intense à *m/z* 311 (fragment 19 :0), un pic net à *m/z* 283 (fragment 17:0) entourant un pic très faible à *m/z* 297. Il est donc possible d'avancer qu'il s'agit de l'AG rare 18-méthylpentacosanoïque que notre équipe a décrit pour la première fois chez *Cinachyrella* cf. *alloclada* de mer Rouge (Barnathan *et al*., 2003).

Identification de l'acide 10,16-diméthyloctadécanoïque (10,16-Me_2-18:0) (**Tome 2, p. 14**)

Il est identifié (tentative) par le dérivé NAP qui donne un ion moléculaire à *m/z* 365 (20:0) avec une LCE faible (18,54) qui laisse prévoir deux ramifications. Celles-ci sont identifiées comme C-10 et C-16 par des ions diminués, par rapport à leurs voisins homologues immédiats, à *m/z* 224 et *m/z* 322, respectivement. Cependant, il faudrait pouvoir expliquer pourquoi l'ion *m/z* 252 (12:0) apparaît anormalement élevé. C'est pourquoi il sera nécessaire de refaire cette analyse pour obtenir un spectre qui permette de conclure.

Identification de l'acide 17-méthyltétracosanoïque (**Tome 2, p. 15**)

Cet acide nouveau, le plus abondant de ce mélange d'AG de phospholipides, a d'abord été identifié au laboratoire dans *Cinachyrella* cf. *kükenthali* de mer Rouge (Barnathan *et al*., 2003). L'éponge *C.* cf. *alloclada* comportait d'autre part plusieurs autres acides gras ramifiés à plus de 24 carbones tel le 18-Me-25:0 cité ci-dessus (Barnathan *et al*., 2003). Les valeurs trouvées ici pour cet acide rare sont M^+ à *m/z* 435 et LCE = 24,38 pour le NAP et M^+ à *m/z* 396 et LCE = 24,40 pour l'EMAG. L'ion *m/z* 322 est nettement abaissé alors que les homologues *m/z* 308 et 336 sont augmentés.



Principaux ions fragments produits par le clivage au niveau C-17
pour l'acide 17-méthyltétracosanoïque

Identification du nouvel acide 21-méthyltétracosanoïque (**Tome 2, p. 15**)

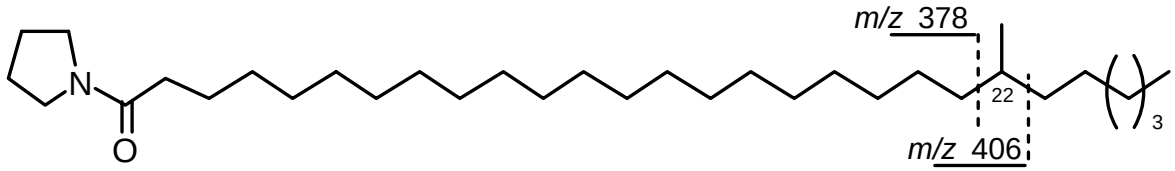
Le pyrrolidide de ce nouvel acide gras présente une LCE de 24,52 et un ion moléculaire à *m/z* 435, soit une structure saturée à une ramification br-25:0. Le méthyle est positionné en C-21 comme le montre le net abaissement de l'ion *m/z* 378 (21:0) par rapport à ses voisins homologues.

Un autre isomère br-25:0 (traces) sort à 33,85 min (M = 435 ; LCE = 24,56) en mélange avec un acide 5,9-28:2 identifiable par sa valeur de M = 473 et par l'ion dominant à *m/z* 180. Il n'est pas possible de situer la ramification du dérivé br-25:0.

Présence d'un nouvel acide gras ramifié à 30 carbones : le 22-Me-29:0 (tentative)

Le dernier pic du chromatogramme des pyrrolidides contient un mélange de deux acides gras, un saturé et un di-insaturé, ce qui en rend l'interprétation accessible. (**Tome 2, p.16**).

Il y a un ion moléculaire à *m/z* 504 (30:0) et un second à *m/z* 487 (29:2). La valeur de LCE d'environ 28,5 est attendue pour un acide 29:2 mais implique l'existence d'au moins une ramification pour un AG 30:0. L'acide 29:2 sera commenté ci-après ; c'est un acide démospongique Δ5,9 normal qui sort à la suite des acides *iso*-5,9-29:2 et *anteiso*-5,9-29:2 présents tous les deux. Pour l'acide 30:0, le SM possède un ion proéminent à *m/z* 406 ($C_{23:0}$) qui permet d'avancer l'hypothèse que le méthyle est fixé sur l'une des positions adjacentes, soit C-22 soit C-24. Il s'agit en fait de l'acide 22-Me-29:0 puisque la coupure se fait plutôt entre la fonction et la ramification comme c'est le cas pour les dérivés *iso* et *anteiso*. De plus, l'ion *m/z* 392 est particulièrement faible. Le spectre ne permet pas d'identifier une autre double liaison.



Il s'agit d'un autre AG avec le méthyle sur le carbone n-7, les autres étant le 10-Me-17:0 et le 17-Me-24:0. Il est alors possible d'envisager une voie de biosynthèse en série impaire par allongement d'unité en C_2 à partir du 10-Me-17:0 (probablement originaire d'une bactérie).

10-Me-17:0 → → → 22-Me-29:0

K-1.3. Acides gras insaturés

Les AG des phospholipides de M. dendyi ne comprennent que peu d'AG monoinsaturés et ce sont des AG à courte chaîne excepté un 25:1 non identifié (traces et en mélange). Il s'agit donc surtout d'AG diinsaturés qui sont tous de la famille des Δ5,9 sauf l'acide linoléique Δ9,12-18:2. Le

mélange des esters n'a été étudié en spectrométrie infrarouge que globalement et n'a pas montré d'absorption dans la zone 960-980 cm^{-1} qui est visible dès qu'il y a une double liaison trans et on considèrera qu'il n'y a pas de liaisons trans dans le mélange des AG..

K-1.3.1 Acides monoinsaturés

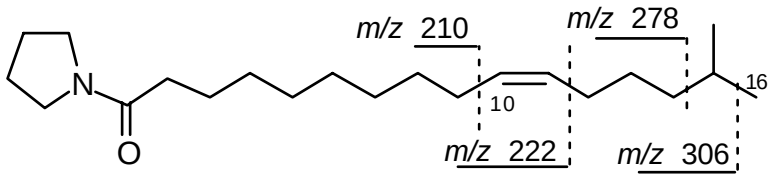
Identification des acide palmitoléique Δ9-16:1 et oléique Δ9-18:1

L'acide hexadéc-9-ènoïque est rapidement identifié compte tenu des données suivantes : pour le NAP : LCE = 15,75 ; M = 307, écart de 12 uma entre les ions fragments *m/z* 196 et *m/z* 208 signant une double liaison entre les carbones C-9 et C-10. L'EMAG donne un SM d'ester insaturé avec toujours les *m/z* 74 et *m/z* 87 intenses mais le pic de base est le *m/z* 55, et le *m/z* 41 est intense, ce qui montre un AG insaturé ; LCE = 15,76 et M = 268 (16:1).

L'acide oléique, octadéc-9-ènoïque, est également rapidement identifié compte tenu des données suivantes : pour le NAP : LCE = 17,65 ; M = 335, écart de 12 uma entre *m/z* 196 et *m/z* 208, donc double liaison entre C-9 et C-10. L'EMAG donne un SM d'ester insaturé avec toujours les *m/z* 74 et *m/z* 87 intenses mais le pic de base est le *m/z* 55, et le *m/z* 41 est intense, ce qui montre un AG insaturé ; LCE = 17,65 et M = 296 (18:1).

Identification de l'acide rare 15-méthylhexadéc-10-ènoïque (*iso*-10-17:1) (Tome 2, p. 17)

Un EMAG insaturé (base à *m/z* 55, un 41 intense dominant les *m/z* 74 et 87) sort après le n-16:0, avec une LCE = 16,35 et l'ion M^+ à *m/z* 282 soit une structure 17:1 et ramifiée. Le pyrrolidide donne les valeurs suivantes : LCE = 16,34 et M = 321 (17:1). La double liaison est située entre les positions C-10 et C-11 comme le montre l'écart de 12 uma entre les ions fragments *m/z* 210 et 222. L'ion *m/z* 210 apparaît faible et cela peut être dû à la soustraction de la phase (*m/z* 207). De plus, le *m/z* 292 (15:1) apparaît extrêmement faible entre les ions homologues *m/z* 278 et 306 : on en déduit la une ramification *iso*, soit un CH_3 en C-15. La double liaison est généralement *cis* et le mélange ne montrait pas d'absorption infrarouge à 960 cm^{-1}. Cet AG rare est typique de ceux décrits chez les bactéries.



Identification des acides Δ11-17:1 et Δ 11-18:1 (**Tome 2, p. 18**)

Les EMAG de ces acides gras ont un SM ayant l'aspect d'un composé insaturé et des masses molaires et des valeurs LCE correspondantes aux structures annoncées. Les écarts de 12 uma sont ainsi constatés entre *m/z* 224 et 238 (d.l. entre C-11 et C-12). Comme on l'a dit ci-dessus, il n'y avait pas dans ces phospholipides d'acides monoènes à longue chaîne (n_C > 23) à part les acides 25:1 et 26:1 sortant en mélanges et en très faibles proportions.

K-1.3.2. Acides diinsaturés

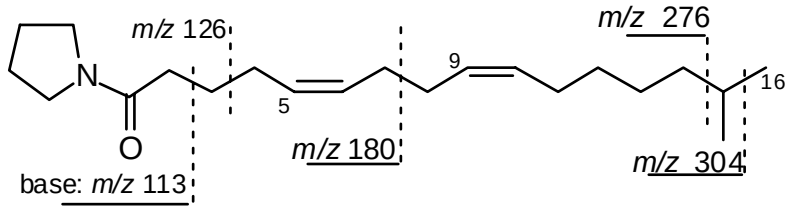
L'acide linoléique Δ9,12-18:2 (traces) est rapidement identifié par son dérivé NAP : M = 333 (18:2), LCE = 17,58 ; écarts de 12 uma entre *m/z* 196 et 208 (d.l. Δ9), et entre *m/z* 236 et 248 (d.l. type Δ12).

Identification d'un acide rare : le *iso*-5,9-17:2 (**Tome 2, p. 19**)

* EMAG. Un EMAG insaturé sort peu après celui du n-16:0 (avec une LCE=16,18). Le pic de base est à *m/z* 81, accompagné d'un autre pic majeur (environ 70% d'intensité relative) à *m/z* 109. Les ions fragments *m/z* 74 et 87 sont faibles. Ce sont là les caractéristiques d'un EMAG Δ5,9

(Barnathan, 1993) : structure Δ5,9-17:2. La faible valeur de LCE indique qu'il y a une ramification (LCE de 16,40-16,50 pour l'EMAG Δ5,9–17:2 linéaire).

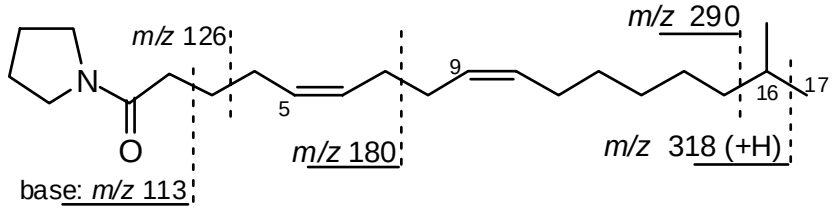
* NAP. Le pic correspondant à ce composé est visible sur la page présentant le début du courant ionique des NAP (**Tome 2, p. 7**). Sous forme de dérivé pyrrolidide, cet AG a bien une structure 17:2 avec un ion moléculaire à *m/z* 319. Le pic de base est *m/z* 113 (Mac Lafferty) et il y a un ion majeur à *m/z* 180 confirmant l'insaturation Δ5,9 (coupure en position doublement allylique, C-7, donc très favorisée par stabilisation par résonance des ions formés). Le composé sort (14,21 min) juste avant le pyrrolidide du n-16:0 (14,38 min), LCE = 15,94. Cela confirme l'existence d'une ramification CH_3.



L'ion *m/z* 290 (15:2) est quasi absent comparé à ses deux voisins homologues *m/z* 276 et 304 pourtant faibles eux-mêmes – ce qui indique la présence du méthyle sur C-15. Il s'agit de l'acide *iso*-5,9-17:2 ou 15-méthylhexadéc-5,9-diènoïque. Il est remarquable que cet acide très rare ait été identifié dans une éponge du même genre. L'acide *iso*-5,9-17:2 a en effet été identifié chez *Myrmekioderma styx* (Carballeira *et al*., 1993) et la valeur de la LCE donnée était de 16,11 (EMAG, phase SPB-1).

Présence de l'acide *iso*-5,9-18:2 (**Tome 2, p. 20**)

Présent à l'état de traces, un dérivé NAP a une LCE de 17,24 et un ion moléculaire à *m/z* 333. C'est donc une structure (18:2) et sans doute ramifiée. L'ion intense à *m/z* 180 montre qu'il s'agit d'un acide Δ5,9. L'examen du SM du pyrrolidide montre la séquence des ions *m/z* 319 (+H), 290 et 276 faibles mais nets, alors que le *m/z* 304 ($C_{16:2}$) est quasi absent.

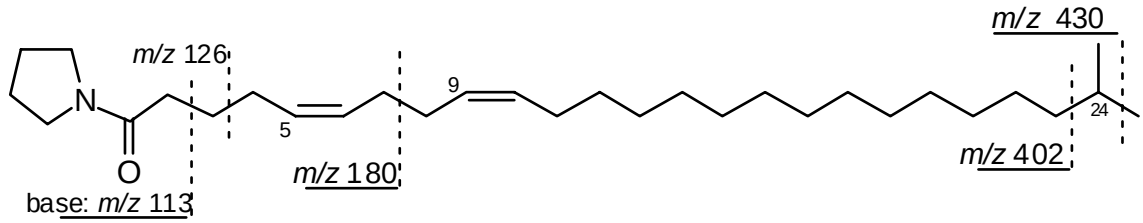


Cet acide rare est donc le 16-méthylheptadéca-5,9-diènoïque c'est-à-dire le *iso*-5,9-18:2. Cela est confirmé par l'EMAG correspondant qui a donné un SM de qualité montrant bien les ions *m/z* 81 et 109 dominants, typiques du système Δ5,9 chez les EMAG, comme ci-dessus décrits pour le *iso*-5,9-17:2. La valeur de LCE (17,34) est compatible avec un isomère ramifié *iso*.

Acides démospongiques □ 5,9 à longue chaîne (n_C > 23)

Un premier acide gras □ 5,9 est le n-25:2 qui sort en mélange avec un acide saturé. La valeur de LCE (24,50) est attendue pour un acide de cette famille à chaîne normale (par exemple : Barnathan, 1993 ; Barnathan *et al*., 1996). Il est possible d'observer dans le SM du pyrrolidide l'ion *m/z* 113 (pic de base), l'ion intense à *m/z* 180 résultant du clivage en position doublement allylique, et l'ion M^+ à *m/z* 431 (25:2).

L'acide *iso*-5,9-26:2 a une LCE (NAP) de 25,07 qui suggère une ramification (**Tome 2, p. 21**). Il est rapidement identifié sur la base du SM du pyrrolidide qui montre, comme ci-dessus, l'ion *m/z* 113 (pic de base) et l'ion intense à *m/z* 180, et un ion moléculaire à *m/z* 445 (26:2).



En plus de la valeur de LCE, la présence de l'ion *m/z* 416 (24:2), très faible vis-à-vis de ses voisins homologues à *m/z* 402 et 430, permet de conclure à une ramification en C-24, c'est-à-dire *iso*. Le spectre de l'EMAG (LCE = 25,18) est typique de ceux des esters démo-spongiques □5,9 avec l'ion *m/z* 81 (pic de base), l'ion moléculaire à *m/z* 406 et celui à *m/z* 374 dû à la perte d'une molécule MeOH.

L'acide n-5,9-26:2 a une LCE attendue (EMAG : 25,46 ; NAP : 25,40) mais sort de la colonne mélangé avec un AG 26:1 et avec un ester provenant d'une analyse CPG-SM précédente (pics moléculaires de 447- structure 26:1- et 487 - 29:2). Il y a le SM de l'ester quasi identique à celui de l'isomère *iso*.

L'acide *iso*-5,9-27:2 est identifié à l'état de pyrrolidide (LCE = 25,98; M = 420, pic intense) (**Tome 2, p. 22**) avec les ions *m/z* 113 et 180 comme précédemment, et avec l'ion *m/z* 430 très faible comparé aux ions *m/z* 416 et 444 nets : d'où un CH_3 fixé sur le carbone C-25. Il s'agit donc du dérivé *iso* soit l'acide 25-méthylhexacosa-5,9-dièn0ïque. Le spectre de l'ester (LCE = 26,08) possède l'ion moléculaire à *m/z* 420 (27:2), l'ion pic de base du SM à *m/z* 81 (avec *m/z* 109 intense). Cet acide gras est suivi de ses isomères *anteiso*-5,9-27:2 et n-5,9-27:2 seulement identifiables correctement dans le chromatogramme des EMAG (LCE = 26,20 et 26,45).

La même séquence des trois isomères en 28:2 est observée dans le cas des EMAG (des SM quasi identiques, et M = 434) Le chromatogramme reconstitué des NAP permet d'identifier le *anteiso*-5,9-28:2 et le n-5,9-28:2 (**Tome 2, p. 23**). Dans le mélange des EMAG, on peut observer la présence d'un acide 5,9,x-29 :3 (LCE = 27,69) sortant en mélange avec un br-30:0 (**Tome 2, p. 24**).

On retrouve la série des trois isomères du 5,9-29:2 mais il s'y ajoute un autre isomère de position qui sort le premier, la ramification méthyle n'étant ni l'une ni l'autre des ramifications usuelles *iso* ou *anteiso*. Les quatre spectres des EMAG, quasi identiques, sont présentés **Tome 2, p. 25**. Les quatre SM des pyrrolidides sont disponibles. Celui du n-5,9-29:2 a été déjà présenté puisque ce composé sortait de la colonne en mélange avec un NAP saturé à 30C **(Tome 2, p. 16)**. Tous ces SM admettent l'ion *m/z* 113 comme pic de base et un ion intense à *m/z* 180 qui correspondent respectivement, comme cela a déjà été indiqué, au réarrangement de Mac Lafferty et au clivage en position doublement allylique entre C-7 et C-8.

Le SM du nouveau 25-Me-5,9-28:2 est présenté **Tome 2, p. 26**. Il comprend le pic de base à *m/z* 113, l'ion intense à *m/z* 180 et l'ion moléculaire à *m/z* 487 (29:2). L'ion *m/z* 430 ($C_{25:2}$) a une intensité nettement plus faible que ses voisins homologues *m/z* 416 et 444 : on en déduit la position du méthyle fixé sur C-25. Nous avons donc identifié le nouvel acide 25-méthyloctacosa-5,9-dièn0ïque. Pour les *iso*- et *anteiso*-5,9-29:2, on n'a représenté **(Tome 2, p. 27)** que la partie significative des fragments de hautes valeurs de *m/z*. Les SM de leurs pyrrolidides sont d'apparence identique à celui du nouveau composé excepté le net abaissement relatif aux voisins homologues de l'ion *m/z* 458 pour le dérivé *iso*, et de l'ion *m/z* 444 pour le dérivé *anteiso*.

K-2. *Stylissa carteri*

K-2.1. Considérations générales

Plusieurs analyses des AG des phospholipides de *Stylissa carteri* ont été réalisées. Il est ainsi possible de comparer les diverses analyses par couplage CPG/SM menées sur les *N*-acyl pyrrolidides (NAP) bien que les conditions CPG aient été modifiées (**Tome 2, p. 28 et 29**):

- entre deux analyses d'une même collecte de l'éponge au large de Djeddah en 1998,
- entre celles-ci et l'étude menée sur des spécimens collectés sur ce même site en 2000,
- entre les études précédentes et celle relative à *S. carteri* collectée sur un autre site, au large de Djibouti en 1996.

Près de 70 AG ont été identifiés dans ces échantillons. Il est remarquable de constater que l'on retrouve sensiblement le même type de profil, un profil classique chez les éponges. C'est ce type de profil qui a été décrit pour *M. dendyi*.

Il est ici dominé par les acides palmitique (16:0) et stéarique (18:0), un acide démospongique (□5,9-25:2), mais surtout par deux AG : l'acide phytanique (3,7,11,15-Me_4-16:0) et le plus répandu des acides démospongiques, le □5,9-26:2.

Les AG poly-insaturés deviennent relativement importants chez *S. carteri*, (Djeddah - collecte 2000) : acides arachidonique 20:4 (n-6) et 22:6 (n-3). Les analyses CPG/SM des mélanges d'esters méthyliques (EMAG) donnent des résultats également comparables entre eux mais les acides courts (< 23C) apparaissent plus concentrés que dans le cas des NAP (Figure 6). Comme cela a été montré au début de l'étude des acides gras, l'extrait du courant ionique calé sur l'ion *m/z* 74 est utilisé pour la détermination des valeurs de LCE dans le cas des EMAG. Il en est de même dans le cas des NAP avec le l'extrait de courant ionique calé sur *m/z* 113. Une excellente linéarité est observée entre les temps de rétention des dérivés des AG et les longueurs de chaîne. C'est précisément avec l'exemple de *S. carteri* que nous avons mis à profit ce caractère pour déterminer les valeurs de longueur de chaîne équivalente, LCE (cf. partie H-5.3, Tableau 18).

On retrouve pratiquement les mêmes AG dans les spécimens récoltés sur le même site à deux ans d'intervalle. C'est pourquoi ces résultats ont été présentés sous forme de moyennes dans un récent article faisant suite au Symposium international sur la "Science des Eponges" à Rapallo, Italie, en 2002 (Barnathan *et al*., 2004). L'extrait de chromatogramme des NAP - courant ionique calé sur l'ion *m/z* 113 de *S. carteri* - est repris selon deux agrandissements (**Tome 2, p. 30**). Il y a encore trois zones apparentes, analogues à ce qui a été décrit chez *M. dendyi*. La zone centrale comprend les AG de 20 à 23 carbones.

Le Tableau 32 récapitule les compositions en AG des phospholipides de *S. carteri*. Les AG seront examinés par grandes classes, comme pour *M. dendyi*, et, dans chaque classe, suivant l'ordre d'élution.

Tableau 32. Composition en acides gras des phospholipides de *Stylissa carteri.*

Acides gras				**Pourcentages massiques**			
	Structures	**LCE**		**Djeddah**[1]		*Djibouti*	
		EMAG	NAP	EMAG[2]	NAP[3,4]	EMAG[2]	NAP[4]
Tétradécanoïque (Myristique)	14:0	14,00	14,00	1,2	0,2	2,3	2,0
13-Méthyltétradécanoïque	*i*-15 :0	14,65	14,60	0,3	0,3	0,5	0,3
14-Méthylpentadécanoïque	*i*-16:0	15,70	15,65	2,0	1,0	0,8	0,4
13-Méthylpentadécanoïque	*ai*-16:0	15,76	15,70	-	-	1,0	0,5
Hexadéc-9-ènoïque (Palmitoléïique)	9-16:1	15,79	15,72	1,1	1,1	-	-
Hexadéc-10-ènoïque	10-16:1	15,82	15,76	tr.	tr.	2,3	1,0
Hexadécanoïque (Palmitique)	16:0	16,00	16,00	7,7	3,9	20,8	6,3
15-Méthyhexadécanoïque	*i*-17:0	16,67	16,62	0,7	tr.	-	0,6
14-Méthyhexadécanoïque	*ai*-17:0	16,75	16,73	0,5	tr.	-	0,2

Heptadéc-9-ènoïque	9-17:1	16,83	16,80	0,5	0,6	1,3	0,8
Heptadécanoïque	17:0	17,00	17,00	1,1	0,5	-	0,5
3,7,11,15-Tétraméthylhexadécanoïque (Phytanique)	3,7,11,15-Me_4-16:0[2]	17,60	17,23	24,1	19,8	24,1	8,5
Octadéca-9,12-dièноïque (Linoléïque)	9,12-18:2	17,55	17,57	0,5	0,5	0,3	tr.
Octadéc-9-ènoïque (Oléïque)	9-18:1	17,60	17,63	tr.	0.7	-	-
Octadéc-10-ènoïque	10-18:1	17,67	17,66	-	tr.	tr.	1,0
Octadéc-11-ènoïque	11-18:1	17,75	17,74	-	0,7	-	tr.
Octadécanoïque (Stéarique)	18:0	18,00	18,00	4,2	2,7	9,1	3,0
br-Nonadécanoïque	br-18:0	-	18,50	0,2	tr.	1,3	tr.
17-Méthyloctadécanoïque	*i*-19:0	18,66	18,62	0,5	tr.	1,1	0,5
Icosa-5,8,11,14-tétraènoïque (Arachidonique)	20:4 (n-6)	18,97	18,93	3,5	2,2	0,2	1,5
Nonadécanoïque	19:0	19,00	19,00	0,5	tr.	0,3	0,5
Icosa-11,15-dièноïque	11,15-20:2	19,57	19,48	tr.	0,8	-	1,0
Icos-11-ènoïque	11-20:1	19,56	19,87	0,5	0,4	-	0,7
Icosanoïque (Arachidique)	20:0	20,00	20,00	0,9	tr.	1,9	0,7
17-Méthylicosanoïque	17-Me-20:0	20,38	20,42	0,2	tr.	0,6	-
19-Méthylicosanoïque	*i*-21:0	19,70	-	0,5	-	0,5	0,4
Heneicosanoïque	21:0	21,00	21,00	3,3	-	0,2	0,3
Docosa-4,7,10,13,16-pentaènoïque	22:5 (n-6)	21,03	20,45	2,5	1,8	-	-
Docosa-9,12,15,18-tétraènoïque	22:4 (n-4)	21,06	20,89	tr.	0,5	-	-
Docosanoïque	22:0	22,00	22,00	0,5	-	0,9	0,3
17-Méthyl-6-docosènoïque*	Me-16-22:1	-	22.20	-	tr.	-	0,4
Tétracosa-5,9-diénoïque	5,9-24:2	23,53	23,56	tr.	0,3	-	0,2
Tétracos-19-ènoïque	5-24:1	23,60	23,80	0,2	tr.	-	-
Tétracosanoïque (Lignocérique)	24:0	24,00	24,00	1,3	1,3	2,3	0,8
23-Méthyltétracosa-5,9-dièноïque	*i*-5,9-25:2	24,28	-	1,0	-	-	-
22-Méthyltétracosa-5,9-dièноïque	*ai*-5,9-25:2	24,36	-	0,2	-	-	-
Pentacosa-5,9-dièноïque	5,9-25:2	24,49	24,47	2,4	5,8	2,4	5,5
Pentacos-5-ènoïque	5-25:1	24,60	24,55	0,9	tr.	0,6	0,6
Pentacosanoïque	25:0	25,00	-	3,1	-	1,3	-
Hexacosa-5,9,12-triènoïque*	5,9,12-26:3	-	25,09	-	tr.	0,4	1,4
Hexacosa-5,9-dièноïque	5,9-26:2	25,52	25,52	27,4	40,6	16,8	53,1
Hexacos-5-ènoïque	5-26:1	25,75	25,59	-	2,1	1,0	3,2
Hexacos-9-ènoïque	9-26:1	25,82	25,80	2,0	7,8	-	-
Hexacos-18-ènoïque	18-26 :1	25,86	25,83	-	-	0,2	1,0
Hexacosanoïque	26:0	26,00	-	0,9	-	1,5	0,9
25-Méthylhexacosa-5,9-dièноïque	*i*-5,9-27:2	-	26,21	-	tr.	0,3	0,9
Heptacosa-5,9-dièноïque	5,9-27:2	26,45	26,50	0,5	0,6	0,5	-
Octacosa-5,9-dièноïque	5,9-28:2	27,50	27,33	-	0,5	-	-

Acides 2-hydroxylés							
2-Hydroxydocosanoïque	2-OH-22:0	-	23,17	-	tr.	-	-
2-Hydroxytétracosanoïque (Cérébronique)	2-OH-24:0	25,27	25,27	2,4	1,7	1,3	-
2-Hydroxypentacosanoïque	2-OH-25:0	26,25	26,28	tr.	1,3	0,7	-
2-Hydroxyhexacosanoïque	2-OH-26:0	27,18	27,28	0,7	tr.	-	-
Total des AG de la colonne	--	--	--	100	97,6	98,6	99,4

[1]Valeurs obtenues à partir de 3 expériences indépendantes ; [2] Pourcentages obtenus avec les pics du courant ionique *m/z* 74
[3]Velosaotsy *et al.*, 2004 ; [4]Pourcentages obtenus avec les pics du courant ionique *m/z* 113 ;
* AG nouveaux ; tr. = traces (% < 0,1).

Autres AG identifiés à ≤ 0,2% dans un ou plusieurs des mélanges analysés: *i*-14:0 ; *i*-15:0 ; *ai*-15:0 ; n-15:0 ; 11-16:1 ; br-18:0 ; 12-18:1 ; *ai*-19:0 ; 13-20:1 ; *ai*-21:0 ; 17-23:1 ; 27:1 ; *ai*-27:0 ; *i*-5,9-28:2 ; *i*-5,9-29:2.
AG présents parmi les AG de *S. carteri*-Djeddah-2000 : 11,14-Me_2-12-15:1*, 15-21:1* ; 2-OMe-16:0 ; 20:3 ; 20:2 ; 22:4 (n-6) ; 22:4 (n-3) ; 22:6 (n-3).

Tableau 33. Distribution (%) des acides gras des phospholipides de *Stylissa carteri*.

Catégories d'acides gras	Djeddah		Djibouti	
	EMAG	NAP	EMAG	NAP
Acides gras saturés (AGS)[1]	53,7	29,7	70,3	26,7
Acides gras insaturés (AGI)	43,2	64,9	26,3	72,3
Acides gras Δ 5,9	31,5	47,8	20,4	61,1
Rapport Δ5,9 / AGI	0,73	0,74	0,78	0,84
Acides gras à longues chaînes (≥ 24C)	42,9	62,3	28,0	67,7
Acides 2-OH	3,1	3,0	2,0	-[2]

[1] non substitués en C-2 ; [2] pas de SM enregistrés dans ce cas (cf. partie sur les acides 2-OH)

Les résultats des Tableaux 32 et 33 montrent des écarts importants dans les compositions en acides gras selon la nature du dérivé d'acide utilisé. Cette observation est bien connue et pourrait provenir de différences entre les facteurs de réponses du détecteur pour un même acide, mais sous forme d'ester méthylique ou de *N*-acyl pyrrolidide. Il n'est pas non plus toujours évident d'attribuer le bon NAP au bon EMAG, et réciproquement. D'autre part, et bien que les NAP soient préparés directement à partir des EMAG, il n'est pas certain que le mélange obtenu après la réaction chimique de conversion soit en tout point identique. Le comportement des acides gras pourrait différer sur les plans thermodynamique et cinétique. Les esters méthyliques sont les plus largement utilisés pour l'analyse quantitative des acides gras lorsqu'il s'agit d'AG classiques. Et il est nécessaire de recourir à d'autres dérivés pour l'élucidation de structures non classiques telles que les AG à insaturations de type non malonique.

Cependant, le Tableau 32 permet de constater que le rapport Δ5,9/AGI reste pratiquement constant (pour une même éponge) et ne semble donc pas dépendre du dérivé utilisé.

K-2.2. Acides gras saturés

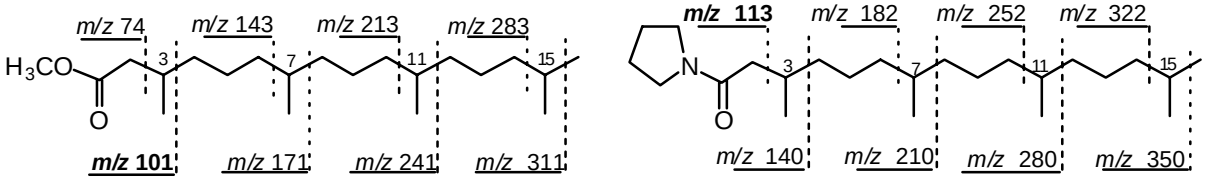
A la différence de *M. dendyi* qui possède plusieurs AG saturés rares ou originaux en plus de structures classiques, les AG saturés sont de types courants chez *S. carteri* avec une large prépondérance des chaînes normales, *iso* et *anteiso*.

Le Tome II donne encore un exemple de spectre d'EMAG saturé rare: celui du n-26:0 **(Tome 2, p. 31**). L'ion moléculaire est à *m/z* 410 (26:0) et ce dérivé est normalement attendu à ce temps de rétention. Les ions majeurs *m/z* 74 et 87 sont présents ainsi qu'une série d'ions fragments homologues dominés par l'ion *m/z* 143. Ce spectre de masse montre bien qu'un composé à très faible concentration, voire à l'état de traces, peut donner un spectre très correct s'il se trouve seul dans le pic chromatographique et donc suffisamment pur. Il permet aussi de disposer d'un précieux

point élevé pour établir la droite expérimentale de détermination des LCE sans le recours d'une co-injection avec des standards.

- Identification de l'acide phytanique (**Tome 2, p. 32)**

En couplage CPG/SM des EMAG, cet acide, présent à des taux élevés (jusqu'à près de 25% du total AG des phospholipides), possède 20 carbones (M = 326) mais sort peu avant le n-18 :0 (LCE = 17,68) : il est donc très ramifié. Le pic de base n'est pas celui produit par le réarrangement de Mac Lafferty (*m/z* 74) mais l'ion à *m/z* 101 ($C_{4:0}$), ce qui caractérise une ramification méthyle en C-3 (Barnathan, 1993). D'autres ions intenses sont observés à *m/z* 171, 24, 283 et 311 et permettent de situer les ramifications respectivement sur C-3, C-7, C-11 et C-15. Les principales coupures sont montrées sur la formule suivante.



Le schéma ci-dessus permet de reconnaître les divers ions fragments diagnostiques pour l'identification de l'acide phytanique à l'état de NAP. Cette analyse a été rapportée en détails (Barnathan, 1993 ; Mirallès *et al*., 1995 ; Viracaoundin, 2001 ; Viracaoundin *et al*., 2003 ; Barnathan et Kornprobst, 1998). Le pic de base du spectre est bien le *m/z* 113. Exceptionnellement très affaibli, l'ion *m/z* 126, alors que le *m/z* 140 est intense, révèle la présence d'un méthyle fixé sur C-3 (**Tome 2, p. 32)**. D'autre part, l'ion *m/z* 196 est absent (fragment 8 :0 mais position C-7) indiquant le méthyle en C-7. L'ion *m/z* 266 est également absent alors que ses voisins homologues *m/z* 252 et 280 sont nets : on en déduit la présence d'un méthyle fixé sur C-11. Enfin, l'extrémité de la chaîne est typiquement ramifiée *iso* : ion *m/z* 336 absent mais ions *m/z* 322 net et *m/z* 350 intense.

Ces observations concordent avec celles rapportées dans la littérature pour les éponges (Carballeira *et al*., 1987 ; Carballeira *et al*., 1993), les gorgones (Mirallès *et al*., 1995), les ascidies (Viracaoundin, 2002 ; Viracaoundin *et al*., 2003), les huiles de poissons (Ratnayake *et al*., 1989).

C'est aussi avec un acide tétraramifié, tel que l'acide phytanique, que s'observe le plus nettement la divergence des valeurs de LCE calculées respectivement pour l'ester méthylique (17,68) et pour le pyrrolidide (17,29). Il a été proposé que le carbonyle du pyrrolidide se trouve en partie associé par liaison hydrogène, et de ce fait, le NAP est relativement moins retenu sur la phase stationnaire de CPG.

Les acides isoprènoïques comme l'acide 4,8,12-triméthyltridécanoïque et l'acide phytanique proviennent de la dégradation de la chaîne latérale (oxydation de la partie phytol) de la chlorophylle. On considère qu'ils ont une origine exogène, provenant d'organismes océaniques photosynthétiques hébergés ou symbiotiques. Ces acides ont été identifiés à 10% ou plus dans les phospholipides des éponges suivantes :

- 4,8,12-triméthyltridécanoïque dans *Axinella* sp., *Cliona aprica*, *Spheciospongia cuspidifera*, *S. Vesparium* (travaux du groupe de Carballeira, Porto-Rico), *Cinachyrella alloclada*, *C. kükenthali*, *Cinachyrella* sp. (travaux du laboratoire).

- phytanique dans *Chondrilla nucula*, *C. reniformis*, *Amphimedon terpenensis*, *Trikentrion laeve* (Barnathan & Kornprobst, 1998)

Du point de vue biomédical, l'acide phytanique est connu pour s'accumuler chez les patients atteints du syndrome de Refsum. Cette accumulation s'effectue en raison d'une déficience de l'activité α-oxydase (Yao *et al*., 1987). Il s'agit d'une maladie neurologique héréditaire du métabolisme (Refsum *et al*., 1949 ; Refsum, 1981) due à un mauvais fonction-nement d'une enzyme localisée dans les peroxysomes, organites intra-cellulaires aux multiples fonctions, entre autres la

biosynthèse de phospholipides à liaison éther (plasmalogènes) et l'oxydation des acides gras à longue et très longue chaîne, et d'acides gras ramifiés, dont l'acide phytanique.

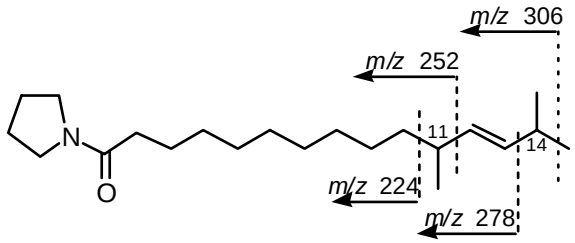
A de telles concentrations dans les phospholipides, il est aussi permis de penser que l'acide phytanique pourrait jouer un rôle dans les propriétés de la membrane cellulaire (Ackman, 1989 ; Barnathan, 1993 ; Barnathan & Kornprobst, 1998 ; Carballeira, 2002). On peut rappeler par exemple que les lipides membranaires des archéobactéries et extrêmophiles comportent principalement des chaînes de type phytyle qui leur assurent une capacité de résistance hors du commun.

K-2.3. Acides gras monoinsaturés

Les positions les plus fréquentes de la double liaison chez les AG à courte chaîne sont observées entre les carbones C-9 et C-10 (Δ9), et C-11 et C-12 (Δ11). Des monoènes Δ10 et, à l'état de traces, Δ12 et Δ13 sont présents.

- Identification du nouvel acide 11,14-diméthylpentadéc-12-ènoïque (11,14-Me_2-12-15:1) **(Tome 2, p. 33**)

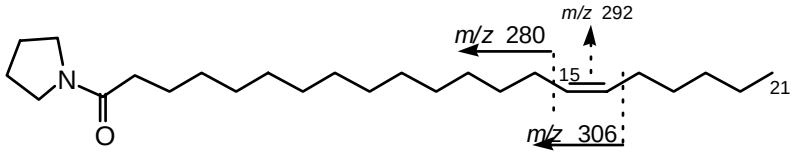
Un dérivé NAP (à env. 0,2%) admet une LCE de 16,17 alors que l'ion M^+ est à *m/z* 321 (17:1). Le composé est donc ramifié. La position des ramifications CH_3 est indiquée comme suit. Le premier méthyle est fixé sur C-11 en raison de l'absence de l'ion homologue *m/z* 238, attendu entre les pics *m/z* 224 et *m/z* 252, pour le fragment 11:0. La seconde correspond à une chaîne *iso* avec l'ion *m/z* 293 très amoindri, et la forte intensité des ions voisins *m/z* 278 (14 :0) et 306 (16:1). Un écart de 12 uma entre les pics 252 et 264 permet de situer la double liaison entre C-12 (il y a un CH_3 en C-11) et C-13 : insaturation Δ12.



Il s'agit du nouvel acide gras court 11,14-diméthylpentadéc-12-ènoïque comportant une unité isoprène terminale. Ce composé br-17:1 est un analogue insaturé du 10,13-diméthyl-tétradécanoïque br-16:0 que nous avons identifié dans les phospholipides de *Myrmekioderma dendyi*, les éponges *Cinachyrella* (Genin, 2002 ; Barnathan *et al*., 2003) et aussi chez *Oceanapia* sp. (Sénégal - Genin, 2002).

- Identification de l'acide rare hénéicos-15-ènoïque (15-21 :1) (**Tome 2, p. 33**)

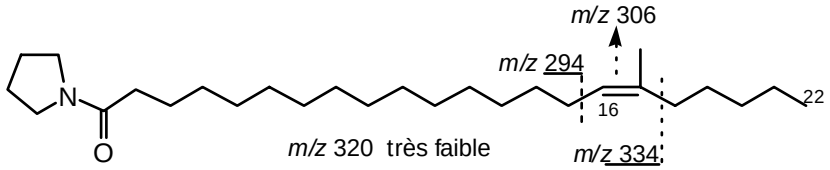
Cet AG original, composant mineur du mélange, est identifié sous forme de NAP : une LCE de 20,63 et un ion M^+ à *m/z* 377 (21:1). La série des ions fragments homologues séparés par un intervalle de 14 uma est interrompue par une différence de 12 uma entre les pics *m/z* 280 (14:0) et 292 (15:1).



C'est un AG monoène de la série impaire (n-6), probablement synthétisé par allongements à partir d'un précurseur à chaîne courte d'origine bactérienne.

- Identification du nouvel acide 17-Me-16-22:1 et de l'acide rare 17-23:1 chez *S. carteri* – Djeddah (**Tome 2, p. 34, 35**)

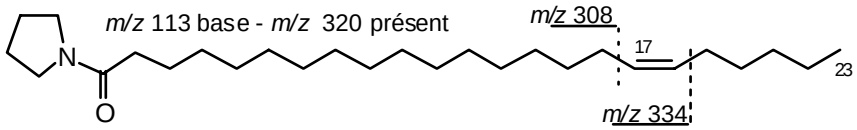
Deux isomères EMAG de structure 23:1 sont séparés par CPG : l'ester du 23:1 normal et un ester sortant plus tôt, donc possédant une double liaison (LCE = 22,20). Les spectres sont quasi identiques : ion M^+ à *m/z* 366 (23:1), perte de méthanol à partir de cet ion, ions *m/z* 74 et 87 faibles, et ions dominants à environ 100% d'intensité relative à *m/z* 55 et 69.



Le premier composé est identifié à l'état de NAP (LCE = 22,20) et ion moléculaire à *m/z* 405 (**Tome 2, p. 34**). La position de la double liaison est déduite d'un écart de 12 uma entre les ions homologues *m/z* 294 (15:0) et 306 (16:1). La ramification CH_3 est située sur C-17 comme l'indique la très faible intensité de l'ion *m/z* 320 (17:1).

Il est remarquable que ce nouvel AG ait été également identifié dans les autres spécimens récoltés au large de Djeddah en 1998 et en 2000 ainsi que dans ceux provenant des parages de Djibouti (en 1996). Cet AG est probablement synthétisé à partir d'un précurseur exogène court, par exemple d'origine bactérienne.

Le second isomère est présenté à la page suivante (**Tome 2, p. 34**). Le spectre du pyrrolidide admet l'ion moléculaire à *m/z* 405 (23:1) et présente une différence de 12 uma entre *m/z* 308 (16:0) et *m/z* 320 (17:1). Il s'agit donc de l'acide rare tricos-17-ènoïque. Le SM de l'ester méthylique montre un ion M^+ à *m/z* 366. Les ions majeurs sont les ions *m/z* 55 et 69 tandis que les ions *m/z* 74 et 87 apparaissent faibles.



Il s'agit d'un AG rare, monoène de la série (n-6). Notre équipe avait identifié un isomère de celui-ci, un AG original, monoène de la série (n-7) : l'acide tricos-16-ènoïque (Barnathan *et al*., 1992).

- Identification de l'acide tétracos-17-ènoïque ou 17-24:1 (**Tome 2, p. 36**)

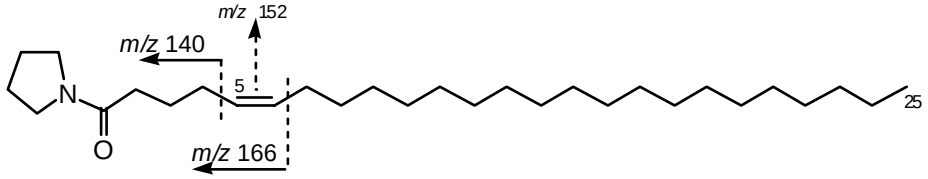
Le spectre de l'EMAG est, comme ci-dessus, typique d'un monoène avec M = 380 (structure 24:1). Le spectre du NAP comprend un ion quasi moléculaire intense à *m/z* 420 $(M + H)^+$ pour une structure 24 :1, la série habituelle d'ions homologues séparés par un écart de 14 uma (CH_2), excepté l'écart de 12 uma entre *m/z* 308 et 320 indiquant là encore une double liaison Δ17. Il s'agit d'un AG relativement fréquent chez les éponges marines, monoène (n-7).

Il est produit par allongements (unités dicarbonées) à partir d'un précurseur court habituel tel que l'acide palmitoléïque 9-16:1. Il existe ainsi des AG démospongiques Δ5,9,x relativement fréquents dont la 3ème double liaison est (n-7) : par exemple 5,9,21-28:3 ou 5,9,23-30:3 (par ex. : Barnathan *et al*., 1996). La biosynthèse de ces derniers passe par des allongements en série monoène (n-7) suivis de désaturations successives en 5 et en 9 (dans cet ordre ou dans l'ordre inverse) (Djerassi & Lam, 1991 ; Barnathan & Kornprobst, 1992).

Il y a deux AG tétracosènoïques dans ce mélange ainsi qu'on peut le voir dans le chromatogramme des EMAG à des temps de rétention proches : 31,90 min et 32,25 min (**Tome 2, p. 37**). Cette page donne aussi un SM d'ester 25 :1 dont le NAP sort en mélange avec un di-insaturé. La question sera traitée ci-après. C'est dans les spécimens collectés à Djibouti qu'il a été possible de l'identifier.

- Identification de l'acide pentacos-5-ènoïque (5-25 :1) (**Tome 2, p. 38**)

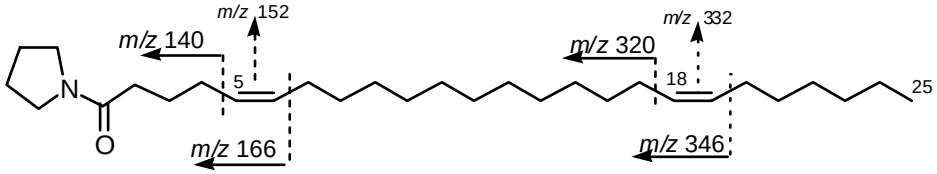
Cet AG rare est identifié parmi les AG des phospholipides de *S. carteri*-Djibouti : LCE de 24,60/24,55 ; M = 433 donc structure 25 :1, et écart de 12 uma entre les pics *m/z* 140 et 152, d'où insaturation Δ5. Ces deux ions fragments sont suivis de la série attendue des fragments homologues séparés par 14 uma.



C'est au laboratoire que cet AG a été identifié pour la première fois dans une éponge, *Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*, et cela montre bien qu'il peut y avoir allongement en série impaire puis désaturation d'abord en 5 avant d'obtenir un AG Δ5,9 contrairement à ce qui a été longtemps pensé (Barnathan, 1993 ; Barnathan *et al.,* 1994 & 1996).

- Ce dérivé NAP 25 :1 est d'autre part détecté dans un échantillon de *S. carteri*-Djeddah-1998 mais en mélange avec un di-insaturé (**Tome 2, p. 38**). Le pic chromatographique considéré se situe à la suite du 5,9-25:2, avec une LCE de 24,65-24,70. On observe en effet le pic quasi moléculaire à *m/z* 434 (M + H pour 25:1). L'écart de 12 uma entre *m/z* 140 et 152 figure clairement, suivi de la série des pics homologues attendus, espacés de 14 uma : insaturation Δ5. Le spectre montre aussi que cette série s'interrompt par un nouvel intervalle de 12 uma entre *m/z* 320 et 332. La série reprend ensuite jusqu'aux pics *m/z* 388 et 402 (Δ18). La seconde analyse CPG/SM à partir de cette même récolte de 1998 confirme en partie ces observations.

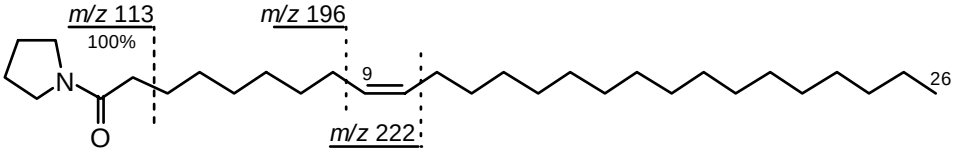
S'il pouvait être caractérisé sans ambiguïté dans l'avenir, l'acide 5,18-25:2 serait nouveau et il présente un réel intérêt du point de vue des voies de biosynthèse. En effet, il constitue un intermédiaire dans la synthèse des acides démospongiques Δ5,9,x qui passe par un allongement en série monoène (n-7) suivis en premier lieu par la désaturation en 5, puis de la désaturation en 9.



L'impossibilité de conclure nettement en faveur d'un mélange de 5-25 :1 et de 5,18-25 :2 est surtout due au fait qu'il n'y a pas d'ion moléculaire à *m/z* 431 et qu'il faut interpréter l'intensité inhabituelle de l'ion *m/z* 418 (24:1). L'analyse devra être reprise et cette interprétation restera donc hypothétique.

- Identification de l'acide hexacos-9-ènoïque ou 9-26:1 (**Tome 2, p. 39**)

Le SM de l'ester est typique de celui d'un AG monoinsaturé avec l'ion M^+ à *m/z* 408 et des ions *m/z* 74 et 87 faibles. Le composé est identifié sous forme de pyrrolidide : ion $(M+H)^+$ à *m/z* 448 (donc 26:1), une LCE = 25,80, et un intervalle de 12 uma entre *m/z* 196, $C_{8:0}$ et *m/z* 208, $C_{9:1}$. Il s'agit donc de l'acide hexacos-9-ènoïque, là encore un AG particulièrement rare.



Toutefois, il faut noter que sa première mise en évidence remonte aux travaux pionniers de Litchfield (Morales & Litchfield, 1977). Cela montre que l'action d'une Δ9-désaturase peut s'exercer non seulement sur un monoène (n-7) mais aussi sur un AG substrat saturé.

- Identification de l'acide icosa-11,15-dièn oïque (11,15-20 :2) (**Tome 2, p. 40**)

Un acide icosadiènoïque est présent dans les deux chromatogrammes. Le SM de l'ester est typique des AG peu insaturés et il admet un ion moléculaire M^+ à *m/z* 322 (20:2). Il est caractérisé par le spectre de son dérivé NAP : M = 361 (20:2), deux écarts de 12 uma entre les pics *m/z* 224 et 236 (donc Δ11), et entre *m/z* 278 et 290 (donc Δ15).

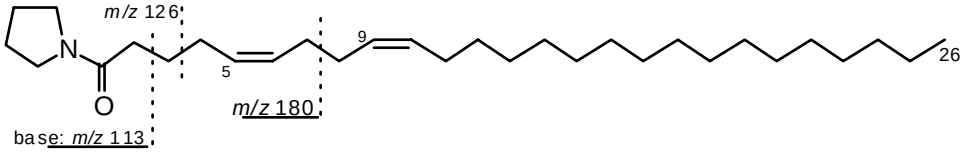


C'est un acide peu fréquent, de type "NMI" c'est-à-dire "non-methylene-interrupted" ou encore non malonique, plus rare que le système Δ5,9. Cet acide a été identifié dans une éponge (Carballeira *et al*., 1991). Dans l'éponge sénégalaise *Pseudaxinella* cf. *lunaecharta,* notre équipe avait décrit pour la première fois les AG 17,21-26 :2 et 19,23-28:2 homologues supérieurs de cet acide (Barnathan *et al*., 1995). Tous ces AG s'inscrivent dans un processus de biosynthèse postulé à partir de l'hypothétique précurseur 5,9-14:2, en supposant des allongements en série di-insaturée comme suit :

5,9-14:2 ⟶⟶⟶ 11,15-20:2 ⟶⟶ 17,21-26:2 ⟶ 19,23-28:2

- Identification des acides démospongiques tétracosa-5,9-dièn0ïque ou 5,9-24:2 **(Tome 2, p. 41)** et hexacosa-5,9-dièn0ïque ou 5,9-26:2 **(Tome 2, p. 42)**

Ces acides démospongiques sont facilement reconnaissables dans des mélanges complexes, aussi bien sous forme d'ester que de pyrrolidide. L'ion moléculaire est présent, à *m/z* 417 pour le 24 :2 et à *m/z* 445 pour le 26:2. Au point de vue valeurs de LCE, ils se situent à mi-chemin entre les AG saturés normaux à un de moins ou à un de plus atome de carbone. L'ion caractéristique est le *m/z* 180 ainsi qu'on l'a montré dans le cas des AG de *Myrmekioderma dendyi*. Un exemple des fragmentations caractérisitiques est montré ci-dessous en liaison avec le SM (**Tome 2, p.42**). On voit de plus nettement (ce qui n'est pas toujours le cas) les écarts de 12 uma entre les pics *m/z* 140 et 152 (Δ5), et *m/z* 194 et 206 (Δ9).



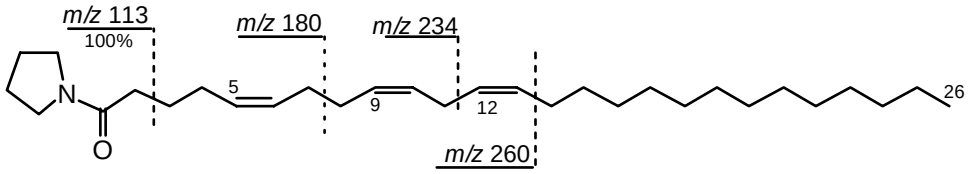
L'acide 5,9-26:2 est de loin le plus répandu chez les éponges et il peut se trouver à 50% et plus du total. C'est le plus abondant dans plusieurs des phospholipides analysés dans ce travail (50% chez *Stylissa carteri*-Djibouti).

- Présence de deux acides 20:3 (**Tome 2, p. 43**)

On observe peu d'AG tri-insaturés chez cette éponge. Deux isomères sont ainsi détectés à l'état d'EMAG et comparés à un spectre de référence, 20:3 (n-7), de la spectrothèque Hewlett-Packard incluse dans l'instrument. Il y a des spectres très proches pour les deux isomères mais qui différent par plusieurs détails du SM comparé. Il pourrait s'agir des acides 20:3 (n-6) et 20:3 (n-3). Mais cela n'a pu être confirmé par les SM des pyrrolidides.

- Identification du nouvel acide démospongique hexacosa-5,9,12-triènoïque ou 5,9,12-26 :3 **(Tome 2 , p. 44)**

Un autre AG tri-insaturé est détecté sous forme EMAG (LCE 25,20) puis identifié sous forme NAP (LCE=25,09). L'EMAG donne un ion moléculaire à *m/z* 404 (26:3) et le pic de base à *m/z* 81 signant une insaturation □5,9,x. Le NAP confirme ces constats avec M = 443 (26:3) et un ion intense à *m/z* 180. L'écart de 12 uma entre les fragments 234 et 246 permet de conclure à une double liaison □12.



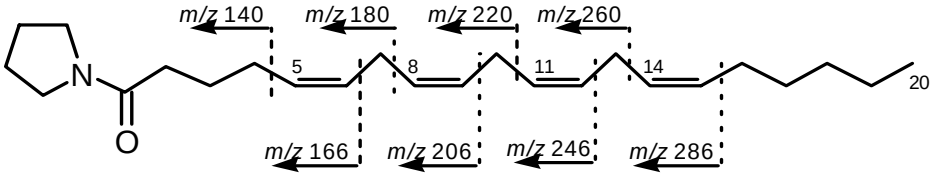
Ce nouvel acide démospongique se démarque des autres AG tri-insaturés de ce groupe qui ont leur 3ème double liaison près de l'extrémité hydrocarbonée de la chaîne, par exemple en (n-7) ou en (n-9). Ce type d'insaturation existe chez l'acide pinolénique 5,9,12-18:3 isolé à partir des pins et qui possède la propriété d'abaisser le taux de cholestérol (cf. Introduction générale ; Lee *et al*., 2004).

K-2.4. Acides gras poly-insaturés

Il y a en général peu ou pas du tout d'AG poly-insaturés (AGPI) dans les phospholipides des éponges. Certains spécimens de *S. carteri* de Djeddah se distinguent en contenant des quantités notables de 22:6 (n-3) ou DHA, de 22:5 (n-6), d'acides 22:4. Les spécimens de Djibouti contiennent un taux notable d'acide arachidonique (*cf.* Chromato-grammes **Tome 2, p. 28 et 29**).Ces AG sont attribués à des organismes hébergés par l'éponge voire symbiotiques, tels que des microalgues (diatomées) du phytoplancton. C'est pourquoi les proportions en AGPI peuvent varier avec la période de collecte de l'éponge et les conditions de l'environnement immédiat. L'identification du DHA sera présentée plus loin avec les AG de *Chalinula saudiensis* et c'est l'acide arachidonique qui sera présenté ci-après.

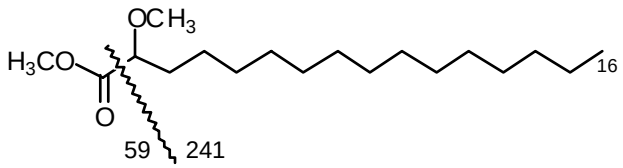
- Identification de l'acide arachidonique (**Tome 2, p. 45**)

L'EMAG sort de la colonne juste avant ou juste après l'acide n-19 :0 (Tableau 26) et, si les ions *m/z* 74 et 87 sont encore visibles malgré leur faible intensité, les ions dominants sont typiques d'un AGPI : *m/z* 67,79, 91 et le SM est identique à celui d'un standard de la spectrothèque HP. L'ion moléculaire, très faible, est à *m/z* 318 (20:4). Cet acide gras est commun mais il n'est pas fréquent d'en obtenir un bon spectres de masse du pyrrolidide dont les coupures principales sous impact électronique sont décrites ci-dessous.



K-2.5. Acide gras α-méthoxylé **(Tome 2, p. 46)**

Un AG 2-méthoxylé a été identifié (à 0,2% du total) par son spectre d'ester méthylique et par comparaison avec un SM de la spectrothèque. La valeur de LCE set très proche de celle qu'aurait son analogue 2-hydroxylé. L'ion moléculaire à *m/z* 300 est présent mais très faible et le pic de base est *m/z* 241 correspondant à $[M - CH_3OCO]^+$.



Cet acide a été trouvé uniquement chez *Amphimedon compressa* (Carballeira *et al*., 1998b). Les acides gras méthoxylés ont été identifiés dans quelques rares sources naturelles et ils semblent n'exister que dans des organismes peu évolués tels que cyanobactéries et bactéries pour les procaryotes, et éponges pour les eucaryotes (Kornprobst & Barnathan, 1998; Carballeira, 2002). Chez les cyanobactéries ils sont liés (amide) à des structures terpèniques halogénées. Les éponges

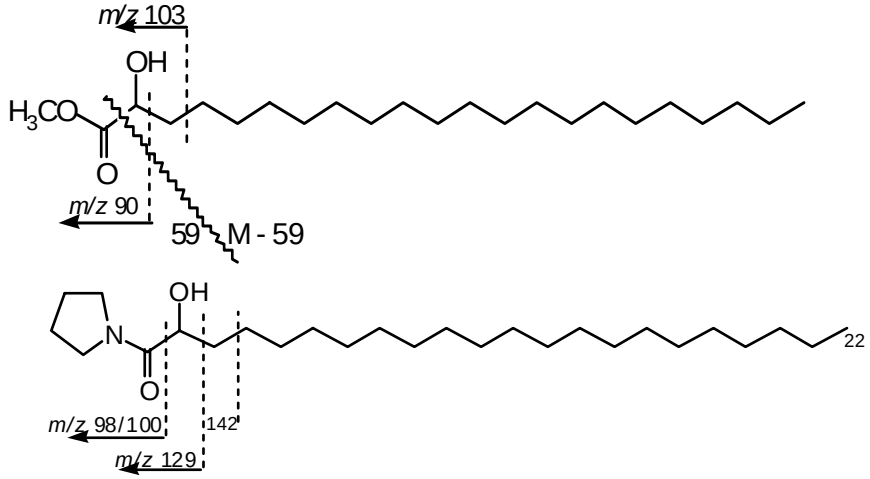
(dans plusieurs ordres) constituent la seule source d'AG α-méthoxylés (environ 30 AG connus) et il s'agit souvent d'AG courts (Carballeira & Sepulveda, 1992 ; Carballeira *et al*., 1992 ; Carballeira & Alicea, 2001 ; Carballeira & Pagán, 2001 ; Carballeira & Alicea, 2002) avec la notable exception de l'éponge sénégalaise *Higginsia tethyoides* (Ayanoglu *et al*., 1983a ; Ayanoglu *et al*., 1983b). Les AG α-méthoxylés à courte chaîne (14 à 18 C) sont attribués à des bactéries symbiontes de l'éponge (Carballeira et Alicea, 2001).

S'agissant d'une série encore mal connue et représentée, il existe peu de données sur l'activité biologique. Le 2-MeO-16:0 est inactif contre des bactéries Gram-positives à la différence des monoènes 2-MeO-15:1 et 2-MeO-16:1 (Carballeira, 2002 ; Carballeira & Alicea, 2002).

K-2.6. Acides gras α–hydroxylés **(Tome 2, p. 47 à 51)**

Les AG 2-hydroxylés, ou α-hydroxylés sont facilement détectés dans les mélanges complexes d'AG. Ils sortent de la colonne immédiatement après un dérivé normal saturé ayant 1 carbone de moins (Tableau 32 pour les LCE), et l'ion provenant du réarrangement de Mac Lafferty est modifié et, finalement, l'ensemble du SM :

- le *m/z* 74 majeur des EMAG devient, avec un atome d'oxygène, le *m/z* 90 mineur (et son homologue impair attendu *m/z* 103). Les ions M^+, $[M - MeOH]^+$ et $[M - COOMe]^+$ sont présents.
- Le *m/z* 113 majeur des NAP devient le *m/z* 129, pic de base, et le spectre est alors dominé par les ions majeurs *m/z* 129 et le 98/100. L'ion M^+ est présent. Les ions résultant de la perte de H_2O à partir de M^+ sont présents.



Il est alors possible de repérer, même à l'état de traces, tous les AG 2-hydroxylés en extrayant le courant ionique calé sur le *m/z* 129. C'est ce qui est montré **Tome 2, p. 47**. Ainsi qu'on l'a montré dans la partie introductive sur l'analyse des AG, les points correspondants à une série d'AG 2-hydroxylés normaux (mais ce serait sans doute vérifié avec des AG ramifiés *iso* ou *anteiso*) sont alignés selon une droite sensiblement parallèle à celles des autres familles d'AG d'un même mélange.

Les spectres des quatre AG hydroxylés identifiés sont présentés dans les pages suivantes du **Tome 2, p. 48 à 51**. Les SM des pyrrolidides comportent encore un ion *m/z* 113 important. Y aurait-il perte d'oxygène au moment de la formation du Mac Lafferty, d'autres AG 2-hydroxylés étudiés au Laboratoire montraient un extrêmement faible, ou bien absent, ion *m/z* 113. C'était en particulier le cas des éponges de la famille Suberitidae dont les phospholipides comportaient une exceptionnelle série de ces acides jusqu'au 2-OH-26:0 et 2-OH-27:0 qui n'avaient jamais été observés chez une éponge (Barnathan *et al*., 1993).

Il est connu depuis longtemps que les AG 2-hydroxylés se trouvent dans les glycolipides et en particulier dans les cérébrosides du cerveau humain (O'Brien *et al*., 1964). Ils sont présents dans les glycolipides d'invertébrés marins et en particulier les éponges où on rencontre des glycolipides à activité pharmacologique (Schmitz & Mac Donald, 1974 ; Costantino *et al*., 1994 ; Natori *et al*., 1994 ; Costantino *et al*., 2001; Genin, 2002 ; Genin *et al*., 2004). Plusieurs phospholipides d'éponges contiennent des AG 2-hydroxylés (par exemple Carballeira & Lopez, 1989 ; Carballeira *et al*., 1989 ; Carballeira *et al*., 1994).

K-3. *Chalinula saudiensis*

Les chromatogrammes des EMAG et des NAP sont présentés dans le Tome II **(Tome 2, p. 52 et 53**). Près de 50 AG ont été identifiés. Malgré des différences entre les résultats de l'analyse CPG/SM obtenus pour les deux types de dérivés, il est frappant de constater que le profil général des AG s'avère tout à fait différent de ceux vus pour *M. dendyi* et pour *S. carteri*. Les AG saturés dominent largement le mélange. Les AG majeurs sont les acides palmitique, stéarique, tétracosanoïque, tricosanoïque, docosanoïque, icosanoïque, et nona-cosanoïque, soit un taux très élevé d'AG saturés normaux. Les insaturés sont dominés par les acides oléique, linoléique, octacosadiènoïque (5,9-28:2). Les Tableaux 34 et 35 présentent la composition en AG et la distribution des AG des phospholipides de *C. saudiensis*.

Tableau 34. Composition en acides gras des phospholipides de *Chalinula saudiensis**.

Noms	Structures	LCE (EMAG)	%
	12:0	12,00	0,4
Tétradécanoïque	14:0	14,00	1,9
13-Méthyl-tétradécanoïque	*i*-15:0	14,61	0,7
12-Méthyl-tétradécanoïque	*ai*-15:0	14,72	0,5
Pentadécanoïque	15:0	15,00	0,7
Hexadéc-5-ènoïque	5-16:1	15,64	1,4
Hexadéc-9-ènoïque	9-16:1	15,72	2,5
Hexadécanoïque	16:0	16,00	8,8
7-Méthyl-hexadéc-6-ènoïque	7-Me-6-16:1	16,44	0,8
Heptadécanoïque	17:0	17,00	0,8
Octadéca-9,12-dièNoïque	9,12-18:2	17,50	5,3
Octadéc-9-ènoïque	9-18:1	17,60	4,9
Octadéc-11-ènoïque	11-18:1	17,70	2,5
3,7,11,15-Me_4-16:0 (phytanique)	3,7,11,15-Me_4-16 :0	17,75	2,0
Octadécanoïque	18:0	18,00	16,9
10,13,16-Triméthylheptadéc-11-ynoïque	10,13,16-Me_3-17≡1	18,60	7,7
Icosa-5,8,11,14-tétraènoïque	20:4 (n-6) arachidonique	18,90	4,2
Nonadécanoïque	19:0	19,00	2,3
Icos-10-ènoïque	10-20:1	19,80	1,5
Icosanoïque	20:0	20,00	2,7
Docosa-4,7,10,13,16,19-hexaènoïque (DHA)	22:6 (n-3)	20,71	3,9
Docosanoïque	22:0	22,00	1,8

Méthyldocosanoïque	br-23:0	22,55	2,7
Tricosanoïque	23:0	23,00	3,3
Tétracos-17-ènoïque	17-24:1	23,82	1,4
Tétracosanoïque	24:0	24,00	6,2
Pentacosanoïque	25:0	25,00	0,6
Hexacosa-5,9-dièn oïque	5,9-26:2	25,50	0,6
Hexacos-16-ènoïque	16-26:1	25,90	0,7
Hexacos-19-ènoïque	19-26:1	25,95	1,2
Heptacosa-5,9-dièn oïque	5,9-27:2	26,50	0,6
Octacosa-5,9-dièn oïque	5,9-28:2	27,50	4,4
Nonacosa-5,9-dièn oïque	5,9-29:2	28,50	0,4
6-Bromo-octacosa-5,9-dièn oïque	6-Br-5,9-28:2	29,45	0,4

* Traces (< 0,2%): 20:1 ; *i*-21:0 ; *ai*-21:0 ; 22:4 ; 22:1, br-22:0 ; 23:2, 2-OH-24:0 ; 29:3

Tableau 35. Distribution (%) des acides gras des phospholipides de *Chalinula saudiensis*.

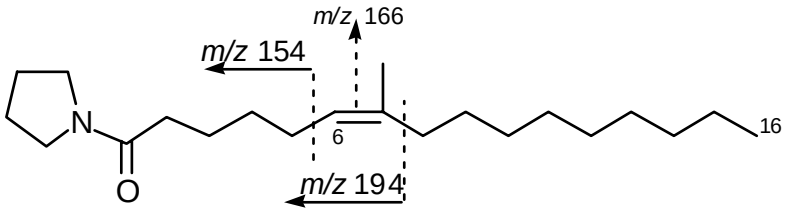
Catégories d'acides gras	%
Acides gras saturés (AGS)	49,6
Acides gras insaturés (AGI)	44,4
Acides gras Δ 5,9	6,4
Rapport entre Δ 5,9 / AGI	0,14
Acides gras à longues chaînes (≥ 23C)	22,5

Bien que situées dans le même environnement marin et à des profondeurs voisines (entre 5 et 15 mètres), les compositions en lipides de *Stylissa carteri* et de *Chalinula saudiensis* sont complètement différentes. Pour cette dernière les teneurs en acides saturés et acides insaturés sont voisines, les acides « démospongiques » Δ5,9 sont en très faible quantité, et enfin les pourcentages cumulés d'acides à longues chaînes sont également faibles, avec un peu plus de 22%. *C. saudiensis* ne contient que des traces d'un unique acide 2-OH-24:0 contrairement à *Stylissa carteri* qui en possède quatre. On note la présence d'une faible quantité d'acide phytanique. Il n'y a pas ici d'AG saturés inhabituels et l'analyse des structures débutera directement par les AG insaturés.

- Identification de l'acide 7-Me-6-16 :1 (**Tome 2, p. 54**)

Parmi les acides rares identifiés dans cette nouvelle espèce, il faut mentionner le 7-Me-6-16:1 qui a déjà été observé chez les organismes marins : éponge des Caraïbes *Amphimedon complanata* (Carballeira & Restituyo, 1991), éponges du Sénégal *Trikentrion loeve* et *Pseudaxinella* cf. *lunaecharta* (Barnathan *et al*., 1996), gorgone du Sénégal *Leptogorgia piccola* (Mirallès *et al*., 1995), ascidie de l'océan Indien (Viracaoundin, 2001 ; Viracaoundin *et al*., 2003).

L'EMAG (0,8% - LCE = 16,44) donne un spectre typique d'AG mono-insaturé, avec M^+ à *m /z* 282 (17:1), et où les ions *m/z* 74 et 87 ne sont plus les majeurs.



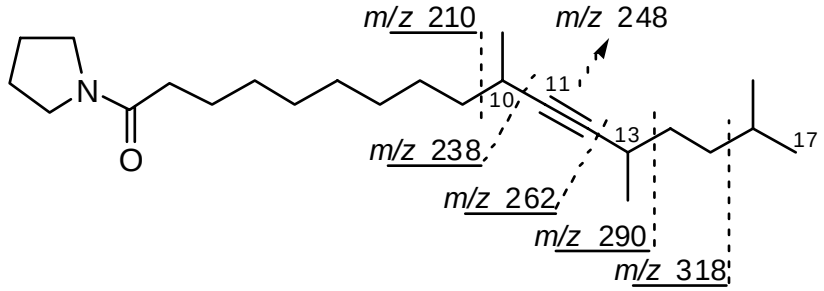
Il est identifié à l'état de NAP (spectre : **Tome 2, p. 54**) : ion M^+ à *m /z* 321 confirmant une structure d'acide 17:1 / LCE = 16,43 / intervalle de 12 uma entre *m/z* 154 et 166 (d'où Δ6) / pas de *m/z* 180 (7:0) alors que les ions *m/z* 166 et 194 sont intenses (d'où 7-Me). Ces données sont identiques à ce qui avait été observé pour cet AG chez les gorgones (Mirallès *et al*., 1996).

- Identification d'un AG acétylénique original : le 10,13,16-triméthylheptadéc-11-ynoïque

Un dérivé pyrrolidide (7,7%) sort de la colonne entre les NAP des acides normaux 18:0 et 19 :0 - soit une LCE = 18,60 - et possède un ion moléculaire intense à *m/z* 361, soit une structure 20:2. Avec une telle structure, le composé devrait admettre une LCE d'environ 19,50. Il est par conséquent ramifié et il est possible d'envisager jusqu'à trois groupes méthyles. Le spectre contient une série habituelle d'ions espacés de 14 uma avec la notable exception d'une différence de 10 uma entre les ions fragments *m/z* 238 (11:0) et *m/z* 248 (12 :2) : ….. 168 / 182 / 196 / 210 / 224 – **238 / 248** – 262 / 276 / 290 / 304 …..

Le comportement des pyrrolidides d'acides gras acétyléniques a été étudié et les auteurs ont pu établir la règle suivante (Kleiman *et al*., 1976 ; Andersson, 1978, Christie, 2004) : « *S'il y a une triple liaison entre les carbones n et n + 1, le SM du pyrrolidide présentera un intervalle de 10 uma entre le pic maximum de l'amas isotopique correspondant aux fragments contenant les carbones n – 1 et n –2* ». Des exemples de SM de pyrrolidides sont montrés dans ces publications.

Une première ramification est située sur C-10 comme le montre la très faible intensité de l'ion homologue *m/z* 224 entouré des voisins intenses *m/z* 210 et 238. De même, l'ion *m/z* 276, soit le fragment 14:2, est quasi inexistant, entre les ions *m/z* 262 et 290 : on en déduit la présence d'un méthyle sur C-13 (position sur la chaîne grasse étant entendu qu'il y a une première ramification). Enfin, l'abaissement relatif de l'ion *m/z* 332 (fragment en 18:2) permet de conclure à une chaîne ramifiée *iso* c'est-à-dire un méthyle en position C-16 sur la chaîne.

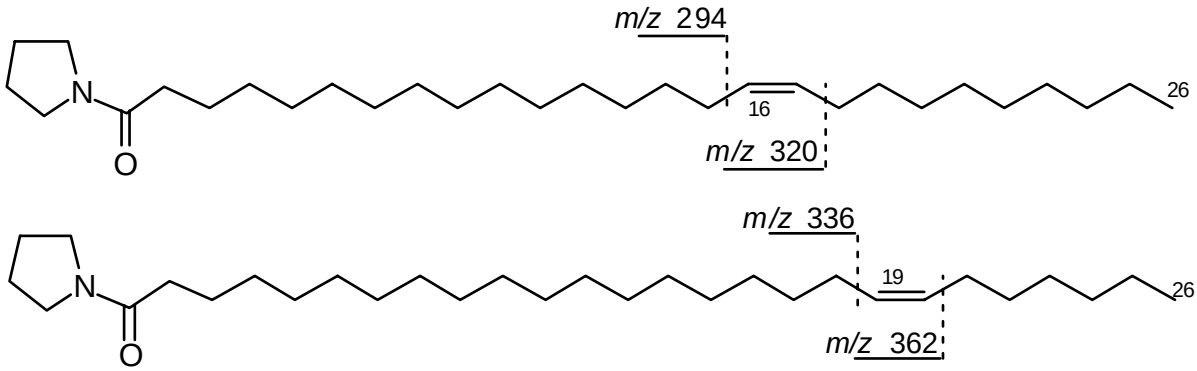


Nous avons donc identifié un acide gras original. Il resterait toutefois à fournir des preuves supplémentaires de structure. Par exemple, il sera déterminant de réaliser une hydrogénation catalytique, ou mieux une deutériation à température ambiante avec le catalyseur de Wilkinson, de façon à établir sans la moindre ambiguïté la nature de l'insaturation et la position des branches méthyles. Quatre atomes de deuterium se fixent sur la triple liaison et l'emplacement de celle-ci sera alors facilement déterminé par CPG/SM.

Plusieurs AG acétyléniques (ou éthynoïques) ont été trouvés dans les éponges et il n'y a pas d'AG monoacétyléniques simples ; ils possèdent aussi d'autres liaisons triples et également des liaisons doubles, et peuvent être bromés (Quinn et Tucker, 1985 ; Hirsch *et al*., 1987). Un AG acétylénique antimicrobien en C_{14} a été isolé d'une éponge *Oceanapia* sp. (Matsunaga *et al*., 2000). Les espèces d'éponges du genre *Stelleta* contiennent des AG acétyléniques originaux en C_{18} avec une seule ramification (les AG acétyléniques sont très rarement ramifiés), qui ont une seule triple liaison entre C-4 et C-5 ou entre C-5 et C-6, une ou deux liaisons doubles (dont une terminale) et parfois un groupe MeO sur C-2. Ces AG ont une activité modérée contre des cellules de plusieurs tumeurs solides, un des α-méthoxylés étant le plus intéressant (Zhao *et al*., 2003 ; Lee *et al*., 2003).

- Identification des acides rares 16-26 :1 et 19-26 :1 (Tome 2, p. 56 et 57)

Les deux isomères ont des temps de rétention très proches sous forme NAP ou EMAG (différence de 0,15 et 0,30 min environ). Ils sont aisément identifiés à l'état de NAP. Les deux composés ont une masse M = 447 (26 :1). Le premier présente un écart de 12 uma entre *m/z* 294 et 306 et on en déduit une double liaison Δ16. Le second présente un écart de 12 uma entre *m/z* 336 et 348 et on en déduit une double liaison Δ19.



Les deux EMAG (LCE de 25,90 et 25,95 attendues pour une d. l. proche de l'extrémité de la chaîne) donnent des spectres quasi identiques, avec l'ion moléculaire faible à *m/z* 408 (26 :1) et un ion important à *m/z* 376 (perte de méthanol partir de M^+).

Le second 19-26:1 est un monoène de la série relativement fréquente est considéré comme un intermédiaire biosynthétique des AG démospongiques tri-insaturés tels que les acides 5,9,19-26:3 et 5,9,21-28:3 (Djerassi et Lam, 1991).

- Acides démospongiques □5,9

Ils sont peu nombreux et représentent un faible total (Tableau 34). L'acide 5,9-28:2 est le principal (%). L'acide 5,9-29:2 est identifié sous forme EMAG par sa mobilité chromato-graphique et son SM (Tome 2, p. 58) : M = 448, pic de base *m/z* 81, pic majeurs à *m/z* 109, 67 et 55.

Un acide bromé 6-Br-5,9-28:2 est présent à l'état de trace mais, comme il est bien isolé, le SM est très lisible (Tome 2, p. 59). Il s'agit d'un composé que le Laboratoire a déjà décrit chez les éponges *Cinachyrella* de mer Rouge (Barnathan *et al*., 2003). Les principaux ions sont interprétés directement sur le spectre. En fait, peu d'ions sont présents et les rares ions intenses ont un fort potentiel diagnostique. L'ion moléculaire n'est pas visible car le brome est très rapidement perdu : on voit donc $[M - Br]^+$ à *m/z* 472. La coupure en position doublement allylique donne le classique *m/z* 180 mais il s'y ajoute le doublet *m/z* 258 / 260 correspondant à ce même clivage, mais le brome se trouvant encore fixé (deux isotopes 79 et 81 à % quasi identiques)

- Acides gras poly-insaturés (AGPI)

La présence d'acide arachidonique et de DHA à des teneurs équivalentes et notables (respectivement 4,2 et 3,9%). Le spectre du pyrrolidide du 22:6 (n-3) ou DHA est présenté dans le Tome II (Tome 2, p. 60). Les écarts de 12 uma permettant de situer les doubles liaisons sont bien nets sauf celui correspondant à l'insaturation Δ7.

S'agissant d'une éponge nouvelle, une étude poussée par microscopie électronique a été réalisée qui a révélé que les bactéries symbiotiques étaient remarquablement peu nombreuses (Vacelet *et al*., 2001). La très faible proportion d'acide phytanique (dérivant du phytol) confirme l'observation faite par microscopie électronique de l'absence de tout symbionte chlorophyllien à l'exception de rares Cyanobactéries qui sont probablement du genre *Oscillatoria* (Vacelet *et al*., 2001). Ainsi, la présence inattendue d'acide arachidonique et d'acide docosahexaènoïque pourrait être attribuée aux Cyanobactéries associées.

K4. *Cinachyrella* cf. *alloclada* et *C.* cf. *kükenthali*

Plus de 50 AG ont été identifiés dans les phospholipides de chaque éponge, *Cinachyrella* cf. *alloclada* et *C.* cf. *kükenthali*, avec une vaste gamme de longueurs de chaîne (de 10 à 30 atomes de carbone). Comme pour les analyses précédemment rapportées dans la thèse, chaque AG est identifié par la prise en compte simultanée de sa mobilité chromatographique (valeur de LCE pour un dérivé donné sur une phase donnée) et de l'examen du spectre de masse (analyse détaillée des fragmentations sous impact électronique et avant tout l'ion moléculaire).

Ces travaux, auxquels ont été associés d'autres expérimentateurs au Laboratoire (Mme R. Nongonierma et Mlle E. Genin), ont fait l'objet de deux communications en congrès international (« Int. Symposium on the Red Sea Marine Environment », Jeddah, nov. 1999 - 6th Int. Sponge Conference, « Sponge Science for the new Millenium », Rapallo, Italie, oct .2002, et de deux publications (Barnathan *et al*., 2003 ; Velosaotsy *et al*., 2004).

Les profils chromatographiques des *N*-acyl pyrrolidides correspondant aux courants ioniques calés sur l'ion *m/z* 113 (Mac Lafferty) extraits des courants ioniques totaux sont présentés dans le Tome 2 (Tome 2, p. 61 et 62). On retrouve ici le type de profil classique chez les éponges, déjà observé pour *Myrmekioderma dendyi* et *Stylissa carteri* (mais pas pour *Chalinula saudiensis*) montrant une zone médiane comportant des AG à 19-23 carbones en faible proportion relative. Dans chaque cas, le profil est encore caractérisé par une zone des AG à très longues chaînes et en proportions importantes. Cette zone est présentée pour *C.* cf. *alloclada* (Tome 2, p. 63). On peut rappeler que ce constat avait été dressé au début des travaux sur les phospholipides d'éponges marines (Walkup *et al*., 1981 ; Ayanoglu *et al*., 1988). Les résultats sur les compositions en AG des deux éponges sont rassemblés dans le Tableau 36.

Tableau 36. Composition en acides gras des phospholipides de *Cinachyrella* cf. *alloclada (C.a.)* et *C.* cf. *kükenthali* (*C. k.*) (Barnathan *et al.*, 2003)

Acides gras identifiés			% massiques	
Noms	Structures	LCE	*C. a.*	*C. k.*
Octanoïque	8:0	8,00	1,3	1,4
Décanoïque	10:0	10,00	1,5	2,3
Tetradécanoïque	14:0	14,00	1,4	2,1
4,8,12-Triméthyltridécanoïque	4,8,12-Me_3-13:0	14,50	8,5	7,1
13-Méthyltetradécanoïque	*i*-15:0	14,66	0,9	6,9
12-Méthyltetradécanoïque	*ai*-15:0	14,74	-	3,1
Pentadécanoïque	15:0	15,00	0,4	1,3
10,13-Diméthyltetradécanoïque	10,13-Me_2-14:0	15,07[1]	-	1,5
14-Méthylpentadécanoïque	*i*-16:0	15,61	1,3	2,5
Hexadéc-9-énoïque	9-16:1	15,75	1,8	3,4
Hexadécanoïque	16:0	16,00	8,5	8,1
10-Méthylhexadécanoïque	10-Me-16:0	16,37	3,9	-
13-Méthylhexadécanoïque	13-Me-16:0	16,38	-	10,5
15-Méthylhexadécanoïque	*i*-17:0	16.60	1,7	3,7
14-Méthylhexadécanoïque	*ai*-17:0	16.69	1,8	1,2
Heptadéc-9-ènoïque	9-17:1	16,79	-	1,0
Heptadécanoïque	17:0	17,00	0,9	1,3
Octadéca-9,12-dièn0ïque	9,12-18:2	17,54	0,2	0,6
Octadéc-9-ènoïque	9-18:1	17,63	3,0	1,7
Octadéc-11-énoïque	11-18:1	17.73	3,0	2,5
Octadécanoïque	18:0	18,00	12,5	7,5
10-Méthyloctadécanoïque	10-Me-18:0	18,38	0,7	-
11-Méthyloctadécanoïque	11-Me-18:0	18,45	2,8	0,2
17-Méthyloctadécanoïque	*i*-19:0	18,64	1,0	1,5
Nonadéc-6-ènoïque	6-19:1	18,73	0,3	0,3
Nonadéc-9-ènoïque	9-19:1	18,85	-	1,7
Nonadéc-11-ènoïque	11-19:1	18.86	1,8	-
Nonadécanoïque	19:0	19,00	1,4	0,3
Icos-14(ou 15)-ènoïque	14- ou 15-20:1	19,77	0,4	0,1
12-Méthyleicosanoïque	12-20:0	20,39	1,1	-

Docosanoïque	22:0	22,00	-	0,4
21-Méthyldocosanoïque	*i*-23:0	22,66	0,7	-
Tétracos-17-ènoïque	17-24:1	23,78	0,7	0,6
Tétracosanoïque	24:0	24,00	0,2	0,3
17-Méthyltétracosanoïque*	17-Me-24:0	24,33	-	4,3
18-Méthyltétracosanoïque*	18-Me-24:0	24,38	4,5	-
Pentacosènoïque	25:1	24,47	0,3	0,5
18-Méthylpentacosanoïque*	18-Me-25:0	25,25	0,6	-
Hexacos-19-ènoïque	19-26:1	25,67	3,7	4,1
25-Méthylhexacos-19 (20)-ènoïque	*i*-20-27:1	25,83	1,3	-
18-Méthylhexacosanoïque*	18-Me-26:0	26,18	7,4	-
18,24-Diméthylhexacosanoïque*	18,24-Me_2-26:0	27,23[1]	0,9	-
Heptacos-20-ènoïque	20-27:1	26,68	3,0	-
Nonacosanoïque	29:0	29,00	2,1	-
Acides insaturés □5,9				
Octadéca-5,9-dièn oïque	5,9-18:2	17,22[1]	0,4	4,2
Hexacosa-5,9,x-triènoïque (x=19 ou 21)	5,9,x-26:3	25,12[1]	0,3	-
24-Méthylpentacosa-5,9-dièn oïque	*i*-5,9-26:2	25,21[1]	-	0,4
23-Méthylpentacosa-5,9-dièn oïque	*ai*-5,9-26:2	25,26[1]	-	0,2
Hexacosa-5,9-dièn oïque	5,9-26:2	25,56[1]	0,2	0,4
25-Méthylhexacosa-5,9-dièn oïque	*i*-5,9-27:2	26,19[1]	-	0,5
24-Méthylhexacosa-5,9-dièn oïque	*ai*-5,9-27:2	26,27[1]	-	2,0
Heptacosa-5,9-diénoïque	5,9-27:2	26,49[1]	0,6	0,5
25-Méthylheptacosa-5,9-dièn oïque	*ai*-5,9-28:2	27,24[1]	-	3,0
Octacosa-5,9-dièn oïque	5,9-28:2	27,51[1]	4,0	0,8
Méthyloctacosa-5,9-dièn oïque	br-5,9-29:2	28,03[1]	0,3	-
27-Méthyloctacosa-5,9-dièn oïque	*i*-5,9-29:2	28,18[1]	0,6	-
26-Méthyloctacosa-5,9-dièn oïque	*ai*-5,9-29:2	28,28[1]	0,4	-
6-Bromo-pentacosa-5,9-dièn oïque	6-Br-5,9-27:2	28,38[1]	0,2	tr.
Nonacosa-5,9-dièn oïque	5,9-29:2	28,58[1]	1,0	tr.
5,9,23-Triacontatriénoïque	5,9,23-30:3	29,32[1]	1,0	0,2
6-Bromo-octacosa-5,9-dièn oïque	6-Br-5,9-28:2	29,36[1]	1,0	tr.
6-Bromo-nonacosa-5,9-dièn oïque*	6-Br-5,9-29:2	30,23[1]	0,2	-
Total AGS (AG saturés)			64,6	67,5
Total AGI (AG insaturés)			27,7	28,7
Total AG Δ5,9			10,2	12,2
Total AG à longue chaîne (≥ 24C)			35,5	22,0

NB. Détermination des LCE avec les EMAG sauf exceptions.

[1] Détermination LCE avec les pyrrolidides ; * AG nouveaux

Autres AG mineurs identifiés (< 0,2%). *C.* cf. *alloclada* : i-20:0 ; 20:0 ; 30:1 ; 30:2 et *C.* cf. *kükenthali* : 12:0 ; br-14:0 ; 16:1 ; i-9-17:1 ; Δ5,9,x-18:3 ; 20:0 ; 26:2 ; 30:2

K-4.1. Acides gras saturés

Les compositions en AG saturés des deux espèces de *Cinachyrella* sont similaires. L'existence d'une importante population bactérienne hébergée semble confirmée par la présence prépondérante de nombreux acides saturés et/ou ramifiés à nombre impair de carbones, en particulier les couples *iso/anteiso* en C_{15}, C_{17}, associés à plusieurs acides *iso* ou *anteiso*, et à d'autres acides majoritairement à nombre impair de carbones et ramifiés en milieu de chaînes : 10,13-Me_2-14:0 ; 10-Me-16:0 ; 13-Me-16:0 ; 10-Me-18:0 ; 11-Me-18:0 ; 12-Me-20:0 ; 17-Me-24:0 ; 18-Me-24:0 ; 18-Me-25:0 ; 18-Me-26:0 ; 18,24-Me_2-26:0). Ces cinq derniers AG sont nouveaux dans la nature. La détermination de leurs structures sera examinée ci-après. La question

de la présence de bactéries dans les tissus d'éponge a fait l'objet des recherches de biologistes et de chimistes (Vacelet, 1975 ; Bobbie et White, 1980 ; Walkup *et al.,* 1981; Gillan *et al*., 1988 ; Carballeira *et al*., 1998). Le 10-Me-16:0 a été plusieurs fois observé chez les invertébrés marins, par exemple chez *Myrmekioderma dendyi*, dans ce travail). Le rare 13-Me-16:0 a été signalé dans les gorgones (Mirallès *et al*., 1996). Le 11-Me-18:0 a été identifié dans des éponges (Walkup *et al*., 1981 ; Dasgupta *et al*., 1984).

Le rare 10,13-Me_2-14:0 n'a été signalé que dans une éponge des Caraïbes *Ectyoplasia ferox* (Carballeira & Maldonado, 1989), dans *Myrmekioderma dendyi* (présent travail) et l'éponge sénégalaise *Oceanapia* sp. (Genin, 2002). Sa caractérisation a été détaillée avec les AG de *M. dendyi*.

Contrairement à l'espèce *Chalinula saudiensis*, l'acide isoprénique 4,8,12-triméthyl-tridécanoïque est présent dans les deux espèc**es** de *Cinachyrella* avec des teneurs notables (8,5 et 7,1% respectivement pour *C.* cf. *alloclada* et *C*. cf. *kükenthali*), confirmant ainsi les résultats déjà obtenus au laboratoire avec d'autres espèces de *Cinachyrella* (Barnathan *et al*., 1993 ; Kornprobst & Barnathan, 1998). L'analyse de la structure de cet acide a été détaillée lors de l'étude précédente sur les AG de *M. dendyi*. C'est dans les espèces du genre *Cinachyrella* que l'on a identifié au Laboratoire l'acide isoprènoïque rare 5,9,13-Me_3-14:0 et l'association de ces deux AG isoprèniques a semblé spécifique du genre (Barnathan *et al*., 1993 ; Barnathan et Kornprobst, 1998). Les *Cinachyrella* de mer Rouge n'en contiennent pas. Ce résultat a été obtenu en recherchant l'AG 17:0 tri-ramifié, par l'ion moléculaire, dans les courants ioniques (chromatogrammes) des EMAG et des NAP, dans les zones de temps de rétention où il aurait pu se trouver.

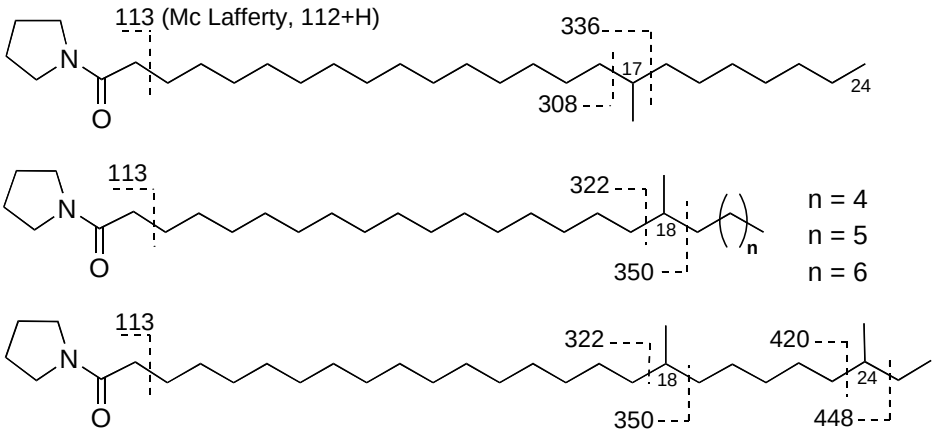
- <u>Identification de cinq nouveaux AG ramifiés à longue chaîne</u> (**Tome 2, p. 64 et 65**)

Dans les phospholipides de *C.* cf. *alloclada*, trois nouveaux AG saturés et ramifiés étaient rapidement identifiés (NAP) (**Tome 2, p. 64**) : présence de l'ion moléculaire à *m/z* 435 (25:0) (LCE=24,38), 449 (26:0) (LCE= 25,35) et 463 (27:0) (LCE=26,38) (Barnathan *et al*., 2003). La ramification méthyle est localisée nettement de par la très faible intensité de l'ion fragment *m/z* 336 (18:0) dans les trois SM des pyrrolidides, flanqué des deux homologues intenses à *m/z* 322 et 350. Les spectres des EMAG sont typiques d'un AG saturé avec l'ion moléculaire attendu et le pic de base à *m/z* 74.

Le nouvel AG 17-Me-24:0, d'abord identifié dans *C.* cf. *kükenthali* (4,3%) a été trouvé plus tard chez *M. dendyi*, à plus de 13%, et sa structure a été décrite avec les AG de *M. dendyi* (**Tome 2, p. 15**).

Un autre AG saturé a été identifié dans *C*. cf. *alloclada*. Il admet une LCE de 27,23 (NAP) et donne un ion moléculaire à *m/z* 477 (**Tome 2, p. 65**): on en déduit une structure d'AG di-ramifié. Il y a dans le SM deux fragments nettement diminués par rapport à leurs voisins immédiats, *m/z* 336 et 434, d'où on déduit que l'acide gras possède un méthyle fixé sur C-18 (comme les composés précédents), et un autre fixé sur C-24 (*anteiso*). Le spectre de l'EMAG est typique d'un AG saturé mais ne permet pas de situer les ramifications. Il correspond bien à une structure 28:0 (M=438) qui est ramifiée (LCE=27,26).

Les spectres des nouveaux composés sont montrés ci-dessous.



Ces AG sont synthétisés à partir de précurseurs courts fournis probablement par les bactéries hébergées. Il est alors possible de relier les AG ramifiés courts, et les AG ramifiés longs, présents dans ces éponges par des schémas de voies de biosynthèse hypothétiques :

10-Me-16:0 ⟶ [12-Me-18:0] ⇢ 18-Me-24:0

[9-Me-16:0] ⟶ 11-Me-18:0 ⇢ 17-Me-24:0

10-Me-18:0 ⟶ 12-Me-20:0 ⇢ 18-Me-26:0

K-4.2. Acides gras insaturés - acides démospongiques Δ5,9

En plus des AG habituels comme les acides palmitoléique (Δ9-16 :1) et oléique (Δ9-18:1), les deux éponges contiennent des AG mono-insaturés typiquement bactériens tels que Δ9-17:1, *iso*-Δ9-17:1, Δ11-17:1, Δ11-18:1 et Δ11-19:1. Le spectre infrarouge des EMAG ne révèle pas d'absorption vers 980-960 cm^{-1} indiquant l'absence de liaison double *trans*.

- Identification de l'acide iso-9-17 :1 (**II, p.66**)

Avec une valeur LCE de 16,28 et un ion moléculaire à *m/z* 321, il s'agit d'un acide 17:1 ramifié. La double liaison est située entre les carbones C-9 et C-10 comme indiqué par l'intervalle de 12 uma entre *m/z* 196 et 208. La ramification appartient au type *iso* comme l'indique la quasi inexistence de l'ion attendu à *m/z* 292.

Un acide rare est identifié, le 20-27:1, qui appartient à la série des monoènes (n-7), et un acide 27:1 ramifié *iso* mais le spectre ne permet pas de conclure entre une double liaison Δ19 ou Δ20, les intensités des fragments diagnostiques étant presque identiques.

- Acides démospongiques Δ5,9

Les phospholipides des deux éponges ne contiennent pas d'AG poly-insaturés et un seul AG di-insaturé, l'acide linoléique Δ9,12-18:2, est présent qui ne soit pas un acide démospongique Δ5,9. Les deux espèces ont des compositions similaires en AG insaturés Δ5,9. Pour chacune des espèces**,** nous avons identifié 13 de ces acides mais cinq d'entre eux seulement sont communs aux deux espèces, si l'on exclut les trois acides Δ5,9 trouvés à l'état de traces dans *Cinachyrella* cf. *kükenthali*. L'acide 5,9,23-30:3, qui est souvent trouvé avec une forte teneur dans de nombreuses démosponges, et en particulier dans les *Cinachyrella* du Sénégal (Barnathan *et al*., 1992), n'est ici présent qu'en faible quantité pour chacune des espèces étudiées. Un AG court, en C_{18}, était présent dans cette famille.

- Identification de l'acide 5,9-18 :2 (**Tome 2, p. 67)**

Il est présent dans les deux éponges mais surtout abondant dans *C.* cf. *kükenthali* (4,2%). L'ion moléculaire à *m/z* 333 révèle une structure 18:2 et l'ion majeur à *m/z* 180 indique que les insaturations sont Δ5,9.

- Identification d'acides 6-bromo-□5,9 (**Tome 2, p. 68 et 69**)

L'espèce *C.* cf. *alloclada* contient 3 acides bromés 6-Br-□5,9 qui ne sont présents qu'à l'état de traces, ou absents, dans la seconde espèce. Si les acides 6-Br-5,9-27:2 et 6-Br-5,9-28:2 étaient déjà connus, il n'en est pas de même de l'homologue en C_{29}.

Le spectre du pyrrolidide de l'acide 6-Br-5,9-28 :2 a été analysé lors de l'étude de *Chalinula saudiensis*. Pour confirmer que le spectre d'un AG bromé de ce type est très simple d'aspect, et ne comporte que quelques pics diagnostiques, celui du 27:2 est présenté dans le Tome 2 (**Tome 2, p. 68**). L'ion moléculaire, ou plutôt le doublet compte tenu des deux isotopes du brome, n'est pas présent. Le brome est trop facilement perdu et on obtient à *m/z* 456 le $[M\text{-}Br]^+$. Le clivage en position bis-allylique conduit aux ions favorisés *m/z* 180 (sans brome) et *m/z* 258/260 (avec brome).

La position vinylique du brome est obtenue *via* une deutériation à température ambiante utilisant le catalyseur de Wilkinson - $RhCl(PPh_3)_3$ – dans le méthanol. La réaction a été réalisée au Laboratoire sur les AG de *Axinella* sp. (Kornprobst et Barnathan, non publié). Le résultat c'est la fixation de 5 atomes de deutérium qui vont marquer la position de l'insaturation, et donc la position du brome, et qui seront par conséquent visibles sur le spectre de masse.

Le spectre de l'EMAG du 5,9-28:2 (**Tome 2, p. 69**) possède l'ion majeur *m/z* 81 (système Δ5,9), l'ion moléculaire après perte de brome soit *m/z* 433, et l'ion correspondant à la perte de méthanol à partir de cet ion *m/z* 401. Les ions attendus à *m/z* 512/514 ne sont pas obtenus.

- Le nouvel acide bromé 6-Br-5,9-29:2 est identifié de même manière. Le spectre de masse du dérivé NAP a pour pic de base le fragment *m/z* 113, les ions fragments bromés à *m/z* 258 et 260 d'intensités égales correspondant à la coupure en position bis-allylique C7-C8, un pic *m/z* 180 de forte intensité due à la même coupure après la perte de l'atome de brome, et l'ion *m/z* 486 correspondant à $[M\text{-}Br]^{\cdot+}$.

Enfin, les points correspondant aux LCE 28,38 (6-Br-5,9-27:2), 29,36 (6-Br-5,9-28:2) et 30,23 (6-Br-5,9-29:2), sont parfaitement alignés.

K-5. *Geodia* sp.

Ainsi qu'il a été noté au début sur l'extraction et la composition en phospholipides, cette éponge vit en grande profondeur, en l'absence de lumière. Dans ces conditions, on ne s'attend pas à trouver des acides isopréniques issus de la chaîne phytyle de la chlorophylle. La composition attendue devrait être marquée par une forte teneur en acides saturés ramifiés d'origine bactérienne. S'agissant d'AG saturés, ou d'AG Δ5,9 aisément reconnaissables, l'identification des AG s'est appuyée pour cette analyse tout autant sur les EMAG que sur les NAP. Le chromatogramme des NAP, extrait du courant ionique total calé sur le *m/z* 113, montre bien cette prépondérance des acides courts saturés et ramifiés (**Tome 2, p. 70**). Le Tableau 37 donne l'essentiel de la composition.

Tableau 37. Composition en acides gras des phospholipides de *Geodia* sp.

Acides gras des phospholipides

Noms	Structures	LCE	% Massiques
11-Méthyldodécanoïque	*i*-13:0	12,62	0,2
10-Méthyldodécanoïque	*ai*-13:0	12,74	0,2
10-Méthyltridécanoïque	10-Me-13:0	13,54	0,2
12-Méthyltridécanoïque	*i*-14:0	13,60	0,2
Tétradécanoïque	14:0	14,00	0,5
Pentadécanoïque ramifié	br-15:0	14,29	2,8
3-Méthyltétradécanoïque	3-Me-15:0	14,48	0,7
6-Méthyltétradécanoïque	6-Me-14:0	14,60	0,9
12-Méthyltétradéc-4-ènoïque	*ai*-4-15:1	14,62	0,7
13-Méthyltétradécanoïque	*i*-15:0	14,65	5,9
12-Méthyltétradécanoïque	*ai*-15:0	14,75	4,3
Pentadécanoïque	15:0	15,00	1,7
Hexadécanoïque ramifié	br-16:0	15,05	0,6
Hexadécanoïque ramifié	br-16:0	15,11	1,3
3-Méthylpentadécanoïque	3-Me-15:0	15,37	0,7
Hexadécanoïque ramifié	br-16:0	15,39	0,3
Hexadécanoïque ramifié	br-16:0	15,44	1,1
10-Méthylpentadécanoïque	10-Me-15:0	15,57	1,5
Hexadéc-5-ènoïque	5-16:1	15,63	0,6
Hexadéc-9-ènoïque	9-16:1	15,68	0,7
Hexadéc-11-ènoïque	11-16:1	15,77	0,8
Hexadécanoïque	16:0	16,00	7,0
3,15-Diméthylhexadéc-9(10)-ènoïque	br_2-17:1	16,12	0,4
13-Méthylhexadécènoïque	*ai*-17:1	16,24	0,4
9-Méthylhexadécanoïque	9-Me-16:0	16,33	10,3
Heptadécanoïque ramifié	br-17 :0	16,36	0,9
Octadécanoïque ramifié	br_3-18:0	16,52	1,3
15-Méthylhexadécanoïque	*i*-17:0	16,60	0,8
Heptadécanoïque	17:0	17,00	0,6
10-MéthylHeptadécanoïque	10-Me-17:0	17,30	1,8
Octadéc-5-ènoïque	5-18:1	17,59	0,5
Octadéc-9-ènoïque	9-18:1	17,66	1,0
Octadécanoïque	18:0	18,00	7,9
9-Méthyloctadéc-5-ènoïque*	9-Me-5-18:1	18,06	1,0
Nonadécènoïque ramifié	br-19:1	18,11	1,8
11-Méthyloctadécanoïque	11-Me-18:0	18,42	24,9
Eicosanoïque ramifié	br_3-20:0	18,55	0,3
17-Méthylnonadécanoïque	*ai*-20:0	18,76	0,4
Henéicosanoïque	21:0	21,00	0,3
Docosanoïque	22:0	22,00	6,3
Tricosanoïque ramifié	br-23:0	22,44	0,4
21-Méthyldocosanoïque	*i*-23:0	22,67	0,5
Tricosanoïque	23:0	23,00	0,6
Tétracosa-5,9-dièneoïque	5,9-24:2	23,49	0,3
Tétracosanoïque	24:0	24,00	0,8
23-Méthyltétracosa-5,9-dièneoïque	*i*-5,9-25:2	24,12	1,5
22-Méthyltétracosa-5,9-dièneoïque	*ai*-5,9-25:2	24,20	0,7

26-Méthylheptacosa-5,9-dièn oïque	*i*-5,9-28:2	27,07	0,3
Dotriacontènoïque ramifié	br-32:1	30,79	0,4
Total AGS			88,2
Total AGI			10,3
Total AG Δ5,9			2,8
Total acides à longues chaînes (≥ 24 C)			5,5

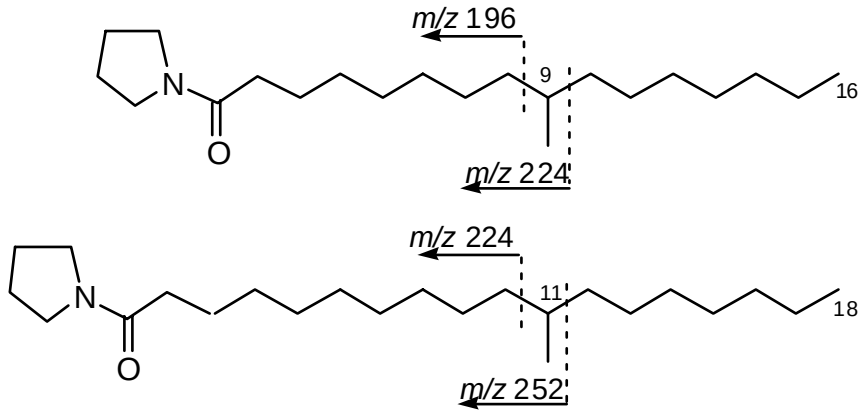
Traces (%< 0,1) : 12:0 ; 13:0 ; 14:0 ; □5,9-16 :2; *i*-18:1 ; 10-18:1 ; 30:2 ; 33 :1 * Acides gras nouveaux

L'importance prépondérante des bactéries est confirmée par la composition en acides gras qui montre une très forte teneur en acides saturés ramifiés et de faibles quantités d'acides à longues chaînes (≥ 23 C ; 5,5%) et surtout d'acides démospongiques Δ5,9 (2,8%). Un tel résultat permet de supposer que les éponges riches en acides à longues chaînes et en acides Δ5,9 contiennent de ce fait davantage de substances antibactériennes que les éponges très profondes qui se comporteraient ainsi comme des « réservoirs de bactéries ».

K-5.1. Acides gras saturés

Les principaux AG de cette catégorie, et d'ailleurs de l'ensemble du mélange, sont les AG rares (au moins avec ces proportions) 9-Me-16:0 (10,3%) et 11-Me-18:0 (24,9%) qui sont d'ailleurs des homologues d'une même série avec le méthyle en (n-7). Leurs spectres de masse sont présentés dans le Tome 2 (Tome 2, p. 71).

Les ions moléculaires sont présents respectivement à *m/z* 323 (17:0) et 351 (19:0). La position des ramifications s'établit comme suit : absence de l'ion *m/z* 210 (encadré des ions 196 et 224 plus intenses que leurs voisins) pour le premier AG d'où un méthyle fixé sur C-9.



Pour le second AG ramifié, le fragment *m/z* 238 est très faible et encadré des pics *m/z* 224 et 252 plus intenses que leurs voisins : d'où un méthyle fixé en C-11. L'acide palmitique n'est qu'à 7% et l'acide stéarique à 7,9%. Dans cette même série d'AG se place le nouveau 17-Me-24 :0 identifié chez une éponge du genre *Cinachyrella* (ce travail).

Plusieurs AG mineurs (6 composés) ont un type de ramification rare. En plus de l'habituel ion *m/z* 74 résultant du réarrangement de Mac Lafferty, un pic intense est présent à *m/z* 101 qui indique un méthyle fixé sur C-3 (comme par exemple pour l'acide phytanique vu précédemment). Deux exemples en sont montré au Tome 2 (Tome 2, p. 72). Malencontreuse-ment, les spectres des NAP qui semblent correspondre à ces structures sont enregistrés sous forme d'extraits, comme c'est souvent le cas, de façon à travailler sur des agrandissements et à optimiser les conditions de l'interprétation. Il s'ensuit que le l'ion *m/z* 126, habituellement un ion majeur mais sans importance diagnostique, est absent. Dans un cas seulement, il est visible et apparaît très nettement affaibli, confirmant ainsi la position de la branche méthyle en C-3.

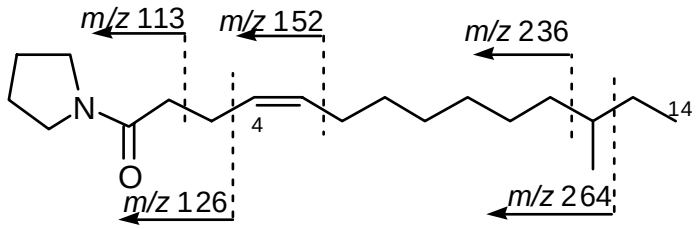
Plusieurs AG saturés di- ou tri ramifiés (valeur LCE plus faible que celle attendue pour une masse molaire donnée) sont présents dans le chromatogramme des EMAG et il n'est pas possible d'identifier toutes les positions des méthyles.

Le 6-Me-14:0 est un AG rare et observé pour la première fois dans une éponge marine: son spectre a l'aspect général d'un EMAG saturé (base *m/z* 74) mais avec un ion majeur à *m/z* 143 (7 :0, 90%).

K-5.2 Acides gras insaturés

- Identification de l'acide rare *anteiso*-4-15 :1 (Tome 2, p. 73).

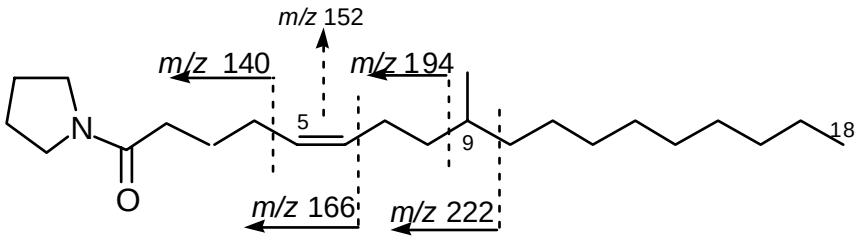
Le spectre de l'EMAG est celui d'un AG mono-insaturé et ramifié avec les ions *m/z* 74, 87 affaiblis et l'ion moléculaire attendu à *m/z* 254 (15:1). Le spectre du NAP révèle un ion moléculaire à *m/z* 293 (15:1) et un écart de 12 uma entre les pics *m/z* 126 et 138 soit une double liaison entre C-4 et C-5. L'ion *m/z* 250 (12:1) révèle la présence de la ramification sur C-12 (*anteiso*-15 :1). Les ions *m/z* 138 et 139 sont d'intensités voisines et l'ion *m/z* 166 est intense conformément à ce qui avait été signalé dans la publication de référence sur l'utilisation des *N*-acyl pyrrolidides (Andersson, 1978).



Cet acide rare, typiquement bactérien, a été trouvé récemment dans une éponge du Sénégal, *Oceanapia* sp. (Genin, 2002). L'isomère analogue, également très rare, *iso*-4-15:1, a été identifié au Laboratoire dans les phospholipides de l'éponge *Suberites massa* (Barnathan, 1993 ; Barnathan *et al*., 1993). Ce dernier AG avait été identifié dans *Dysidea fragilis* (Christie *et al*., 1992). Les deux isomères *iso* et *anteiso* étaient présents dans la même éponge (Carballeira et Pagan, 2002). Ces AG rares sont d'origine bactérienne (Gudmestad *et al*., 1988 ; Henningson *et al*., 1988).

- Identification du nouveau 9-Me-5-18 :1 (Tome 2, p. 74).

Un EMAG sortant peu après celui de l'acide stéarique (LCE=18,06) donne un ion moléculaire à *m/z* 349 (19 :1 et ramifié). Le spectre du NAP montre un espacement de 12 uma entre les pics 140 et 152, suivi d'une série normale de fragments espacés de 14 uma jusqu'à *m/z* 194. Il s'agit donc d'une double liaison entre C-5 et C-6. Le méthyle est fixé sur C-9 comme l'indique l'absence de l'ion *m/z* 208, encadré par des ions nets *m/z* 194 et 222.



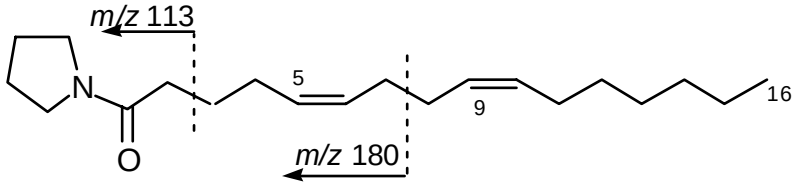
Deux AG monoènes 32:1 et 33:1 sont repérés par le spectre des EMAG, typiquement insaturés, avec des ions moléculaires respectifs à *m/z* 492 et 506, associés à des ions $(M-32)^+$ et $(M-31)^+$. On peut voir une parenté entre cet acide et le 5,9-18:2 si l'on considère que la voie classique

de fixation d'un méthyle opère sur une double liaison préexistante, qui pourrait être la liaison Δ9, *via* la S-adénosyl méthionine.

L'acide 3,15-diméthylhexadéc-9(10)-ènoïque n'a pu être identifié complètement.

- Identification de l'acide rare 5,9-16:2 (Tome 2, p. 75)

L'EMAG seul permet de conclure sur une structure 16:2 (M=266) et un système 5,9 (*m/z* 81 base). Le spectre du NAP confirme cette structure avec M=305 et avec la présence de l'ion intense *m/z* 180. Nous avons identifié cet acide aussi dans *Axinyssa djiferi* (ce travail ; Genin, 2002).



Cet acide a été d'abord identifié chez *Chondrilla nucula* (Carballeira et Maldonado, 1986), dans *Xestospongia muta* à plus de 10% (Carballeira & Maldonado, 1988) et dans *Chondrosia reformis* (Carballeira *et al*., 1993).
L'acide démospongique 5,9-24:2 est identifié à la fois sous forme d'EMAG et sous forme de NAP. Quelques autres acides de cette famille sont identifiés comme par exemple l'acide *iso*-5,9-28:2.
Un AG diènique a un ion moléculaire à *m/z* 490, associé au *m/z* 459 $(M-31)^+$. Il s'agit donc d'un acide 32:2. Le spectre est insuffisamment net pour conclure à un acide di-insaturé 5,9. C'est en effet un composé mineur et il est mélangé à des extraits siliconés de la phase. On se trouve aux limites de température d'utilisation de la phase.

K-6. *Axinyssa djiferi*

Les AG se singularisent par une très forte proportion (78%) des AG à longue chaîne principalement due à un taux exceptionnel d'acide 5,9-26:2 (plus de 56%). Le chromato-gramme des dérivés NAP est donné dans le Tome 2 (Tome 2, p. 76). Le Tableau 38 fournit l'essentiel de la composition en AG.

Tableau 38. Composition en acides gras des phospholipides d'*Axinyssa djifferi*.

Acides	Structures	LCE	% Massiques
Tétradécanoïque	14:0	14,00	0,4
4,8,12-Triméthyltridécanoïque	4,8,12-Me_3-13:0	14,51	0,9
Hexadéc-5,9-dièn oïque	5,9-16:2	15,32[1]	tr.
14-Méthylpentacosanoïque	*i*-16:0	15,67	0,1
Hexadéc-9-ènoïque	9-16:1	15,79	1,1
Hexadécanoïque	16:0	16,00	3,3
Octadéca-10,15-dièn oïque	10,15-18:2	17,61[1]	tr.
Octadéc-9-ènoïque	9-18:1	17,71	1,0
Octadécanoïque	18:0	18,00	2,3
Nonadéc-12-ènoïque	12-19:1	18,85	0,7
18-Méthylnonadécanoïque	*i*-20:0	19,63	1,3
Eicosanoïque	20:0	20,00	0,8
19-Méthyléicosanoïque	*i*-21:0	20,64	1,2
18-Méthyléicosanoïque	*ai*-21:0	20,72	0,8
Tricos-16-ènoïque	16-23:1	22,80[1]	0,4
Tetracos-17-ènoïque	17-24:1	23,80[1]	1,5
Tétracosanoïque	24:0	24,00	0,4
22-Méthyltétracosa-5,9-dièn oïque	*ai*-5,9-25:2	24,22[1]	7,0

Pentacosa-5,9-dièn oïque	5,9-25:2	24,54	2,4
Pentacosanoïque	25:0	25,00	0,2
Hexacosa-5,9,19-triènoïque	5,9,19-26:3	25,04[1]	3,1
Hexacosa-5,9-dièn oïque	5,9-26:2	25,38[1]	56,3
Hexacos-17-ènoïque	17-26:1	25,68[1]	3,3
Heptacosénoïque branché	br-27:1	26,20	5,4
Total AGS			11,7
Total AGI			82,2
Total AG 5,9			68,8
Total AG à longues chaînes (≥ 24 C)			78,1

[1]Valeurs obtenues à partir des dérivés NAP. Acides caractérisés à l'état de traces (% ≤ 0,1) : 12:0 ; *i*-15:0 ; *ai*-15:0 ; 15:0 ; 6-16:1 : *ai*-17:0 ; 17:0 ; 11-18:1 ; 19:0 ; Me-21:0 ; 21:0 ; 22:0 ; 23:1 ; 18-26:1.
Quelques acides (environ 5%) n'ont pu été identifiés.

Avec plus de 80% d'acides insaturés, près de 80% d'acides à longues chaînes et près de 70% d'acides Δ5,9, la composition en acides gras des phospholipides apparaît comme particulièrement atypique. En particulier, *Axinyssa djiferi* semble actuellement la seule éponge connue dont le pourcentage en 5,9-26:2 représente plus de la moitié de la fraction acide gras des phospholipides, l'espèce *Spheciospongia confeoderata* n'en contenant que 49,6% (Ayanoglu *et al*., 1990). Il est également important de noter que la fraction AG à longues chaînes ne comporte que des acides ayant de 24 à 27 carbones, ce qui paraît inhabituel. Un extrait du courant ionique *m/z* 113 est agrandi afin de permettre une bonne observation (**Tome 2, p. 77**).

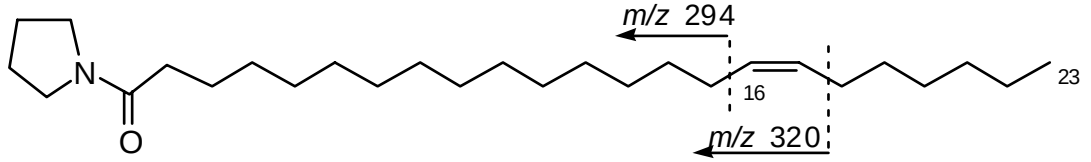
K-6.1. Acides gras saturés

Les seuls AG saturés présents en proportion importante sont des acides communs (myristique, palmitique, stéarique). L'acide isoprènique 4,8,12-triméthyldécanoïque est présent en faible quantité (0,9%).

K-6.2. Acides gras insaturés

Certains AG mono-insaturés classiques sont présents (palmitoléique, 9-16:1, oléique 9-18:1, vaccénique 11-18:1). Mais le mélange contient aussi des AG peu rencontrés chez les éponges. Ainsi, l'acide hexadéc-6-ènoïque, présent à l'état de traces, a été identifié dans une éponge des Caraïbes (Carballeira & Restituyo, 1991) et dans une éponge sénégalaise du genre *Cinachyrella* (Barnathan *et al*., 1994). Il est facile à caractériser à partir du spectre du NAP : ion M^+ à *m/z* 307 (16:1) et écart de 12 uma entre *m/z* 154 et 166 (discontinuité dans la série des fragments homologues séparés par 14 uma).

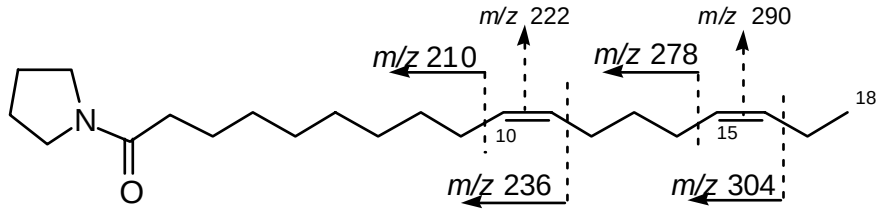
Des monoènes de série (n-7) paire ou impaire sont à signaler : 9-16:1, 12-19:1, 16-23:1 et 17-24:1. Le très rare tricos-16-ènoïque a été décrit pour la première fois au Laboratoire et n'a été mis en évidence que dans trois éponges (Barnathan *et al*., 1992 ; Carballeira *et al*., 1992 ; Barnathan *et al*., 1994). Le spectre du NAP montre un ion moléculaire **(Tome 2, p. 78**) à *m/z* 405 (23:1), et deux fragments homologues séparés par 12 uma (*m/z* 294 et 306) d'où on déduit la position de la double liaison entre C-13 et C-14.



Un autre AG rare à signaler est le 17-26:1 (3,3%). Tous les composés insaturés de cette partie sont identifiés par le spectre du NAP et avec des LCE compatibles avec les structures trouvées : ion M^+ et écarts de 12 uma pour le repérage de la double liaison.

- Identification du nouvel acide octadéca-10,15-dièn oïque (**Tome 2, p. 78**)

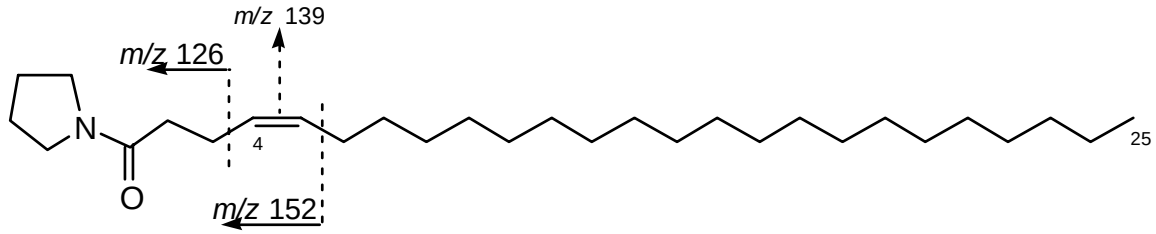
Il est présent à l'état de traces mais, là encore, le composé est seul, bien isolé, et son spectre est tout à fait interprétable. Le spectre de l'EMAG est typique de celui d'un EMAG di-insaturé avec des ions *m/z* 74 et 87 très diminués. L'ion moléculaire est à *m/z* 294 (18:2). La LCE de 17,61 est compatible avec ce type structural.



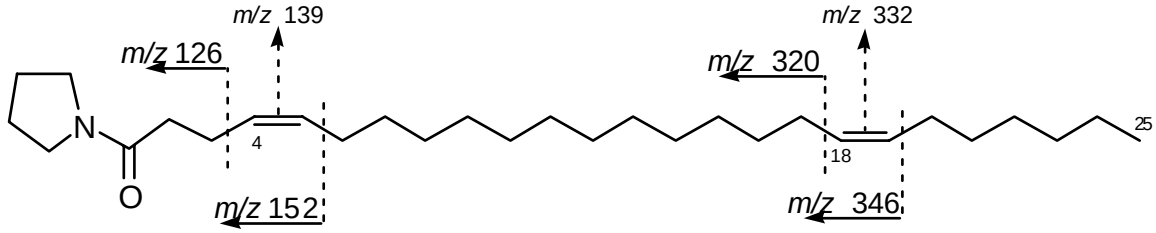
Le spectre du NAP montre nettement les emplacements des doubles liaisons entre C-10 et C-11 (Δ10), et entre C-15 et C-16 (Δ15) par les écarts existant respectivement entre les ions *m/z* 210 et 222, et *m/z* 278 et 290.

- Mise en évidence d'un mélange 4-25:1 et 4,18-25:2 (**Tome 2, p.79**)

Sortant peu après le 5,9-25 :2 normal, un pic chromatographique mérite qu'on s'y arrête. En effet, la présence dans ce mélange d'un acide très rare, le 4-25 :1 est attestée par un ion moléculaire intense à *m/z* 433 (25:1) et par la séquence des ions 113/ 126 / 139 / 152 (intense) /166 …Cette configuration a été anciennement décrite par le travail pionnier de Andersson (1978). On en déduit la présence d'une double liaison entre C-4 et C-5.



D'autre part, un autre écart de 12 uma entre *m/z* 320 et 332 signale une seconde double liaison entre C-18 et C-19. Mais l'ion moléculaire *m/z* 431 est très faible.



Une telle situation a été déjà rencontrée avec les AG de *Stylissa carteri* (**Tome 2, p. 32**).

- Les acides démospongiques Δ5,9

Il y a trois AG diènes : le 5,9-16:2 mineur déjà observé chez *Geodia* sp.et discuté à cette occasion (ce travail), le 5,9-25:2 (7%) et le majeur 5,9-26:2 à un taux exceptionnel (56,3%), déjà décrit dans cette thèse. Il n'y a pas d'AGPI classiques et n'est présent chez *Axinyssa djiferi* que le triène 5,9,19-26:3 (**Tome 2, p. 80**).

- Identification de l'acide 5,9,19-26:3.

C'est un isomère rare, confiné aux éponges, du nouvel acide 5,9,12-26:3 que nous avons déjà décrit. Les deux valeurs habituelles pour l'analyse (LCE 25,04 et ion moléculaire à *m/z* 443 soit structure 26:3) mettent en évidence un acide démospongique Δ5,9,x. La position de la double liaison terminale est déduite de l'écart de 12 uma entre les ions *m/z* 332 et 344 soit Δ19.

Cet AG démospongique est connu depuis les travaux pionniers de Litchfield (Litchfield *et al*., 1976). Il a été utilisé comme modèle d'étude de la biosynthèse de ce type d'AG (Morales &

Litchfield, 1977). Par marquage isotopique, le groupe de Djerassi a montré qu'il y avait allongement en série (n-7) à partir d'un précurseur exogène court jusqu'au 19-26:1 (rapporté dans le présent travail) suivi des désaturations en 5 et 9 (Hahn *et al.*, 1989 ; Djerassi et Lam, 1991).

K-7. *Trikentrion laeve*

L'analyse des AG des phospholipides de *Trikentrion laeve* (ex-*T. loeve*) a déjà été publiée par le Laboratoire (Barnathan & Kornprobst, 1992 ; Barnathan *et al*., 1995) et il était intéressant de reprendre cette étude quelques années plus tard pour plusieurs raisons. Il s'agissait de retrouver certains AG rares ou nouveaux identifiés, de mettre en évidence d'éventuels caractères constants de la composition en AG, et surtout de découvrir de nouveaux AG intermédiaires dans les voies de biosynthèse.

En effet, cette analyse avait conduit à des résultats intéressants en terme de biosynthèse des acides démospongiques Δ5,9 sur deux plans. D'une part, la découverte d'intermédiaires de biosynthèse d'acides démospongiques postulés dés le début des années 1980 mais jamais observés à l'état naturel – acides 23-30:1 et 9,23-30:2 – permet d'illustrer une voie de bio-synthèse conduisant aux acides 5,9,x, démontrée jusqu'au 5,9,19-26:3 par marquage isoto-pique de précurseur court (Djerassi & Lam, 1991) procédant par allongement en série (n-7).

D'autre part, un nouvel AG avait été identifié (5,9,25-30:3) montrant l'existence d'une autre voie de biosynthèse passant par un allongement en série monoènoïque (n-5). Cette voie était déjà illustrée par les AG 5,9,21-26:3 et 5,9,23-28:3 mais les intermédiaires restaient inconnus au début de la présente étude.

Dans cette éponge et au cours de la présente investigation, la contribution des bactéries pour les AG reste modérée comme le montrent des teneurs cumulées très faibles en acides saturés ramifiés qui se réduisent au couple *iso*/*anteiso* 15:0 et *anteiso*-17:0, avec une total inférieur à 5% (Tableau 39). Le chromatogramme des dérivés NAP peut être consulté Tome II (**Tome 2, p. 81**).

Tableau 39. Composition en acides gras des phospholipides de *Trikentrion laeve*.

Acides	Structures	LCE	% Massiques
Dodécanoïque	12:0	12,00	3,1
Tétradécanoïque	14:0	14,00	5,9
4,8,12-Triméthyltridécanoïque	4,8,12-Me_3-13:0	14,49	2,7
13-Méthyltétradécanoïque	*i*-15:0	14,63	1,3
12-Méthyltétradécanoïque	*ai*-15:0	14,72	0,9
Pentadécanoïque	15:0	15,00[1]	1,7
Hexadéc-5-ènoïque	5-16:1	15,63[1]	2,1
Hexadécanoïque ramifié	br-16:0	15,67	0,6
Hexadécènoïque	9-16:1	15,78	1,4
Hexadécanoïque	16:0	16,00	27,8
Heptadéc-6-ènoïque	6-17:1	16,46[1]	0,7
Heptadécadiènoïque	17:2	16,66	1,0
14-Méthylhexadécanoïque	*ai*-17:0	16,75	2,0
Heptadécanoïque	17:0	17,00	1,7
Octadécanoïque ramifié	br-18:0	17,28[1]	1,0
Octadéca-8,13-diènoïque*	8,13-18:2	17,56[1]	1,1
Octadéc-8-ènoïque	8-18:1	17,67[1]	13,6
Octadéc-10-ènoïque	10-18:1	17,70	5,3
Octadécanoïque	18:0	18,00	20,6

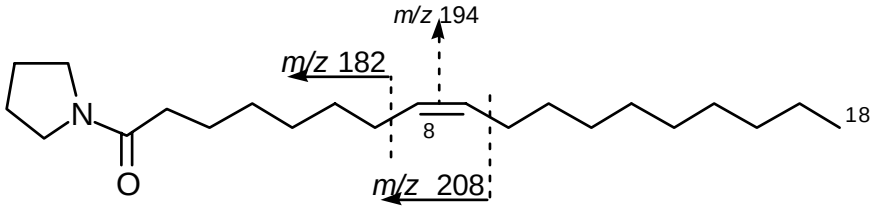
Nonadécanoïque ramifié	br-19:0	18,61	0,2
Nonadécanoïque	19:0	19,00	0,7
Eicosanoïque	20:0	20,00	2,2
Octacosa-5,9-diènoïque	5,9-28:2	27,30	tr.
Triconta-5,9,23-triènoïque	5,9,23-30:3	28,93	1,9
Total AGS			72,4
Total AGI			27,1
Total AG Δ5,9			1,9
Total AG à longues chaînes (≥ 24 C)			1,9

[1]Valeurs obtenues à partir des dérivés NAP. Acides détectés à l'état de traces (% < 0,1) : 21:0 ; 24:0.

La composition en acides gras des phospholipides se caractérise par une abondance d'acides gras saturés linéaires, les pourcentages cumulés des acides 12:0, 14:0, 16:0, 18:0 et 20: 0 sont très proches de 60%, par la présence du 4,8,12-Me_3-13:0 qui implique la présence, dans les tissus de l'éponge, d'organismes photosynthétiques, et surtout par une exceptionnelle pauvreté en acides à longues chaînes qui se résument à des traces de l'acide 5,9-28:2 et à moins de 2% de l'acide 5,9,23-30:3. La composition observée pour les acides Δ5,9 à longues chaînes diffère très fortement avec la saison de la récolte. Dans une première publication, les teneurs cumulées en Δ5,9 à longues chaînes atteignaient 22,6% pour un mélange de 14 acides, avec 14,8% de 5,9,23-30:3 pour des échantillons récoltés au mois de février 1990 (Barnathan *et al*., 1996). Le mois de février est la période la plus froide et la température de l'océan au large de Dakar et à 40 mètres de profondeur ne dépasse pas 14°C. Pour les analyses présentées ci-dessus (total Δ5,9 = 1,9%, et pour un mélange de 2 AG) les spécimens d'éponges ont été récoltés au mois de septembre 1996 qui est le mois où la température de l'océan est la plus élevée de l'année et est de l'ordre de 25°C, même à 40 mètres de profondeur. Ceci indiquerait que le métabolisme de *Trikentrion laeve* est particulièrement sensible à la température.

- Identification du rare 8-18:1 (Tome 2, p. 82)

L'EMAG a un spectre AG mono-insaturé et la structure 18 :1 est confirmée par le spectre du NAP : M = 335, espacement de 12 uma entre 182 et 194 donc double liaison Δ8.

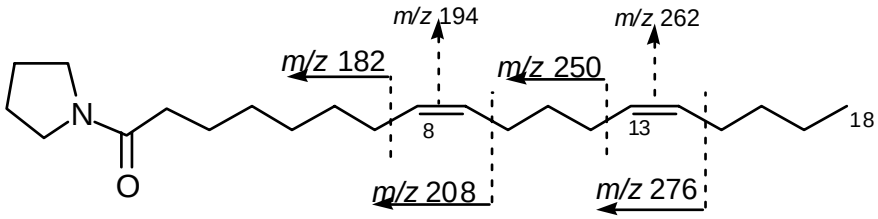


- Identification du rare 10-18:1

Sortant peu après le précédent AG, un autre isomère rare est identifié. Le spectre de l'EMAG est celui d'un mono-insaturé avec les ions *m/z* 74 et 87 non majeurs et l'ion moléculaire à *m/z* 296 (18:1). Le spectre du NAP confirme la structure 18 :1 avec M^+ à *m/z* 335 et un écart net de 12 uma entre les pics *m/z* 210 et 222 : donc double liaison entre C-10 et C-11.

- Identification de l'acide rare 8,13-18 :2 (nouveau chez les éponges) (Tome 2, p. 82)

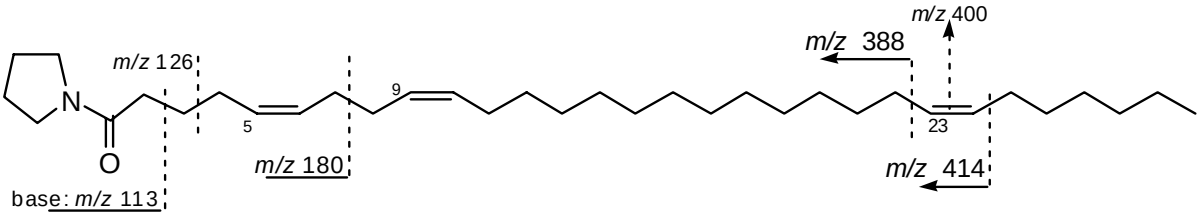
Cet acide est identifié par l'interprétation de son spectre de masse (NAP) : ion moléculaire à *m/z* 333 (18:2), deux écarts de 12 uma entre *m/z* 182 et 194 (Δ8), et *m/z* 250 et 262 (Δ13).



L'acide rare octadéca-8,13-dièноïque a été identifié dans l'éponge *Desmapsamma anchorata* à l'occasion d'une nouvelle investigation (Carballeira & Shalabi, 1994), et dans des sédiments côtiers (Sun *et al*., 1999) et il est peut-être d'origine phytoplanctonique.

- Identification de l'acide 5,9,23-30:3 (Tome 2, p. 83 et 84)

Un acide démospongique (NAP) est détecté avec un spectre de masse caractéristique montrant l'ion moléculaire à *m/z* 499 (30:3) et l'ion intense *m/z* 180 caractéristique des AG Δ5,9 (Tome 2, p. 83). Une différence de 12 uma entre les fragments *m/z* 388 et 400 permet de conclure pour la 3ème double liaison qui est Δ23. Il s'agit encore d'un AG provenant d'allongements progressifs dans la série (n-7). L'EMAG (LCE=28,93) a un spectre typique des AG démospongiques (Tome 2, p. 84) avec le pic de base *m/z* 81 et l'ion moléculaire à *m/z* 460 (30:3). Il est intéressant de retrouver dans une nouvelle collecte de *T. laeve* à des années d'intervalle.



Le 5,9,23-30:3 était prédominant dans les phospholipides de *Amphimedon viridis* (Carballeira & Shalabi, 1994). Il a été identifié dans une précédente recherche au Laboratoire sur *T.laeve* et trouvé à 14%, et dans les éponges *Cinachyrella* (Barnathan *et al*., 1992 ; Barnathan & Kornprobst, 1992 ; Barnathan, 1993 ; Barnathan *et al*., 1996).

Les résultats obtenus dans cette analyse s'avèrent décevants au regard des objectifs. Les intermédiaires biosynthétiques recherchés n'ont pas été trouvés. Cependant, la mise en évidence de composés rares à insaturation Δ8 est intéressante.

Avec l'analyse répétée des AG de *T. laeve*, le présent travail a confirmé que la composition est susceptible de variations importantes en fonction du site de récolte, de la profondeur, de la période de récolte et des facteurs environnementaux. Cela montre bien aussi qu'il peut être intéressant de reprendre l'étude de composition en AG.

K-8. *Aaptos papillata*

La composition en AG des phospholipides apparaît exceptionnelle dans la mesure où :

- elle se réduit à quelques AG à longue chaîne, dont un à près de 50% du mélange
- la zone médiane habituelle apparaît pratiquement vide
- les AG à chaîne courte sont présents à faible proportion y compris les AG usuels ubiquistes, myristique, palmitique et stéarique.

Le chromatogramme issu du courant ionique total des EMAG est donné dans le Tome 2 (Tome 2, p. 85 et 86). C'est le choix qui a été fait compte tenu du fait que le courant ionique des NAP n'a pas pris en compte de nombreux AG à faible %. Dans ces conditions, un certain nombre de pics chromatographiques ne correspondent pas à des EMAG. La composition en acides gras des phospholipides est donnée dans le tableau 40.

Tableau 40. Composition en acides gras des phospholipides *Aaptos papillata*

Noms	Structures	LCE*	% massiques
4,8,12-Triméthyltridécanoïque	4,8,12-Me_3-13:0	14,50	1,0

Hexadécanoïque	16:0	16,00	0,4
Octadéc-11-ènoïque	11-18:1	17,73	0,5
Octadécanoïque	18:0	18,00	0,6
Méthyleicosanoïque	br-20:0	20,41	0,3
Tricosanoïque	23:0	23,00	0,2
Tétracosènoïque	24:1	23,78	0,2
Tétracosanoïque	24:0	24,00	0,3
Pentacosa-5,9-dièNoïque	5,9-25:2	24,48	1,3
Pentacosènoïque	25:1	24,52	0,7
Pentacosanoïque	25:0	25,00	0,8
Hexacosa-5,9,x-triènoïque	5,9,x-26:3	25,15	0,7
Hexacosa-5,9,y-triènoïque	5,9,y-26:3	25,26	0,8
Hexacosa-5,9-dièNoïque	5,9-26:2	25,47	28,2
Hexacosa-4,17-dièNoïque**	4,17-26:2	25,65	1,8
Hexacos-17-ènoïque	17-26:1	25,67	13,1
Heptacosa-5,9-dièNoïque	5,9-27:2	25,46	3,2
Heptacos-5-ènoïque	5-27:1	25,83	1,7
Octacosa-5,9,19-triènoïque	5,9,19-28:3	27,17	43,2
Octacosa-5,9-dièNoïque	5,9-28:2	27,44	1,1
Nonacosa-5,9,z-triènoïque	5,9,z-29:3	28,20	0,5
Triaconta-5,9,t-triènoïque	5,9,t-30:3	29,20	2,6

* Détermination des LCE avec les EMAG. La détermination des positions des doubles liaisons n'a été possible que dans quelques cas où un spectre de NAP a été enregistré et exploitable.

** AG nouveau ; autres AG mineurs identifiés (< 0,2%). 12:0 ; 14:0 ; 20:1 ; 20:0

Le tableau 40 montre une composition exceptionnelle et tout à fait inhabituelle en acides gras dans laquelle 3 acides totalisent près de 85% (84,8) des acides totaux et les pourcentages cumulés en acides Δ5,9 dépassent 80% (81,6).

Près de 10 AG démospogiques Δ5,9 sont présents dans le mélange. L'acide 5,9,19-28:3 n'avait jamais été observé à près de 50% du mélange. Il se trouvait par exemple à 13% dans *Xestospongia halichondroides* (Litchfield et Marcantonio, 1978), dans *Suberites massa* à 11% (Barnathan *et al*., 1993), dans *Xestospongia muta* à 7% (Carballeira et Maldonado, 1988) et dans *Trikentrion loeve* et *Pseudaxinella* cf. *lunaecharta* à moins de 1% (Barnathan *et al*., 1995). biosynthèse de cet acide démospongique procède probablement par allongements successifs en série monoènoïque (n-9) à partir d'un précurseur exogène tel que l'acide oléique 9-18:1 et jusqu'à l'hypothétique 19-28:1. Il s'ensuit alors des insaturations en 5 et 9. Cela donne un intérêt évident à l'intermédiaire 17-26:1 présent à 13% dans ce mélange d'AG des phospholipides. Il est alors permis de supposer que certains AG 5,9,x de ces phospholipides s'inscrivent dans cette voie de biosynthèse.

Il est d'autre part possible d'avancer que le nouvel AG 4,17-26:2 est biosynthétisé par une dernière étape de désaturation, également à partir de l'acide 17-26:1. C'est là un nouveau type de désaturase chez les éponges. Il sera intéressant d'analyser de nouveau les AG de cette éponge pour vérifier si une composition aussi originale est conservée, pour être en mesure d'identifier d'autres AG s'inscrivant dans ces voies de biosynthèse. L'analyse devra se faire avec soin pour bien observer l'insaturation Δ4.

L - Etude de la composition en stérols

L-1. Isolement, purification, et analyse par couplage CPG/SM. La quasi-totalité du mélange des stérols libres est obtenue à partir des fractions dichlorométhane médianes et ils sont souvent concentrés sur quelques fractions seulement. Les stérols sont contrôlés par CCM et qui permettent de distinguer les stérols conventionnels de ceux qui ne les sont pas (Figure 15). Il est ainsi possible

de distinguer les stérols conventionnels Δ5 dont le Rf est de 0,46 des *nor*-A-stérols dont le Rf est de 0,51. La séparation et la purification des deux groupes de stérols se fait par grattage de la plaque CCM, lavage au méthanol anhydre et recristallisation dans le méthanol.

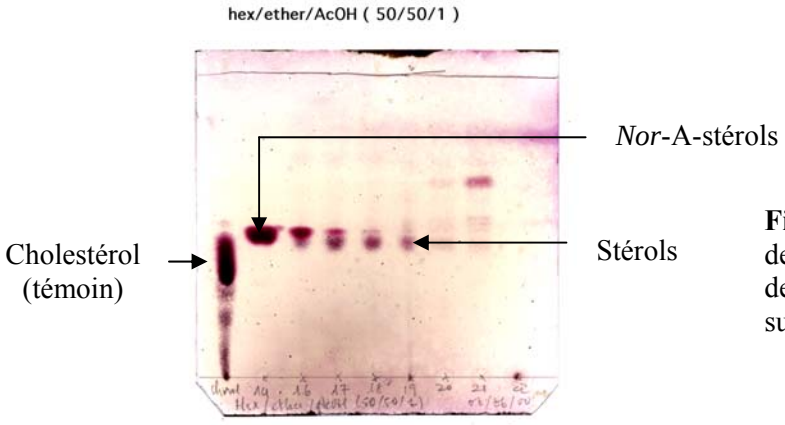


Figure 15. Analyse par CCM des fractions dichlorométhane de *Stylissa carteri* (vanilline sulfurique 1%).

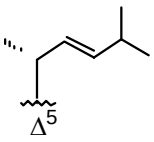
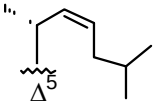
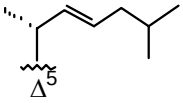
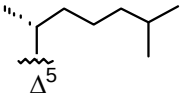
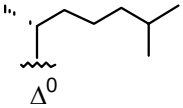
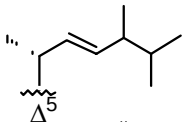
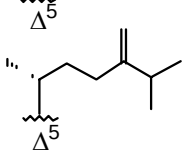
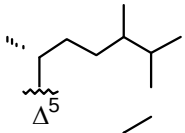
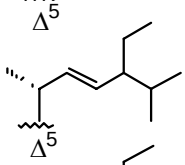
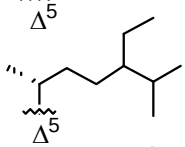
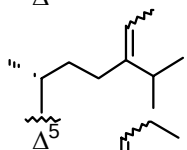
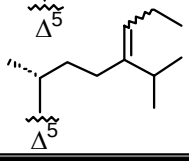
La seule injection du mélange des stérols libres ne donne pas assez d'informations spectrométriques pour permettre d'attribuer une structure à chaque spectre. Par ailleurs le courant ionique total des acétates est souvent plus facilement interprétable que celui des stérols libres car la résolution en CPG est en général moins bonne pour les stérols libres que pour les acétates. L'analyse conjointe des stérols libres et des acétates de stérols permet d'obtenir des fragments diagnostiques précieux, en partie identiques et en partie différents qui permettent des recoupements utiles pour l'interprétation Les conditions expérimentales du couplage CPG/SM se trouvent dans la partie expérimentale.

L-2. *Myrmekioderma dendyi*.

L-2.1. Identification des stérols

L'allure du courant ionique total des acétates de stérols (Tome 2, p.91) montre 13 stérols dont 12 ont été identifiés (Tableau 41).

Tableau 41. Composition en stérols de *Myrmekioderma dendyi*

Stérols conventionnels					
N°	**Nom**	**Structure de la chaînes latérales (R)**	**M**	**T_{RR}***	**Composition (%)**
M1	24ξ-*nor*-cholesta-5,22-dièn-3β-ol	 Δ^5	370	0,90	0,3
M2	22*Z*-Déhydrocholestérol	 Δ^5	384	0,97	2,3
M3	22-Déhydrocholestérol	 Δ^5	384	0,98	1,5
M4	Cholestérol	 Δ^5	386	1,00	9,1
M5	Cholestanol	 Δ^0	388	1,01	tr.
M6	Stérol non identifié	Δ^5(C27:2)	384	1,02	4,1
M7	Crinostérol ou Brassicastérol	 Δ^5	398	1,03	14,7
M8	Ostreastérol	 Δ^5	398	1,05	2,7
M9	Campestérol ou 22-Dihydrobrassicastérol	 Δ^5	400	1,06	6,7
M10	Stigmastérol ou Poriférastérol	 Δ^5	412	1,07	6,4
M11	Sitostérol ou Clionastérol	 Δ^5	414	1,11	tr.
M12	Fucostérol ou isofucostérol.	 Δ^5	412	1,12	48,4
M13	29-Méthylfucostérol ou 29-Méthylisofucostérol	 Δ^5	426	1,15	2,1

- Stérol M1 (**Tome 2, p. 92**)

Nous n'avons pas pu obtenir le spectre de masse du stérol libre de ce composé car il est en petite quantité (0,3 %) et que la résolution du courant ionique total n'est pas bonne. Ce stérol a été identifié par le spectre de son acétate qui montre les ions-fragments *m/z* 352 ($[M\text{-}AcOH]^+$, pic de base), qui correspond à une structure C-26:2, *m/z* 255 ($[M\text{-}AcOH\text{-}C.L.]^+$, intense) et *m/z* 213 ($[M\text{-}AcOH\text{-}C.L.\text{-}cycleD]^+$). Ces ions-fragments, caractéristiques d'un stérol C_{26} $\Delta^{5,22}$ se ressemblent à ceux que Goad et Akihisa l'a décrit, en 1997, ensuite confirmé par Santalova, , en 2004. Etant donnée que le composé 1sorte en premier (T_{RR} = 0,90), avant les stérols C27, sur une colonne capillaire apolaire (Goad & Akihisa, 1997, p.122 ; Santalova *et al*., 2004). Nous l'avons donc attribué au **24ξ-*nor*-cholesta-5,22-dièn-3β-ol** (Viracaoundin, 2001).

- Stérols M2 et M3 **(Tome 2, p. 93)**

Les deux spectres de masse des acétates des composés M2 et M3 sont identiques à l'exception de l'ion-fragment *m/z* 69 plus intense que l'ion *m/z* 81 pour le composé M2 et inversement pour le composé M3. Les deux spectres présentent un ion-fragment *m/z* 366 $[M\text{-}AcOH]^+$ comme pic de base (structure C27:2), associé à trois autres ions-fragments *m/z* 324 (faible intensité), qui est caractéristique d'un groupe isopropyle au bout de chaîne (Gauvin, 1998), *m/z* 255 (intense), et *m/z* 213 qui indique une double liaison dans le système tetracyclique. Ces observations nous permettent de conclure aux deux isomères 22(*Z*) et 22(*E*) d'un stérols C_{27} $\Delta^{5,22}$. Les valeurs du T_{RR} des stérols M2 (0,97) et M3 (0,98) confirment, cette hypothèse de la présence du **(22*Z*)-déhydrocholestérol** et du **(22*E*)-déhydrocholestérol**.

- Stérol M4 (**Tome 2, p. 94**)

Ce stérol a été identifié à partir du spectre de masse du stérol libre qui montre un pic de base *m/z* 386 (C27:1) et l'ion-fragment *m/z* 213 qui indique que l'unique insaturation est une double liaison dans le sysytème tétracyclique. Le spectre de masse de l'acétate confirme que cette double liaison est en position 5 (Δ^5) du noyau tétracyclique par la présence des ions-fragments *m/z* 368 ($[M\text{-}AcOH]^+$ (pic de base), *m/z* 255 et *m/z* 213. Ce spectre n'est autre que celui du c**holestérol**.

- Stérol M5 (**Tome 2, p. 95**)

Le spectre de masse du stérol M5 sous forme libre montre un ion moléculaire *m/z* 388 intense qui signifie qu'il s'agit d'un stanol en C_{27}. Le pic de base est l'ion *m/z* 233 alors que celui de l'acétate est l'ion-fragment *m*/z 215. La présence de l'ion *m/z* 275 ($[M\text{-}C.L.\text{-}cycleD]^+$) dans les deux spectres confirme que ce stérol est le **cholestanol.**

- Stérol M6 (**Tome 2, p. 96**)

Le spectre de l'acétate montre les ions-fragments à *m/z* 366 $[M\text{-}AcOH]^+$ (pic de base) qui indique la présence de deux insaturations, et *m/z* 324 $[M\text{-}AcOH\text{-}C_3H_7 + H]^+$ qui indique qu'il y a un groupements d'isopropyle sur la chaîne latérale. De plus, la présence des ions *m/z* 313 (faible intensité) et *m/z* 253 $[M\text{-}AcOH\text{-}C.L.]^+$, associés à la valeur 1,02 de son T_{RR} suggèrent de proposer que ce stérol est le cholesta-5,8-dièn-3β-ol identifié par Viracaoundin en 2001 dans une Ascidie de la Réunion (*Eudistoma bituminis*). Mais, la présence de l'ion-fragment *m/z* 213 (intensité moyenne) au lieu du fragment *m/z* 211 caractéristique des système Δ5,8 ne nous permet pas d'affirmer qu'il s'agit bien de ce stérol.

- Stérol M7 (**Tome 2, p. 97**)

Le spectre de masse du stérol libre présente un ion moléculaire intense *m/z* 398 qui correspond à la structure C28:. La présence des ions-fragments *m/z* 300, *m/z* 271et *m/z* 255 indique que l'une de deux insaturation est une double liaison en position 22 sur la chaîne latérale. Cette hypothèse est confirmée par l'existence d'ion-fragment *m/z* 213 dans le spectre du stérol libre qui signifie que le noyau stérolique ne possède qu'une double liaison. Le spectre de masse du stérol M7

acétylé présente l'ion *m/z* 380 ([M-AcOH]$^+$) comme pic de base d'un stérol $\Delta^{5,22}$ à C28, confirmant notre interprétation du spectre du stérol libre. Les autres ions-fragments à *m/z* 296, *m/z* 282, *m/z* 255 et *m/z* 213, typiques de cette structure. Le stérol M7 correspond au **crinostérol** ou au **brassicastérol**.

- Stérol M8 (**Tome 2, p. 98**)

Le spectre de l'acétate pésente un ion *m/z* 380 intense, qui correspond à une structure C28:2 avec une double liaison est en position 5. Le pic de base est l'ion *m/z* 296 qui correspond à un coupure de liaison C_{22}-C_{23} par le réarrangement de McLafferty (Figure 16), de la chaîne latérale, dû à la présence de la double liaison en position 24(28) (Goad & Akihisa, 1997, p.172). En outre, ce spectre présente des ions-fragments typiques à *m/z* 253 et *m/z* 213, caractéristique du 24-méthylène cholestérol.

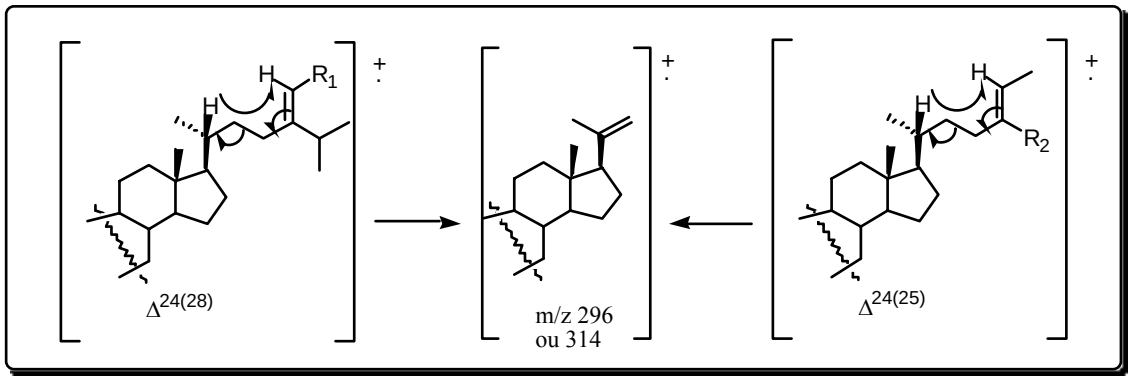


Figure 16. Coupure C_{22} /C_{23} selon Mac Lafferty (Goad & Akihissa, 1997 ; Djerassi, 1978)

- Stérol M9 (**Tome 2, p. 99**)

Le spectre de masse de la forme libre présente un ion moléculaire *m/z* 400 intense correspondant à la structure C28:1. Le spectre de l'acétate permet de conclure qu'il s'agit du **campestérol** ou du **22-dihydrobrassicastérol** par la présence des ions-fragments typiques de ces stérols : *m/z* 382 ([M-AcOH]$^+$, pic de base), *m/z* 365, *m/z* 261, *m/z* 255 et *m/z* 213 (Santalova *et al.*, 2004).

- Stérols M10 et M11(**Tome 2, p. 100, 101**)

Les spectres de masse des stérols libres présentent des ions moléculaires à *m/z* 412 et *m/z* 414 qui correspondent à des structures C29:2 et C29:1. Le spectre de masse du stérol M10 acétylé (**Tome 2, p. 100**) montre des ions-fragments, *m/z* 394 ([M-AcOH]$^+$, pic de base), *m/z* 379 et *m/z* 351([M-AcOH-43]$^+$) qui indiquent que la double liaison en position 22 favorise la coupure de la liaison C_{24}-C_{25} et celle de C_{21}-C_{22} pour obtenir l'ion caractéristique *m/z* 282 du stérol $\Delta^{5,22}$. Par contre, le spectre de masse du composé 11 acétylé (**Tome2, p. 101**) présente un pic de base *m/z* 396 ([M-AcOH]$^+$) et un ion-fragment *m/z* 213 qui indiquent que l'unique double liaison se trouve en position 5. Nous pouvons donc conclure que le stérol M10 correspond au **stigmastérol** ou au **poriférastérol** et que le stérol M11 est du **sitostérol** ou du **clionastérol**.

- Stérols M12 et M13 (**Tome 2, p. 102**)

Le spectre de l'acétate du stérol M12 montre un ion-fragment à *m/z* 394 ([M-AcOH]$^+$) qui indique que une structure C29:2. La présence des ions-fragments à *m/z* 296 (pic de base), *m/z* 281, *m/z* 253 et *m/z* 213, typiques de stérols $\Delta^{5,24(28)}$, associée à la valeur 1,12 du T_{RR} indiquent qu'il s'agit du **fucostérol** ou de l'**isofucostérol**.

Les ions-fragments du spectre de l'acétate du stérol M13 sont identiques à ceux du stérol M12 jusqu'à *m/z* 296 (pic de base). La présence supplémentaire de l'ion *m/z* 408 ([M-AcOH]$^+$) indique

une structure C30:2. L'ordre d'élution des deux stérols nous a permis de conclure que le stérol M13 est le **29-méthylfucostérol** ou le **29-méthylisofucostérol**.

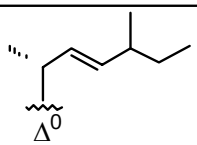
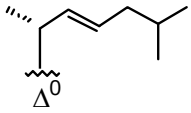
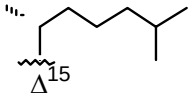
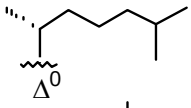
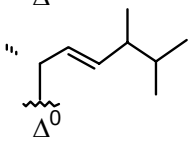
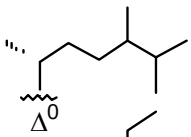
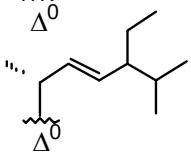
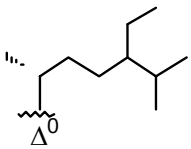
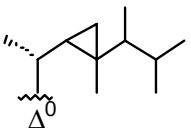
L-3. *Stylissa carteri*.

L-3.1. Les *nor*-A-stérols

Les *nor*-A-stérols sont des stérols rares qui n'ont guère été trouvés que dans quelques éponges (Planche 10, p. 31). Ces stérols sont moins polaires que les stérols conventionnels (Rf = 0,46 et 0,51 ; **Figure 15** p. 118) à cause de la réduction du cycle A du noyau tétracyclique de stérols. Les *nor*-A-stérols sont des alcools primaires tandis que les stérols conventionnels sont des alcools secondaires. Les spectres de masse des *nor*-A-stérols libres présentent l'ion-fragment caractéristique *m/z* $[M-31]^+$ qui correspond à la perte de CH_2OH provenant de l'alcool primaire, alors les stérols conventionnels (alcool secondaire) donnent un ion-fragment *m/z* $[M-33]^+$ correspondant à une perte de CH_3 et d'eau.

Le courant ionique total est présenté **Tome 2, p. 103** et la composition en *nor*-A stérols est donnée dans le Tableau 42.

Tableau 42. Composition de *nor*-A-stérols dans *Stylissa carteri*

Stérols					Composition (%)	
N°	Nom	Structure de la chaînes latérales (R)	M	T_{RR}	Djeddah	Djibouti
S1	*nor*-A-patinostérol		386	0.95	1,0	1,0
S2	3β-Hydroxyméthyl-*nor*-A-5α-cholest-22*E*-ène		386	0.96	3,1	7,4
S3	3β-hydroxyméthyl-*nor*-A-5α-cholest-15-ène		386	0.97	9,5	-
S4	3β-hydroxyméthyl-*nor*-A-5α–cholestane		388	1.00	22,1	31,4
S5	3β-hydroxyméthyl-24ξ-méthyl-*nor*-A-5α-cholest-22-ène		400	1.03	20,0	tr.
S6	3β-hydroxyméthyl-24ξ-méthyl-*nor*-A-5α-cholestane		402	1.08	14,0	23,4
S7	3β-hydroxyméthyl-24ξ-éthyl-*nor*-A-5α-cholest-22-ène		414	1.10	10,1	12,9
S8	**3**β-hydroxyméthyl-24ξ-éthyl-*nor*-A-5α-cholestane		416	1,17	13,1	23,9
S9	3β-hydroxy-méthyl-*nor*-A-5α –gorgostane		428	1,25	1,5	-

- Stérols S1 et S2 (**Tome 2 p. 104**)

Les SM des acétates des stérols S1 et S2 sont pratiquement identiques et se caractérisent par l'ion moléculaire *m/z* 428 (C27:1) et les ions-fragments *m/z* 368 ($[M-AcOH]^+$), *m/z* 354 ($[M-AcOCH_2-H]^+$), *m/z* 353 ($[M-AcOH-CH_3]^+$), et *m/z* 344 ($[M-$(coupure entre C_{20} et C_{22} +1H)$]^+$, *m/z* 315 ($[M-C.L.-2H]^+$), *m/z* 257 ($[M-CL-AcOH]^+$, pic de base), *m/z* 255 ($[M-CL-2H-AcOH]^+$), *m/z* 215 ($[M-CL-C_3H_7-AcOH+H]^+$). L'ion *m/z* 215 confirme que ces deux stérols ne possèdent qu'une double liaison dans la chaîne latérale (Δ^{22}). Le spectre de masse du *nor*-A-stanol libre présente des ions *m/z* 386 (C27:1), *m/z* 371($[M-CH_3]^+$), *m/z* 355 ($[M-CH_2OH]^+$) dont l'intensité est deux fois supérieure à celle de l'ion *m/z* 353 ($[M-CH_2OH-2H]^+$). L'ion *m/z* 355 est caractéristique des *nor*-A-stanols C27:1 dont l'intensité est reliée à l'appartenance à la série 3β (Bohlin *et al.*, 1982 ; De Nanteuil *et al*., 1985). Les stérols S1 et S2 ne se différencient que par leurs temps de rétention relatif (T_{RR}) par rapport au 3β-acétoxyméthyl-*nor*-A-cholestane, respectivement 0,95 et 0,96.

L'ensemble des ions-fragments des stérols S1 et S2 est analogue à celui qui est observé pour le ξ-acétoxyméthyl-24ξ-méthyl-*nor*-27-*nor*-A-5α-cholest-22*E*-ène (ou 3ξ-acétoxy-méthyl-*nor*-A-patinostérol) ou le 3ξ-acétoxyméthyl-*nor*-A-5α-cholest-22*E*-ène trouvés par par Bohlin en 1981, mais en faible quantité (1 % et 3,7 %) dans l'éponge *Teichaxinella morchella* récoltée sur la côte mexicaine (Atlantique). Ce stérol a été retrouvé un an après (à 3 %), dans l'éponge de la mer Rouge *Acanthella aurantiaca* (Bohlin, *et al*., 1981 & 1982). Les temps de rétention relatifs (T_{RR}) du 3β-acétoxyméthyl-24ξ-méthyl-*nor*-27-*nor*-A-5α-cholestane et du 3β-acétoxyméthyl-*nor*-A-5α-cholest-22*E*-ène sont respectivement de 0,89 et 0,92 (Bohlin *et al.,* 1981, 1982 ; Teshima *et al*., 1984b ; Santalova *et al*., 2004), alors que nous avons trouvé 0,95 et 0,96 (Tableau 42). Comme, en CPG/SM, Santalova a remarque que ce deux *nor*-A-stanols ne se différencient que par leurs T_{RR} (le T_{RR} du *nor*-A-patinostérol acétylé est inférieur à celui du 3β-acétoxyméthyl-*nor*-A-5α-cholest-22*E*-ène) et leurs pics caractéristiques (*m/z* 55 pour *nor*-A-patinostérol acétylé et *m/z* 95 pour 3β-acétoxyméthyl-*nor*-A-5α-cholest-22*E*-ène). Nous avons donc attribué au stérol S1 la structure du ***nor*-A-patinostérol** (**3β-hydroxyméthyl-24ξ-méthyl-*nor*-27-*nor*-A-5α-cholestane**) et au stérol S2 celle du **3β-hydroxyméthyl-*nor*-A-5α-cholest-22*E*-ène**.

- Stérol S3 (**Tome 2, p. 105**)

Le SM de ce stérol libre présente un ion moléculaire à *m/z* 386 qui correspond à la structure C27:1. Ce stérol (T_{RR}= 0,97) sort, en CPG, juste après les deux C27:1 précédemment décrits (S1 et S2). Les autres ions-fragments caractéristiques de ce stérol libre sont *m/z* 355 (deux fois l'intensité de *m/z* 353, qui correspond à la perte de CH_2OH, fragment typique des *nor*-A-stérols), *m/z* 273 ($[M- CL]^+$) , *m/z* 255, *m/z* 215 et *m/z* 206 (pic intense caractéristique du stérol Δ^{15}; voir Tableau 27, p. 66 (Malik & Djerassi, 1989). Ces ions-fragments montrent que ce stérol possède une double liaison en position 15 du *nor*-A-stérol (De Nanteuil *et al*., 1985). Le spectre de masse de l'acétate confirme que ce *nor*-A-stérol possède une double liaison Δ^{15} par la présence des ions-fragments caractéristiques à *m/z* 428 (M^+, C27:1), *m/z* 368 ($[M-AcOH]^+$), *m/z* 255 (pic de base de Δ^{15}, *m/z* 206 (pic caractéristique d'une insaturation en Δ^{15} , Figure 17). Il s'agit donc du **3β-hydroxyméthyl-*nor*-A-5α-cholest-15-ène**.

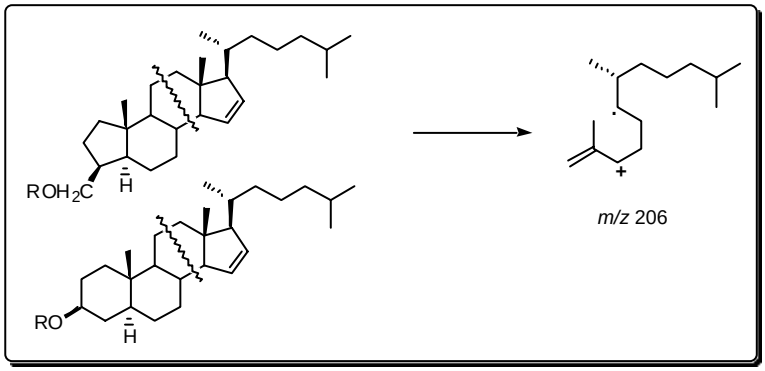


Figure 17. Clivage caractéristique de la Δ^{15} des noyaux stéroliques montrant la formation du fragment *m/z* 206 (Goad & Akihisa, 1997 ; R = H ou OAc).

Ce stérol a été trouvé par l'équipe de Djerassi en 1982 dans l'éponge *Acanthella aurantiaca*, à une teneur de 6 % des *nor*-A-stérols totaux. Il a ensuite été identifié sous forme acétate dans l'espèce du Pacifique *Acanthella cristagalli* (Teshima *et al*., 1984b). Deux autres équipes, De Nanteuil *et al*. et Aknin *et al*. l'ont trouvé respectivement dans deux éponges tropicales : *Pseudaxinyssa cantharella* (Pacifique sud, 1985) et *Axinella proliferans* (océan Indien, à 30km de la côte reunionnaise en 1996) avec une teneur de 4,4% des *nor*-A-stérols.

- Stérol S4 (**Tome 2, p. 106**)

Le spectre de masse de ce stérol présente un ion moléculaire *m/z* 388 qui correspond à la structure C27:0 (isomère du cholestanol). Les autres ions-fragments sont *m/z* 373($[M-CH_3]^+$, 41 %), *m/z* 357 ($[M-CH_2OH]^+$), dont l'intensité est deux fois celle de l'ion *m/z* 355 ($[M-CH_2OH-2H]^+$), *m/z* 233, *m/z* 217 (pic de base) et *m/z* 203 (au lieu de 201 pour le cholestanol). Ces ions sont typiques du 3β-hydroxyméthyl-*nor*-A-5α–cholestane (Bohlin *et al*., 1981 ; Teshima *et al*., 1984b ; De Nanteuil *et al.*, 1985). Après avoir co-injecté les *nor*-A-stérols et les stérols conventionnels, nous avons remarqué que le 3β-hydroxyméthyl-*nor*-A-5α–cholestane sort juste après le cholestanol sur une colonne capillaire apolaire. Contrairement aux stérols libres, le 3β-acetoxyméthyl-*nor*-A-5α–cholestane sort avant l'acétate de cholestanol (Goad & Akihisa, 1997). La plupart des auteurs considèrent que le 3β-hydroxyméthyl-*nor*-A-5α–cholestane ou son acétate servent de référence de temps de rétention pour les *nor*-A-stérols (T_{RR} = 1).

- Stérols S5 et S7 (**Tome 2 p. 107, 108**)

Ces stérols ont été identifiés sous forme libre et acétylée. Le spectre de masse du stérol S5 libre montre des ions-fragments à *m/z* 400 (ion moléculaire de C28:1), *m/z* 369 $[M-CH_2OH]^+$ dont l'intensité est deux fois celle de l'ion *m/z* 367 $[M-CH_2OH-2H]^+$, *m/z* 273 (pic de base), *m/z* 257, *m/z* 217 (son intensité est supérieure à celle de *m/z* 215) et *m/z* 69 (intensité supérieure à celle de l'ion *m/z* 273). Ces ions-fragments sont caractéristiques d'un *nor*-A-stérol C28 qui sont similaires à ceux du spectre décrit par De Nanteuil, 1985. Le spectre de masse de l'acétate montre un ion moléculaire *m/z* 442 (50 %) qui indique une structure C28:1, et des ions-fragments à *m/z* 382, *m/z* 368 ($[M-AcOCH_2-1H]^+$), *m/z* 367 ($[M-AcOH-CH_3]^+$), *m/z* 344 (50 %), *m/z* 339 ($[M-AcOH-C_3H_7]^+$), *m/z* 315 ($[M-C.L.-2H]^+$), *m/z* 257 (pic de base), *m/z* 215 (un ion qui montre que le noyau est saturé), *m/z* 69 et *m/z* 55. En CPG l'acétate sort juste après le *nor*-A-cholestanol ((T_{RR}= 1,03) et il est conforme aux données de la littérature. Le composé S5 est donc attribué au **3β-hydroxyméthyl-24ξ-méthyl-*nor*-A-5α-cholest-22-ène** (Teshima *et al.*, 1984b ; Santalova *et al.,* 2004).

En comparant les SM des stérols libres S2, S5 et S7, on constate que les trois spectres présentent les mêmes séries d'ions-fragments et ne diffèrent qu'à partir d'ion *m/z* 302 ([M-(coupure entre C_{20} et C_{22}+1H)]$^+$), de faible intensité. Même constat pour les spectres de leurs acétates où les ions-fragments ne diffèrent qu'à partir de l'ion *m/z* 344 ([M-(coupure entre C_{20} et C_{22} +1H)]$^+$)

(Tableau 43). Nous avons comparé aussi les spectres du stérol S7, libre et acétylé aux données de la littérature, ce qui nous a permis de conclure qu'il s'agit du **3β-hydroxyméthyl-24ξ-éthyl-*nor*-A-5α-cholest-22-ène** (**Tome 2, p. 108**).

Le tableau 43 résume les caractéristiques des ions-fragments pour les stérols $\Delta^{0,22}$, libres acétylés.

Tableau 43 . Principaux ions-fragments des *nor*-A-stérols $\Delta^{0,22}$ libres et acétylés.

Ions-fragments (70 ev)	Composé 2	Composé 5	Composé 7
nor-A-stérols libres			
M^+	386	400	414
$[M-CH_3]^+$	371	385	399
$[M-CH_2OH]^+$	355	369	383
$[M-CH_2OH-2H]^+$	353	367	381
$[M-C_3H_7]^+$		357	371
$[M-C_3H_7-H_2O]^+$		339	353
$[M-(\text{coupure } C_{20}-C_{22}+1H)]^+$	302	302	302
$[M-(\text{coupure } C_{20}-C_{22}+1H)-CH_3]^+$	287	287	287
$[M-C.L.-2H]^+$	**273**	**273**	**273**
$[M-C.L.-H_2O]^+$	257	257	257
$[M-C.L.-(\text{cycle D})]^+$	233	233	233
$[M-C.L.-(\text{cycle D})- H_2O+2H]^+$	217	217	217
nor-A-stérols acétylés			
M^+	428	442	456
$[M-CH_3]^+$	413	427	441
$[M-AcOH]^+$	368	382	396
$[M-AcOCH_2-1H]^+$	354	368	382
$[M-AcOH-CH_3]^+$	353	367	381
$[M-AcOH-C_3H_7]^+$		339	353
$[M-(\text{coupure } C_{20}-C_{22}+1H)]^+$	344	344	344
$[M-C.L.-2H]^+$	315	315	315
$[M-C.L.-C_3H_7+1H]^+$	**257**	**257**	**257**
$[M-AcOH-C.L.-C_3H_7+1H]^+$	215	215	215

- Stérols S6 et S8 (**Tome 2, p. 109, 110**)

Le SM du stérol S6 libre présente des ions-fragments à *m/z* 402 (ion moléculaire C28:0), *m/z* 387, *m/z* 371($[M-CH_2OH]^+$), plus intense que *m/z* 369 ($[M-CH_2OH-2H]^+$) lesquels prouvent que ce stérol C28 appartient à la série des 3β-hydroxyméthyl-*nor*-A-stérols (**Tome 2 p. 107**). Les autres ions sont à *m/z* 273, *m/z* 257, *m/z* 233 (intense) et *m/z* 217 (pic de base). La présence des ions-fragments du 3β-acétoxyméthyl-*nor*-A-stérol (stérol S6 acétylé, **Tome 2, p. 109**), tels que *m/z* 444 (ion moléculaire), *m/z* 402 (groupe isopropyle à l'extrémité de la chaîne latérale), *m/z* 384 (intense), *m/z* 370 ($[M-AcOCH_2-1H]^+$) (moins intense que *m/z* 369), et *m/z* 215 (pic de base), indiquent que ce *nor*-A-stérols est le **3β-hydroxyméthyl-24ξ-méthyl-*nor*-A-5α-cholestane** (Bohlin *et al.,* 1981 ; Santalova *et al.,* 2004).

Les spectres de masse du stérol S8 libre et acétylé (**Tome 2 p. 110**), ont une partie identique à ceux du stérol S6 (ion moléculaire *m/z* 416 qui correspond à la structure d'un stanol C29:0, ainsi que les ions-fragments *m/z* 385 qui correspond également à une perte de CH_2OH, caractéristique du *nor*-A-stérol, dont l'intensité est supérieure à celle de l'ion *m/z* 383 (Bohlin *et al.,* 1982). Dans la mesure où le spectre de masse de ce 3β-acétoxyméthyl-*nor*-A-stérol présente des ions-fragments à *m/z* 456, *m/z* 398 (très intense ; 98% pour Bohlin contre 100% pour Teshima), *m/z* 383, *m/z* 275,

m/z 257 et *m/z* 215 (à 100 % ; même valeur pour Bohlin contre 55% pour Teshima), nous pouvons donc l'attribuer au **3β-hydroxy-méthyl-24ξ-éthyl-*nor*-A-5α-cholestane** (Minale & Sodano, 1974 ; Bohlin *et al.,* 1981 ; Teshima *et al.,* 1984b ; Santalova *et al.,* 2004).

- Stérol S9 (**Tome 2, p. 111**)

Le spectre de masse du stérol libre présente un ion moléculaire *m/z* 428 correspondant à la structure C30:1. La présence des ions-fragments *m/z* 397 (faible intensité) et *m/z* 273 (pic de base) nous indiquent que ce stérol est un *nor*-A-stérol. D'autres ions, comme *m/z* 301, *m/z* 285, *m/z* 257, *m/z* 217 et *m/z* 215, montrent que l'insaturation se trouve dans la chaîne latérale (Hale *et al.*, 1970). La succession des coupures de la chaîne latérale, *m/z* 357 ($[M-71]^+$), *m/z* 316 ($[M-112]^+$), *m/z* 301 ($[M-127]^+$), *m/z* 275 ($[M-153]^+$), *m/z* 273 ($[M-153-2H]^+$), *m/z* 257 ($[M-153-H_2O]^+$) et *m/z* 215 ($[M-194-H-H_2O]^+$), nous a permis d'établir que la chaîne latérale correspond à celle du gorgostanol (Goad & Akihisa 1997, p.177). Nous avons écarté le hydroxyméthyl-3β-éthyl 24ξ-méthyl-26ξ nor-A-cholest-5α-ène-22(*E*), même s'il possède un pic de base *m/z* 273, car l'intensité du pic de l'ion *m/z* 316 est très faible par rapport au nôtre (80 %) (De Nanteuil *et al.,* 1985). En revanche, ce spectre correspond au **3β-hydroxy-méthyl-*nor*-A-5α–gorgostane** que Bohlin a trouvé en 1980 et 1982 dans les deux éponges, *Stylotella agminata* du Pacifique sud et *Acanthella aurantiaca* de la mer Rouge.

Le spectre de masse de la forme acétylée confirme la succession des coupures de la chaîne latérale du *nor*-A-gorgostanol en ions à *m/z* 399 ($[M-71]^+$), *m/z* 358 ($[M-112]^+$, intense), *m/z* 343 ($[M-127]^+$), *m/z* 317 ($[M-153]^+$), *m/z* 315 ($[M-153-2H]^+$(pic de base), *m/z* 299 ($[M-153-H_2O]^+$), et 257 ($[M-194-H-H_2O]^+$). L'ion *m/z* 367, de faible intensité, est caractéristique d'un groupement isopropyle en bout de chaîne, et l'ion *m/z* 215 justifie la présence d'un cycle dans la chaîne latérale (donc l'absence de la double liaison dans le noyau tétracyclique). Nous avons écarté l'hypothèse du 3β-hydroxyméthyl-24*E*-propylidène-*nor*-A-5α-cholestane, décrit par Teshima et son équipe en 1984b, car le spectre de masse de ce stérol acétylé de ce stérol présente l'ion *m/z* 358 comme pic de base (Figure 18). La présence de l'ion *m/z* 315, (absent chez Teshima) dans notre spectre, confirme cette hypothèse.

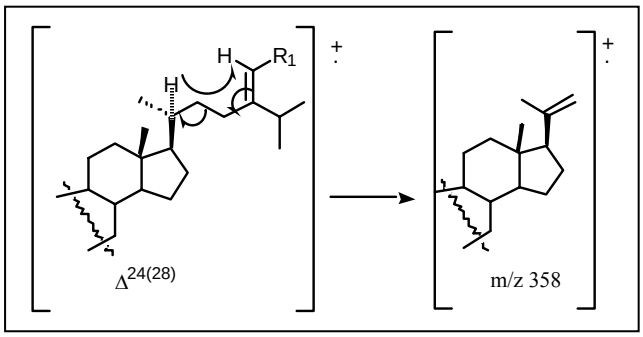


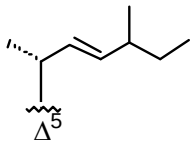
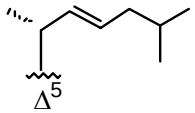
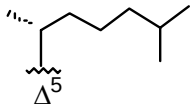
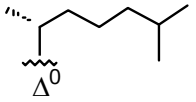
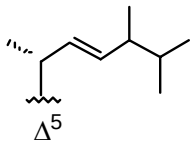
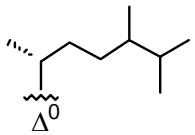
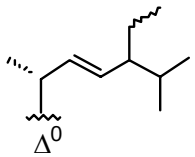
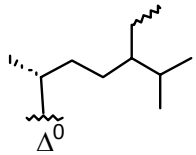
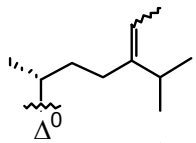
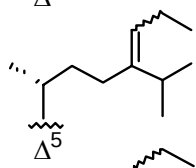
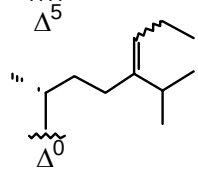
Figure 18. Formation de l'ion *m/z* 358 par coupure C_{22}/C_{23} , à partir de M^+.

L-3.2. Les stérols conventionnels

Le courant ionique de la fraction stérols conventionnels est présenté dans le **Tome 2, p. 112** et la composition en stérols conventionnels (Δ5) est présentée dans le tableau 44 pour l'espèce récoltée à Djeddah.

La présence de stérols conventionnels Δ5,22 (Occélastérol, 22-Déhydrocholestérol, Crinostérol/Brassicastérol) et de stérols Δ22 parmi les nor-A-stérol (Tableau 42) confirment la transformation biosynthétique des stérols conventionnels en nor-A-stérols (Planche 12, p. 32). Dans Stylissa carteri cette biosynthèse est à peu près complète car 78,4 % de la fraction stérols de cette éponge sont constitués de nor-A-stérols (soit 14,9 % des lipide totaux), contre 21,6 % pour les stérols conventionnels (4,1 % des lipide totaux).

Tableau 44 . Composition des stérols conventionnels dans *Stylissa carteri*

Stérols conventionnels				
Nom	**Structure de la chaînes latérales (R)**	**M**	**T_{RR}***	**Composition (%)**
Occélasrérol ou 27-Norergosta-5,22-dienol		384	0,98	2,1
22*E*-Déhydrocholestérol		384	0,99	5,8
Cholestérol		386	1,00	11,7
Cholestanol		388	1,00	8,7
Crinostérol ou Brassicastérol		398	1,02	10,7
Campestanol ou Ergostanol		402	1,03	12,9
Stigmast-22-ènol ou Poriférast-22-ènol		414	1,04	11,3
Stigmastanol ou Poriférastanol		416	1,06	15,6
24ξ-Ethylènecholestanol		414	1,08	6,2
29-Méthylfucostérol ou 29-Méthylisofucostérol		426	1,10	tr.
24ξ-Propylidènecholestanol		428	1,11	14,9

- <u>Mise en évidence d'Occélastérol ($\Delta^{0,22}$)</u> (**Tome 2, p. 113)**

La présence de l'ion-fragment *m/z* 366 (pic de base) dans le spectre de l'acétate permet de déduire qu'il y a une perte de l'acétate dûe à la présence d'une double liaison Δ^5, la structure correspondante est donc C27:2. La présence de l'ion *m/z* 282 qui correspond à la coupure de la liaison C_{20}-C_{22} semble situer la deuxième double liaison en position 22 de la chaîne latérale du stérol. Par contre, l'absence d'ion-fragment *m/z* 324 écarte l'hypothèse du 22*Z*-Déhydrocholestérol. Ces positions de la double liaison sont confirmées par les autres ions-fragments tels que *m/z* 213, *m/z* 255 et *m/z* 69 (pic très intense).

- Mise en évidence du 24ξ-Ethylènecholestanol **(Tome 2, p. 114**)

Les deux spectres de masse de ces stérols libres présentent un ion moléculaire m/z 400 pour la structure C28:1(traces) et m/z 414 pour la structure C29:1(**Tome 2, p. S12**). Des ions-fragments comme m/z 316, pic de base (contre m/z 314, pour le fucostérol ou l'isofucostérol), et m/z 273, intense, présents dans les deux spectres, nous ont permis d'envisager une double liaison en position 24(28) dans chacune des structure (Brooks et al., 1972). La présence d'ions moléculaire, m/z 442, pour l'un, et m/z 456, pour l'autres, dans le spectre de masse de l'acétate de ce stérol, et des ions-fragments m/z 358 (pic de base pour C29:1, intense pour C28:1), m/z 255 (pic de base pour C28:1) et m/z 215, confirment notre hypothèse (Santalova et al., 2004). Le même hypothèse sur un stérol C30:1, nous a permis de mettre en évidence le 24ξ-Propylidènecholestanol.

L-4. *Cinachyrella alloclada* et *C. kükenthali*

La composition en stérols pour ces deux espèces récoltées sur le même site sont présentées dans le Tableau 45.

Tableau 45. Composition en stérols de *Cinachyrella alloclada* et *C. kükenthali* (Barnathan *et al.,* 2003)

Stérols	Double liaison	M	Pourcentage (%)	
			C. alloclada	*C. kükenthali*
22(*Z*)-Dehydrocholestérol	5,22	384	2,3	1,4
22(*E*)-Dehydrocholestérol	5,22	384	5,3	4,8
22-Dehydrocholestanol	0	386	-	1,2
Cholestérol	5	386	14,5	11,3
Cholestanol	0	388	3,1	5,4
Brassicasterol	5,22	398	24,3	18,8
24-Méthylènecholestérol	5, 24(28)	398	0,3	0,4
Campestérol ou Dihydrobrassicastérol	5	400	11,0	14,2
Campestèn-7-ol	7	400	-	2,1
22-Déhydrocampéstanol	22	400	-	3,4
Campestanol	0	402	1,1	2,8
Poriférastérol	5,22	412	0,8	1,0
Clérostérol	5,25	412	11,8	10,7
Poriférastèn-7-ol	7	412	-	0,7
Stigmastèn-7-ol	7	412	-	1,0
Clionastérol	5	414	18,4	13,7
Sitostérol	5	414	0,7	0,9
22-Déhydrostigmastanol	22	414	1,6	2,0
Stigmastanol	0	416	4,2	3,6
29-Méthylfucostérol ou 29-Méthylisofucostérol	5, 24(28)	426	0,3	0,5
Gorgostérol	5,22:23-CH_2	426	0,3	0,1

Le Tableau 45 montre que les compositions des stérols de ces deux éponges de la mer Rouge apparaissent très similaires à l'exception des stérols Δ^7 que l'on ne trouve que dans *C. kükenthali* et les stérols Δ^{22} qui sont majoritairement présents dans *C. alloclada.*

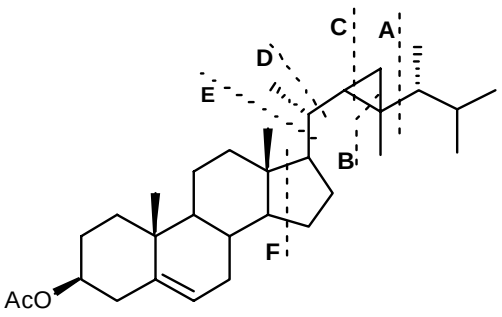
Les principaux stérols sont le brassicastérol, le cholestérol, le campestérol et le clionastérol, qui sont présents à des teneurs voisines de 10% pour chacune des espèces, mais les compositions relatives dépendent de la zone géographique des éponges selon qu'elles proviennent du Sénégal (Atlantique), de Nouvelle-Calédonie, ou de la mer Rouge. Deux éponges sénégalaises des mêmes espèces, et une autre *C.* aff. *Schulzei* de Nouvelle-Calédonie, ont respectivement 33,40 et 37 % de clionastérol (Barnathan *et al*., 1992) alors que le brassicastérol (19 et 24%) est majoritaire pour les deux espèces de la mer Rouge. Les compositions majeures des stérols de chaque éponge donnent donc des informations sur les nombres des insaturations des stérols selon le lieu de récolte (Barnathan *et al*., 2003).

Ces éponges de la mer Rouge contiennent de faibles pourcentages de stérols en C_{30}. L'un d'eux possède une structure (30:2) avec une double liaison en 5 et une autre insaturation dans la chaîne latérale. Le spectre du dérivé acétylé possède un pic de base *m/z* 296 et celui du stérol libre est à *m/z* 314, suggérant une double liaison en 24. Un autre fragment à *m/z* 408 (10%) correspond a une perte du groupe acétyle et nous permet de déduire qu'il s'agit du 29- méthyl-isofucostérol.

L'autre stérol C_{30}, à l'état de trace (0,1 et 0,3% respectivement), a de fragments typique de Δ^5, m/z 408 $[M\text{-}AcOH]^+$, m/z 255 (Goad & Akihissa, 1997). Il a aussi un pic de base *m/z* 296 dû à l'ouverture du cyclopropane qui a une intensité de 94%, contre 87% pour le pic *m/z* 408. Néanmoins, la comparaison du spectre de ce stérol obtenu après purification par CPLH avec celui d'un échantillon authentique de gorgostérol (Viracaoundin, 2001) nous a permis d'attribuer cette structure pour ce stérol C_{30} présent dans les deux *Cinachyrella*.

Le spectre de masse du deuxième stérol C_{30} , qui n'est présent qu'aux teneurs de 0,1 et 0,3% dans *C. alloclada* et *C. kükenthali*, correspond au gorgostérol. Ceci représente le résultat le plus important de cette analyse car ce stérol n'avait jusqu'à présent été isolé que dans certains cnidaires, essentiellement des gorgones, et dans les zooxanthelles qui leurs sont associés (Withers *et al*., 1982). Le spectre de masse de l'acétate de gorgostéryle (Figure 19) est en tous points identique aux données de la littérature avec un pic intense à *m/z* 408 correspondant à $[M\text{-}AcOH]^+$ et un pic à *m/z* 255 correspondant à la perte de la chaîne latérale $[M\text{-}AcOH\text{-}CL]^+$. le pic de base à *m/z* 296 traduit la coupure de la chaîne latérale au niveau du cyclopropane et les pics à *m/z* 337 et *m/z* 213 correspondent respectivement à l'ouverture du cyclopropane entre les carbones C22 et C23 et à la coupure du cycle D.

La mise en évidence du gorgostérol dans les trois espèces de la mer Rouge *Cinachyrella alloclada* et *C. kükenthali* et *Chalinula saudiensis* sont ainsi les premières observations de ce stérol dans une éponge. Ce résultat est d'autant plus important que dans les espèces analogues du Sénégal, le gorgostérol est absent mais pas son précurseur direct, le 23,24–dimethyl-cholesta-5,22-dien-3β-ol que nous n'avons pas détecté dans les espèces de mer Rouge. Enfin, dans l'espèce *Cinachyrella* aff. *schulzei* de Nouvelle-Calédonie, ni le gorgostérol ni son précurseur n'ont été observés (Figure 20, Barnathan *et al*., 2003).



M'^{+}= $(M - AcOH)^+$	***m/z* 408**	
side-chain: 153 amu		
A	$(M' - 71)^+$	*m/z* 337
B	$(M' - 98)^+$	*m/z* 310
C	$(M' - 112)^+$	***m/z* 296**
D	$(M' - 127)^+$	*m/z* 281
E	$(M' - 153)^+$	***m/z* 255**
F	$(M' - 194 - H)^+$	*m/z* 213

Figure 19. Spectre de masse de l'acétate de gorgostéryle

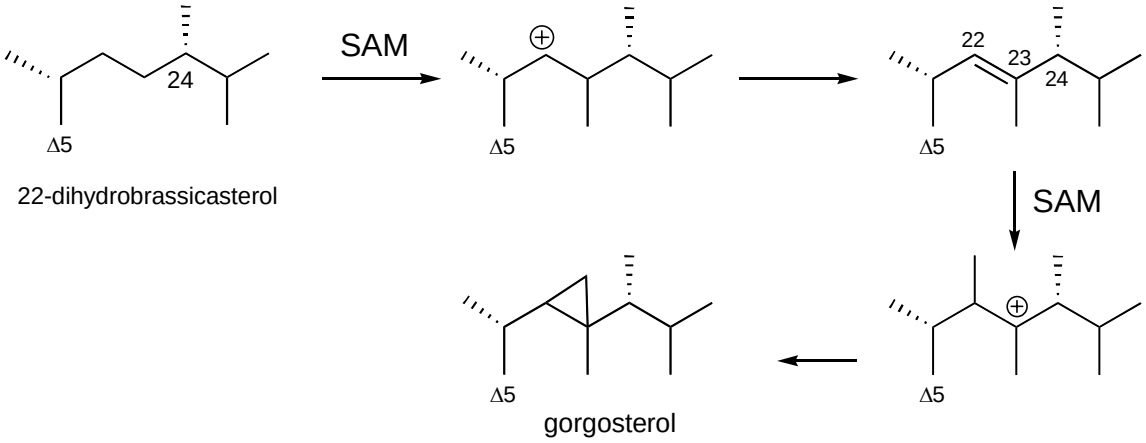


Figure 20. Principales étapes de la biosynthèse du gorgostérol (d'après Goad, 1978).

Le gorgostérol a été isolé la première fois dans une gorgone (Ciereszko *et al*., 1968) et il a été établi que ce stérol est impliqué dans la symbiose avec des dinoflagellés qualifiés ici de zooxanthelles (Withers *et al.*, 1982). Les diatomées et les dinoflagellés sont des constituants importants du phytoplankton et font partie des premiers maillons de la chaîne alimentaire. La présence de gorgostérol dans des éponges suggère ainsi l'existence probable de symbiose avec des dinoflagellés qui produiraient le 23,24-diméthylcholesta-5,22-dièn-3β-ol, ce dernier pouvant ultérieurement conduire au gorgostérol. C'est très probablement ce qui est observé dans les *Cinachyrella* de mer Rouge bien que le précurseur n'ait pu être détecté, et c'est également ce qui doit se produire dans les *Cinachyrella* du Sénégal mais sans qu'on ait pu détecter le gorgostérol terminal. Enfin, ce type de symbiose serait absent de l'espèce *Cinachyrella* aff. *Schulzei* puisque ni le 23,24-diméthylcholesta-5,22-dièn-3β-ol, ni le gorgostérol n'y ont été décelés.

L-5. *Chalinula saudiensis*. La composition en stérols est présentée dans le Tableau 46. Elle fait apparaître une composition très « classique » sans structure particulière, à l'exception toutefois des stérols C30, très vraisemblablement d'origine exogène (Kornprobst, 2005).

Tableau 46. **C**omposition en stérols de *Chalinula saudiensis*

Nom	ion moléculaire	T_{RR}	pourcentage(%)
nor-24-cholesta-5,22-dièn-3β-ol	370	0,90	tr.
22(*Z*)-Dihydrocholestérol	384	0,97	1,4
22(*E*)-Dihydrocholestérol	384	0,98	5,9
Cholestérol	386	1,00	15,8
Crinostérol/Brassicastérol	398	1,03	20,5
Ostréastérol (24-méthylène cholestérol)	398	1,05	6,0
Campestérol/22-Dihydrobrassicastérol	400	1,06	7,7
Stigmastérol	412	1,07	1,5
Poriférastérol	412	1,08	8,0
Clérostérol	412	1,10	3,4
Sitostérol/Clionastérol	414	1,11	17,5
Fucostérol ou Isofucostérol	412	1,12	10,0
29-Méthylfucostérol	426	1,15	1,3
29-Méthylisofucostérol	426	1,16	tr.
Gorgostérol	426	1,18	1,0

Le premier acétate de stérol de *Chalinula saudiensis* sorti de la colonne présente un pic de base *m/z* 352 qui correspond à la perte de l'acétate. Ce stérol Δ5 est à 26 carbones et possède une autre insaturation en dehors du cycle, ce qui est justifié par la présence des fragments *m/z* 213 et *m/z* 255 intense. La comparaison de ce spectre avec celui publié par Santalova *et al*., 2004 nous a permis d'identifier le *nor*-24ξ-cholesta-5,22-dièn-3β-ol.

Les autres stérols C27 - C29 ont été déjà identifiés dans les éponges précédentes (*M. dendyi* et *S. carteri*), à l'exception du clérostérol. Les ions-fragments de l'acétate de ce stérol sont identiques à ceux que Viracaoundin a décrit en 2001, comme les ions *m/z* 394 (pic de base), *m/z* 379, *m/z* 352, *m/z* 282, *m/z* 253 (intense), *m/z* 228, *m/z* 213 et *m/z* 55 (Viracaoundin, 2001, Tome 2, p. 50). En outre, nous avons pu obtenir deux spectres distincts du stigmastérol et du poriferastérol, ainsi que ceux du fucostérol et de l'isofucostérol.

Trois stérols C30:2 ont été identifiés à partir des spectres de leurs acétates. Les deux premiers sont les isomères géométriques 29-méthylfucostérol et 29-méthylisofucostérol. Leurs ions-fragments sont semblables et ils ne se différentient que par les intensités des pics et leurs temps de rétention relatifs par rapport au cholestérol (Brooks *et al*, 1972 ; Rohmer *et al*., 1980). Les acétates de ces deux stérols sont connus par la présence de pics de base *m/z* 296, pour les stérols acétylés, et *m/z* 314, pour les stérols libres. Le troisième stérol C30:2 a un T_{RR} de1,18) et a été identifié au gorgostérol par comparaison avec les spectres déjà présentés (**Tome 2, page 111** et pages précédentes). C'est ainsi la seconde mise en évidence du gorgostérol dans une éponge et il nous paraît important de noter que ces observations ne concernent que des éponges récoltées dans les parages de Djeddah.

Nous avons résumé dans le Tableau 47 les fragments caractéristiques des stérols $\Delta^{5,24(28)}$ de C_{28} à C_{30} et nous avons retrouvé l'observation faite par Brooks en 1972 qui a constaté, selon les intensités de pic $[M\text{-}AcOH]^+$ que la perte du groupe acétate est d'autant plus facile que la chaîne latérale est moins condensée en carbones.

Tableau 47. les différentes fragmentations des acétates des stérols $\Delta^{5,24(28)}$

Ions-fragments (70 ev)	Stérols $\Delta^{5,24(28)}$		
	C_{28}	C_{29}	C_{30}
$[M\text{-}AcOH]^+$	380	394	408
$[M\text{-}AcOH\text{-}CH_3]^+$	365	379	393
$[M\text{-}AcOH\text{-coupure } C_{22}\text{-}C_{23}]^+$	**296 ***	**296**	**296**
$[M\text{-}AcOH\text{-coupure } C_{20}\text{-}C_{22}]^+$	281	281	281
$[M\text{-}AcOH\text{-}CL\text{-}2H]^+$	253	253	253
$[M\text{-}AcOH\text{-}CL\text{-}42]^+$	213	213	213

* *m/z* 296 : pic de base

Le Tableau 48 montre les fragmentations des spectres de masse des stérols $\Delta^{5,22}$. Nous avons constaté que les fragments obtenus à partir de stérol $\Delta^{5,22}$ de C_{26} à C_{29} ont des intensités analogues et nous avons également vérifié l'observation de Brookes, 1972 selon laquelle les isomères *Z* et *E* d'un même stérol se distinguent par l'ordre d'élution sur la colonne, les isomères *Z* étant davantage retenus que les *E*.

Tableau 48. Principales fragmentations des acétates des stérols $\Delta^{5,22}$

Ions-fragments (70 ev)	Stérols $\Delta^{5,22}$			
	C_{26}	C_{27}	C_{28}	C_{29}
$M\text{-}AcOH]^+$	352	366	380	394
$M\text{-}AcOH\text{-}CH_3]^+$	337	351	365	379
$M\text{-}AcOH\text{-}43]^+$			337	351
$[M\text{-}AcOH\text{-coupure } C_{20}\text{-}C_{22}]^+$		282	282	282
$[M\text{-}AcOH\text{-}CL\text{-}2H]^+$	**255 ***	**255**	**255**	**255**
$[M\text{-}AcOH\text{-}CL\text{-}42]^+$	213	213	213	213

* *m/z* 255 : pics des bases

L-6. *Geodia* sp.

Rappelons qu'il s'agit d'une éponge profonde, récoltée par dragage à plus de 1 000 mètres de profondeur, donc dans un environnement froid (environ 2°C) et totalement aphotique. La composition observée est présentée dans le Tableau 49 et fait apparaître un pourcentage exceptionnel en fucostérol et isofucostérol dont les teneurs cumulées dépassent 75% de la fraction stérols totaux. Le 24-méthylène cholestérol représente un peu plus de 11% du total les deux isomères géométriques du propénylcholestérol (C_{30}) totalisent près de 8% du mélange de stérols. Au bilan, 2 stérols représentent plus de 75% et 4 stérols totalisent plus de 95% de la fraction stérol de cette éponge.

Tableau 49. **C**omposition en stérols *Geodia* sp.

Stérols	Ion moléculaire	T_{RR}	Pourcentage(%)
Occélastérol	384	0,97	0,3
Cholestérol	386	1,00	2,0
Cholestanol	388	1,01	1,2
Ostréastérol	398	1,04	11,6
Fucostérol	412	1,19	37,8
Isofucostérol	412	1,21	39,4
29-Méthylfucostérol	426	1,23	1,1

29-Méthylisofucostérol	426	1,27	6,7

Cette éponge possède moins de dix stérols dont près de 98 % d'entre eux sont constitués par des stérols Δ24(28) à C28, C29 et C30 carbones. Les deux stérols majoritaires sont le fucostérol et l'isofucostérol (75 %). Cette situation permet de le comparer à *Myrmekioderma dendy* qui vit cependant dans un environnement marin complètement différent, Atlantique nord très profond pour l'une et Pacifique sud peu profond pour l'autre. Si on compare les compositions des stérols de *Geodia* sp. avec celles de *Geodia megastrella* et de *G. arcoterus* de Canada, on voit de grandes différences car notre spécimen de *Geodia* sp. possède 75 % de fucostérol/isofucostérol alors que *Geodia megastrella* et *Geodia arcoterus* ont respectivement 4 % chacun (Kingston *et al*., 1979). D'autre part, *G. megastrella* et *G. arcoterus* ont des teneurs élevées en ostréastérol (72 % et 27 %), et possèdent des quantités significatives du 24-*nor*-cholesta-5,22-diènol, d'occélastérol, de cholestérol, de brassicastérol et du sitostérol et/ou clionastérol.

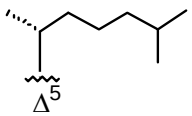
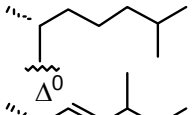
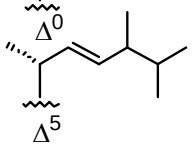
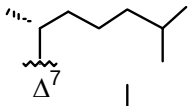
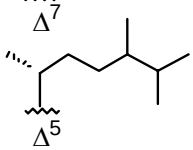
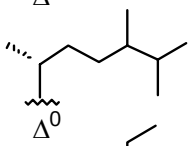
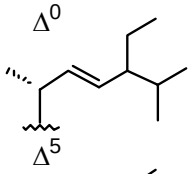
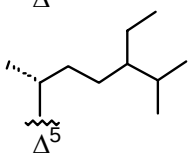
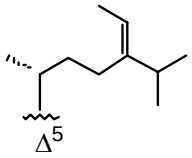
Cette composition particulièrement atypique compte tenu du biotope de l'éponge pose d'intéressants problèmes de biosynthèse. S'il est admis que les propylidènestérols proviennent de micro-organismes hébergés appartenant à la classe des Haptophycées qui les produisent à partir du desmostérol ou de l'isofucostérol (Kornprobst, 2005), il n'est pas possible d'envisager ici une telle voie de biosynthèse car les Haptophycées sont des micro-organismes photosynthétiques dont la présence à plus de 1 000 mètres de profondeur est extrêmement improbable. Il resterait donc l'hypothèse de la voie non-mévalonique, mais si celle-ci a été démontrée dans de nombreux cas pour la biosynthèse de terpènes, elle ne semble pas encore avoir été établie pour des stérols, bien que ceux-ci dérivent de ceux-là.

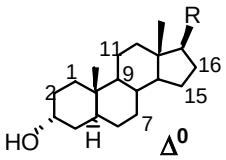
L-7. *Axinyssa djiferi*

Découverte en 1983 cette éponge présente la particularité, actuellement unique à notre connaissance, de vivre sur un substrat vivant, en l'occurrence les racines des palétuviers de l'espèce *Rhizophora mangle*, particulièrement abondants dans la mangrove du Siné-Saloum. Il était donc probable de retrouver dans la composition en stérols de l'éponge des « indicateurs » de la présence du végétal-support. Par ailleurs le biotope de cette éponge est particulièrement atypique : eau saumâtre et chaude (estuaire en zone tropicale), très faible profondeur (les éponges se trouvent entre 1 et 2 mètres de profondeur à marée haute et sont très proches de la surface à marée basse) et forte présence d'organismes associés (algues, débris végétaux, invertébrés) et il est plus que probable que cette éponge renferme de grandes quantités de micro-organismes divers.

La composition en stérols est présentée dans le Tableau 50.

Tableau 50. Composition en stérols d'*Axinyssa djiferi*.

Chaînes latérales	M	t_{RR}	%	Nom
	386	1,00	5,3	Cholestérol
	388	1,01	29,6	Cholestanol
	398	1,04	17,3	Brassicastérol/Crinostérol
	386	1,04	9,1	Cholest-7-èn-3β-ol
	400	1,07	3,2	Campestérol/Dihydrobrassicastérol
	402	1,08	2,8	Campestanol/Ergostanol
	412	1,10	7,1	Stigmastérol/Poriferastérol
	414	1,14	13,3	Sitostérol/Clionastérol
	412	1,15	12,4	Fucostérol



Cette composition fait apparaître un pourcentage très élevé de cholestanol qui est le stérol majoritaire avec environ 30% de la fraction totale. Viennent ensuite des stérols « végétaux » comme le sitostérol et le fucostérol qui représentent à eux deux également près de 30% des stérols totaux. Cette composition en stérols n'est donc pas originale dans la mesure où aucune structure nouvelle n'a été identifiée, mais elle semble correspondre à ce que l'on pouvait s'attendre d'une éponge vivant en étroite association avec un végétal.

L-8. *Trikentrion laeve*

Cette éponge se trouve au large de Dakar sur des fonds d'une quarantaine de mètres et exclusivement sur la partie supérieure des gros blocs rocheux où l'éclairement est maximal, mais reste globalement faible. La zone où se trouvent ces éponges est très souvent soumise à de forts courants qui doivent fournir à l'éponge nutriments et micro-organismes associés. La composition en stérols de cette espèce (Tableau 51) ne présente néanmoins aucune originalité si ce n'est que 75%

de la fraction stérol ne sont constitués que des 3 stérols traditionnels : le cholestérol (Δ5), le brassicastérol (Δ5,22) et le clionastérol (Δ5,54(28)).

Tableau 51. Composition en stérols de *Trikentrion laeve*.

Stérols	M	Insaturations	%
24-Norcholestadienol	370	5, 22	1,2
22(*Z*)-déhydrocholestérol	384	5, 22	1,6
22(*E*)-déhydrocholestérol	384	5, 22	5,6
Cholestérol	386	5	10,9
Cholestanol	388	0	0,4
Brassicastérol	398	5,22	24,1
24-Méthylènecholestérol	398	5, 24(28)	2,3
Campestérol	400	5	4,4
23,24-Diméthylcholestadienol	412	5, 22	0,5
Poriférasterol	412	5, 22	5,5
Clérosterol	412	5, 25	0,2
Clionastérol	414	5	39,4
Fucostérol	412	5, 24(28)	0,4
Stigmastanol	416	5	0,4
Isofucostérol	412	5, 24(28)	2,2

L-9. *Aaptos papillata*.

La seule espèce méditerranéenne étudiée dans le cadre de cette thèse présente une composition « attendue » pour une éponge de la famille des Suberitidae dont la quasi-totalité des représentants se caractérisent par une forte majorité de stanols qui est considérée comme un marqueur chimiotaxonomique de cette famille (Barnathan *et al*., 2004). Le Tableau 52 montre en effet que les stanols représentent plus de 50% de la fraction stéroïdes avec 45% pour le seul cholestanol.

Tableau 52. Composition en stérols d'*Aaptos papillata*

Stérols	M	T_{RR}	%
3β-Hydroxyméthyl-*nor*-24-*nor*-A-5α-cholest-22-ène	372	0,90	1,4
nor-A-patinostérol	386	0,96	1,4
3β-Hydroxyméthyl-*nor*-A-5α-cholest-22-ène	386	0,97	4,0
Cholestanol (Δ0)	388	1,00	45,0
nor-A-stanol non identifié Δ0,x-C27:1 (Δ0)	386	1,01	5,3
3α-Hydroxyméthyl-*nor*-A-cholest-7-ène (Hypothèse)	386	1,02	18,0
Campest-5-ènol ou Ergost-22-ènol	400	1,02	7,7
22-Dehydrolathostérol	384	1,03	2,5
Stéllastérol	400	1,04	2,0
Ergost-24(28)-ènol	400	1,05	2,7
Campestanol ou Ergostanol (Δ0)	402	1,07	0,6
Stigmastanol (Δ0)	416	1,09	tr.
Poriférastanol (Δ0)	416	1,10	3,4
Total stanols			54,3

La composition en stérols d'*Aaptos papillata* reste néanmoins atypique par la présence de 4 *nor*-A-stérols dont les teneurs cumulées sont légèrement supérieures à 30% et qui, à notre connaissance, sont trouvés pour la première fois dans une éponge Suberitidae.

Identification des *nor*-A-stérols

Le 3ξ-hydroxyméthyl-*nor*-A-cholest-7-ène présente un ion moléculaire *m/z* 386 (sous forme libre) et *m/z* 428 (sous forme d'acétate). C'est le *nor*-A-stérol qui sort en dernier après le cholestanol. Le 3β-acetoxy-méthyl-*nor*-24-*nor*-A-5α-cholest-22-ène a été identifié par comparaison de son SM avec ceux décrits par Sanalova. Les deux autres : *nor*-A-patinostérol et 3β-hydroxyméthyl-*nor*-A-5α-cholest-22-ène (C27:1) ont été déjà identifiés sur des nombreuses éponges dont *Stylissa carteri*. Par contre, le spectre de masse du quatrième *nor*-A non acétylé (troisième isomère C27:1) présente les ions *m/z* 355 (caractéristique du *nor*-A), *m/z* 273 (pic de base), *m/z* 231, et *m/z* 215 (caractéristique d'un stanol) (**Tome 2, p. 115**). Le spectre de son acétate montre un ion moléculaire *m/z* 428 et des ions-fragments *m/z* 353 ($[M\text{-}AcOH\text{-}CH_3]^+$), *m/z* 315 ($[M\text{-}C.L.\text{-}2H]^+$, pic de base), *m/z* 255 ($[M\text{-}CL\text{-}2H\text{-}AcOH]^+$), et *m/z* 215 ($[M\text{-}CL\text{-}C_3H_7\text{-}AcOH+H]^+$) (**Tome 2, p. 115**). Les SM de ce stérol (libre et acétylé) nous ont permis de montrer que la double liaison ne se trouve pas dans le système tétracyclique. En revanche, les SM (stérol libre et acétylé) du dernier isomère C27:1 nous conduit à présenter comme structure probable celle du 3ξ-hydroxyméthyl-*nor*-A-cholest-7-ène (**Tome 2, p. 116**). Cette hypothèse est confortée d'une part, par la présence des ions-fragments *m/z* 386 (pic de base), *m/z* 355 ($[M\text{-}CH_2OH]^+$, caractéristique du *nor*-A-stérol) dont l'intensité est deux fois plus faible que celle de l'ion *m/z* 353 ($[M\text{-}CH_2OH]^+$), et d'autre part par la présence des ion *m/z* 246 et *m/z* 213 qui permettent de situer la double liaison en 7 (Bohlin *et al.*, 1982). Si cette hypothèse est confirmée il s'agirait d'un nouveau *nor*-A-stérol.

M - Etude de deux terpènes de *Myrmekioderma dendyi*

M-1. Extraction et isolement des terpènes

Après la récolte, l'éponge a été traitée et conservée sur place (Vanuatu, centre IRD de Nouméa - Nouvelle-Calédonie). L'extraction au CH_2Cl_2 des extrait lipidique au laboratoire de chimie marine (LCM) à Nantes, nous a permis d'obtenir 4g de lipides totaux.

La séparation en classe de lipides, par polarités croissantes, nous a permis d'obtenir une fraction éluée à l'hexane (156 mg), 13 fractions au dichlorométhane (2444 mg), 7 fractions à l'acétone (519 mg) et une fraction au méthanol (517 mg). L'analyse par CCM de la fraction hexanique et les fractions D1 à D8 éluées au dichlorométhane, en utilisant comme témoins le cholestérol et l'acétate de cholestérol, nous permis de constater que les fractions D1 à D4 comportent des mélanges de spots alors que les fractions D5 et D6 ont une spot unique (Figure 21). A partir de la fraction D7 des spots correspondant au témoin cholestérol mélangé avec le spot de D6 apparaissent. Les composés, c ol et son acétate, sont en général, chimiquement et biol CCM nous nous sommes intéressés à la fraction D5 car t de 415 mg (Figure 21 et Tableau 53).

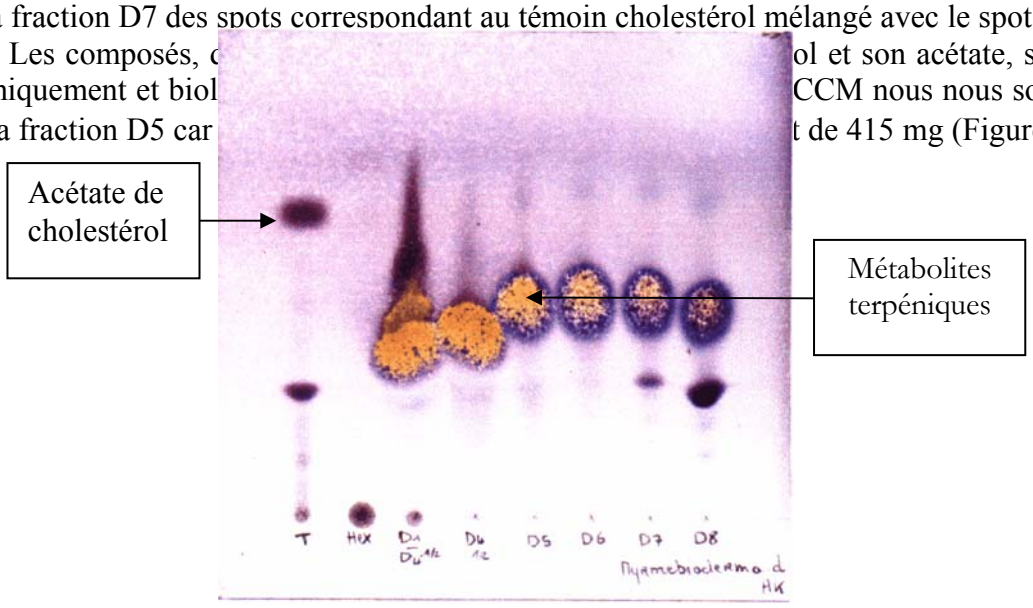


Figure 21. Plaque CCM des fractions terpéniques

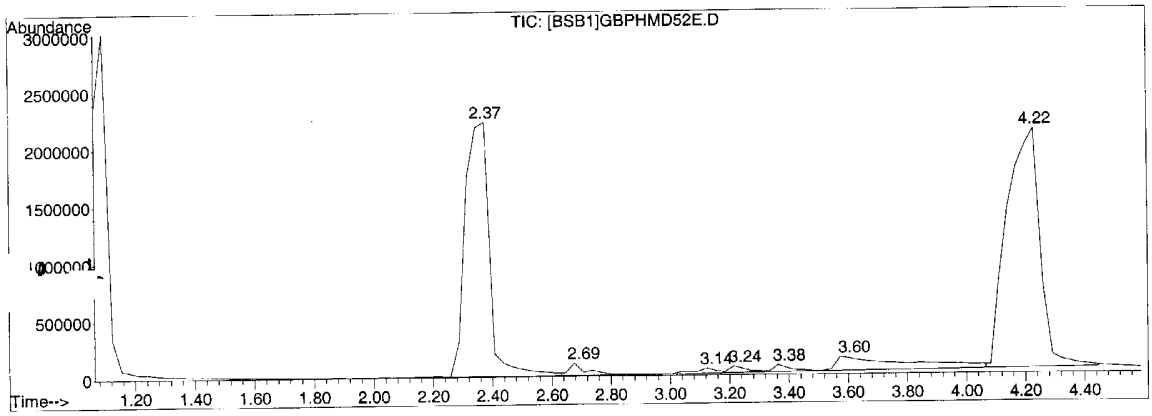
Tableau 53. Quantités de fractions éluées à l'hexane et au dichlorométhane

Fractions	Hexane	Fractions de dichlorométhane										
N°	Hex	D1 à D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13
Masse (mg)	132	1188	274	415	155	101	65	95	60	32	27	32

Le tableau 53 et le figure 21 montrent que près de 90 % de fractions de dichlorométhane sont composées de métabolites secondaires apolaires dont la majorité présente un spot unique en CCM.

Cholestérol

Une a[illegible]plage CPG/SM (colonne HP1, 30m ; 0,25µ ; 120°C pendant 2min puis programmation de la température 15°c/min jusqu'à 300°C a été réalisée pour vérifier la pureté de la fraction D5 (Figure 22). Il apparaît que le spot unique en CCM de cette fraction est formé de deux pics majoritaires dans des proportions respective de 39,4 % et 50,9 % .



Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
2.367	125856865	39.431	77.393
2.692	4633521	1.452	2.849
3.139	1940460	0.608	1.193
3.237	2238406	0.701	1.376
3.385	2452852	0.768	1.508
3.605	19443705	6.092	11.957
4.222	162619817	50.948	100.000

Figure 22. Chromatogramme des deux terpènes de *Myrmekioderma dendyi* (CPG/SM)

Ce résultat nous a amené à séparer ces deux produits que nous avons appelés respectivement, D5-3 (39,4 %) et D5-4 (50,9 %), par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en utilisant les conditions suivantes (Figure 23):

- Une colonne en phase inverse C18 : Inertsil ODS-3 ; 5µm ; 4,6x250mm (A-C18-13)
- Eluant) : MeOH / 20 % Eau - Débit : 0,6ml/min
- Détection : réfractométrie et UV à 215nm (0,2 AUFS)
- Masse injectée : environ 4mg

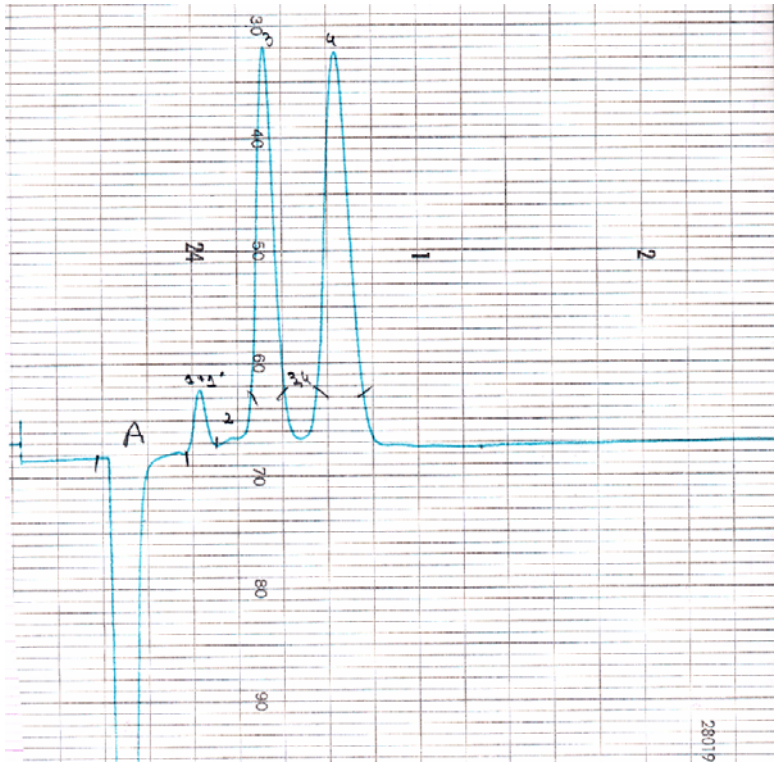


Figure 23. Allure du chromatogramme CLHP de la fraction D5 (Fraction CH_2Cl_2 n° 5)

M-2. Caractérisation structurale de D5-4

Le spectre IR de la fraction"DH5-4" présente les bandes caractéristiques suivantes (**Tome 2, p. 117**) :

- Une bande large à 3328 cm-1 correspond à la fonction O-H
- Une bande fine à 2963cm-1, caractéristique de l'élongation asymétrique de la liaison C-H de groupements méthyle
- Une bande fine à 2921cm-1, caractéristique de l'élongation asymétrique de la liaison C-H d'un groupement méthylène
- Une bande fine à 2873cm-1, caractéristique de l'élongation symétrique de la liaison C-H de groupements méthyle
- Une bande fine et intense à 1673cm-1, caractéristiques des liaisons C=O d'un groupement cétone conjugué avec un groupement méthylène (-C=C-CO-)
- Une bande moyennement fine et intense à 1613cm-1 correspond à l'absorption de la forme énolique d'un groupement cétone, insaturée

Nous en déduisons l'existence d'une fonction hydroxyle, d'une fonction cétone double liaison α–éthylénique et de groupes -CH3.

L'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution (SMHR) de cette fraction donne une masse molaire exacte à 232,1334 ($[255,1334\text{-}Na]^+$) qui correspond à la formule brute $C_{15}H_{20}O_2$. Cette molécule possède 6 insaturations dont un C=O (voir IR).

La spectrométrie de masse à impact électronique produit les fragments suivants (**Tome 2, p. 118**) :

- *m/z* = 232,13 (25 %) : masse moléculaire (M^+)
- *m/z* = 199,13 (40 %) : $[M\text{-}33]^+$ (une perte d'eau et d'un méthyle)
- *m/z* = 176,13 (17 %) : $M\text{-}56]^+$ (une perte d'un groupement $C_4H_7^+$)
- *m/z* = 135,13 (85 %) : $[M\text{-}97]^+$ (une perte de $C_9H_{11}O$, selon Mac Lafferty, concurrencé par la coupure radicalaire de la fonction cétone)

- *m/z* = 91,08 (14 %) : $[M-141]^+$ (une présence d'un fragment d'ion aromatique $C_7H_7^+$ dans la molécule étudiée)
- *m/z* = 83,08 (100%): pic de base (une perte de $C_{10}H_{13}O$ due à une coupure de type radicalaire de la fonction cétone, pic de base)
- *m/z* = 55,08 (22 %) : perte d'un groupement CO à partir du pic de base

Les résultats des analyses par RMN sont résumées dans les tableaux 54 et 55 (**Tome 2, p. 119**).

Tableau 54. RMN ^{13}C et DEPT 135, à 75MHz dans $CDCl_3$

RMN ^{13}C (δ_C en pm)	DEPT 135	Positions de C*	RMN ^{13}C (δ_C en pm)	DEPT 135	Positions de C*
20,94	**C**H_3-C=C	**8**	123,07	=**C**H-CO-	**3**
21,18	**C**H_3-Ar	**7'**	126,07	=**C**H-C	**6'**
21,41	**C**H_3-CH	**7**	130,24	-**C**=C-	**1'**
25,68	-**C**H-CH_3	**6**	137,16	=**C**-CH=	**4'**
27,90	**C**H_3-C=C	**1**	153,71	-**C**=CH-CO	**2**
54,17	-**C**H_2-CH-	**5**	157,94	=**C**(OH)-C=	**2'**
118,49	-**C**H=C-	**3'**	202,00	**C**=O	**4**
121,68	-**C**H=CH-	**5'**			

(*) voir structure de D5-4 ; Ar : noyau aromatique

Les déplacements chimiques de RMN ^{13}C et de DEPT 135 ont des ressemblances avec ceux de D5-3, déterminé auparavant, car on trouve la plupart de carbones constitutifs de l'hydroxyturmérone sauf, celle-ci a 15 carbones au lieu de 12. Les trois carbones correspondent probablement à un propylène dont la double liaison est située en α du cétone, confirmant les détections en IR à 1673cm-1et à 1613cm-1.

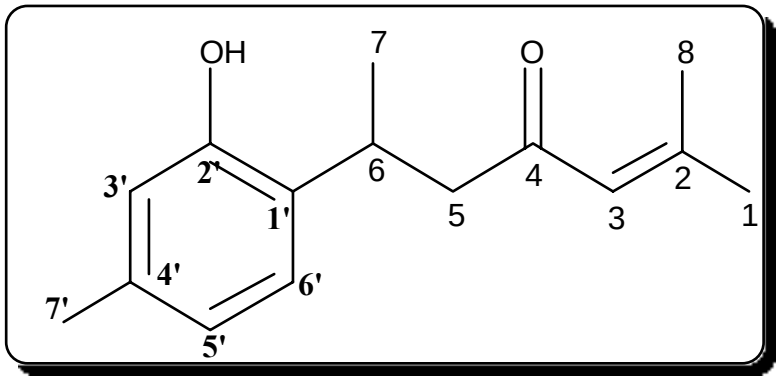
Tableau 55. RMN ^1H (300MHz) dans $CDCl_3$ (**Tome 2, p. 120**)

δ (ppm)	multiplicité	Groupements correspondants	Positions des Protons
1,29	Doublet	C**H$_3$**-CH(Ar)-CH_2-	**7**
1,85	Singulet	C**H$_3$**-C=CH-CO(*trans*)	**1**
2,11	Singulet	C**H$_3$**-Ar	**7'**
2,25	Singulet	C**H$_3$**-C=CH-CO(*cis*)	**8**
2,80	Doublet	-C**H$_2$**-CH-	**5**
3,50	Multiplet	-CH_2-C**H**(CH_3)-	**6**
6,00	Singulet	-C=C**H**-CO-	**3**
6,70	Singulet	-C**H**=C-	**3'**
6,73	Doublet	-**C**H=CH-	**5'**
7,02	Doublet	=**C**H-C-	**6'**

Ar : aromatique

L'analyse par corrélations HMQC, entre les carbones (Tableau 54) et les protons (Tableau 55), permet de relier les groupes de carbones et de protons existants (**Tome 2, p. 122**). Ces données, comparées avec celles que Aratanechemuge, 2002, nous a permis d'attribuer à D5-4 la structure de 2-hydroxyturmérone ou 6-(2-Hydroxy-4-méthyl-phenyl)-2-méthyl-hept-2-en-4-one.

La mesure du pouvoir rotatoire du composé 5-4 (0,07 % dans le chloroforme, longueur



d'onde 589 nm, donne une valeur positive ($[\alpha]_D$ = +7,6). Cette valeur de la pouvoir rotatoire de D5-4 positive nous permet de déduire que le carbone asymétrique C-6 de cette molécule est la même configuration que la turmérone. Le composé D5-4 serait ainsi la 2'-hydroxyturmérone.

M-3. Caractérisation structurale de la fraction D5-3

Le spectre IR de la fraction D5-3 mis en solution dans le dichlorométhane présente des bandes caractéristiques suivantes:

- Une bande large et intense à 3387cm^{-1} qui correspond une fonction hydroxylées –OH ou un phénol.
- Une bande fine et intense à 2960cm^{-1} caractéristique de la liaison C-H des éthyléniques
- Deux bandes fines et intenses à 2927cm^{-1} et à 2876cm^{-1}, caractéristique de la liaison C-H et deux autres bandes fine à 1452cm^{-1} et à 1416cm^{-1}, caractéristiques de l'élongation des liaisons C-H des groupements -CH_2CO et CH_3CO
- Une bande fine et intense à 1700cm-1, caractéristique de la torsion des liaisons C=O d'un groupement cétone.

L'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution (SMHR) de cette fraction nous a donné une masse molaire exacte 192,1048 g/mol qui correspond a la formule brute $C_{12}H_{16}O_2$ (**Tome 2, p. 121)**.

Le spectre de masse nous a permis d'obtenir les différents ions-fragments suivants :

- *m/z* 192 (38%) ($C_{12}H_{16}O_2$)
- *m/z* 177 (16%): une perte de CH_3
- *m/z* 159 (56%): une perte de CH_3 et d'une molécule d'eau
- *m/z* 135 (100%): une perte de C_2H_5CO ou CH_3COCH_2

L'analyse par RMN ^{13}C et DEPT 135 indique que les 12 carbones sont composés de 3 méthyles (3 x –CH_3), un groupement « -CH_2-» et 4 groupements «-CH-» . les 4 carbones restants sont des carbones quaternaires car ils sont absents sur le spectre DEPT 135.

Tableau 56. RMN ^{13}C et DEPT 135, à 75MHz, dans $CDCl_3$ (**Tome 2, p. 119**)

RMN ^{13}C (δ_C en pm)	DEPT 135	Positions de C*	RMN ^{13}C (δ_C en pm)	DEPT 135	Positions de C*
19,31	**C**H_3-	**5**	121,78	=**C**H-	**5'**
20,95	**C**H_3-	**7'**	123,84	-**C**=C	**3'**
24,75	-**C**H-	**4**	126,52	-C=**C**H-	**6'**
29,39	**C**H_3-	**1**	137,30	=**C**-C	**1'**
40,59	-**C**H_2-	**3**	151,61	=**C**-	**2'**
117,35	-**C**H=	**3'**	211,08	**C**=O	**2**

(*) voir structure de D5-3

Les groupements -CH_2CO et CH_3CO correspondent, respectivement aux déplacements chimiques, 40,59 ppm et 29,39 ppm. Dans ce cas, on peut retenir déjà, en spectrométrie de masse, une perte de groupement -CH_2CO CH_3, au lieu de C_2H_5CO, justifiant le pic de base à *m/z* 135. Six déplacement chimiques correspondent aux trois groupement -CH- et aux trois autres groupement -C- (absents au DEPT 135 et faibles intensités à la RMN ^{13}C), se trouvent entre 117 ppm et 152 ppm. Le composé D5-3 possède ainsi un noyau aromatique trisubstitué. Ces fonctions ne peuvent être qu'une fonction hydroxyle (Voir spectre IR), alkyle, acyle, ou autres fonctions. Enfin, le déplacement chimique à 211,08 nous a permis de confirmer la fonction cétone, en excluant totalement l'aldéhyde.

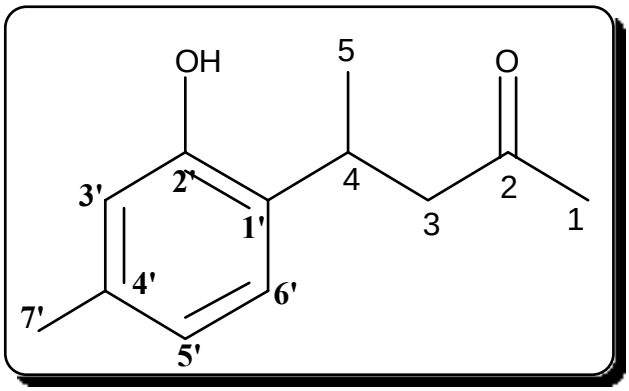
La RMN du proton permet de compléter les informations précédentes (Tableau 57).

Tableau 57. RMN ^{1}H (300MHz, ($CDCl_3$) (**Tome 2, p. 120**)

δ (ppm)	multiplicité	Groupements correspondants	Positions des Protons
1,32	Doublet	C**H₃**-CH(Ar)-CH_2-	**5**
1,62	Singulet	C**H₃**-Ar	**7'**
2,12	Doublet	-C**H₂**-CO-	**3**
2,27	Singulet	C**H₃**-CO-	**1**
3,11	Multiplet	CH_3-C**H**-CH_2-	**4**
6,62	Singulet	-C(OH)-C**H**=C-	**3'**
6,74	Doublet	-C(CH_3)-C**H**-CH-	**5'**
7,16	Doublet	-CH=C**H**-C-	**6'**

Ar : aromatique

L'analyse par corrélations HMQC permet de relier les carbones et protons (**Tome 2, p. 122**). Ces données comparées avec celles de Mori (Mori, 2005) et Aratanechemuge (Aratanechemuge *et al.*, 2002) nous ont conduit à attribuer à D5-3 la structure de 2-hydroxycurcumone ou 4-(2-hydroxy-4-méthyl-phenyl)-pentan-2-one.



Les deux dérivés isolés apparaissent ainsi comme dérivant l'un de l'autre par dégradation de type coupure oxydative, le dérivé D5-3 étant très probablement un produit de dégradation de la 2-hydroxyturmérone. S'il en est ainsi la configuration absolue du carbone 4 du dérivé D5-3 serait la même que celle de la 2-hydroxyturmérone mais ceci reste à confirmer par d'autres expériences.

La présence de quantités importantes de phénols dans cette éponge semble indiquer qu'ils jouent un rôle défensif contre les agressions bactériennes, les phénols étant bien connus pour leurs propriétés antiseptiques.

M-4. Mécanisme de fragmentation des composés D5-3 et D5-4.

Les pics de base de ces deux molécules, D5-3 et D5-4, sont respectivement *m/z* 135 et *m/z* 83. Mais le 2-hydroxyturmérone (D5-4) a aussi un pic important à *m/z* 135 (85 %). On peut déduire que les deux molécules subissent deux coupures de type radicalaire pour obtenir ces deux ions-fragments (Figure 23).

Le « coupure β » lié à la présence d'insaturation (système π du cycle aromatique) permet d'avoir un ion *m/z* 135 comme, pic de base pour le 2-hydroxycurcumone (D5-3) et pic intense pour le 2-hydroxyturmérone (D5-4).

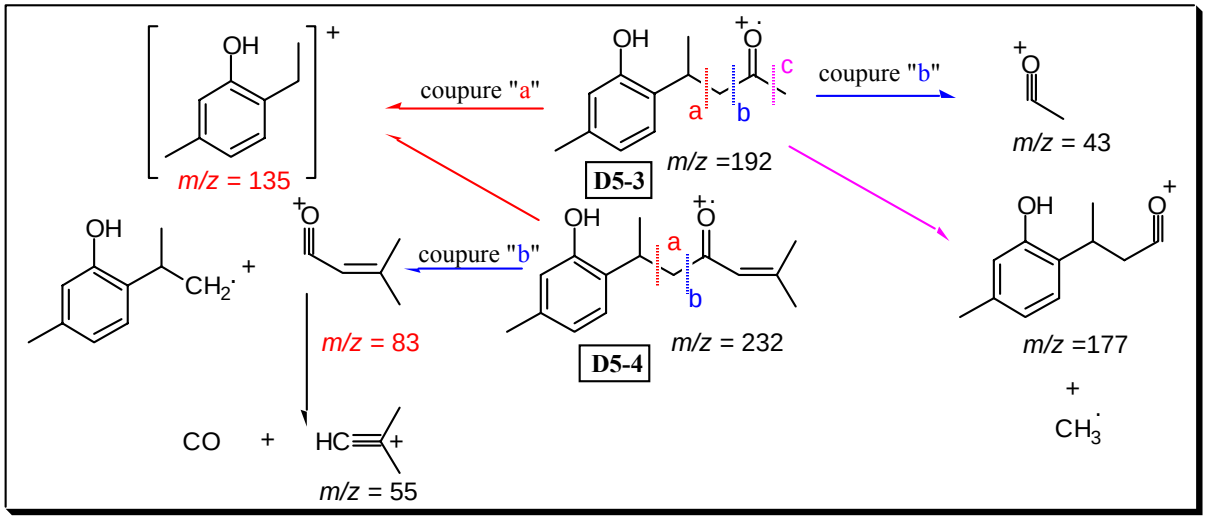


Figure 24. Fragmentations de 2-hydroxycurcumone (D5-3) et de 2-hydroxyturmerone (D5-4), sous impact électronique à 70 eV

Comme la structure de 2-hydroxyturmérone est stabilisée, par résonance, par la double liaison en α du groupement cétone, la coupure « a » de type radicalaire de la liaison « -CH_2-CO-» est donc doublement favorisé par la présence de la fonction cétone en position α et l'insaturation (système π) en position β (Figure 25).

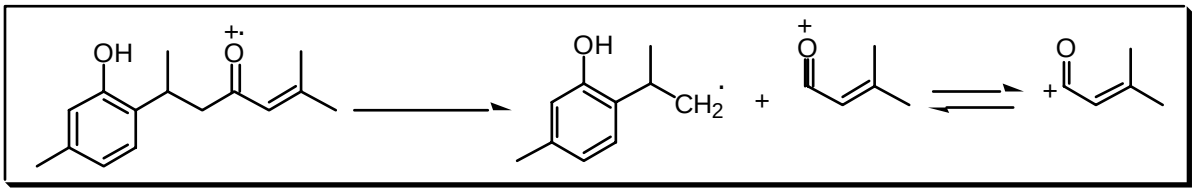


Figure 25. Coupure de type radicalaire de 2-hydroxyturmerone

M-5. Evaluation neurotoxicité de deux terpènes

Les deux molécules terpéniques ont été testées sur les larves de diptères. Le 4-(2-hydroxy-4-méthyl-phenyl)-pentan-2-one (2-hydroxycurcumone) provoque une paralysie totale des larves en injectant 25 µg ; l'injection de la moitié de cette dose n'a pas d'influence notable sur les larves. On peut considérer que ce composé est modérément neurotoxique. Des tests supplémentaires sur l'activité de cette molécule sur les canaux ioniques sont actuellement effectués à l'Université d'Angers.

Par contre, et dans les mêmes conditions expérimentales, l'hydroxyturmérone ne donne aucun résultat sur les larves.

PARTIE EXPERIMENTALE

PARTIE EXPERIMENTALE

N -Collecte et description des éponges :

N-1. Collecte des éponges :

Les éponges que nous avons étudiées ont été récoltées dans des mers ou des océans différents.

N-1.1. L'éponge du Pacifique sud *Myrmekioderma dendyi* (Vanuatu).

L'espèce *Myrmiokiderma Dendyi* a été collectée au Vanuatu dans le Pacifique sud, par les plongeurs du centre IRD de Nouméa (Nouvelle-Calédonie) dans le cadre du programme européen MAST III (Marine Science and Technology).

N-1.2. Les éponges de la mer Rouge :

Nous avons pu récolter trois éponges qui proviennent d'un endroit encore très peu exploité.

N-1.2.1. *Stylissa carteri*

L'espèce *Stylissa carteri* est la nouvelle dénomination par Van Soest et son équipe d'*Acanthella carteri* (Carter 1885, Devidy 1889, Fedoreyev *et al*., 1986) ou *Acanthella aurantiaca* (Bohlin *et al*., 1982) qui a été inclus dans l'Ordre *Halichondrida*, famille des *Axinellidae* (Lévi, 1973). Entre 1990 et 1998, quatre articles (Van Soest *et al*., 1990 ; Diaz *et al*., 1991 ; Pomponi *et al*, 1991 ; Diaz *et al*, 1993 ; Alvarez, 1998) présentent des modifications dans la taxonomie des spongiaires. Ces auteurs ont créé deux nouvelles familles : *Halichondriidae* et *Hymeniacidonidae* dans l'Ordre des *Halichondrida* sensu, ce dernier étant séparé du nouvel Ordre des *Axinellida* qui regroupe quatre nouvelles familles : *Axinellidae*, *Desmoxyidae*, *Halichondriidae* et *Dictyonellidae* (Van Soest *et al*., 1990).

De nouveaux résultats obtenus par séquençage des ARN ribosomaux (Chombard *et al*., 1999 ; Alvarez *et al*., 2000) conduit à de nouvelles modification taxonomiques. En 2002, Hooper & Van Soest ont établi que l'espèce *Acanthella carteri* (Carter 1885) doit désormais s'appeler *Stylissa carteri* (Van Soest *et al*., 2002).

Cette éponge a été trouvée abondamment au large de Jeddah (Arabie Saoudite), elle a été récoltée en deux reprise par le Professeur Jean-Michel Kornprobst au large de la station marine de la KAAU (King Abdulaziz University) à Obhur. Deux récoltes ont été effectuées le 25 octobre 1998 et le 05 janvier 2000 (références des échantillons : SP-10-25-98-01 et SP-01-05-2000-01). Une autre recolte a été éffectué à Djiboutti par le Professeur Jean-François Biard.

N-1.2.2. *Chalinula saudiensis*.

Cette éponge a été récoltée au nord de Jeddah (22°02N, 38°55E, à 20 mètres de profondeur, le 05 janvier 2001 par le Professeur Jean-Michel Kornprobst (référence SP 01-05-2001-02). Cette éponge a été découverte en 1998 et décrite en 2001 (Vacelet *et al*., 2001).

N-1.2.3. *Cinachyrella alloclada* et *kükenthali*.

Ces deux éponges ont été récoltées à une centaine de kilomètres au nord de Jeddah, en novembre 1997 (Références des échantillons : **SP-11-02-97-04**, **SP-11-02-97-05)**. Elles se sont trouvées entre 5 et 10 mètres de profondeur.

N-1.3. Les éponges de l'Atlantique

Nous avons étudié deux éponges de l'océan Atlantique, l'une provenant de l'Atlantique Nord (Irlande), l'autre de l'Atlantique tropical (Sénégal).

N-1.3.1. *Geodia* sp.

L'espèce *Geodia* sp. (Références des échantillons : Ifremer Thl1 et Thl2) est indéterminée au niveau du genre, elles ont été collectées en profondeur (1 200 mètres) par dragage dans le cadre d'une campagne océanographique de l'Ifremer au nord-ouest des côtes Irlandaises.

N-1.,3.2. *Axinyssa djifferi*

C'est une éponge récoltée par le Professeur Jean-Michel Kornprobst (JMK) en septembre 1996 dans la mangrove du Sine Saloum, dans la région de Djifer (Sénégal). Cette espèce originale, découverte en 1983, a été décrite en 2001 (Boury-Esnault *et al*., 2002).

N-1.3.3. *Trikentrion loeve*

Cette éponge a été collectée en septembre 1996 (JMK), au large de Dakar entre 35 et 40 mètres de profondeur.

N-1.4. L'éponge de méditerranée, *Aaptos papillata*

Cette espèce a été récoltée par M. Patrice Petit de Voize, au large de Montpellier.

N-2. Description et identification des éponges

N-2.1. Méthode générale d'identification de l'éponge

L'étude morphologique des éponges permet de les décrire et de les classer. Cette étude consiste à définir leur morphologie (taille, couleur, consistance (dure, molle, souple, rugueuse, etc…), forme (coupe, sphérique, tubulaire, arborescente, encroûtante, etc…). Ces observations consignées il est nécessaire d'étudier le squelette de l'éponge qui comprend l'étude des spicules et la répartition de ces derniers au sein de l'éponge.

Etude des spicules. Il est indispensable de préparer les spicules afin d'en étudier leur formes et leurs dimensions. Un fragment d éponge sèche est traité par de l'acide nitrique concentré ou de l'acide sulfurique concentré à chaud. Lorsque tous les matériaux organiques (spongine, protéines, …) ont été éliminés, le résidu minéral est abondamment lavé à l'eau déminéralisée jusqu'à neutralité, puis rincés à l'acétone et séchés. Ainsi préparés, les spicules peuvent être conservés indéfiniment. L'observation des spicules de l'éponge est ensuite réalisée par microscope optique ou électronique.à balayage.

Pour l'ensemble des éponges étudiées, les diagnoses ont été réalisées au Centre d'Océanologie de Marseille (Station Marine d'Endoume, par Mme N. Boury-Esnault et M. J. Vacelet).

N-2.2. Description et identification des éponges collectées.

Myrmekoiderma dendyi : Cette Démosponge appartient à la sous-classe des Ceratinomorpha, Ordre Halichondrida, famille des Desmoxyidae, Hallman, genre *Myrmekioderma*, espèce *Dendyi*. Elle a été référencée sous le code R1736 par le centre IRD de Nouméa.

Stylissa carteri est une éponge formées par une succession de lames rouge-orangées, de faible épaisseur, de formes irrégulières, et de tailles variables (de 10 à 20 cm). Cette éponge appartient dans l'Ordre de *Halichondrida*, famille des *Dictyonellidae*, genre *Stylissa*, espèce *carteri* (photographie *in situ* page).

Chalinula saudiensis est de couleur bleue vif et se présente en plaque de formes irrégulières, souples mais fermes, d'une épaisseur de 1 à 2 cm. Sa description biologique complète a été publiée en 2001 et a fait l'objet de présentations dans des congrès internationaux au Moyen-Orient. Elle appartient à l'Ordre des *Haplosclerida*, famille de *Chalinidae*, genre *Chalinula*, espèce *saudiensis*. Des éponges similaires ont été étudiées auparavant par Keller en 1889 et 1891, par Row en 1910 et 1911 et par Lévi en 1958 et 1965. On peut confondre *Chalinula saudiensis* avec d'autres éponges

du même genre, en particulier; *Chalinula renieroides* Schmidt, 1868 (= *Acervochalina*, Ridley, 1884, synonyme *Chalinula* par Weerdt, 2000), qui a été trouvé dans la région Indo-Pacifique.

Cinachyrella cf. *alloclada* et cf. *kükenthali* appartiennent à la famille de Tetillidae (Démosponges, Tétractinomorphes, Ordre de Spirophorida). Elles sont globulaires à charpente radiaire avec de nombreux protriaènes. L'espèce *Cinachyrella* cf. *alloclada* a été décrite pour la première fois sur les côtes sénégalaises par Lévi (1960), elle présente des morphologies quelque peu différentes selon qu'il s'agit de spécimens de la zone intertidale (Pointe Senti, Sénégal, profondeur inférieure à 50 cm) ou de spécimens d'eaux plus profondes (Iles des Madeleine, Sénégal, profondeur 15 à 25 mètres). Dans la zone côtière les éponges ont une forme globulaire et régulière, quasiment sphérique (3 à 8 cm de diamètre), tandis que les espèces de zone profonde ont une forme globulaire mais légèrement aplatie sur la face supérieure (Barnathan *et al*., 1992). L'espèce *Cinachyrella kükenthali* récoltée au Sénégal a été identifiée plus tard par Mme N. Boury-Esnault. Elle a une forme globulaire à surface hispide (rugueuse), de 3 à 8 cm de diamètre pour les spécimens de zones intertiales, et une forme sphroïdale légèrement aplatie faisant apparaître sur la face supérieure l'équivalent d'une « collerette », pour les spécimens de profondeur. Pour les deux espèces la couleur est jaune et la surface fait apparaître de très longs spicules (de1 à 3 mm) qui provoquent de fortes irritations lorsqu on saisit les éponges à mains nues.

Geodia sp. (Thl2). Cette éponge a été récoltée à 1200 m de profondeur au large de la côte Irlandaise. Elle appartient à l'Ordre des Astrophorida, famille des Geodiidae, et elle est proche des espèces *Geodia barretti*, *G. cydonium* et *G. megastrella* (Kingston *et al.,* 1979). Le nom d'espèce reste indeterminé.

Axinyssa djifferi. Cette éponge appartient à l'Ordre *Halichondrida*, famille *Halichondriidae*. Elle a été récoltée dans les eaux saumâtres de la mangrove de la règion de Djifer (sud-Sénégal) et elle vit fixée sur les racines du palétuvier *Rhizophora mangle*.

Trikentrion loeve. Cette espèce appartient à l'Ordre *Poecilosclerida*, famille des *Raspailliidae*.

Aaptos papillata : C'est une éponge de couleur rouge qui appartient à l'Ordre Hadromerida, famille des Suberitidae.

O - Etude expérimentale de la composition chimique des éponges

O-1. Extraction des lipides totaux.

Les éponges récoltées sont soigneusement lavées à l'eau de mer pour les débarrasser du sable et des autres organismes indésirables. Ces éponges sont découpées et laissées macérer dans un mélange $CHCl_3$/MeOH (1/1) pendant 2 jours. On décante la phase liquide et on laisse de nouveau macérer pendant 24 heures à température ambiante, et on les filtre pour séparer la phase liquide et les résidus, morceaux de l'éponge (Barnathan, 1993). La plupart de cette première extraction a été réalisée sur place pour les éponges de mer Rouge et de Sénégal pour des raisons de moyen de conservation et de transport.

Le mélange $CHCl_3$/MeOH (1/1) est très efficace pour récupérer la quasi-totalité des lipides(Bligh & Dyer, 1959 ; Schmid, 1973; Schmid *et al*., 1973a,b; Schmid & Hunter, 1971). Ce mélange est utilisé pour accéder aux constituants des membranes cellulaires et pour rompre diverses liaisons, la présence de méthanol dans ce mélange a un rôle protecteur des enzymes pendant l'extraction (Kates, 1986).

La phase liquide est concentrée à sec et reprise par du dichlorométhane. La phase organique est lavée plusieurs fois à l'eau pour éliminer les sels minéraux, séchée sur sulfate de sodium anhydre, puis filtrée sur un papier-filtre, puis évaporée et pesée pour obtenir les lipides totaux.

O-2. Séparation des lipides en classes

C'est une méthode pour séparer, purifier et analyser des substances en mélange (Determann, 1969). Cette méthode de séparation des classes de lipides par chromatographie d'adsorption s'effectue en phase normale et à pression atmosphérique. On utilise comme phase stationnaire la gel de silice 60 A C.C (granulométrie 40-63µm, surface massique = 550m^2/g et pH = 7)(Bobbitt *et al*., 1972).

Quatre solvants de polarité croissante, ont été utilisés successivement comme phase mobile pour la chromatographie sur colonne :

- L'hexane, solvant apolaire, entraîne les hydrocarbures, les résines, les pigments caroténoïdes, de terpènes non fonctionnalisés et tous les autres composés de polarité équivalente (lipides neutres par exemple, …).
- Le dichlorométhane est utilisé pour fractionner les terpènes fonctionnalisés, les stérols, non conventionnels et conventionnels. On peut trouver aussi d'autres lipides neutres et des acides gras libre qui sortent à la fin du fractionnement. Le passage d'un solvant à l'autre s'opère lorsque le précédent n'entraîne plus que des masses inférieures à 5 mg.
- L'acétone n'est pas un véritable solvant chromatographique mais nous l'avons utilisé pour isoler les glycolipides, les glycoconjugués et les éthers de glycérol (Kates, 1986).
- Le méthanol est en général utilisé pour récupérer les composés très polaires, en particulier les phospholipides.

Toutes les fractions obtenues à partir de la chromatographie sur colonne sont contrôlées par la chromatographie sur couche mince (CCM) en présence de témoins (cholestérol et acétate de cholestéryle).

O-3. Séparation de chaque classe de lipides

O-3,1 - Chromatographie sur couche mince préparative (CCMp).

Cette méthode de séparation est utilisée pour une purification de spots de produit visible sur la plaque CCM. Le spot des stérols de *Chalinula saudiensis* a été récupéré du mélange à l'aide de cette méthode. On utilise une plaque en verre 20x20cm contenant du gel de silice (0,5 mm d'épaisseur, sans indicateur de fluorescence). Les solvants d'élution et les réactifs utilisés dépendent de la nature de composés séparés.

L'échantillon à séparer, dissout dans un solvant de point d'ébullition entre 40 et 100°C (CH_2Cl_2 par exemple), est déposé suivant une ligne fine (0,5 à 1 mm) à 1cm d'un côté et de l'autre d'une grande plaque. Après élution, le chromatogramme est développé perpendicu-lairement à cette ligne de manière à résoudre le mélange en bandes parallèles. S'il s'agit de composés colorés, chaque bande colorée est grattée. Sinon, 1,2 cm sur un côté de la plaque chromatographique est révélé par le réactif (vanilline sulfurique), tout en protégeant le reste du chromatogramme par une grande plaque en verre pour ne pas détruire les bandes des composés qui viennent être séparées ; puis la partie détruite est chauffée doucement sur une plaque chauffante et elle sert à repérer la partie de chaque bande qu'on veut ôter sur la plaque après élution. Les poudres de chaque bande de composés récupérés sont immergées dans un solvant (CH_2Cl_2/MeOH, 80:20) de manière à libérer les produits de silices, lesquels ils étaient fixés. Ces composés sont ensuite filtrés, évaporés et pesés.

O-3.2. Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP),

Cette technique a été utilisée pour séparer les fractions D5, contenant deux terpènes majeurs (D5-3 et D5-4), de *Myrmekioderma dendyi*, ainsi les fractions acétoniques, présentant des activités biologiques, de *Stylissa carteri*. L'appareil, qui se trouve dans le laboratoire, pharmacochimie marine, de SMAB, est composé de :

- une pompe à solvants, *Gilson* 305, de pression à 100Ba
- un injecteur, à vanne Rheodyne boucle 100µL, Gilson 7125
- deux détecteurs, l'une à refractométrique (*Gilson* 132), l'autre à l'ultra violet (*Gilson* 115)
- un enregistreur , Linseis L 250, à deux vitesse de déroulement du papier (2 et 5 mm/min)

Deux colonnes analytiques, ODS-3 (250 x 4,6mm, Nucleosil 5 µm Si), ont été utilisées ; l'une est en phase normale (A-Si-8, CH_2Cl_2) et l'autre en phase inverse (A-C18-13, MeOH).

Les solvants d'élution, le débit et le solvant de solubilisation varient en fonction de types de mélange à séparer, alors que les quantités de produit injecté varient de 0,5 à 5mg.

O-4. Techniques d'analyse et d'élucidation structurale

O-4.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette méthode est utilisée pour analyser et contrôler le bon fonctionnement de la séparation et les degrés de pureté des fractions recueillies. Des plaques de gel de silice 60 en Aluminium (Alugram SIL G /UV 254) ou en plastique (0,25mm d'épaisseur, avec indicateur de fluorescence), ont été utilisées. Par contre, les solvants d'élution et les réactifs de révélation changent selon la polarité du mélange et la nature de composés (**Tableau 58**).

Tableau 58. Variations des solvants d'élution et du révélateur en fonction des composés étudiés

Composés	**Eluants**	**Révélateurs**
Hydrocabures, terpènes non fonctionnalisées, carotènes,…	Hexane/ether/AcOH (90/10/1)	Vanilline sulfurique
terpènes non fonctionnalisées Stérols,…	Hexane/ether/AcOH (50/50/1)	Vanilline sulfurique
Ethers de glycérols, …	Hexane/ether/AcOH (70/30/1)	Vanilline sulfurique
Glycolipides, Glycoconjugués, alkaloïdes,…	$CHCl_3$/MeOH/H_2O (70/18/3)	Vanilline sulfurique et orcinol

O-4.2 - Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

Il s'agit d'une combinaison de deux méthodes physiques d'investigation tels que la chromatographie en phase gazeuse (CPG) sépare d'abord les mélanges des composés ayant des temps de rétention différents, et chaque pic de composés individuels est ensuite analysés sur un spectromètre de masse à impact électronique (SMIE) ou sur un spectrométrie de masse par ionisation chimique positive (SMICP). Cette méthode a été utilisée pour la détermination de la composition des acides gras de phospholipides et celle des stérols. Nous l'avons utilisé aussi pour contrôler la pureté de la fraction D5 (**Figure** ? et ?) de *Myrmekioderma dendyi* avant et après la séparation en CLHP. Les analyses CPG/SM ont été effectués par Gilbert NOURRISSON au laboratoire de synthèse organique (LSO) à l'université de Nantes.

Caractéristiques des appareils :

CPG : - chromatographe Hewlett Packard 5890

- colonne capillaire : DB1, apolaire, longueur 30m, diamètre intérieur 0,32 mm, épaisseur de la phase liquide stationnaire à 0,25 µm
- gaz vecteur : héllum, split 1/50
- Programmation linéaire de la température dépend les mélanges analysés
- Solvant de solubilisation et d'injection : Hexane (Medina *et al*., 1994)

Spectrométrie de masse

- à impacte électronique : courant ionisation à 70 eV équipé
- par ionisation chimique positive : ammoniac comme gaz d'ionisation
- équipée d'un intégrateur HP-9000-345

O-5. Etude chimique des acides gras des phospholipides

L'étude de classes des phospholipides a été réalisée, en collaboration avec Emilie GENIN à l'aide d'une chromatographie sur couche mince haute performance (CCMHP), à l'Institut Français pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) de Nantes.

O-5.1. Acides gras des phospholipides

O-5.2.1. Préparation et conditions CPG/SM des EMAG

La trans-estérification est réalisé à partir du 50 mg des fractions méthanoliques mélangées au méthanol chlorhydrique à 5%. Ce mélange est porté à reflux pendant une heure et demie, sous garde à $CaCl_2$ (Careau & Dubacq, 1978). Après refroidissement, le mélange réactionnel est versé dans de l'eau, puis, extrait trois fois à l'hexane. La phase hexanique contenant des EMAG, est lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4, filtrée, évaporée et pesée.

Les phospholipides dans les fractions méthanoliques peuvent être saponifiés directement afin de libérer les acides gras qui seront ensuite estérifiés. Une aliquote de la fraction méthanolique (environ 100 mg) est portée au reflux pendant 2 heures dans 6 ml de la potasse alcoolique 2N (5,6 g de KOH dans 50 ml d'éthanol). Après refroidissement le mélange réactionnel est versé dans 30 ml d'eau et extrait trois fois à l'hexane. La phase hexanique est éliminée et la phase aqueuse est acidifiée avec un léger excès d'acide sulfurique à 2N. Les acides gras libérés dans cette phase aqueuse sont alors repris trois fois par l'hexane et la phase organique est ensuite lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4, filtrée et évaporée, pesée pour obtenir les acides gras. Pour obtenir les esters méthyliques 20 mg d'acides gras libres sont mis dans un petit ballon avec le mélange méthanol chlorhydrique à 2 %, ce mélange réactionnel est porté à reflux pendant 30 minutes (sous garde à $CaCl_2$). L'extraction des esters méthyliques est identique à la première méthode.

EMAG : Palier isotherme à 170°C pendant 4 minutes, puis on augmente de 3°C par minute la température jusqu'à 300°C.

O-5.2.3. Préparation et conditions CPG/SM des NAP

12 mg du mélange des esters méthyliques, 0,12 ml d'acide acétique et 1,2 ml de pyrrolidine sont portés à reflux pendant 1h, sous garde à $CaCl_2$. Après retour à la température ambiante, le mélange réactionnel est repris à l'hexane et lavé avec une solution d'acide chlorhydrique dilué (1N) puis à l'eau jusqu'à neutralité puis séchée sur Na_2SO_4 et filtrée. Le filtrat obtenu est évaporé sous pression réduite pour isoler les dérivées des pyrrolidides.

NAP : Palier isotherme à 200°C pendant 4 minutes et ensuite on augmente de 3°C par minute température de jusqu'à 310°C.

O-5.2. Etudes des stérols

Les stérols sont élués obtenues dans les fractions dichlométhanes de classes des lipides (Goad & Akihisa, 1992). Dans certaines éponges, par exemple *Stylissa carteri,* ces fractions dichlorométhane possèdent deux types de stérols ; les *nor*-A-stérols (Bohlin *et al*., 1980; Bohlin *et al*., 1981; Bohlin *et al*., 1982) et les stérols conventionnels, ainsi que des traces de pigments ou d'autres composés. Deux recristallisations successives dans le méthanol permettent d'obtenir les stérols purifiés (poudre blanche), sinon une seconde chromatographie sur colonne de silice ou sur une plaque préparative est nécessaire. Cette méthode d'isolement suffit en général pour réaliser une étude préliminaire des stérols.

O-5.2.1 Acétylation et conditions CPG/SM pour les stérols

14 mg de stérols, 1,4 ml de pyridine (catalyseur basique) et 1,4 ml d'anhydride acétique sont mélangés dans un petit ballon et on laisse agiter pendant une nuit, sous azote et à la température ambiante. Le mélange réactionnel est versé dans 30 mL d'eau et extrait trois fois avec 15 ml d'hexane. L'eau permet d'éliminer l'acide *N*-acétyl-1,2-dihydro-2-pyridylacétique (réaction secondaire obtenue par le mélange entre l'anhydride acétique et la pyridine) (Blau et Halket, 1993). La phase hexanique est lavée avec une solution diluée d'acide chlorhydrique (0,1M) enfin d'éliminer complètement l'excès de pyridine, puis à l'eau distillée jusqu'à neutralité. Elle est ensuite séchée sur Na_2SO_4, filtrée sur papier-filtre, évaporée sur le rotavapor et le mélange des acétates (poudre blanche) est pesé.

Stérols libres et acétylés

- *Nor*-A-stérols : palier isotherme à 120°C pendant 4 min, puis on augmente de 3°C par minute la température jusqu'à 300°C

- Stérols conventionnels : palier isotherme à 170°C pendant 4 min, puis on augmente de 3°C/min par minute la température jusqu'à 310°c

O-6. Etude des terpènes de *Myrmekioderma dendyi*

O-6.1. Analyse par CCM des fractions dichlorométhane :

- Plaque : en Aluminium (Alugram SIL G /UV 254) ou en plastique, silice 60 0,25 mm d'épaisseur avec inducateur de fluorescence
- Eluant : Hexane/ether/acide acétique (50/50/1)
- Révélation : vanilline sulfurique et chauffage à l'étuve (100°C)

Analyse par CPG/SM de la fraction D5, Programme linéaire de température : Palier isotherme à 170°C, puis on augmente 10°C par minute la température jusqu'à 300°C.

O-6.2. Conditions de la séparation par CLHP

- Pression : 100 Bar
- Colonne analytique : en phase inverse (A-C18-13), Inertsil ODS-3, réf° 9AI86037
  longueur : 250mm
  diamètre :4,6mm
  granulométrie : 6µm
  solvant de stockage : MeOH

-Vitesse de déroulement du papier : 5 mm/min

- Eluant :MeOH/H_2O, 80:20
- Débit :0,6 ml/min
- Solvant de solubilisation : MeOH
- Quantité injectée : 4mg

O-6.3. Spectrométrie de masse par ionisation chimique (SMIC)

Cette analyse a été réalisée par Gilbert NOURISSON, au laboratoire de synthèse organique (université de Nantes). On utilisant une colonne HP1MS (30m-0,25µ) et on injecte le produit à 120°C pendant 2min, puis augmentée la température de 15°C par minute jusqu'à 300°C.

O-6.4. Spectrométrie de masse à haute résolution (SMHR)

La détermination de masses molaires exactes de D5-3 et D5-4 de *Myrmekioderma dendyi*, obtenues par la CLHP, a été réalisée par le Pr. Guénot au Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest (CRMPO) à l'Université de Rennes 1.

Condition d'analyse :

-Solvant : $CH_3OH/CHCl_3$ (50/50)

-Résolution : 8000 FL
-Accélération : 4,5kV
-Température : 200°c
-Mode d'ionisation : positif
-Adduits : $[M+Na]^+$

O-6.5. Analyse des terpènes par infrarouge

Le spectrographe IR utilisé provient du module spectromètre infrarouge du couplage CPG/IR-TF du Laboratoire de Chimie Marine (LCM)-SMAB de Nantes. Il s'agit d'un appareil Perkin-Elmer IR 2000.

« light pipe » cellule à gaz pour infra-rouge :

- longueur 160mm, température 293°C ;
- Détecteur :4000-600cm-1, refroidi à l'azote liquide ;
- Résolution : $8cm^{-1}$;
- Nombre d'accumulations : 16
- Temps d'accumulation : 2s.

O-6.6. Analyse par RMN

La dernière étape d'étude chimique d'analyses structurales des composés actifs est l'identification des produits actifs. La RMN est donc incontournable pour les chimistes et les biochimistes. Il existe différentes techniques de RMN telles que :

- La RMN monodimensionnelle qui est composée de la RMN ^1H, la RMN ^{13}C et la DEPT 135 (Distortionless Enchancement Polarisation Transfer). Les deux premières RMN permettent déjà de déterminer la structure d'un composé simple en comparant les déplacements chimiques théoriques (tableaux des valeurs) et pratiques (spectres RMN) de ^1H ou de ^{13}C, tandis que la dernière distingue les signaux entre les groupes CH,CH_3 (signaux positifs) et le groupe CH_2 (signal négatif). Par contre, un composé possédant des structures compliquées, on fait recours à la RMN bidimensionnelle.
- La RMN bidimensionnelle est un complément d'étude structurale de la RMN monodimensionnelle puisqu'elle permet de déterminer les couplages homonucléaires (couplages entre proton-proton et carbone-carbone) ou hétéronucléaire (couplage entre proton-carbone, HMQC).

Les analyses par RMN ont été réalisées, sur un spectromètre Bruker à 300 MHz dans chloroforme deutéré, au laboratoire de synthèse organique (Université de Nantes).

O-6.7. - Détermination du pouvoir rotatoire

Cette mesure a été faite sur le polarimètre Perkin-Elmer 241-MC, d'absorption sodique à la température ambiante, du laboratoire de synthèse organique (Université de Nantes). Elle a été mesurée à partir de la formule

$[\alpha]_D = 100 \times \alpha / (l \times c)$ (α est la valeur de l'angle de rotation mesuré ; l est la longueur de mesure, c est la concentration de la solution).

P - Tests de neurotoxicité sur les larves de diptères

Actuellement, un certain nombre de maladies sont liés aux troubles de l'excitabilité neuronale (exemple canalopathies) et de nombreuses autres maladies, comme les douleurs neuropathiques (spontanées ou associées aux opérations, cancers, zonas, etc…), neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), les troubles psychiques (schizophrénie) ou neurologiques (épilepsie) sont aussi liés à un dérèglement du système nerveux central. Les recherches qui ont été menées sur les notions d'électrophysiologie ont montré que les canaux ioniques ont un rôle primordial dans la fonction

cellulaire, d'où l'utilité de trouver des produits actifs sur les canaux ioniques neuronaux permettant de mieux connaître les mécanismes des fonctions nerveuses (excitabilité, libération de neurotransmetteurs, canaux ioniques,…etc).

Les larves de diptères utilisées appartiennent à l'espèce *Phormia terrae novae* (Cyloraphes) et sont au stade larvaire III, juste avant le stade imago permettant la métamorphose en pupe ou en nymphe.

2,8 mg de produit est solubilisé dans 7µL d'une solution aqueuse de diméthylsulfoxide (DMSO) à 15 %, puis le mélange obtenu, soit 400g/L, est injecté dans une larve de poids moyen de 70 mg (déterminé sur 10 à 20 larves), dont elle provient des magasins de pêche et se conserve à 4°C pendant 10 jours maximum. Si le poids moyen de larves est inférieur à 70 mg, dans ce cas, on procède au premier test à raison de 1µl d'injection (soit 100 µg de produit dans 1µL d'une solution aqueuse de DMSO à 15 %) pour une larve de 10 mg. L'extrait est ensuite dilué plusieurs fois au demi jusqu'à déterminer la dose minimale induisant une réponse positive (paralysie totale), des doses encore plus faibles entraînant une immobilisation partielle voire aucune immobilisation. Chaque concentration est testée sur trois larves au minimum.

L'injection du produit est réalisée, par Madame Marie-Claude BOUMARD au laboratoire de toxicologie (SMAB), à l'aide d'une micro-seringue de précision équipée d'une aiguille hypodermique biseautée. L'aiguille est insérée au niveau du dernier segment abdominal de l'animal face dorsal. L'injection est considérée comme réussie si la larve est toujours mobile au bout de l'aiguille. Le chronomètre est déclenché dès la fin de l'injection et le délai d'apparition des symptômes est noté.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A l'issue de ce travail nous pouvons dresser un bilan rapide des résultats obtenus et évoquer quelques-unes des perspectives qu'ils offrent.

Les phospholipides des neuf éponges étudiées dans cette thèse : *Stylissa carteri*, *Chalinula saudiensis*, *Cinachyrella alloclada*, et *Cinachyrella kükenthali*, de la mer Rouge ; *Myrmekioderma dendyi* du Pacifique sud ; *Geodia* sp., de l'Alantique nord ; *Axinyssa djifferi* et *Trikentrion laeve* de l'Atlantique tropical (Sénégal) ; *Aaptos papillata*, de Méditerranée ont pratiquement toutes conduit à de nouveaux acides gras et dans la plupart des cas les compositions en acides gras présentent des originalités notables.

Myrmekioderma dendyi a permis de caractériser 5 nouveaux acides dont deux acides démospongiques diinsaturés 5,9 et des acides ramifiés rares comme le 8,8-Me_2-16:0. Près de la moitié des acides gras sont des insaturés à longues chaînes (> 23C) et 34% de la fraction acide est constituée de diinsaturés 5,9.

Les éponges de mer Rouge ont également conduit à des résultats intéressants. Les acides gras de *Stylissa carteri* qu'elle provienne de la partie centrale ou de l'extrémité sud de la mer Rouge font apparaître de très fortes teneurs en acides insaturés (de 64 à 72 %) dont la majorité d'entre eux sont diinsaturés 5,9. Ces éponges ayant été récoltées à faible profondeur elles contiennent toutes des acides isoprèniques comme l'acide phytanique qui caractérisent des associations avec des organismes photosynthétiques. La présence d'acides ramifiés à nombre impair de carbone montre également que ces éponges hébergent de nombreuses bactéries, à l'exception toutefois de *Chalinula saudiensis* qui se distingue nettement des autres éponges récoltées dans les parages de Djeddah par une très faible teneur en acides diinsaturés 5,9 (environ 6%), mais qui se caractérise par la découverte d'un nouvel acide acétylénique trisubstitué qui pourrait être le premier exemple connu à

ce jour. Les acides gras des deux espèces du genre *Cinachyrella* se caractérisent par de faibles teneurs en acides insaturés (moins de 30%) mais par une remarquable diversité d'acides diinsaturés 5,9 (18 acides dont 2 bromés mais leurs teneurs cumulées ne soit que d'environ 12%) permettent de faire d'intéressantes comparaisons avec celles qui ont été récoltées au Sénégal et en Nouvelle-calédonie, comparaison qui ont déjà fait l'objet d'une publication internationale annexée à cette thèse.

L'éponge profonde de l'Atlantique nord, Geodia sp. nous parait exceptionnelle par l'apparente ambiguïté présentée par sa composition en acides gras et en stérols. Si la quasi-totalité des acides gras sont des acides saturés dont la plupart sont d'origine bactérienne (la fraction AG saturés représente plus de 88% du total), ce qui est conforme à ce que l'on pouvait attendre, il n'en est plus de même avec les stérols qui sont constitués à plus de 75 % des deux stérols « végétaux » le fucostérol et l'isofucostérol. La biosynthèse de ces stérols en milieu totalement aphotique reste mystérieuse à moins qu'ils ne proviennent de la voie non mévalonique, ce qui reste à prouver dans le domaine des stérols.

Les deux éponges de l'Atlantique tropical (Sénégal) font également apparaître d'intéressantes perspectives. *Axinyssa djiferi* qui est à notre connaissance la seule éponge connue vivant sur un substrat végétal contient plus de 56% du seul 5,9-26:2, au demeurant bien connu mais pas encore à cette teneur. La dispersion de cette éponge dans le delta saumâtre du Siné-Saloum, de l'embouchure vers l'intérieur, pourrait conduire à d'intéressants développements concernant l'influence de la salinité sur la production lipidique car les observations actuelles montrent que cette espèce ne se trouvent ni en bordure de l'océan où l'eau est sans doute trop salée, ni dans les profondeurs du delta ou les canaux ne sont probablement plus assez salés. L'espèce *Trikentrion laeve*, quant à elle, semble très sensible aux variations de température, en particulier pour les acides Δ5,9, bien que son biotope soit très localisé dans l'espace (quelques roches du large à une profondeur moyenne de 38 mètres). Cette espèce se caractérise également par une très forte teneur en acides insaturés (plus de 70%)

L'espèce méditerranéenne, enfin, *Aaptos papillata* montre une grande variété d'acides Δ5,9 (9 sur un total de 22) avec une teneur exceptionnelle de 43% pour le seul 5,9,19-28:3. La présence de cet acide et de ses précurseurs probables de la série (n-9) comme le 17-26:1 présent à 13% et le 4,17-26:2 (2%) ouvre la voie à d'intéressantes questions de biosynthèse.

Concernant les stérols la voie est également ouverte pour de nombreux développements. La présence de nombreux *nor*-A stérols dans *Stylissa carteri* montre que le reclassement de cette espèce ne l'a pas « éloigné » du genre *Acanthella* ou des autres genres de l'ancienne famille des Axinellidae qui sont connues pour lproduire ce type de stérols. La mise en évidence de *nor*-A stérols dans *Aaptos papillata* est remarquable dans la mesure où c'est la première observation de tels stérols dans une éponge suberitidae et des recherches plus systématiques au sein de cette famille devraient être entreprises pour vérifier s'il s'agit d'un cas isolé. Le critère chimiotaxonomique de la présence massive de stanols dans les suberitidae, à nouveau vérifié pour *Aaptos papillata*, montre en tous cas qu'il s'agit bien d'une éponge appartenant à cette famille.

La mise en évidence de l'hydroxyturmérone et d'un produit de dégradation de cette dernière dans *Myrmekioderma dendyi* est intéressante dans la mesure où ce sesquiterpène (la turmérone) n'était encore connu que dans l'essence de Curcuma. La présence d'une fonction phénol et la quantité élevée de ces dérivés dans l'éponge permettent de supposer qu'ils ont un rôle défensif vis à vis des bactéries marines du Pacifique sud. La mise en évidence d'une certaine activité neurologique du produit de dégradation en C-12 fait actuellement l'objet de recherches complémentaires.

Nous espérons ainsi que ce premier travail va pouvoir « ouvrir » quelques nouvelles pistes dans le domaine des lipides d'éponges.

BIBLIOGRAPHIE

Ackman R.G. (1989). Fatty acids *in « marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils»*, R.G. Ackman Ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, p. 103-137.

Aguilar-Martinez M., Liaeen-Jensen S. (1974). Animal carotenoids. 9. Trikentriorhodin. *Acta Chem. Scand*., **B28** : 1247-1248.

Aiello A., Fattorusso E., Menna, M. (1999). Steroids from sponges : recent reports. *Steroids*, **64** : 687-714.

Aknin M., Miralles J., Kornprobst J.M., Faure R., Gaydou E.M., Boury-Esnault N., Kato Y., Clardy J. (1990). Trikentramine, an unusual pyrrole derivative from the sponge *Trikentrion loeve* Carter. *Tetrahedron Lett*., **31** : 2979-2982.

Aknin M., Gaydou E.M., Boury-Esnault N., Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A. (1996). Nor-sterols in *Axinella proliferans*, sponge from the Indian Ocean. *Comp. Biochem. Physiol*., **113B** : 845-848.

Alvarez B. (1998). The phylogenetic relationships of the family Axinellidae (Porifera : Demospongiae). PhD. Thesis (Australian National University : Canberra).

Alvarez B., Crisp M.D., Driver F., Hooper J.N.A., Van Soest R.W.M. (2000a). The phylogenetics relationships of the family Axinellidae (Porifera : Demospongiae) using morphological and molecular data. *Zool. Scripta*, **29** : 169-198.

Alvarez B., Miller K., Battershill C., Northcote P. (2000b). Discovering sponge species – the new way. *Water and Atmosphere*, NIWA, **8** : 7-9.

Andersson B.A., Holman R.T. (1974). Pyrrolidides for mass spectrometry determination of the position of the double bond in monounsaturated fatty acids, *Lipids*, **9** :185-190.

Andersson B.A., Holman R.T. (1975). Mass spectrometric localization of methyl branching in fatty acids using acylpyrrolidines, *Lipids*, **10** :716-718.

Andersson B.A., Heimermann W.H., Holman R.T. (1974). Comparison of pyrrolidides with other amides for mass spectral determinations of structure of unsaturated fatty acids, *Lipids*, **9** :443-449.

Andersson B.A., Christie W.W., Holman R.T. (1975). Mass spectrometric determination of positions of double bonds in polyunsaturated fatty acids pyrrolidides, *Lipids*, **10** : 215-219.

Angerhofer C.K., Pezzuto J.M., König G.M., Wright A.D., Sticher O. (1992). Antimalarial activity of sesquiterpenes from the marine sponge *Acanthella klethra*. *J. Nat. Prod*., **55** : 787-1789.

Aoki S., Higuchi K., Kato A., Murakami N., Kobayashi M. (1999). Myrmekiosides A and B, novel mono-*O*-alkyl-diglycosylglycerols reversing tumor cell morphology of ras-transformed cells from a marine sponge of *Myrmekioderma* sp. *Tetrahedron*, **49** : 14865-14870.

Aratanechemuge Y., Komiya T., Moteki H., Katsuzaki H., Imai K., Hibasami H. (2002). Selective indiction of apoptosis by ar-turmenone isolated from tumeric (*Curcuma longa* L) in two human leukemia cell lines, but not in human stomach cancer cell line. *Intern. J. Mol. Med.*, **9**, 481-484.

Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P. (1995). *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*, 4è éd., Masson, Paris.

Ayanoglu E., Walkup R.D., Sica D., Djerassi C. (1982). Phospholipid studies of marine organisms : III. New phospholipid fatty acids from *Petrosia ficiformis*. *Lipids*, **17** : 617-625.

Ayanoglu E., Kornprobst J.M., Aboud-Bichara A., Djerassi C. (1983a). Phospholipid studies of marine organisms 4. (2*R*,21*Z*)-2-methoxy-21-octacosenoic acid, the first naturally occurring α-methoxy acid from a phospholipid. *Tetrahedron Lett*., **24** : 1111-1114.

Ayanoglu E., Popov S., Kornprobst J.M., Aboud-Bichara A., Djerassi C. (1983b). Phospho-lipid Studies of Marine Organisms: V. New α-methoxy acids from *Higginsia tethyoides*. *Lipids*, **18** : 830-836.

Ayanoglu E., Kurtz K., Kornprobst J.M., Djerassi C. (1985). New natural 2-acetoxy fatty acids using chemical ionization and electron impact mass spectrometry. *Lipids*, **20** : 141-144.

Ayanoglu E., Li H., Djerassi C., Duzgunes N. (1988). Unusual sponge phospholipids and their analogs. Synthesis and interactions with conventional phospholipids ans cholesterol in model membranes, *Chem. Phys. Lipids*, **47** : 165-175.

Ayanoglu E., Rizzolio M., Beaulieu S., Roberts B., Oz O., Djerassi C. (1990). Covalently bound fatty acids in membrane proteins of some sponges. *Comp. Biochem. Physiol*., **96B** : 597-603.

Baker B.J., Kerr R.G. (1993). Biosynthesis of marine sterols, *in: Marine Natural Products – Diversity and Biosynthesis*, *Topics in Current Chemistry*, **167**, Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-32.

Baker J.T., Wells R.J., Oberhänsli W.E., Hawes G.B. (1976). A new diisocyanide of novel ring structure from a sponge. *J. Am. Chem. Soc*., **98** : 4010-4012.

Barnathan G. (1993). Acides gras et stérols d'éponges marines du Sénégal et de Nouvelle-Calédonie, Thèse de Doctorat, Université de Nantes.

Barnathan G., Kornprobst, J.M. (1992).Sponge fatty acids-2. Identification of three new C30 fatty acids in the marine sponge *Trikentrion loeve* Carter. *Nat. Prod. Lett*., **1**, 201-207.

Barnathan G., Kornprobst J.M. (1998a). Isoprenoid fatty acids in sponge phospholipids. A review. *Recent Res. Develop. Lipids Res*., **2** : 235-248.

Barnathan G.,Kornprobst J.M. (1998b). Fatty acids from marine organisms: recent research developments. In: Baudimant G., Guezennec J., Roy P., Samain J.F. (Eds.), *Marine Lipids*. IFREMER Press, Brest, France, pp.35-43.

Barnathan G., Mirallès J., Gaydou E.M., Boury-Esnault N., Kornprobst J.-M. (1992). New Phospholipid fatty acids from the Marine Sponge *Cinachyrella alloclada* Uliczka. *Lipids*. **27** : 779-784.

Barnathan G., Mirallès J., Kornprobst J-M. (1993a). Sponge fatty acids – 4. Co-occurrence of two isoprenoid fatty acids (4,8,12-trimethyltridecanoic and 5,9,13-trimethyl-tetradecanoic) in phospholipids of marine sponges from the genus *Cinachyrella*. *Nat. Prod. Letters*., **3** : 113-118.

Barnathan G., Kornprobst J.M., Doumenq P., Mirallès J., Boury-Esnault N. (1993b). Sponge fatty acids. 5. Characterization of complete series of 2-hydroxy long-chain fatty acids in phospholipids of two Senegalese marine sponges from the family Suberitidae: *Pseudosuberites* sp. and *Suberites massa*. *J. Nat. Prod.,* **56** : 2104-2113.

Barnathan G., Doumenq P., Njinkoué J.M., Mirallès J., Debitus C., Lévi C., Kornprobst J.M., (1994). Sponge fatty acids. 3. Occurrence of series of n-7 monoenoic and *iso*-5,9 dienoic long-chain fatty acids in the phospholipids of the marine sponge *Cinachyrella* aff. *schulzei* Keller. *Lipids,* **29** : 297-303.

Barnathan G., Kornprobst J.M., Doumenq P., Mirallès J. (1996). New unsaturated long-chain fatty acids in the phospholipids from the Axinellida sponges *Trikentrion loeve* and *Pseudaxinella* cf. *Lunaecharta*. *Lipids,* **31** : 193-200.

Barnathan G., Genin, E., Velosaotsy, N.E., Kornprobst, J.M., Al-Lihaibi, S., Al-Sofyani, A., Nongonierma, R. (2003). Phospholipid fatty acids and sterols of two *Cinachyrella* sponges from Saudi Arabia Red Sea : comparison with *Cinachyrella* species from other origins. *Comp. Biochem. Physiol*., **135B** : 297-308.

Barnathan G., Velosaotsy N.E., Al-Lihaibi S., Njinkoué J.M., Kornprobst J.M., Vacelet, J., Boury-Esnault N. (2004). Unusual sterol composition and classification of three marine sponge families. *Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova*, **68** : 201-208.

Barrow C.J., Blunt J.W., Munro M.H.G. (1988). Sesquiterpenes from a New Zealand sponge of the genus *Eurypon*. *Aust. J. Chem.*, **41** : 1755-1761.

Bergmann W. (1949). Comparative biochemical studies on the lipids of marine invertebrates, with special reference to the sterols. *J. Mar. Res.*, **8** : 137-176.

Bergmann W. (1962). Sterols : Their structure and distribution, *in : Comparative Biochemistry*, Eds. Florkin M. and Mason H.S., Academic Press, New York, **3** : 103.

Bergmann W., Feeney R.J. (1949). Contribution to the study of marine products. XXIII. Sterols from sponges of the family Haliclonidae. *J. Og. Chem.*, **14** : 1078-1084.

Bergquist P.R. (1978). Sponges, Hutchinson University Library, London. a - The basic sponge : its organization and operation, p. 84-98 ; b- The sponge skeleton, p. 136-180 ; c- Sponge classification, p. 136-180 ; d- Sponge biochemistry, p. 202-216.

Biard J-F. (2004). « Les médicaments de la mer : l'actualité ». *Pathologie Biologie*, **52** : 1-3.

Bibolino L., Minale L., Sodano G. (1978). Investigations on the ring contraction step in the biosynthesis of A-*nor*-stanols by the marine sponge *Axinella verrucosa*. *J. C. S. Chem. Com.*, 524-525.

Blackburn C.L., Hopmann C., Sakowicz R., Berdelis M.S., Goldstein L.S.B., Faulkner D.J. (1999). Adociasulfates 1-6, inhibitors of kinesin motor proteins from the sponge *Haliclona* (aka *Adocia*) sp. *J. Org. Chem.*, **64** : 5565-5570.

Blau K., Halket J. (1993). *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Second Edition, John Wiley & Sons, London, UK.

Bligh E.G., Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37** : 911-917.

Blunden G. (2001), Biologically active compounds from marine organisms. *Phytother. Res.*, **15** : 89-94.

Blunt J.W., Munro M.G.H. (2004). Base de données MarinLit, contact : j.blunt@chem.canterbury.ac.nz

Bobbie R.J., White D. (1980). Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters, *Appl. Environ. Microbiol.*, **39** : 1212-1222.

Bobbitt J.M., Schwarting A.E., Gritter R.J. (1972). *Introduction à la chromatographie,* Gauthier-Villars, Paris.

Bochar D.A., Friesen J.A., Stauffacher C.V., Rodwell V.W. (1999). Biosynthesis of mevalonic acid from acetyl-CoA, *in: Comprehensive Natural Products Chemistry*, D.H. Barton, K. Nakanishi, Eds., Elsevier, Vol. 2, 15-44.

Böhlin L., Gehrken H., Scheuer P.J., Djerassi C. (1980). Minor and trace sterols in marine invertebrates. XVI. Hydroxymethyl-A-*nor*-5α-gorgostane, a novel sterol from the sponge *Stylotella agminata*. *Steroids*, **35** : 295-304.

Böhlin L., Sjöstrand U., Djerassi C., Sullivan C. (1981). Minor and trace sterols in marine invertebrates. Part 20. 2ξ-Hydroxymethyl-A-nor-patinosterol and 3ξ-hydroxy-A-*nor*-dinosterol. Two new sterols with modified nucleus and side chain from the sponge *Teichaxinella morchella*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1023-1028.

Böhlin L., Sjöstrand U., Sodano G., Djerassi C. (1982). Sterols in marine invertebrates. 33. Structure of five new 3β-(hydroxymethyl)-A-*nor*-sterane: indirect evidence for transformation of dietary precursors in sponges. *J. Org. Chem.*, **47** : 5309-5314.

Bonini C., Kinnel R.B., Li M., Scheuer P.J., Djerassi C. (1983). Minor and trace sterols in marine inverebrates 38 : Isolation, structure elucidation and partial synthesis of papakusterol, a new biosynthetically unusual marine sterol with a cyclopropyl-containing side chain. *Tetrahedron Lett.*, **24** : 277-280.

Bongiorni L., Pietra F. (1996). Marine natural products for industrial applications. *Chemistry & Industry*, 54-58.

Bourguet-Kondracki M.L., Kornprobst J.M. (2005). Some current trends in marine pharmacology *in : Marine Biotechnology*, Y.Le Gal & R.Ulber, Eds., Series "Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology", Springer-Verlag, Heidelberg, sous presse.

Boury-Esnault N. Marschal C. Kornprobst J-M. Barnathan. G. (2002). A new species of *Axinyssa* Lendenfeld, 1897 (Porifera, Demospongiae, Halichondrida) from the Senegalese coast. *Zootaxa*, **117** : 1-8.

Bretscher M. (1988). Les molécules de la membrane cellulaire, *in : Les molécules de la vie*, E. Sakiz, Ed., Librairie « Pour la Science », Belin, Paris, pp. 62-71.

Brooks C.J.W., Knights B.A., Sucrow W., Raüchel B. (1972).The characterisation of 24-ethylidene-sterols. *Steroids*, **20** : 487-497.

Brusca R.C., Brusca G.J. (2002). *Invertebrates*, Sinauer Associates Inc., Publishers, 936 pages. Le Chapitre 6 (pp. 179-208) est consacré aux éponges dont le nombre d'espèces est estimé à 5500.

Butler M.S., Capon R.J., Nadeson R., Beveridge A.A. (1991). Aromatic bisabolenes from an Australian marine sponge, *Arenochalina* sp. *J. Nat. Prod*., **54** : 619-623.

Cafieri F., Fattorusso E., Magno S., Santacroce C., Sica D. (1973). Isolation and structure of axisonitrile and axisothiocyanate ; two unusual sesquiterpenoids from the marine sponge *Axinella cannabina*. *Tetrahedron*, **29** : 4259-4262.

Capon R.J., MacLeod J.K., Scammels P.J. (1986). The trikentrins : novel indoles from the sponge *Trikentrion flabelliforme*. *Tetrahedron*, **42** : 6545-6550.

Capon R.J., Rochfort S.J., Ovenden S.P.B., Metzger R.P. (1998). Mycaperoxides F and G and a related norterpene ketone from Southern Australian marine sponges, *Mycale* species. *J. Nat. Prod*., **61** : 525-528.

Capon R.J., Miller M., Rooney F. (2000). Clathrins A-C : metabolites from a Southern Australian marine sponge, *Clathria* sp. *J. Nat. Prod*., **63** : 821-824.

Carballeira N.M., (1997). *Recent Res. Develop Lipid Res*., **1** : 9-17.

Carballeira N.M. (2002). New advances in the chemistry of methoxylated lipids. *Prog. Lipid Res*., **41** : 437-456.

Carballeira N.M., Alicea J. (2001). The first naturally occurring α-methoxylated branched-chain fatty acids from the phospholipids of *Amphimedon complanata*. *Lipids*, **36** : 83-87.

Carballeira N.M., Alicea J. (2002). Novel methoxylated fatty acids from the Caribbean sponge *Spheciospongia cuspidifera*. *Lipids*, **37** : 305-308.

Carballeira N.M., Cruz C. (1998). 5,9-nonadecadienoic acids in *Malvaviscus arboreus* and *Allamanda cathartica*. *Phytochemistry*, **49** : 1253-1256.

Carballeira N.M., Emiliano A.J. (1993). Novel brominated phospholipid fatty acids from the Caribbean sponge *Agelas* sp. *Lipids*, **28** : 763-766.

Carballeira N.M., Lopez M.R. (1989). On the isolation of 2-hydroxydocosanoic and 2-hydroxytricosanoic acids from the marine sponge *Amphimedon compressa*. *Lipids,* **24** : 89-91.

Carballeira N.M., Maldonado L. (1986). Identification of 5,9-hexadecadienoic acid in marine sponge *Chondrilla nucula*, *Lipids*, **21** : 470-471.

Carballeira N.M., Maldonado L. (1988). The phospholipid fatty acids of the marine sponge *Xestospongia muta*. *Lipids*, **23** : 682-684.

Carballeira N.M., Maldonado M.E. (1989a). On the isolation of the new fatty acid 6,11-eicosadienoic (20:2) and related 6,11-dienoic acids from the sponge *Euryspongia rosea*. *Lipids*, **24** : 665-668.

Carballeira N.M., Maldonado M.E. (1989b). New phospholipid fatty acids from the Caribbean sponge *Ectyoplasia ferox*. *Lipids,* **24** : 371-374.

Carballeira N.M., Medina J.R. (1994). New $\Delta^{5,9}$ Fatty Acids in the Phospholipids of the sea anemone *Stoichactis helianthus*. *J. Nat. Prod.*, **57** : 1688-1695.

Carballeira N.M., Negron V. (1991). Identification and characterization of two new methyl-icosadienoic acids from *Erylus formosus*. *J. Nat. Prod.,* **54** : 305-309.

Carballeira N.M., Pagán M. (2000). Identification and total synthesis of a novel dimethylated fatty acid from the Caribbean sponge *Calyx podatypa*. *J. Nat. Prod*. **63** : 666-669.
Carballeira N.M., Pagán M. (2001). New methoxylated fatty acids from the Caribbean sponge *Callyspongia fallax*. *J. Nat. Prod*., **64** : 620-623.
Carballeira N.M., Reyes E.D. (1990a). Novel very long chain fatty acids from the sponge *Petrosia pellasarca*. *J. Nat. Prod.,* **53** : 836-840.
Carballeira N.M., Reyes E.D. (1990b). Identification of the new 23-méthyl-5,9-pentacosadiènoic Acid in the Sponge *Cribrochalina vasculum*. *Lipids*, **25** : 69-71.
Carballeira N.M., Reyes M. (1995). Identification of a new 6-bromo-eicosadienoic acid from the anemone *Condylactis gigantea* and *Palythoa caribaorum*, *J. Nat. Prod*., **58** : 1689-1694.
Carballeira N.M., Restituyo J. (1991). Identification of the new 11,15-icosadienoic acid and related acids in the sponge *Amphimedon complanata*. *J. Nat. Prod*., **54** : 315-317.
Carballeira N.M., Sepulveda J.A. (1992). Two novel naturally occurring α-methoxy acids from the phospholipids of two Caribbean sponges. *Lipids*, **27** : 72-74.
Carballeira N.M., Shalabi F. (1989). On the sterol composition of the marine sponge *Verongula gigantea*. A comparative study of the Verongidae. *Biochem. Syst. Ecol*., **17** : 315-317.
Carballeira N.M., Shalabi F.(1990). Identification of naturally occurring *trans, trans* Δ5,9 fatty acids from the sponge *Plakortis halichondroides*. *Lipids*, **25** : 835-840.
Carballeira N.M., Shalabi F.(1993). Novel brominated phospholipid fatty acids from the Caribbean sponge *Petrosia* sp. *J. Nat. Prod*., **56** : 739-747.
Carballeira N.M., Shalabi F. (1994). Unusual lipids in the Caribbean sponges *Amphimedon viridis* and *Desmapsamma anchorata*, *J. Nat. Prod*., **57**: 1152-1159.
Carballeira N.M., Thompson J.E., Ayanoglu E., Djerassi C. (1986). Biosynthetic studies of marine lipids. 5. The biosynthesis of long-chain branched fatty acids in marine sponges. *J. Org. Chem.*, **51** : 2751-2756.
Carballeira N.M., Maldonado L., Porras B. (1987). Isoprenoid fatty acids from marine sponges. Are sponges selective ? *Lipids,* **22** : 767-769.
Carballeira N.M., Shalabi F., Negron V. (1989). 2-Hydroxy fatty acids from marine sponges 2. The phospholipid fatty acids of the Caribbean sponges *Verongula gigantea* and *Aplysina archeri*. *Lipids,* **24** : 229-232.
Carballeira N.M., Shalabi F., Cruz C., Rodriguez J., Rodriguez E. (1991). Comparative study of the fatty acid composition of sponges of the genus *Ircinia.* Identification of the new 23-methyl-5,9-tetracosadienoic acid. *Comp. Biochem. Physiol.,* **100B** : 489-492.
Carballeira N.M., Negron V., Reyes E. (1992a). Novel naturally occurring α-methoxy acids from the phospholipids of Caribbean sponges. *Tetrahedron*, **48** : 1053-1058.
Carballeira N.M., Negron V., Reyes E. (1992b). Novel monounsaturated fatty acids from the sponges *Amphimedon compressa* and *Mycale laevis*. *J. Nat. Prod.,* **55** : 333-339.
Carballeira N.M., Reyes E. and Shalabi F. (1993). Identification of novel *iso/anteiso* nonacosadienoic acids from the phospholipids of the sponges *Chondrosia reniformis* and *Myrmekioderma styx*. *J. Nat. Prod.,* **56** : 1850-1855.
Carballeira N.M., Shalabi F., Reyes M. (1994). New 2-hydroxy fatty acids in the Caribbean urchin *Tripneustes esculentus*. *J. Nat. Prod*., **57** : 614-619.
Carballeira N.M., Reyes E.D., Sostre A., Rodriguez A.D., Rodriguez J.L., Gonzales F.A. (1997). Identification of the novel antimicrobial fatty acid (5Z,9Z)-14-methyl-5,9-pentadecadienoicacid in *Eunicea succinea*. *J. Nat. Prod*., **60** : 502-504.
Carballeira N.M., Pagan M., Rodriguez A.D. (1998a). Identification and total synthesis of novel fatty acids from the Caribbean sponge *Calyx podatypa*. *J. Nat. Prod.*, **61** : 1049-1052.
Carballeira N.M., Colon R., Emiliano A.J. (1998b). Identification of 2-methoxyhexadecanoic acid in *Amphimedon compressa*. *J. Nat. Prod*., **61** : 675-676.
Carballeira N.M., Gimenez L., Orellano E.A., Gonzales F. (2003a). Abstracts of Papers, 225th National Meeting, New Orleans, LA, USA.

Carballeira N.M., Cruz H., Orellano E.A., Gonzalez F.A. (2003b). The first total synthesis of the marine fatty acid (±)-2-methoxy-13-methyltetradecanoic acid : a cytotoxic fatty acid to leukemia cells, *Chem. Phys. Lipids*, **126** : 149-153.

Carballeira N.M., Sanabria D., Ayala N.L., Cruz C. (2004). A stereoselective synthesis for the (5*Z*,9*Z*)-14-methyl-5,9-pentadecadienoic acid an dits monounsaturated analog (*Z*)-14-methyl-9-pentadecenoic acid, *Tetrahedron Lett*., **45** : 3761-3763.

Carmely S., Kashman Y. (1983). The sipholanes : a novel group of triterpenes from the marine sponge *Siphonochalina siphonella*. *J. Org. Chem*., **48** : 3517-3525.

Carreau J.P., Dubac J.P. (1978). Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts. *J. Chromatogr*., **151** : 384-390.

Carrier D.J., Cunningham J.E., Hogge L.R., Taylor D.C., Dunstan D.I. (1995). Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of some fatty acids from white and interior spruce. *J. Chromatogr.,* **A 715** : 317-324.

Cassidy M.P., Ghisalberti E.L. (1993). New terpene hydrocarbons from the sponge *Higginsia* sp. *J. Nat. Prod*., **56** : 1190-1193.

Catalan C.A.N., Thompson J.E., Kokke W.C.M.C. and Djerassi C. (1985). Biosynthetic studies of marine lipids–3[1]. Experimental demonstration of the course of side chain extension in marine sterols, *Tetrahedron*, **41** : 1073-1084.

Cerqueira F., Watanadilok R., Sonchaeng P., Kijjoa A., Pinto M, van Ufford H.Q., Kroes B., Beukelman C., Nascimento M.S.J. (2003). Clionasterol : a potent inhibitor of complement component C1. *Planta Medica*, **69** : 171-174.

Chang C.W.J., Scheuer P.J. (1993). Marine isocyano compounds, *in: Marine Natural Products – Diversity and Biosynthesis*, *Topics in Current Chemistry*, **167**, Springer-Verlag, pp. 33-75.

Chang C.W.J., Patra A., Roll D.M., Scheuer P.J., Matsumoto G.K., Clardy J. (1984). Kalihinol-A ; a highly funtionalized diisocyano diterpenoid antibiotic from a sponge, *Acanthella* sp. *J. Am. Chem. Soc*., **106** : 4644-4646.

Chang C.W.J., Patra A., Baker J.A., Scheuer P.J. (1987). Kalihinols, multifunctional diterpenoid antibiotics from marine sponges *Acanthella* spp. *J. Am. Chem. Soc*., **109** : 6119-6123.

Chen C., Shen Y., Chen Y., Sheu J., Duh C. (1999). Bioactive sesquiterpenes from a Taiwanese marine sponge *Parahigginsia* sp. *J. Nat. Prod*., **62** : 573-576.

Cho J.-H., Djerassi C. (1987). Sterols in marine invertebrates. Part 57. Stereostructure, synthesis, and acid-catalysed isomerization of hebesterol-A biosynthetically significant cyclopropyl-containing marine sterol. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **I**, 1307-1318.

Chombard C., Boury-Esnault N. (1999). Good congruence between morphology and molecular phylogeny of Hadromerida, or how to bother sponge taxonomists ? *Memoirs of the Queensland Museum*, **44** : 100.

Christie W.W. (1988). Equivalent chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gaz chromatography. *J. Chromatog.*, **447** : 305-314.

Christie W.W. (1989). *Gas chromatography and lipids – A pratical guide*. The oily Press, Ayr, Scotland

Christie W.W. (2004). Lipid Analysis - Mass spectra of derivatives of acetylenic fatty acids, 13 p., http://www.lipidlibrary.co.uk/ms/ms22/

Christie W.W., Brechany E.Y., Stefanov K., Popov S. (1992). The fatty acids of the sponge *Hymeniacidon sanguinea* from the Black Sea. *Comp. Biochem. Physiol.,* **109 B** : 245-252.

Christie W.W., Brechany E.Y., Marekov, I.N., Stefanov K., Andreev, S.N. (1994). The fatty acids of the sponge *Hymeniacidon sanguinea* from the Black Sea. *Lipids,* **27** : 640-644.

Ciavatta M.L., Scognamiglio G., Trivellone E., Bisogno E.., Cimino G. (2002). New additional triterpenoids from the Mediterranean sponge *Raspaciona aculeata*. *Tetrahedron*, **58** : 4943-4948.

Ciereszko L.S., Johnson M.A., Schmidt R.W., Koons C.B. (1968). Chemistry of coelenterates-VI. Occurrence of gorgosterol, a C_{30} sterol, in coelenterates and their Zooxanthellae. *Comp. Biochem. Physiol.,* **24** : 899-904.

Cimino G., De Stefano S., Guerriero A., Minale L. (1975). Furanosesquiterpenoids in sponges – IV. Microcionins from *Microciona toxystila*. *Tetrahedron Lett*., **16** : 3723-3726.

Cimino G., Crispino A., Mattia C. A., Mazzarella L., Puliti R., Trivellone E., Uriz M.J. (1990). A new triterpenoid skeleton from the Mediterranean sponge *Raspaciona aculeata* : structure of raspacionin. *Tetrahedron*, **31** : 6565-6568.

Cimino G., Crispino A., Epifanio R. de A., Madaio A., Mattia C.A., Mazzarella L., Puliti R., Trivellone E., Uriz M. (1992). Raspacionin-A : a novel rearranged triterpenoid from the Mediterranean sponge *Raspaciona aculeata*. *Tetrahedron*, **48** : 9013-9022.

Cimino G., Epifanio R. de A., Madaio A., Puliti R., Trivellone E. (1993a). Absolute stereo-chemistry of raspacionin, the main triterpenoid from the marine sponge *Raspaciona aculeata*. *J. Nat. Prod*., **56** : 1622-1626.

Cimino G., Crispino A., Madaio A., Trivellone E., Uriz M.J. (1993b). Raspacionin B, a further triterpenoid from the Mediterranean sponge *Raspaciona aculeata*. *J. Nat. Prod*., **56** : 534-538.

Cimino G., Madaio A., Trivellone E., Uriz M. (1994). Minor triterpenoids from the Mediterranean sponge *Raspaciona aculeata*. *J. Nat. Prod*., **57** : 784-790.

Clark R.J., Stapleton B.L., Garson M.J. (2000). New isocyano and isothiocyanato terpene metabolites from the tropical marine sponge *Acanthella cavernosa*. *Tetrahedron*, **56** : 3071-3076.

Collignon-Thiennot F., Allais J.P., Barbier M. (1973). *Biochimie*, **55** : 579-582.

Cordeiro L., Djerassi C. (1990). Biosynthetic studies of marine lipids. 25. Biosynthesis of $\Delta^{9(11)}$- and Δ^{7}-sterols and saponins in sea cucumbers. *J. Org. Chem.*, **55** : 2806-2813.

Cordeiro L., Kerr R.G., Djerassi C. (1988). Biosynthetic studies of marine lipids. 15. Conversion of parkeol (lanosta-9(11), 24-dien-3β-ol) to 14α-methylcholest-9(11)-en-3β-ol in the sea cucumber *Holothuria arenicola*. *Tetrahedron Lett.,* **29** : 2159-2162.

Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A., Aknin M., Fall A., Samb A., Mirallès J. (1993). An unusual ether glycolipid from the Senegalese sponge *Trikentrion loeve* Carter, *Tetrahedron* **49** : 2711-2716.

Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A., Aknin M., Gaydou E.M. (1994). Two novel tri-α-galactosylceramides from the marine sponge *Axinella* sp. *Liebigs Ann. Chem.* : 1181-1185.

Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A., Di Rosa M., Ianaro M. (1997). Glycolipids from sponges. 6. Plakoside A and B, two unique prenylated glycosphingolipids with immunosuppressive activity from the marine sponge *Plakortis simplex*, *J. Am. Chem. Soc*. **119** : 12465-12470.

Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A. (2001). Glycolipids with immunomodulating activity from marine sponges. *In* : *Bioactive Compounds from Natural Sources*, C. Tringali (ed),. Taylor & Francis Inc., London, New York, Chap. **14** : 557-575.

Crews P., Harrison B. (2000). New triterpene-ketides (merotriterpenes), haliclotriol A and B, from an Indo-Pacific *Haliclona* sponge. *Tetrahedron*, **56** : 9039-9046.

Crist B.V., Li X., Bergquist P.R., Djerassi C. (1983).Sterols of marine invertebrates. 44. Isolation, structure elucidation, partial synthesis, and determination of absolute configuration of pulchrasterol. The first example of double bioalkylation of the sterol side chain at position 26. *J. Org. Chem.*, **48** : 4472-4479.

Dacosta Y. (2004). *Les acides gras oméga-3 : synthèse des connaissances actuelles*, Editions Tec&Doc, 310 pages.

Dasgupta A., Ayanoglu E., Djerassi C. (1984). Phospholipid studies of marine organisms : New branched fatty acids from *Strongylophora durissima*. *Lipids*, **19** : 768-776.

Dasgupta A., Ayanoglu E., Wegmann-Szente A-M., Tomer K.B., Djerassi C. (1986). Mass spectral behavior and HPLC of some unusual molecular phospholipid species. *Chem. Phys. Lipids*., **41** : 335-347.

Datta P.K., Ray A.K., Barua A.K., Chowduri S.K., Patra A. (1990). Isolation of a bioactive sterol from a seapen, *Pteroides esperi. J. Nat. Prod*., **53** : 1347-1348.

De Luca P., De Rosa M., Minale L., Sodano G. (1972). Marine sterols wit a new pattern of ide-chain alkylation from the sponge *Aplysina* (=*Verongia*) *aerophoba*. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 2132-2135.

De Nanteuil G., Ahond A., Poupat C., Potier P., Pusset M., Pusset J., Laboute P. (1985). Isolement et identification de onze stérols de type hydroxyméthyl-3β *nor*-A cholestane du spongiaire, *Pseudaxinyssa cantharella*. *Tetrahedron*, **41** : 6035-6039.

De Rosa M., Minale L., Sodano G. (1973). Metabolism in Porifera. I. Some studies on the biosynthesis of fatty acids, sterols and bromo-compounds by the *sponge Verongia aerophoba*. *Comp. Biochem. Physiol*., **45** : 883-893.

De Rosa M., Minale L., Sodano G. (1975a). Metabolism in Porifera. V. Conversion of cholesterol into nor-19-cholestanol by the sponge *Axinella polypoides*. *Experientia*, **31** : 758-759.

De Rosa M., Minale L., Sodano G. (1975b). Metabolism in Porifera. IV. Biosynthesis of 3β-hydroxymethyl-A-nor-steranes in the sponge *Axinella verrucosa*. *Experientia*, **36** : 630-632.

De Rosa M., Minale L., Sodano G. (1976). Metabolism in Porifera. VI. Role of 5,6 double bond and fate of C-4 of cholesterol during conversion into 3β-hydroxymethyl-A-nor-5α-steranes in the sponge *Axinella verrucosa*. *Experientia*, **32** : 1112-1113.

De Stefano A., Sodano G. (1980). Metabolism of Porifera. XII. The biosynthesis of 3β-hydroxymethyl-A-nor-5α-steranes from cholesterol by *Axinella verrucosa*. *Experientia*, **31** : 408-409.

Dembitsky V. M., Rezanka T. (1996). Unusually high level of eicosatetraenoic, eicosa-pentaenoic, and docosahexaenoic fatty acids in Palestinian freshwater sponges. *Lipids*, **31** : 647-650.

Dembitsky V. M., Rezanka T., Kashin A.G. (1993). Comparative study of the endemic fresh-water fauna of Lake Baikal-II. Unusual lipid composition of two sponge species *Baicalospongia bacillifera* and *Baicalospongia intermedia* (family Lubomirskiidae, class Demospongiae). *Comp. Biochem. Physiol.* **106B** : 825-831.

Dembitsky V. M., Rezanka T., Kashin A.G. (1994). Comparative study of the endemic fresh-water fauna of Lake Baikal-VI. Unusual fatty acid and lipid composition of the endemic sponge *Lubomirskia baicalensis* and its amphipod crustacean parasite *Brandtia* (*Spinacanthus*) *parasitica*. *Comp. Biochem. Physiol.* **109B** : 415-426.

Dembitsky V.M., Srebnik M. (2002). Natural halogenated fatty acids: their analogues and derivatives. *Progr. Lipid Res.,* **41**: 315-367

Dewick P.M. (2002). The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep*., **19** : 181-222.

De Vos L., Rutzler K., Boury-Esnault N., Donadey C. et Vacelet J. (1991). Atlas de morphologie des éponges, Smithsonian Institution Press, Washington and London.

Di Blasio B., Fattorusso E., Magno S., Mayol L., Santacroce C., Sica D. (1976). Axisonitrile-3, axisothiocyanate-3 and axamide-3. Sesquiterpenes with a novel decane skeleton from the sponge *Axinella cannabina*. *Tetrahedron*, **32** : 473-478.

Diaz M.C., Van Soest R.W.M., Pomponi S.A. (1991). A systematic revision of the Central-Atlantic Halichondrida (Demospongiae, Porifera). Part I : Evaluation of characters and diagnosis of genera. *in : Fossil and Recent Sponges*, J. Reitner, H. Keupp (Eds.), Springer-Verlag, pp. 134-149.

Diaz M.C., Pomponi S.A., Van Soest R.W.M. (1993). A systematic revision of the Central West Atlantic Halichondrida (Demospongiae, Porifera). Part III : Description of valid species. *in : Recent Advances in Ecology and Systematics of Sponges*, M-J. Uriz, K. Rützler, (Eds.), *Scientia marina*, **57** : 273-432.

Djerassi C. (1978). Recent studies in the mass spectrometry of steroids, *Pure & Appl. Chem*., **50** : 171-184.

Djerassi C. (1981). Recent studies in the marine sterol field. *Pure & Appl. Chem*., **53** : 873-890.

Djerassi C., Doss G.A. (1990). Structure and biosynthesis of cyclopropane-containing sterols of marine origin. *New J. Chem*., **14** : 713-718.

Djerassi C., Lam W-K. (1991). Sponge phospholipids. *Acc. Chem. Res.,* **24** : 69-75.

Djerassi C., Silva C.J. (1991). Sponge sterols : origin and biosynthesis. *Acc. Chem. Res.,* **24** : 371-378.

Doss G.A., Djerassi C. (1988). Sterols in marine invertebrates. 60. Isolation and structure elucidation of four new steroidal cyclopropenes from the sponge *Calyx podatypa*. *J. Am. Chem. Soc.*, **110** : 8124-8128.

Dubey V.S., Bhalla R., Luthra R. (2003). An overview of the non-mevalonate pathway for termenoid biosynthesis in plants. *J. Biosci*., **28** : 637-646.

Dumdei E.J., Blunt J.W., Munro M.H.G., Battershill C.N., Page M.J. (1998). The whys and whats of sponge chemistry : why chemists extract sponges and what problems does this cause ? *in : Sponge sciences – multidisciplinary perspectives*, Y. Watanabe, N. Fusetani, Eds., Springer, pp. 353-364.

Duque C., Cepeda N., Martinez A. (1993). The steryl esters and phospholipid fatty acids of the sponge *Agelas conifera* from the Colombian Caribbean. *Lipids,* **28** : 767-769.

Edenborough M.S., Herbert R.B. (1988). Naturally occurring isocyanides. *Nat. Prod. Rep*., **5** :229-245.

Eggersdorfer M.L., Kokke W.C.M.W., Crandell W.C., Hochlowski J.E., Djerassi C. (1982). Sterols in marine invertebrates. 32. Isolation of 3β-(hydroxymethyl)-A-*nor*-5α-cholest-15-ene, the first naturally occurring sterol with a 15-16 double bond. *J. Org. Chem*., **47** : 5304-5309.

El Sayed K.A., Bartyzel P., Shen X., Perry T.L., Zjawiony J.K., Hamann M.T. (2000). Marine natural products as antituberculosis agents. *Tetrahedron*, **56** : 949-953.

Fattorusso E., Magno S., Mayol L., Santacroce C., Sica D. (1974). Isolation and structure of axisonitrile-2. New sesquiterpenoid isonitrile from the sponge *Axinella cannabina*. *Tetrahedron*, **30** : 3911-3913.

Fattorusso E., Magno S., Mayol L., Santacroce C., Sica D. (1975). New sesquiterpenoids from the sponge *Axinella cannabina*. *Tetrahedron,* **31** : 269-270.

Fedoreyev S.A., Utkina N.K., Ilyin R.G., Reshnetnyak M.V., Maksimov O.B. (1986). The structure of dibromoisophakellin from the marine sponge *Acanthella carteri*. *Tetrahedron*, **27** : 3177-3180.

Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. (1957). *J. Biol. Chem*., **191**: 833 et **226**: 497.

Fusetani N., Sugano M., Matsunaga S., Hashimoto K. (1987). (+)-Curcuphenol and dehydro-curcuphenol, novel sesquiterpenes which inhibit H,K-ATPase, from sponge *Epipolasis* sp. *Experientia*, **43** : 1234-1235.

Garson M.J., Zimmermann M.P., Hoberg M., Larsen R.M., Battershill C.N., Murphy P.T. (1993). Isolation of brominated long-chain fatty acids from phospholipids of the tropical marine sponge *Amphimedon terpenensis*. *Lipids,* **28** : 1011-1014.

Garson M.J., Simpson J.S., Flowers A.E., Dumdei E.J. (2000). Cyanides and thiocyanates-derived functionality in marine organisms – structures, biosynthesis and ecology, *in: Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman, Ed., Elsevier, Vol. 21, pp. 329-372.

Gauvin A. (1998). Etude de cinq éponges de l'ocean indien. Contribution chimiotaxonomique - Recherche de molécules bioactives. Thèse de l'Université de la Réunion, France.

Genin E. (2002). Mémoire Ecole Pratique des Hautes Etudes, PHE, Sorbonne, Paris, 115 pages.

Genin E., Njinkoué J.M., Wielgosz-Collin G., Houssay C., Kornprobst J.M., Débitus C., Bonin M., Micouin L., Boury-Esnault N., Hooper J.N.A., Barnathan G. (2004). Glycolipids from marine sponges: monoglycosylceramides and alkyldiglycosylglycerols: isolation, characterization and biological activity. *Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova*, **68** : 327-334.

Gillan F.T., Stoilov I.L., Thompson J.E., Hogg R.W., Wilkinson C.R., Djerassi C. (1988). Fatty acids as biological markers for bacterial symbionts in sponges. *Lipids,* **23** : 1139-1145.

Giner J-L., Djerassi C. (1990). Biosynthetic studies of marine lipids. XXVIII. Use of sponge cell-free extracts in the study of marine sterol biosynthesis. *Tetrahedron Lett.*, **31** : 5421-5424.

Giner J-L., Djerassi C. (1991a). Biosynthetic studies of marine lipids. 31. Evidence for a protonated cyclopropyl intermediate in the biosynthesis of 24-propylidenecholesterol. *J. Am. Chem. Soc.*, **113** : 1386-1393.

Giner J-L., Djerassi C. (1991b). Biosynthetic studies of marine lipids. 33. Biosynthesis of dinosterol, peridinosterol, and gorgosterol: unusual patterns of bioalkylation in dinoflagellate sterols. *J. Org. Chem*, **56** : 2357-2363.

Giner J-L., Silva C.J., Djerassi C. (1990). Biosynthetic studies of marine lipids. 32. The missing step in sterol cyclopropyl biosynthesis : enzymatic desaturation of 24(*S*)-ethyl-cholesterol. *J. Am. Soc.*, **112** : 9626-9627.

Goad L.J. (1978). The sterols of marine invertebrates : composition, biosynthesis, and metabolites, *in: Marine Natural Products – Chemical and Biological Perspectives*, P.J. Scheuer, Ed., Academic Press, Vol. II, pp. 75-172.

Goad L.J., Akihisa T. (1997). *Analysis of Sterols*, Blackie Academic & Professional/New York, pp. 1-437.

Grassé P.P., Ed., (1973). *Traité de Zoologie*, *Tome III, Fasc. I, Spongiaires*, Masson, 716 pages.

Gudmestad N.C., Henningson P.J., Bugbee W.M. (1988). Cellular fatty acid comparison of strains od *Corynebacterium michiganense* subsp. *sepedonicum* from patato and sugar beet, *Can. J. Microbiol*., **34** : 716-722.

Hagadone M.R., Scheuer P.J. (1984). On the origin of the isocyano function in marine sponges. *J. Am. Chem. Soc*., **106** : 2447-2448

Hahn S., Stoilov I.L., Tam Ha T.B., Readerstorff D., Doss G.A., Li H-T., Djerassi C. (1988). Biosynthetic studies of marine lipids. 17. The course of chain elongation and desaturation in long-chain fatty acids of marine sponges. *J. Am. Chem. Soc*., **110** : 8117-8124.

Hahn S., Lam W.-K., Wu I., Silva C.J., Djerassi, C. (1989). Unusual pattern of acid biosynthesis, evidence for C-19 desaturase activity in freshwater sponges. *J. Bio. Chem.*, **264** : 21043-21046.

Hale R.L., Leclercq J., Tursch B., Djerassi C., Gross R.A., Weinheimer A.J., Gupta K., Scheuer P.J. (1970). Demonstration of a biogenetically unprecedented side chain in the marine sterol, gorgosterol. *J. Am. Chem. Soc.*, **92** : 7, 2179-2180.

Henningson P.J., Vick B., Bugbee W.M., Gudmestad N.C. (1988). Characterization of 12-mehtyl-cis-4-tetradecenoic acid from *Corynebacterium sepedonicum*, *Lipids*, **23** : 1086-1088.

Hirota H., Tomono Y., Fusetani N. (1996). Terpenoids with antifouling activity against barnacle larvae from the marine sponge *Acanthella cavernosa*. *Tetrahedron,* **52** : 2359-2368.

Hirsch S., Carmely S., Kashman Y. (1987). Brominated unsaturated fatty acids from the marine sponge *Xestospongia* sp., *Tetrahedron*, **43**: 3257-3261.

Hoffmann F. (1990). Preparation of pyrrolidides from fatty acids via trimethylsilyl esters for gaz chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography*, **513** : 405-407.

Hooper J.N.A. (2000). *Sponguide : Guide to Sponge Collection and Identification*, Version August 2000, http://www.qmuseum.qld.gov.au/search/index.asp , 129 pages.

Hooper J.N.A., Van Soest R.W.M. (2002). *Systema Porifera - A Guide to the Classification of Sponges*, Kluwer, Academic/Plenum Publishers, Vol. 1, pp. 1-1101, Vol. 2., pp. 1103-1708 (chacun des 2 volumes contient le même index de 38 pages).

Imbs A.B., Pham L.Q. (1996). Fatty acids and triacylglycerols in seeds of Pinaceae species. *Phytochemistry* **42** : 1051-1053.

Imbs A.B., Rodkina S.A. (2004). Isolation of 2-methyl branched unsaturated very long fatty acids from marine sponge *Halichondria panicea*, *Chem. Phys. Lipids*, **129** : 173-181.

Isaacs S., Hizi A., Kashman Y. (1993). Toxicols A-C and toxiusol – new bioactive hexa-prenoid hydroquinones from *Toxiclona toxius*. *Tetrahedron*, **49** : 4275-4282.

James A.T., Martin A.J.P. (1956). Gas-liquid chromatography : the separation and indentification of the methyl esters of saturated and unsaturated acids from formic acid to n-octadecanoic acid. *Biochem. J.,* **63** : 144-152.

Joh Y-G., Elenkov I.J., Stefanov K.L., Popov S.S., Dobson G., Christie W.W. (1997). Novel di-, tri-, and tetraenoic fatty acids with *bis*-methylene-interrupted double-bond systems from the sponge *Haliclona cinerea*. *Lipids*, **32** : 13-17.

John V., Stoilov I.L., Djerassi C., Karuso P., Poiner A. Scheuer P.J. (1989). Biosynthetic studies of marine lipids. 20. Sequence of double-bond introduction in sponge sterol 24β-methylcholesta-5,7,22,25-tetraen-3β-ol, *J. Org. Chem.*, **54** : 1642-1647.

Joseph J. (1975). Identification of 3,3,9,12,15-octadecapentaenoic acid in laboratory-cultured photosynthetic dinoflagellates, *Lipids*, **10** : 395-402.

Kahlert S., Schönfeld P., Reisert G. (2005). The refsum disease marker phytanic acid, a branched chain fatty acid, affects Ca++ homeostasis and mitochondria, and reduces cell viability in rat hippocampal astrocytes, *Neurobiology of Disease*, **18**, 110-118.

Kanazawa A. (2001). Sterols in marine invertebrates. *Fish. Sc*., **67** : 997-1007.

Kanazawa A, Guary J.B., Ceccaldi H.J. (1976). *Comp. Biochem. Physiol.,* **54B** : 205-208.

Kashman Y., Yosief T., Carmely S. (2001). New triterpenoids from the Red Sea sponge *Siphonochalina siphonella*. *J. Nat. Prod*., **64** : 175-180.

Kates M. (1964). Bacterial Lipids. *Adv. Lipid Res.*, **2** : 17-90.

Kates M. (1986). *Techniques in Lipidology* – Laboratory Techniques in Biochemistry and molecular Biology Vol.3 (Burdon R.H. & van Knippenberg éd.). Elsevier, Amsterdam, New York, London (1986).

Kazlauskas R., Murphy P.T., Wells R.J. (1980). New diterpene isocyanides from a sponge. *Tetrahedron Lett*., **21** : 315-318.

Kernan M.R., Cambie R.C., Bergquist P.R. (1990). Chemistry of sponges, X. New sesqui-terpenes from a marine sponge of the genus *Eurypon*. *J. Nat. Prod*., **53** : 1353-1356.

Kerr R.G., Kerr S.L. (1999*)*. Marine natural products as therapeutic agents. *Expert. Opin. Ther. Pat*. **9** : 1207-1222, Ashley Publication.

Kerr, R.G., Baker, B.J. (1991). Marine sterols. *Nat. Prod. Rep*., 465-497.

Kerr R.G., Baker B.J., Kerr S.L., Djerassi C. (1990). Biosynthetic studies of marine lipids-XXIX. Demonstration of sterol side chain dealkylation using cell-free extracts of marine sponges. *Tetrahedron Lett.*, **31** : 5425-5428.

Kerr R.G., Kerr S.L., Malik S., Djerassi C. (1992). Biosynthetic studies of marine lipids 38. Mechanism and scope of sterol side chain dealkylation in sponges : evidence for concurrent alkylation and dealkylation. *J. Am. Chem. Soc.*, **114** : 299-303.

Khalil M.W., Idler D.R. (1976). *Comp. Biochem. Physiol.*, **55B** : 239-242.

Khalil M.W, Djerassi C., Sica D. (1980). Minor and Trace Sterols in Marine Invertebrates XVII. (24)-24,26-dimethylcholesta-5,26-dien-3β-ol, a new sterol from the sponge *Petrosia ficiformis*. *Steroids*, **35** : 707-719.

Killday K.B., Longley R., McCarthy P.J., Pomponi S.A., Wright A.E., Neale R.F., Sills M.A. (1993). Sesquiterpene-derived metabolites from the deep-water marine sponge *Poecillastra sollasi*. *J. Nat. Prod*., **56** : 500-507.

Kingston J.F., Benson E., Gregory B., Fallis A.G. (1979). Sterols from the marine sponges *Orina arcoferus* and *Geodia megastrella*. *J. Nat. Prod*., **42** : 528-531.

Kobayashi M., Tomioka A., Mitsuhashi H. (1979). Marine Sterols. VIII. Isolation and structure of sarcosterol, a new sterol with a $\Delta^{17(20)}$-double bond from the soft coral *Sarcophyton Glaucum*, *Steroids*. **34** : 273-284.

Kokke W.C.M.C., Pak C.S., Fenical W., Djerassi C. (1979). Minor and Trace Sterols in marine invertebrates. XII. Occurrence of 24(*R*+*S*)-methylcholesta-5,25-dien-3β-ol, and 24(*R*+*S*)-Methylcholesta-7,25-dien-3β-ol in the Caribbean Sponge, *Verongia cauliformis*. *Helvetica Chimica Acta*, **62** :1310-1318.

Kokke W.C.M.C., Shoolery J.N., Fenical W., Djerassi C. (1984). Biosynthetic studies of marine lipids. Mecanism of side chain alkylation in (*E*)-24-propylidenecholesterol by a Chrysophyte alga. *J. Org Chem.*, **49** : 3742-3752.

König G.M., Wright A.D. (1996). Marine natural products research : current directions and future potential. *Planta Medica*, **62** : 193-211.

König G.M., Wright A.D. (1997). New and unusual sesquiterpenes : kelsoene, prespatane, epi-γ-gurjunene, and T-cadinthiol, from the tropical marine sponge *Cymbastela hooperi*. *J. Org. Chem.*, **62** : 3837-3840.

König G.M., Wright A.D., Angerhofer C.K. (1996). Novel potent antimalarial diterpene isocyanates, isothiocyanates, and isonitriles from the tropical marine sponge *Cymbastela hooperi*. *J. Org. Chem.*, **61** : 3259-3267.

Kornprobst J.M. (2005). *Substances Naturelles d'Origine Marine : chimiodiversité pharmacodiversité - biotechnologies,* Lavoisier (Tec&Doc, sous presse).

Kornprobst J.M., Barnathan G. (1998). Methoxy fatty acids in nature. *Recent Res. Develop. Lipids Res.*, **2** : 371-380.

Krupcik J., Bohov P. (1985). Use of equivalent chain lengths for the characterization of fatty acid methyl esters separated by linear temperature-programmed gas chromatography. *J. Chromatog.*, **346** : 33-42.

Lam W.-K., Wu S., Ayanoglu E., Djerassi C. (1989). Phospholipid studies of marine organisms. 22. Structure and biosynthesis of a novel brominated fatty acid from a Hymeniacidonid sponge. *J. Org. Chem.*, **54** : 3428-3432.

Lawson M.P., Thompson J.E., Djerassi C. (1988). Localization of long-chain fatty acids and unconventional sterols in spherulous cells of a marine sponge. *Lipids*, **23** : 1037-1048.

Le Quere J.L., Sémon E., Lanher B., Sébédio J.L. (1989). On-line hydrogenation in GC-MS analysis of cyclic fatty acid monomers isolated from heated linseed oil. *Lipids*, **24** : 347-350.

Lecointre G., Le Guyader H. (2001). *Classification phylogénétique du vivant*, Belin, Paris, 543 pages. Dans cet ouvrage, le nombre des démosponges est estimé à 8 000, celui des Hexactinellides à 1 000 et celui des éponges calcaires à 1 000.

Lee H.S., Rho J.R., Sim C.J., Shin J. (2003). New acetylenic acids from a sponge of the genus *Stelletta*. *J. Nat. Prod.*, **66** : 566-568.

Lee J.W., Lee K.W., Kim I.H., Rhee C. (2004). Selective increase in pinolenic acid (all-cis-5,9,12-18:3) in Korean pine nut oil by crystallization and its effect on LDL-receptor activity. *Lipids,* **39** : 383-387.

Lévi C. (1960). Spongiaires des côtes occidentales africaines. *Bull. Inst. Franç. Afr. Noire*, **XXII-A**, 743-769.

Lévi C. (1973). Systématique de la Classe des *Demospongia* (Démosponges). *In : Traité de Zoologie*, *Tome III, Fasc. I, Spongiaires*, P.P. Grassé, Ed., Masson, Paris, pp. 577-631.

Li L.N., Li H.T., Lang R.W., Itoh T., Sica D., Djerassi C. (1982). Minor and Trace Sterol in marine invertebrates. 31. Isolation and structure elucidation of 23*H*-isocalysterol, a naturally occurring cyclopropene. Some comparative observations on the course of hydrogenolytic ring opening of steroidal cyclopropenes and cyclopropanes. *J. Am. Chem.* Soc., **104** : 6726-6732.

Li Y, Ishibashi M, Sasaki T, Kabayashi J. (1995). New bromine-containing unsaturated fatty acid derivatives from the Okinawan marine sponge *Xestospongia* sp. *J. Chem. Res.* (S) 1995 : 126-127.

Litchfield C., Liaaen-Jensen S. (1980). Animal carotenoids. Part 23. Carotenoids of the marine sponge, *Microciona prolifera*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **66B** : 359-365.

Litchfield C., Marcantoni E. E. (1978). Occurrence of 5,9,19-octacosatrienoic and 5,9-hexacosadienoic and 17-hexacosaenoic acids in the marine sponge *Xestospongia halichondroides*, *Lipids*, **13** :199-201.

Litchfield C., Morales R.W. (1976). Are demospongiae membranes unique among living organisms ? *in* : *Aspects of Sponge Biology*, F.W. Harrison, R.R. Cowden, Eds., Academic Press, pp. 183-200.

Litchfield C., Tyszkiewicz J., Marcantonio E.E., Noto G. (1979). 15,18,21,24-Triaconta-trienoic and 15,18,21,24,27-triacontapentaenoic acids : new C_{30} fatty acids from the marine sponge *Cliona celata*. *Lipids*, **14** : 619-622.

Litchfield C., Tyszkiewicz J., Dato V. (1980). 5,9,23-Tricontatrienoic acid, principal fatty acid of the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Lipids*, **15** : 200-202.

Loukaci A., Guyot M. (1994). Trikendiol, an unusual red pigment from the sponge *Trikentrion loeve*, anti-HIV-1 metabolite. *Tetrahedron Lett*., **35** : 6869-6872.

Mai J., Kinsella J.E., Smith C.R. (1980). Phtalic ester, an artifactual contaminant in diazomethane prepared from *N*-méthyl-*N*-nitroso-*p*-toluenesulfonamide for the derivation of prostaglandins. *Lipids*, **15** : 968-971.

Makarieva T.N., Santalova E.A., Gorshkova I.A., Dmitrenok A.S., Guzii A.G., Gorbach V.I., Svetashev V.I., Stonik V.A. (2002). A new cytotoxic fatty acid (5*Z*,9*Z*)-22-methyl-5,9-tetracosadienoic acid and the sterols from the far eastern sponge *Geodinella robusta*. *Lipids*, **37** : 75-80.

Malik S., Djerassi C. (1989). Minor and trace sterols in marine invertebrates. 61. Isolation and structure elucidation of new A-*nor* sterols from the marine sponge *Phakellia aruensis*. *Steroids*, **53** : 271-284.

Malik S., Stoilov I.L., Djerassi C. (1988a). Biosynthesis of 3β-(hydroxymethy)-A-*nor*-5α-cholest-15-ene in the marine sponge *Phakellia aruensis*. *Tetrahedron Letters*, **29** : 4081-4084.

Malik S., Kerr R.G., Djerassi C. (1988b). Biosynthesis of marine lipids. 19. Dealkylation of the sterol side chain in sponges. *J. Amer. Chem. Soc.,* **110** : 6895-6897.

Martin A.J.P., James A.T. (1956). *Biochem. J.*, **63** : 138.

Martinez A., Duque C., Fujimoto Y.(1997). Novel fatty esters of (7 *E*,12*E*,18*R*,20*Z*)-variabilin from the marine sponge *Ircinia felix*. *Lipids*, **32** : 565-569.

Matsunaga S., Okada Y., Fusetani N., van Soest R.W.M. (2000). An antimicrobial C_{14} acetylenic acid from a marine sponge *Oceanapia* species, *J. Nat. Prod.,* **63** : 690-691.

Mayer A.M.S., Hammann M.T. (2002). Marine pharmacology in 1999 : compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol*., **132 C** : 315-339.

McKee T., Cardellina J.H., Tischler M., Sader K.M., Boyd M.R. (1993). Ibisterol sulfate, a novel HIV-inhibitory sulfated sterol from the deep water sponge *Topsentia* sp. *Tetrahedron Lett*., **34** : 389-392.

McKee T., Cardellina J.H., Riccio R., D'Auria M.V., Iorizzi M., Minale L., Moran R.A., Gulakowski R.J., McMahon J.B., Buckheit Jr. R.W., Snader K.M., Boyd M.R. (1994). HIV-Inhibitory natural products. 11. Comparative studies of sulfated sterols from marine invertebrates. *J. Med. Chem*., **37** : 793-797.

McNally M., Capon R.J. (2001). Phorbasin B and C : novel diterpenes from a southern Australian marine sponge, *Phorbas* species. *J. Nat. Prod*., **64** : 645-647.

Medina I., Linares F., Garrido J.L. (1994). Use of a packed programmed-temperature vaporizer injector in the solvent elimination mode for the determination of fatty acid methyl esters by gas chromatography. *J. Chromatogr., A,* **659** : 472-476.

Meyer M., Guyot M. (2002). 5,9,23-triacontatrienoic methyl ester, an elastase inhibitor from the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Lipids*, **37** : 1109-1111.

Minale L., Sodano G. (1974a). Marine sterols. 19-Nor-stanols from the sponge *Axinella polypoides*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1888-1892.

Minale L., Sodano G. (1974b). Marine sterols. Unique 3β-hydroxymethyl-A-*nor*-5α-steranes from the sponge *Axinella verrucosa*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2380-2384.

Minale L., Riccio R., Sodano G. (1974). Acanthellin-1, an unique isonitrile sesquiterpene from the sponge *Acanthella acuta. Tetrahedron,* **30** : 1341-1343.

Minale L., Persico D., Sodano G. (1979). Metabolism in porifera. IX. Studies on the biological conversion of cholesterol into nor-19-cholestanol by the sponge *Axinella polypoides*. *Experientia*, **35** : 296-297.

Mirallès J., Barnathan G., Galonnier R., Sall A., Samb A., Gaydou E.M., Kornprobst J.M. (1995). New branched-chain fatty acids from the Senegalese gorgonian *Leptogorgia piccola* (white and yellow morphs). *Lipids*, **30** : 459-466.

Misso N.L.A., Goad L.J. (1984). Investigations on the Δ^{23}-, $\Delta^{24(28)}$- and Δ^{25}-sterols of *Zea mays*. *Phytochemistry*, **23** : 73-82.

Mitome H., Shirato N., Miyaoka H., Yamada Y., Van Soest R.W.M. (2004). Terpene isocyanides, isocyanates, and isothiocyanates from the Okinawan marine sponge *Stylissa* sp. *J. Nat. Prod*., **67** : 833-837.

Miyaoka H., Shimomura M., Kimura H., Yamada Y., Kim H.S., Wataya Y. (1998). Anti-malarial activity of kalihinol A and new relative diterpenoids from the Okinawan sponge, *Acanthella* sp. *Tetrahedron*, **54** : 13467-13474.

Morales R.W., Litchfield C. (1976). Unusual C_{24}, C_{25}, C_{26}, and C_{27} polyunsaturated fatty acids of the marine sponge *Microciona prolifera*. *Biochim. Biophys. Acta*, **431** : 206-216.

Morales R.W., Litchfield C. (1977). Incorporation of 1-^{14}C-acetate into C_{26} fatty Acids of the marine sponge *Microciona prolifera*. *Lipids*, **12** : 570-576.

Moreau R.A., Whitaker B. D., Hicks K. B. (2004). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res.*, **41** : 457–500.

Mori K. (2005). Synthesis of (*R*)-*ar*-turmerone and its conversion to (*R*)-*ar*-himachalene, a pheromone component of the flea beetle: (*R*)-*ar*-himachalene is dextrorotatory in hexane, while levorotatory in chloroform, *Tetrahedron* : Asymmetry, **16** : 685-692.

Morita M., Motoki K., Akimoto K., Natori T., Sakai T., Sawa E., Yamaji K., Koezuka Y., Kobayashi E., Fukushima H. (1995). Structure-activity relationship of α-galactosyl-ceramides against B-16 bearing mice. *J. Med. Chem.*, 38 : 2176-2187.

Musman M., Tanaka J. Higa T. (2001). New sesquiterpene carbonimidic dichlorides and related compounds from the sponge *Stylotella aurantium*. *J. Nat. Prod*., **64** : 111-113.

Natori T., Koezuka Y., Higa T. (1993). Agelasphines, novel α-galctosylceramides from the marine sponge *Agelas mauritianus*. *Tetrahedron Lett.,* **34** :5591-5592.

Natori T., Morita M., Akimoto K., Koezuka Y. (1994). Agelasphines, novel antitumor and immunostimulatory cerebrosides from the marine sponge *Agelas mauritianus*. *Tetrahedron,* **50** : 2771-2784.

Nechev J., Christie W.W., Robaina R., Diego F., Popov S., Stefanov K. (2004). Chemical composition of the sponge *Hymeniacidon sanguinea* from the Canary Islands. *Comp. Biochem. Physiol.,* **137 A** : 365-374.

Nelson G.J. (1974). Elution caracteristics of fatty acid methyl esters on capillary columns. *Lipids*, **9** : 254-263.

Nemoto T., Yoshimo G., Ojika M., Sakagami Y. (1997). Amphimic acids and related long-chain fatty acids as DNA topoisomerase I inibitors from an Austrilian sponge, *Amphimedon* sp. : isolation, structure, synthesis, and biological evaluation ?x2022, *Tetrahedron*, **53** : 16699-16710.

O'Brien J.S., Fillerup D.L., Mead J.F. (1964). Brain lipids : I. Quantification and fatty acid composition of cerebroside sulfate in human cerebral gray and white matter, *J. Lipid Res*., **5** : 339-342.

Ould El Kébir M., Barnathan G., Siau Y., Miralles J., Gaydou E.M. (2003). Fatty acid distribution in muscle, liver, and gonads of *rays (Dasyatis marmorata*, *Rhinobatos cemiculus*, and R*hinoptera marginata*) from the East tropical Atlantic Ocean. *J. Agric. Food Chem*., **51**, 1942-1947.

Perkins E.G. (1993). *Analyses of Fats, Oils and Derivatives*, AOCS Press, Champaign, Illinois, USA.

Pioronen V., Lindsay D.G., Miettinen T.A., Toivo J., Lampi A.M. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological functions and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric*., **80** : 939-966.

Pomponi S.A., Wright A.E., Diaz M.C., Van Soest R.W.M. (1991). A systematic revision of the Central Atlantic Halichondrida (Demospongiae, Porifera). Part II. Patterns of distribution of secondary metabolites. *In : Fossil a,d Recent Sponges*, J. Reitner & H. Keupp (Eds.), Springer-Verlag, pp. 150-158.

Puliti R., Trivellone E., Crispino A., Cimino G., Mattia C.A., Mazzarella L. (1991). Raspacionin, a new tetracyclic triterpenoid from the sponge *Raspaciona aculeata* : a structure-containing disordered solvent. *Acta Crystallogr. Sect. C*., 2609-2612.

Quinn R.J., Tucker D.J. (1985). A brominated bisacetylenic acid from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*, *Tetrahedron Lett*., **21**: 567-568.

Rabinowitz M.H., Djerassi C. (1992). Biosynthesis studies of marine lipids. 39. 19-Norsterols : the course of C-19 methyl elimination. *J. Am. Chem. Soc*., **114** : 304-317.

Raederstorff D., Shu A.Y.L., Thompson J.E., Djerassi C. (1987). Biosynthetic studies of marine lipids. 11. Synthesis, biosynthesis, and absolute configuration of the internally branched demospongic acid, 22-methyl-5,9-octacosadienoic acid. *J. Org. Chem.*, **52** : 2337-2346.

Rahier A., Benveniste P. (1989). *Analysis of sterols and other biologically significant steroids*, Academic Press Paris, Inc.

Ratnayake W.M.N., Olsson B., Ackman R.G. (1989). Novel branched fatty acids in certain fish oils. *Lipids*, **24** : 630-637.

Ravi B.N., Wells R.J. (1982). Malabaricane triterpenes from a Great Barrier reef collection of the sponge *Jaspis stellifera*. *Aust. J. Chem*., **35**, 39-50.

Refsum S. (1981). *Heredopathia atactica polyneuritiformis* phytanic-acid storage disease, Refsum's disease : "a biochemically well-defined disease with a specific dietary treatment", *Archives of Neurology*, **38** : 605-606.

Refsum S., Salomonsen L., Skatvedt M. (1949). *Heredopathia atactica polyneuritiformis* in children, *J. Pediat*ry, **35** : 335-343.

Rezanka T. (1989). Very long-chain fatty acids from the animal and plant kingdoms. *Progr. Lipid Res.*, **28** : 147-187.

Rezanka T., Dembitsky V. M. (1993). Isoprenoid polyunsaturated fatty acids from freshwater sponges. *J. Nat. Prod.,* **56** : 1898-1904.

Rezanka T, Mares P. (1987). Unusual and very long-chain fatty acids produced by basidiomycetes. *J. Chromatog.*, **409** : 390-395.

Rho J-R., Lee H-S., Sim C.J., Shin J. (2002). Gagunins, highly oxygenated diterpenoids from the sponge *Phorbas* sp. *Tetrahedron*, **58**, : 9585-9591.

Rohmer M. (1999). A mevalonate-independent route to isopentenyl diphosphate, *in: Comprehensive Natural Products Chemistry*, Sir D.H. Barton & K. Nakanishi, Eds., Elsevier, Vol. 2, 45-67.

Rohmer M., Kokke W.C.M.C., Fenical W., Djerassi C. (1980). Isolation of two new C_{30} sterols, (24*E*)-24-n-propylidenecholesterol and 24ζ-n-propylcholesterol, from a cultured marine chrysophyte. *Steroids*, **35** : 219-231.

Rouessac F., Rouessac A. (1997). *Analyse chimique, Méthodes et Techniques Instrumentales modernes*, 3ème edition, Masson, Paris.

Rudi A., Kashman Y., Benayahu Y., Schleyer M. (1995). Durbinal A, B, and C : three new cytotoxic sponge metabolites. *Tetrahedron Lett*., **36** : 4853-4856.

Sacchettini J.C., Poulter C.D. (1997). Creating isoprenoid diversity. *Science*, **277** : 1788-1789.

Santalova E.A., Makarieva T.N., Gorshkova I.A., Dmitrenok A.S., Krasokhin V.B., Stonik V.A. (2004). Sterols from six marine sponges. *Biochem. Syst. Ecol.*, **32** : 153-167.

Saxegaard P., Renstrom B., Litchfield C., Liaaen-Jensen S, Borch G., Tanaka Y. (1981). Identity and stereochemistry of allopurpurine and tedaniaxanthine. *Biochem. Syst. Ecol*., **9** : 325-327.

Scheuer P.J. (1992). Isocyanides and cyanides as natural products. *Acc. Chem. Res.*, **25**, 433-439.

Schmid P. (1973). Extraction and purification of lipids. II. Why is chloroform-methanol such a good lipid solvent, Physiol. Chem. & Physics, 5 : 141-150.

Schmid P., Hunter E. (1971). Extraction and purification of lipids. I. Solubility of lipids in biologically important solvents, Physiol. Chem. & Physics, 3 : 98-102.

Schmid P., Calvert J., Steiner R. (1973a). Extraction and purification of lipids. IV. Alternative binary solvent systems to replace chloroform-methanol in studies on biological membranes, Physiol. Chem. & Physics, 5 : 157-166.

Schmid P., Hunter E., Calvert J. (1973b). Extraction and purification of lipids. III. Serious limitations of chloroform and chloroform-methanol in lipid investigations, Physiol. Chem. & Physics, 5 : 151-155.

Schmitz F.J. (1978). Uncommon marine steroids, *in: Marine Natural Products – Chemical and Biological Perspectives*, P.J. Scheuer, Ed., Academic Press, Vol. I, pp. 241-297.

Schmitz F.J., Mac Donald F.J. (1974). Isolation and identification of cerebrosides from the marine sponge *Chondrilla nucula*, *J. Lipid Res.,* 15 : 158-164.

Schmitz F.J., Pattabhiraman T. (1970). New marine sterol possessing a side chain cyclopropyl group : 23-demethylgorgosterol. *J. Am. Chem. Soc.* **92** : 6073-6074.

Seidel S.B., Proudfoot J.R., Djerassi C., Sica D., Sodano G. (1986). Minor and trace sterols from marine invertebrates 56. Novel coprostanols from the marine sponge *Petrosia ficiformis*. *Steroids*, **47** : 49-62.

Shimomura M., Miyaoka H., Yamada Y. (1999). Absolute configuration of marine diterpenoid, kalihinol-A. *Tetrahedron Lett*., **40** : 8015-8017.

Sica D., Musumeci D. (2004). Secosteroids of marine origin. *Steroids*, **69** : 743-756.

Silva C.J., Wünsche L., Djerassi C. (1991). Biosynthetic studies of marine lipids 35. The demonstration of *de novo* sterol biosynthesis in sponges using radiolabelled isoprenoid precursors. *Comp. Biochem. Physiol*., **99B** : 763-773.

Silva C.J., Djerassi C. (1992). Biosynthetic studies of marine lipids. 36.* The origin of common sterol side chains in eleven sponges using [3-^{3}H]-squalene. *Comp. Biochem. Physiol*., **101B** : 255-268.

Simpson J.S., Raniga P., Garson M.J. (1997). Biosynthesis of dichloroimines in the tropical marine sponge *Stylotella aurantium. Tetrahedron Lett*., **38** : 7947-7950.

Sjöstrand U., Kornprobst J-M., Djerassi C. (1981). Minor and trace sterols in marine invertebrates. 29. (22*E*)-Ergosta-5,22,25-trien-3β-ol and (22*E*,24*R*)-24,26-dimethyl-cholesta-5,22,25(27)-trien-3β-ol. Two new marine sterols from the sponge *Pseudaxinella lunaecharta*. *Steroids*, **38** : 355-364.

Sodano G. (1979). Non-conventional sterols from marine sponges : occurrence and bio-synthesis. *Colloques internationaux du C.N.R.S.* n° 291, Biologie des spongiaires, pp. 393-399.

Stoilov I.L., Bladocha-Moreau M., Thompson J.E., Djerassi C. (1987). Biosynthetic studies of marine lipids 12. Biosynthesis in marine sponges of sterols possessing the $\Delta^{5,7}$-nucleus typical of fungi and the 24-alkyl side chain characteristic of plants. *Tetrahedron*, **43** : 2213-2222.

Sun M.Y., Wakeham S.G. (1999). Diagenesis of planktonic fatty acids and sterols in Long Island Sound sediments : influences of a phytoplankton bloom and botom water oxygen content, *J. Marine Res*., **57** : 357-385.

Tanaka J., Higa T., Suwanborirux K., Kokpol U., Bernardinelli G., Jefford C.W. (1993). Bioactive norsesterterpene 1,2-dioxanes from a Thai sponge, *Mycale* sp. *J. Org. Chem*., **58** : 2999-3002.

Teshima S., Kanazawa A. (1971). *Comp. Biochem. Physiol.*, **38B** : 603-607.

Teshima S., Kanazawa A., Yoshioka M., Kitahara K. (1974). Hypocholesterolemic effect of 24-methylenecholesterol and 7-cholestenol in the rat. *J. Steroid Biochem*. **5**: 69-72.

Teshima S., Kanazawa A., Miyawaki H. (1979). *Comp. Biochem. Physiol.*, **63B** : 323-328.

Teshima S., Kanazawa A., Hyodo S. (1980). 3β-Hydroxymethyl-24-methyl-A-*nor*-5α-cholestane from the sponge *Hymeniacidon perlevis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **46** : 1517-1520.

Teshima S., Kanazawa A., Yamada I. (1984a). A novel A-*nor* sterol, 3β-hydroxymethyl-24*Z*-ethylidene-A-*nor*-5α-cholestane from the sponge *Acanthella cristagalli*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50** : 545.

Teshima S., Kanazawa A., Yamada I. (1984b). Occurrence of 3β-hydroxymethyl-A-*nor* sterols in the sponge *Acanthella cristagalli*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50** : 707-712.

Theobald N., Wells R.J., Djerassi C. (1978a). Minor and trace sterols in marine invertebrates. 8. Isolation, structure elucidation, and partial synthesis of two novel sterols : stellifera-sterol and isostelliferasterol. *J. Am. Chem. Soc.*, **100** : 7677-7684.

Theobald N., Shoolery J.N., Djerassi C., Erdman T.R., Scheuer P.J. (1978b). 24-Ethyl-$\Delta^{5,24(28),28}$-cholestatrien-3β-ol – a naturally occurring allenic marine sterol. *J. Am. Chem. Soc.*, **100** : 5574-5575.

Tomono Y., Hirota H., Fusetani N. (1998). Antifouling compounds against barnacle (*Balanus amphitrite*) larvae from the marine sponge *Acanthella cavernosa.*, *In: Sponge Sciences – Multidisciplinary Perspectives*, Y. Watanabe, N. Fusetani, Eds., Springer-Verlag, pp. 413-424.

Tranchant J. (1995). *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*, 4e éd., Masson, Paris, 700 pages.

Tsuda M., Ishibashi M., Agemi K., Sasaki T., Kobayashi J. (1991). Stelliferins A-F, new antineoplastic isomalabaricane triterpenes from the Okinawan marine sponge *Jaspis stellifera*. *Tetrahedron*, **47** : 2181-2194.

Tsukamoto S., Kato H., Hirota H., Fusetani N. (1998). Antifouling and metamorphosis-promoting compounds from the marine sponges *Pseudoceratina purpurea* and *Agelas mauritiana*, *in : Sponge Sciences*, Y. Watanabe, N. Fusetani, eds., Springer, pp. 399-424.

Tulloch A.P. (1985). Mass spectra of pyrrolidides of oxo, hydroxy and trimethyloxy octanoic acids, *Lipids*, **20** : 650-663.

Uy M.M., Ohta S., Yanai M., Ohta E., Hirata T., Ikegami S. (2002). Exiguamide, a new spirocyclic sesquiterpene from the marine sponge *Geodia exigua* that inhibits cell fate specification during sea urchin embryogenesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12** : 3037-3039.

Uy M.M., Ohta S., Yanai M., Ohta E., Hirata T., Ikegami S. (2003). New spirocyclic sesquiterpenes from the marine sponge *Geodia exigua*. *Tetrahedron*, **59** : 731-736.

Vacelet J.(1975). Etude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida), *J. Microsc. Biol. Cell*, **3** : 271-288.

Vacelet J., Al Sofyani A., Al Lihaibi S., Kornprobst J.M. (2001). A new Haplosclerid sponge species from the Red Sea. *J. Mar. Biol. Assoc.* UK, **81** : 943-948.

Van Soest R.W.M., Diaz M.C., Pomponi S.A. (1990). Phylogenetic classification of the Halichondrids (Porifera, Demospongiae). *Beaufortia*, **40** : 15-62.

Van Soest R.W.M., Erpenbeck D., Alvarez B. (2002). Family Dictyonellidae Van Soest, Diaz & Pomponi, *in : Systema Porifera : A Guide to the Classification of Sponges*, J.N.A. Hooper, & R.W.M. Van Soest, Eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 773-786.

Velosaotsy N.E., Genin E., Nongonierma R., Al-Lihaibi S., Kornprobst J.-M., Vacelet J., Barnathan G. (2004). Phospholipid distribution and phospholipid fatty acids in four Saudi Red Sea sponges, *Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova*, **68** : 639-645.

Verhoeven N., Jakobs C. (2001). Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid. *Prog. Lipid Res.*, **40** : 453-466.

Viracaoundin I. (2001). Etude chimique et pharmacologique de deux ascidies de Mayotte (Océan Indien). Isolement d'alcaloïdes à noyau pyridoacridine. Analyse de la fraction lipidique. Thèse de l'Université de la Réunion, France.

Viracaoundin I., Barnathan G., Gaydou E. M., Aknin M. (2003). Phospholipid fatty acids from Indian Ocean tunicates *Eudistoma bituminis* and *Cystodytes violatinctus*, *Lipids,* **38** : 85-88.

Volkman J.K. (2003). Sterols in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **60** : 495-506.

Vuong D., Capon R.J. (2000). Phorbasin A : a novel diterpene from a Southern Australian marine sponge, *Phorbas* species. *J. Nat. Prod*., **63** : 1684-1685.

Walkup R.D., Jamieson G.C., Ratcliff M.R., Djerassi C. (1981). Phospholipid studies of marine organisms : 2. Phospholipids, phospholipid-bound fatty acids and free sterols of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas) forma *fulva* (Pallas) (= *Verongia thiona*). Isolation and structure elucidation of unprecedented branched fatty acids, *Lipids*, **16** : 631-646.

Wijekoon W.M., Ayanoglu E., Djerassi C. (1984). Phospholipid studies of marine organisms 9. New brominated demospongic acids from the phospholipids of two *Petrosia* species. *Tetrahedron Lett.,* **25** : 3285-3288.

Withers N.W., Kokke W.C.M.C., Fenical W., Djerassi C. (1982). Sterol patterns of cultured zooxanthellae isoled from marine invertebrates: synthesis of gorgosterol and 23-desmethylgorgosterol by aposymbiotic algae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, **24** : 3764-3768.

Wolff R.L., Pedrono F., Pasquier E., Marpeau A.M. (2000). General characteristics of *Pinus* spp. seed fatty acid compositions, and importance of Δ5-olefinic acids in the taxonomy and phylogeny of the genus. *Lipids*, **35**:1-22.

Wratten S.J., Faulkner D.J., Hirotsu K., Clardy J. (1978). Diterpenoid isocyanides from the marine sponge *Hymeniacidon amphilecta*. *Tetrahedron Lett*., **45** : 4345-4348.

Wright A.D., Wang H., Gurrath M., König G.M., Kocak G., Neumann G., Loria P., Foley M., Tilley L. (2001). Inhibition of heme detoxification processes underlies the antimalarial activity of terpene isonitrile compounds from marine sponges. *J. Med. Chem*., **44** : 873-885.

Wright A.E., Pomponi S.A., McConnell O.J., Kohmoto S., McCarthy P.J. (1987). Curcu-phenol and curcudiol, sesquiterpene phenols from sponge *Didiscus flavus*. *J. Nat. Prod*., **50** : 976-978.

Yamaguchi M. (1957). Chemical constitution of renieratene. *Bull. Chem. Soc. Japan,* **30** : 979-983.

Yamaguchi M. (1958). Renieratene, a new carotenoid containing benzene ring, isolated from a sea sponge. *Bull. Chem. Soc. Japan,* **31** : 739-742.

Yao J.K., Dick P.J. (1987). Tissue distribution of phytanic acid and its analogues in a kinship with Refsum's disease, *Lipids*, **22** : 69-75.

Yu Q.T., Liu B.N., Zhang J.Y. and Huang Z.H. (1988). Location of methyl branching in fatty acids : Fatty acids in uropygial secretion of shanghai duck by GC-MS of 4,4-dimethyl-oxazoline derivatives. *Lipids*, **23** : 804-810.

Zhao Q.C., Lee S.Y., Hong J.K., Lee C.O., Im K.S., Sim C.J., Lee D.S., Jung J.H. (2003). New acetylenic acids from the marine sponge *Stelletta* species, *J. Nat. Prod*., **66** : 408-411.

Zimmerman M.P., Djerassi C. (1991). Biosynthetic studies of marine lipids. 34. Stereochemical features of the enzymatic C-methylation on the path to isofucosterol and fucosterol, *J. Am. Cem. Soc.,* **113**, 3530-3533.

Zimmerman M.P., Thomas F.C., Thompson J.E., Djerassi C. (1989). The distribution of lipids and sterols in cell types from the marine sponge *Pseudaxinyssa* sp. *Lipids*, **24** : 210-216.

Zimmerman M.P., Hoberg M., Ayanoglu E., Djerassi C. (1990). Phospholipid studies of marine organisms. 24. Cell separation of *Tethya aurantia*, an analytical study of embryonic and differentiated cells. *Lipids*, **25** : 383-390.

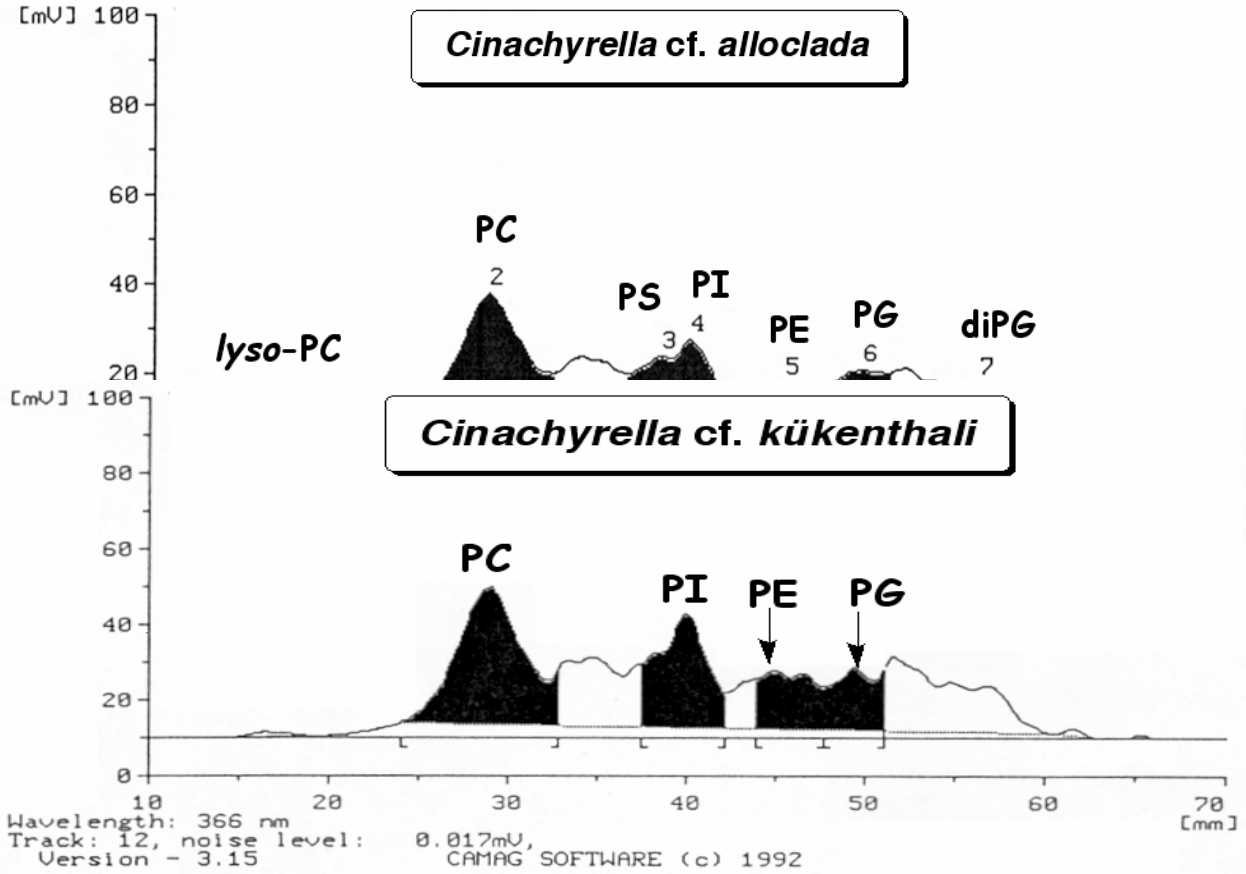
Préambule

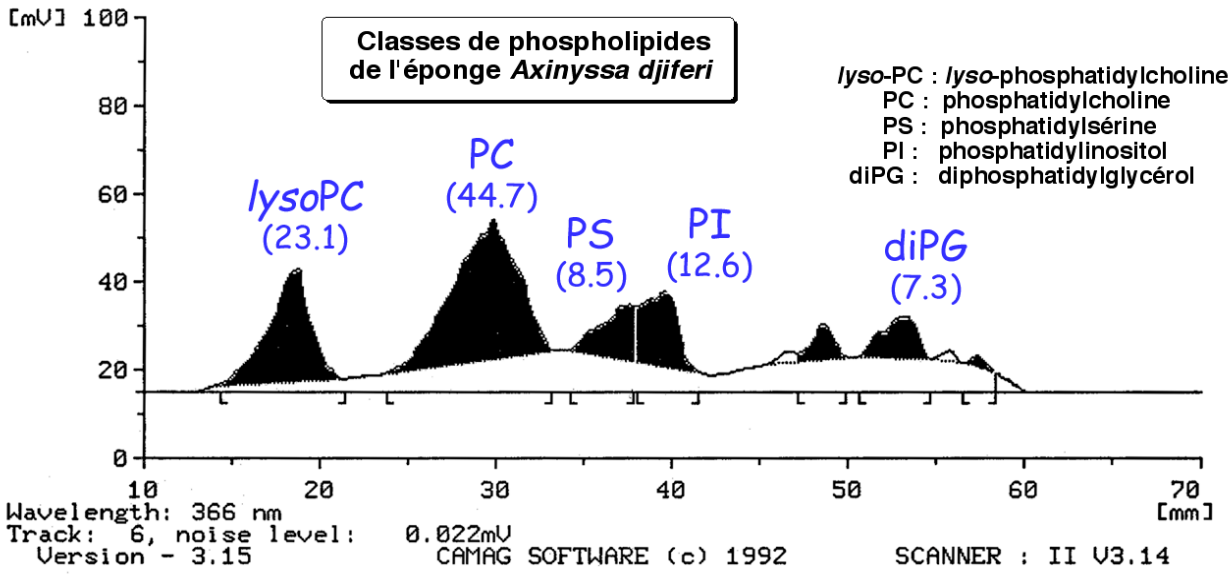
Les résultats présentés dans cette thèse s'appuient très largement sur l'utilisation intensive du couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Les déterminations structurales font appel à l'analyse fine des spectres de masse obtenus en impact électronique pour des dérivés volatils judicieusement choisis. C'est pourquoi il est apparu opportun de présenter ces spectres, chromatogrammes reconstitués et autres figures, aussi clairement que possible dans ce Tome 2 qui peut être consulté au fur et à mesure de la lecture du Tome 1 dont le sommaire est rappelé en début de volume.

Les différents spectres sont présentés éponge par éponge, d'abord pour les acides gras des phospholipides et ensuite pour les stérols.

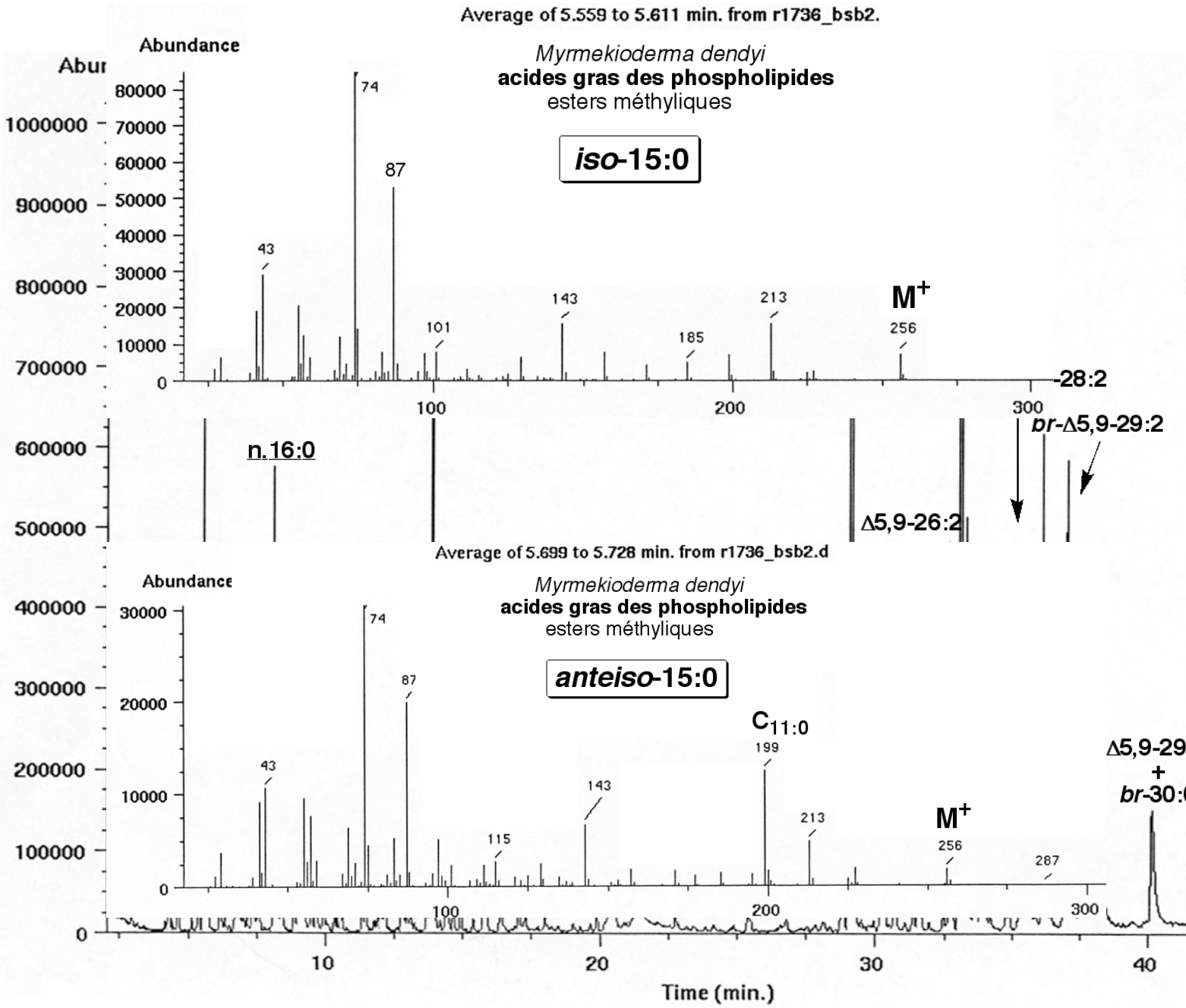
Quelques documents spectroscopiques concernant les deux terpènes isolés de l'espèce *Myrmekioderma dendyi* sont présentés à la fin du volume.

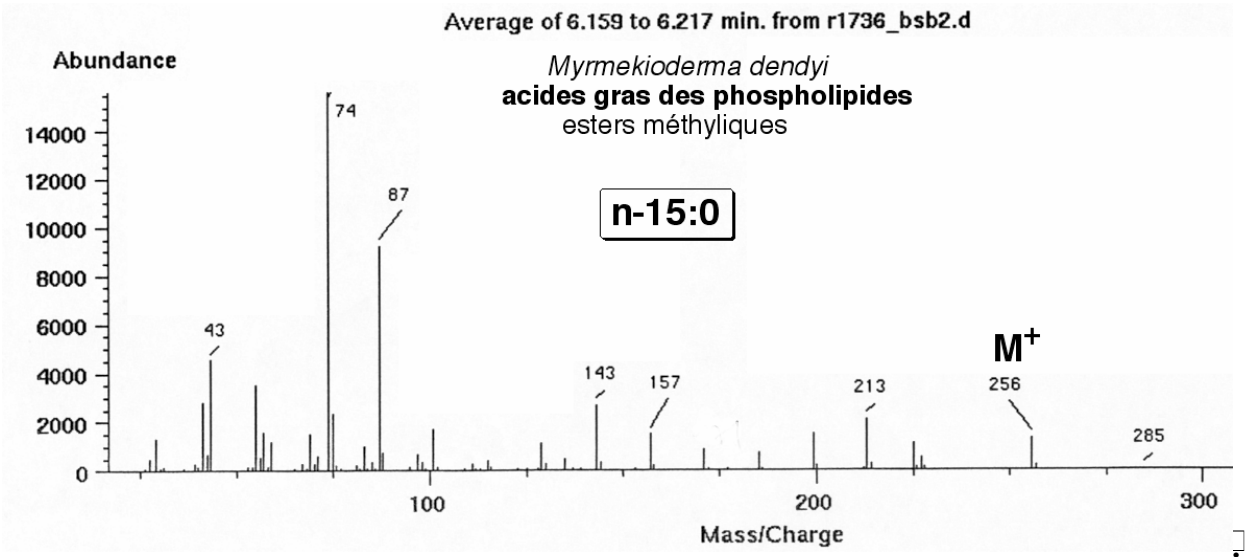
Exemples d'analyse HPTLC des classes de phospholipides

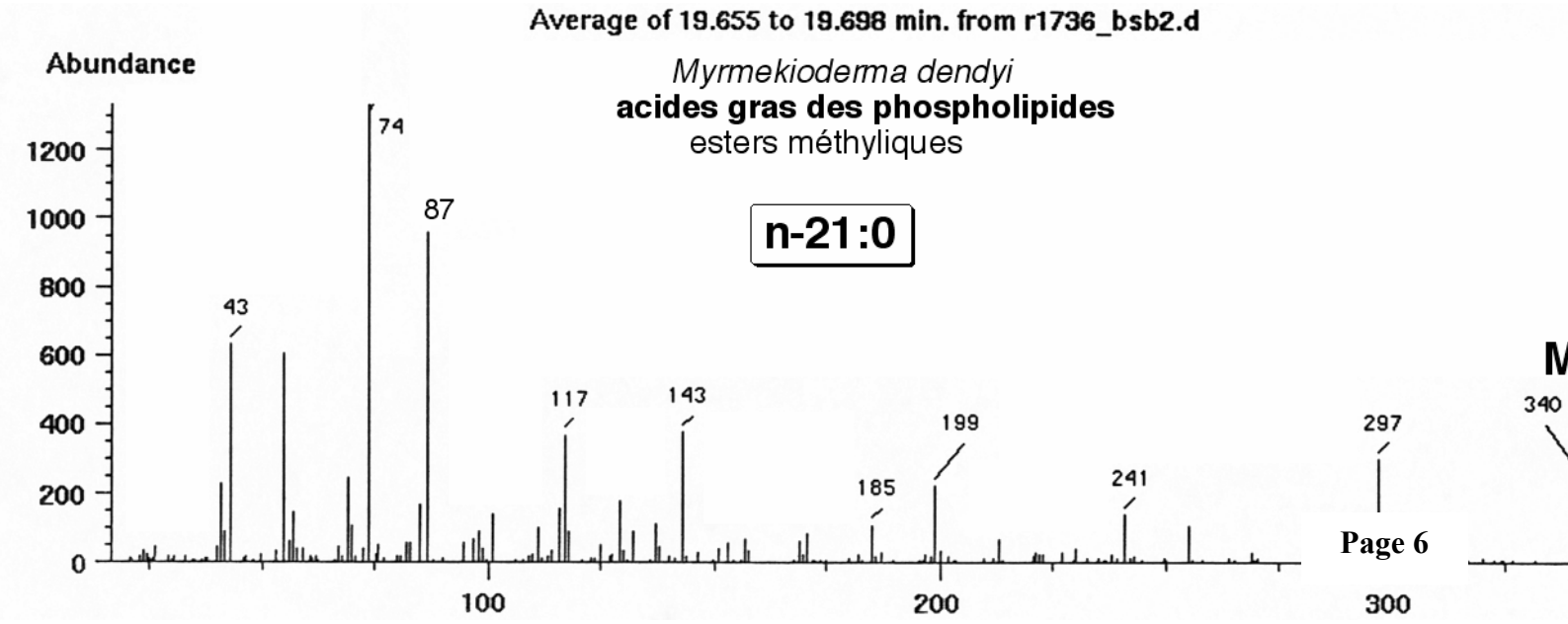


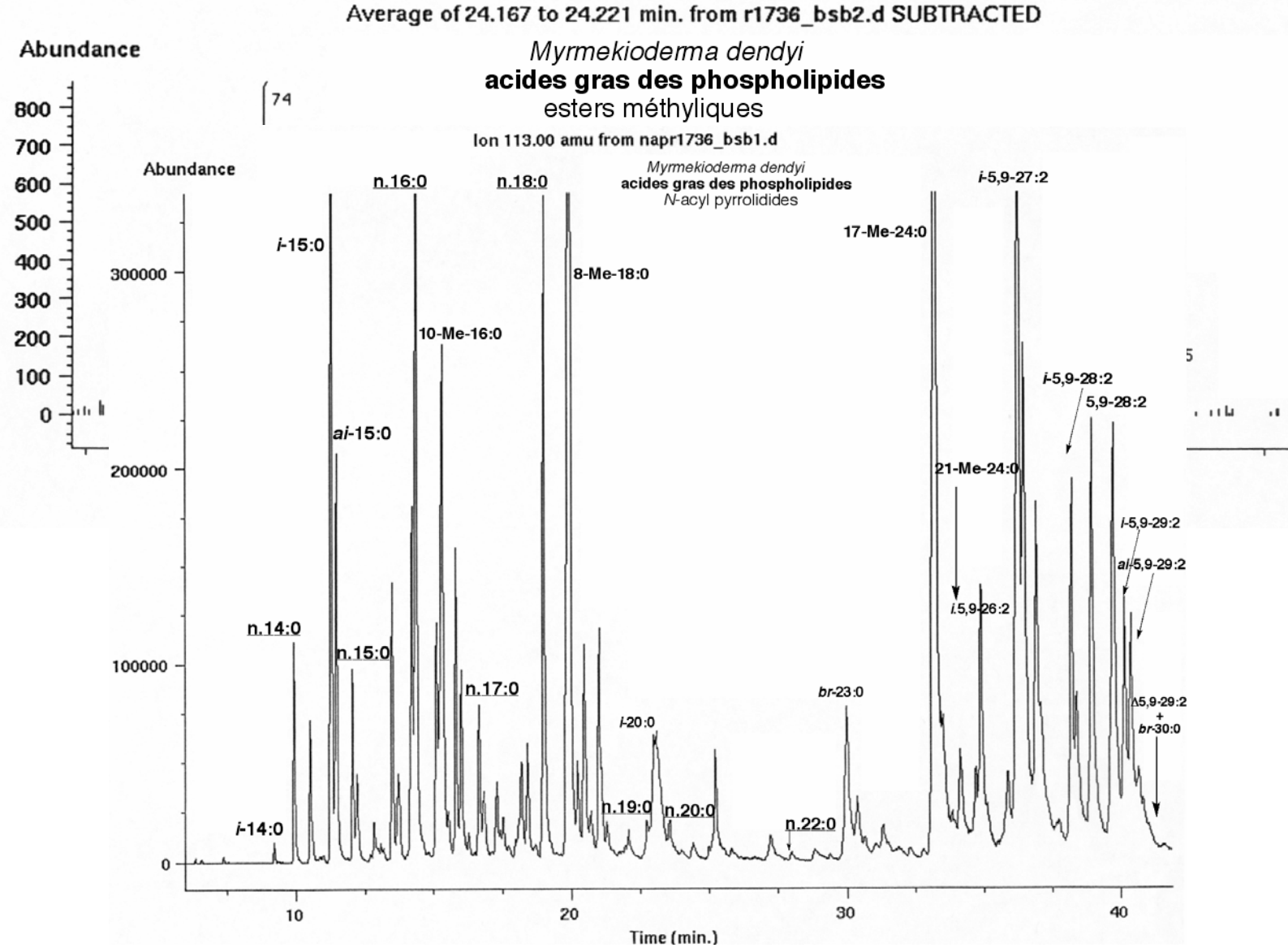


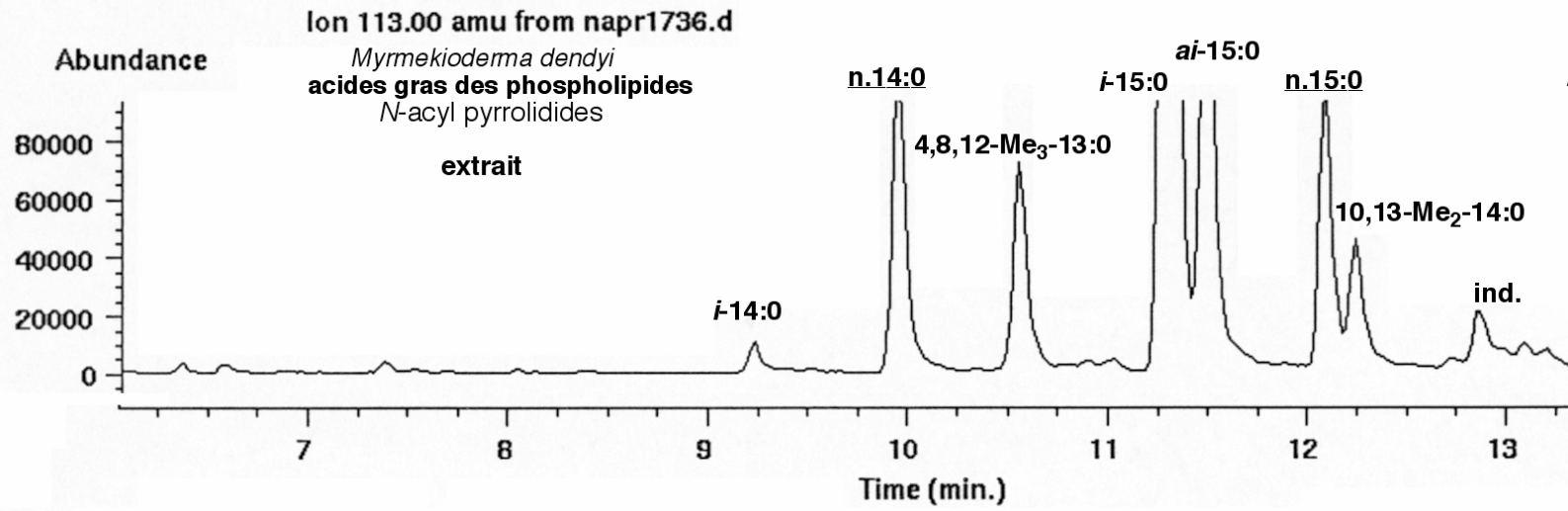
Analyses effectuées à l'IFREMER, Centre de Nantes
Laboratoire du Dr. J.-P. Gouygou

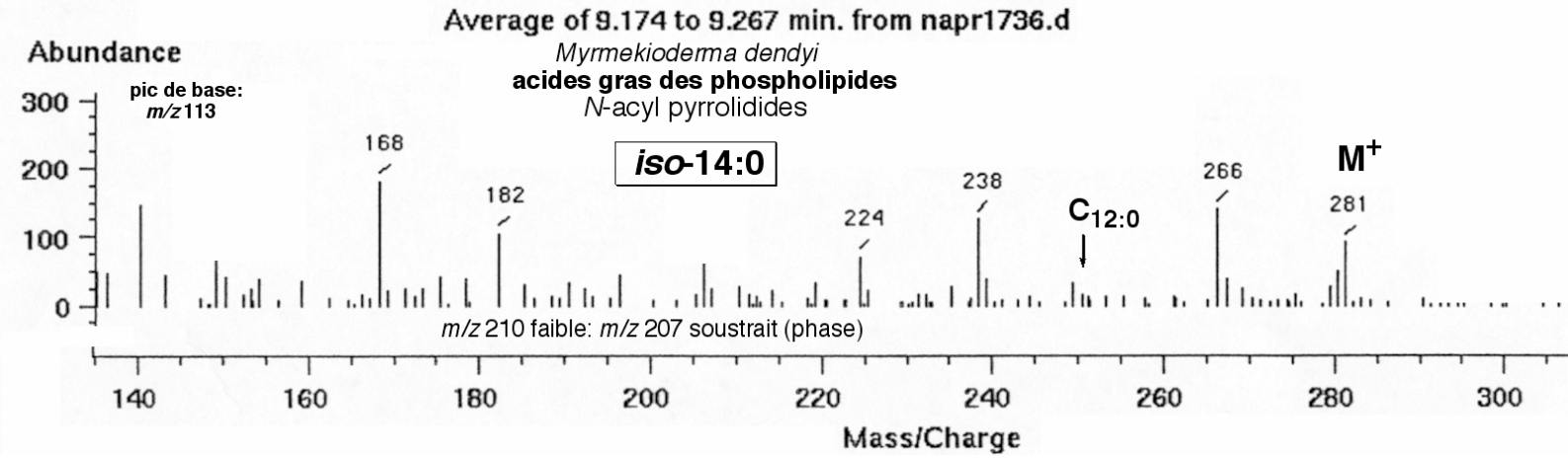

Average of 5.559 to 5.611 min. from r1736_bsb2.
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
iso-15:0
74
87
43
143
213
M+
256
101
185
-28:2
n.16:0
br-Δ5,9-29:2
Δ5,9-26:2
Average of 5.699 to 5.728 min. from r1736_bsb2.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
anteiso-15:0
74
87
C11:0
199
43
143
213
M+
256
115
287
Δ5,9-29:
+
br-30:0
Time (min.)

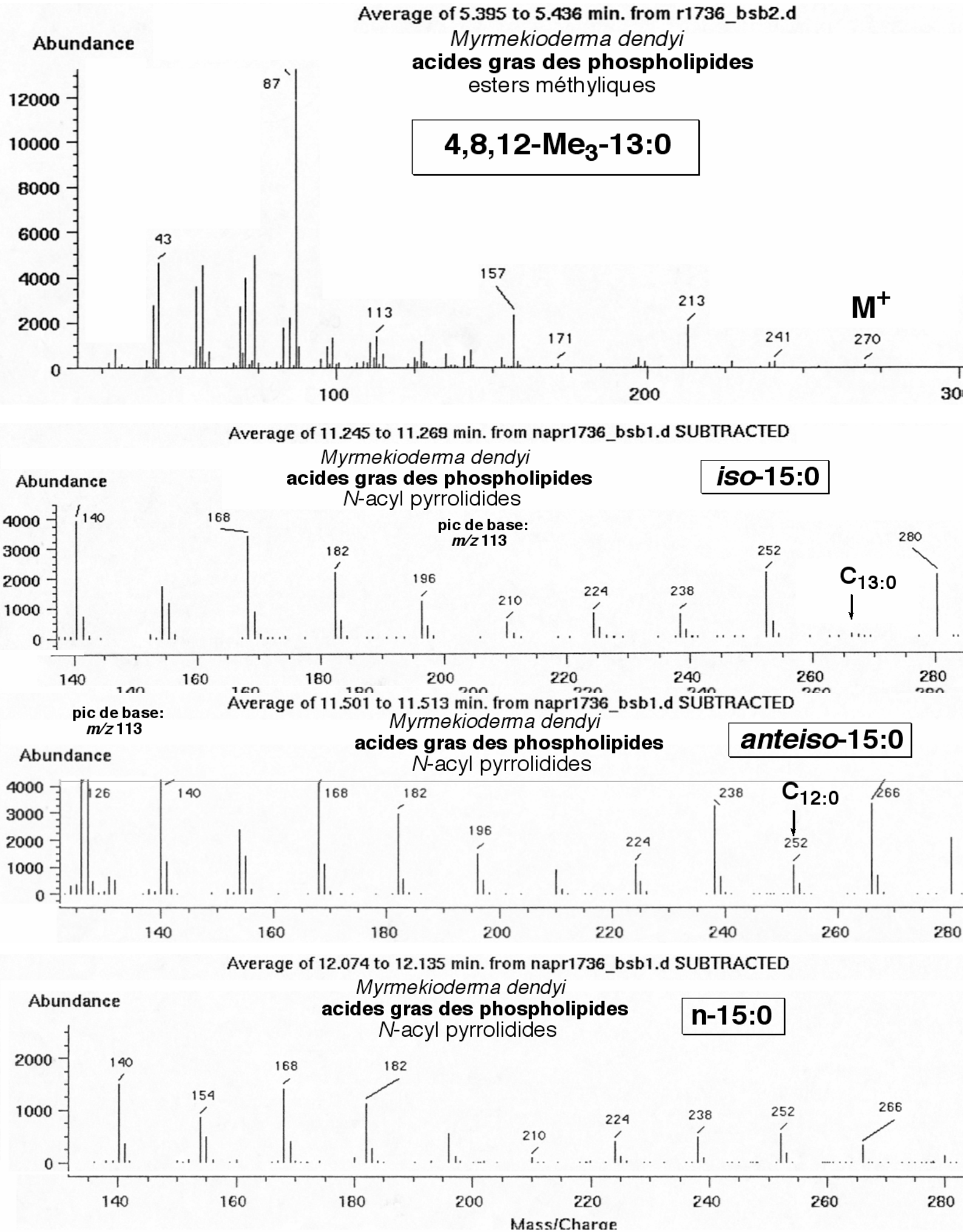

Average of 6.159 to 6.217 min. from r1736_bsb2.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
n-15:0
M+
74
87
43
143
157
213
256
285
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
100
200
300
Mass/Charge

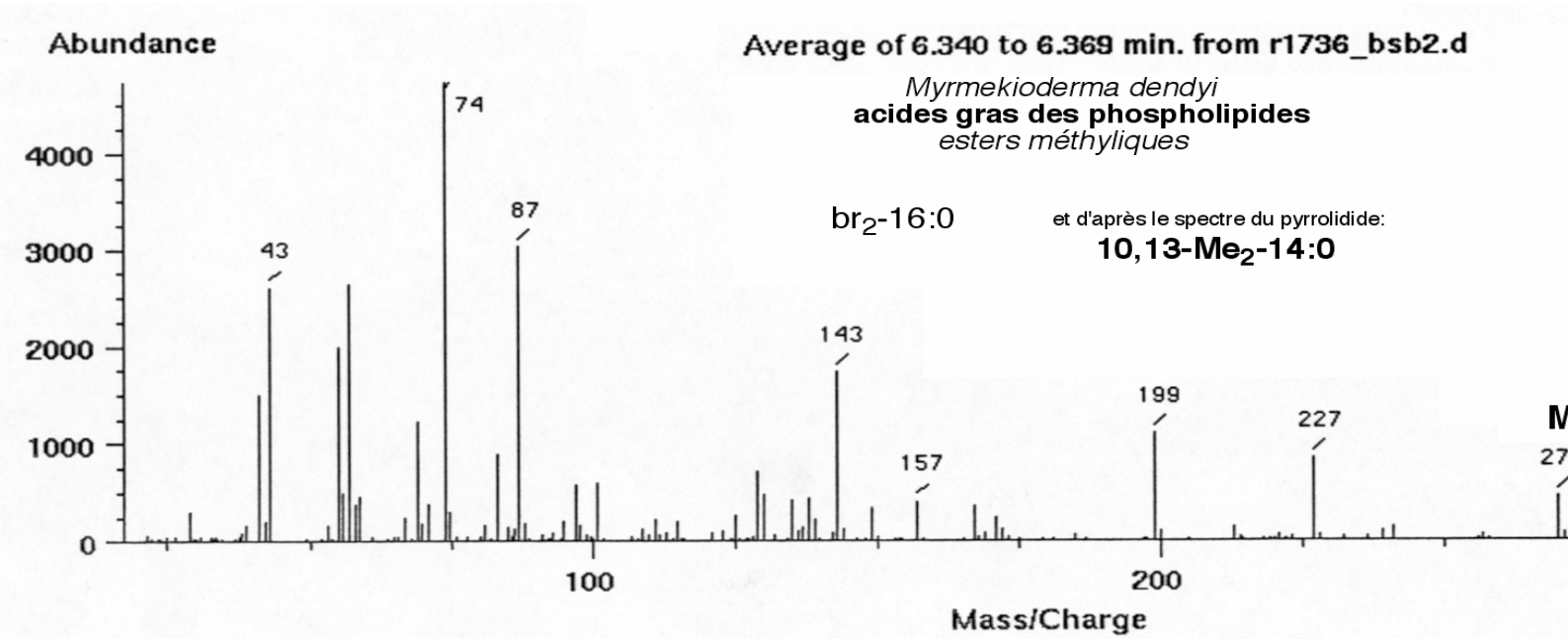

Average of 19.655 to 19.698 min. from r1736_bsb2.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
n-21:0
74
87
43
117
143
199
185
241
297
340
1200
1000
800
600
400
200
0
100
200
300

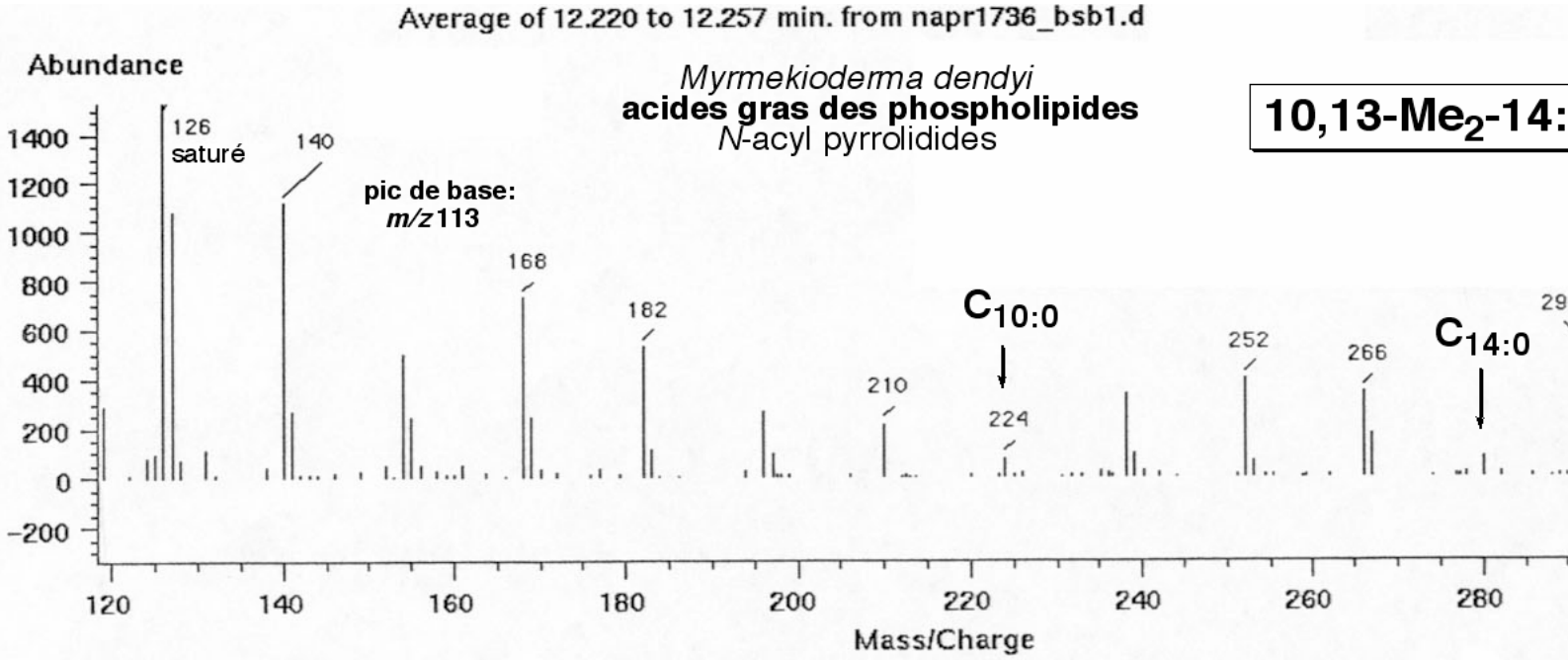

Average of 24.167 to 24.221 min. from r1736_bsb2.d SUBTRACTED
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
74
Ion 113.00 amu from napr1736_bsb1.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
n.16:0
n.18:0
i-15:0
8-Me-18:0
10-Me-16:0
ai-15:0
n.14:0
n.15:0
n.17:0
i-20:0
n.19:0
n.20:0
i-14:0
n.22:0
br-23:0
17-Me-24:0
i-5,9-27:2
i-5,9-28:2
5,9-28:2
21-Me-24:0
i-5,9-29:2
ai-5,9-29:2
i-5,9-26:2
Δ5,9-29:2
+
br-30:0
800
700
600
500
400
300
200
100
0
300000
200000
100000
0
10
20
30
40
Time (min.)

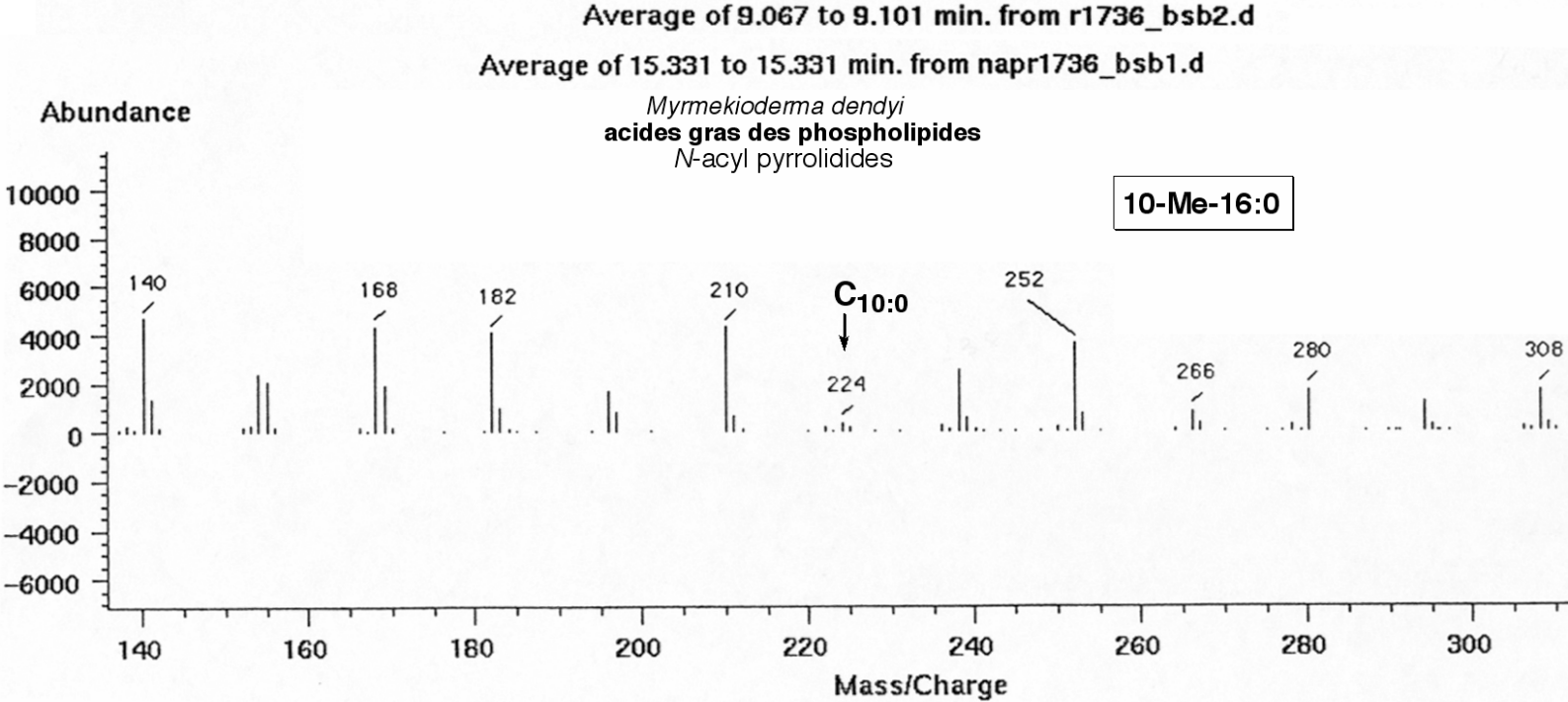

Ion 113.00 amu from napr1736.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
extrait
n.14:0
i-15:0
ai-15:0
n.15:0
4,8,12-Me3-13:0
10,13-Me2-14:0
i-14:0
ind.
80000
60000
40000
20000
0
7
8
9
10
11
12
13
Time (min.)

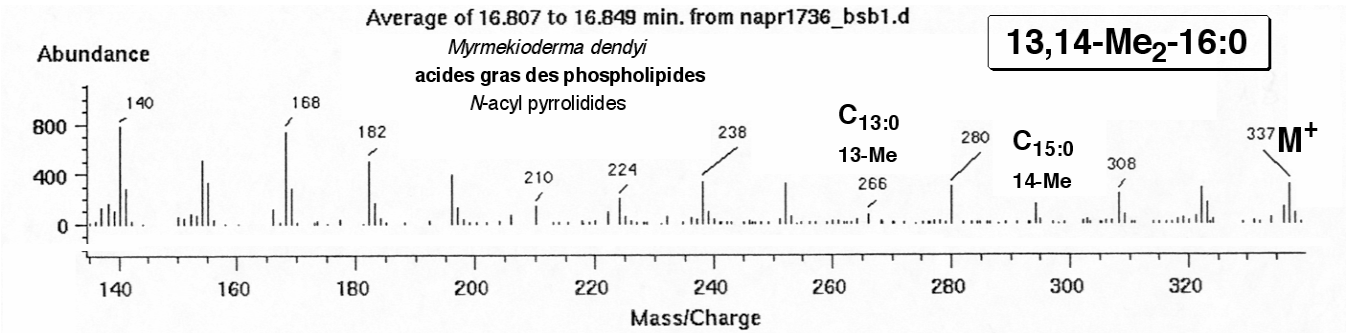

Average of 9.174 to 9.267 min. from napr1736.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
pic de base:
m/z 113
iso-14:0
168
182
224
238
C12:0
266
281
M+
300
200
100
0
m/z 210 faible: m/z 207 soustrait (phase)
140
160
180
200
220
240
260
280
300
Mass/Charge

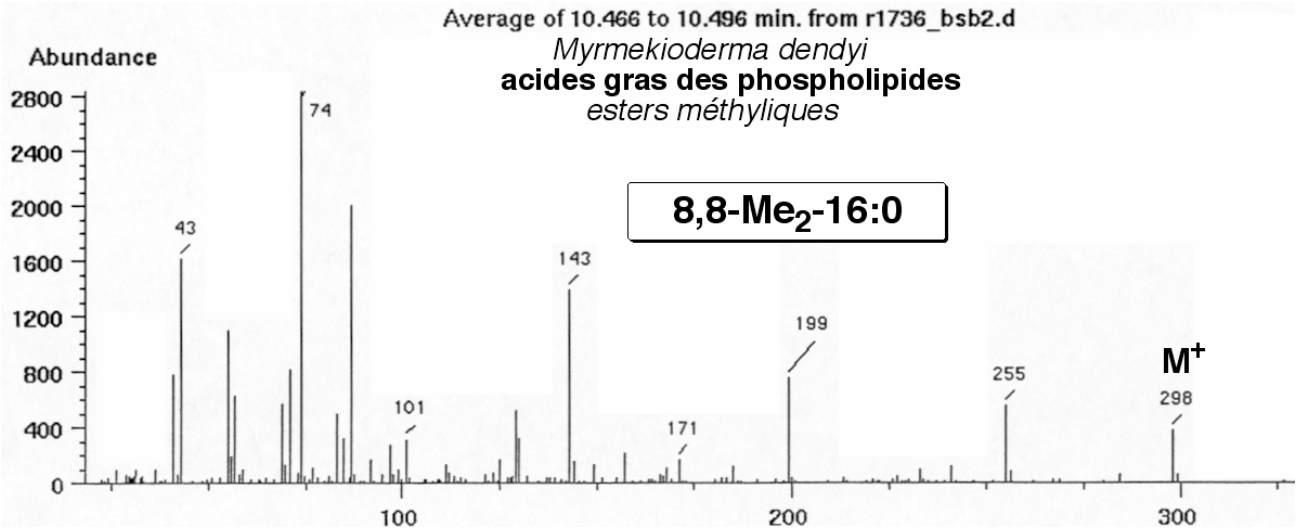

Average of 5.395 to 5.436 min. from r1736_bsb2.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
4,8,12-Me3-13:0
87
43
157
113
213
171
241
270
M+
Average of 11.245 to 11.269 min. from napr1736_bsb1.d SUBTRACTED
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
iso-15:0
pic de base:
m/z 113
140
168
182
196
210
224
238
252
280
C13:0
Average of 11.501 to 11.513 min. from napr1736_bsb1.d SUBTRACTED
pic de base:
m/z 113
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
anteiso-15:0
126
140
168
182
196
224
238
252
266
C12:0
Average of 12.074 to 12.135 min. from napr1736_bsb1.d SUBTRACTED
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
n-15:0
140
154
168
182
210
224
238
252
266
Mass/Charge

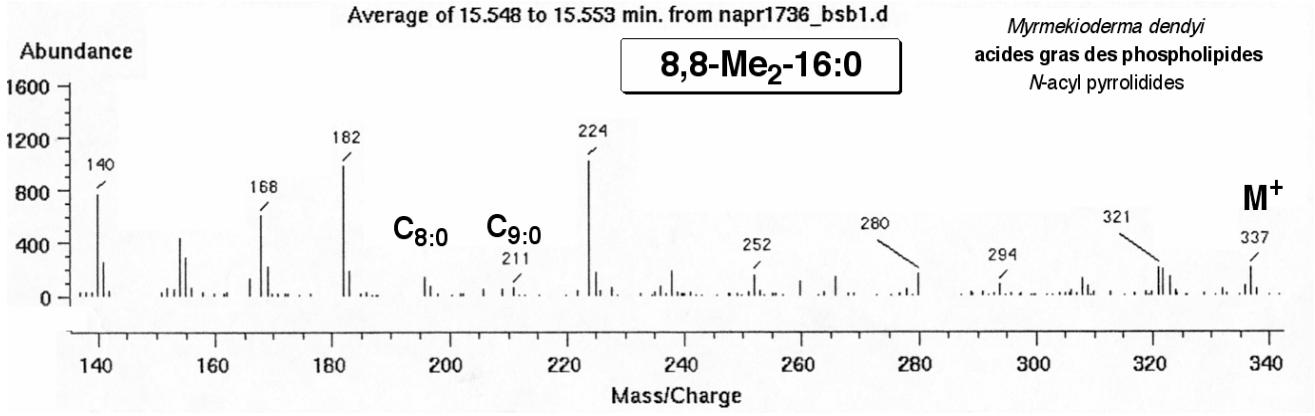

Abundance
Average of 6.340 to 6.369 min. from r1736_bsb2.d
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
br2-16:0
et d'après le spectre du pyrrolidide:
10,13-Me2-14:0
74
87
43
143
199
227
157
4000
3000
2000
1000
0
100
200
Mass/Charge

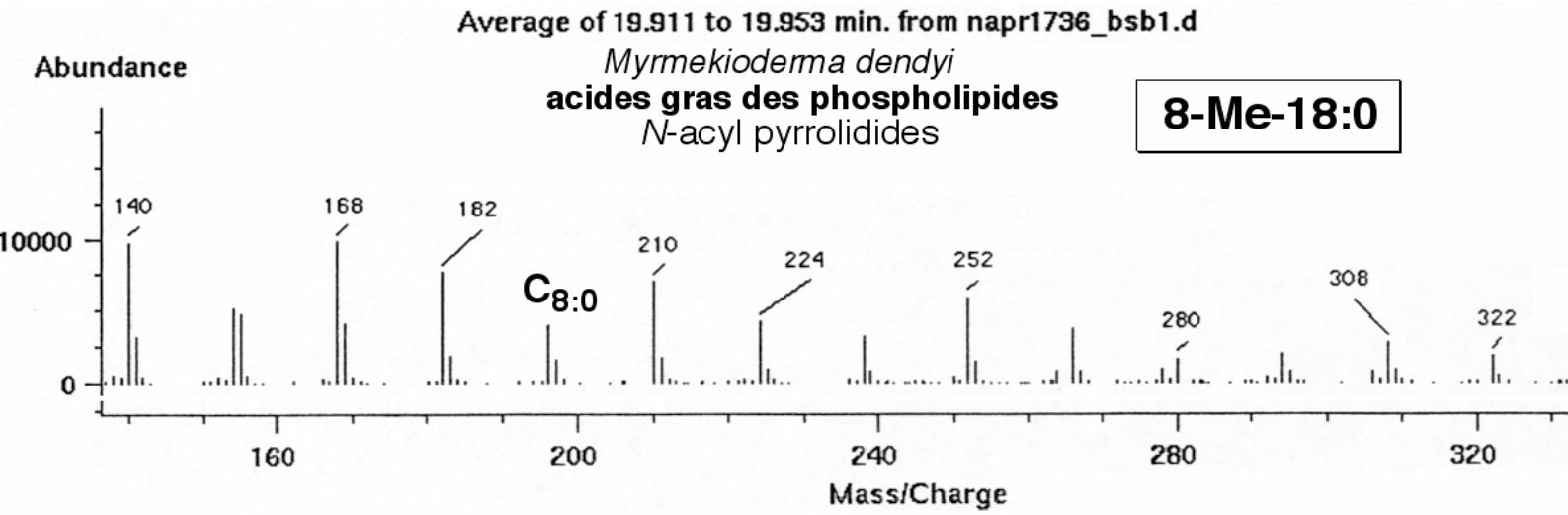

Average of 12.220 to 12.257 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
10,13-Me2-14:
126
saturé
140
pic de base:
m/z 113
168
182
C10:0
210
224
252
266
C14:0
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
120
140
160
180
200
220
240
260
280
Mass/Charge

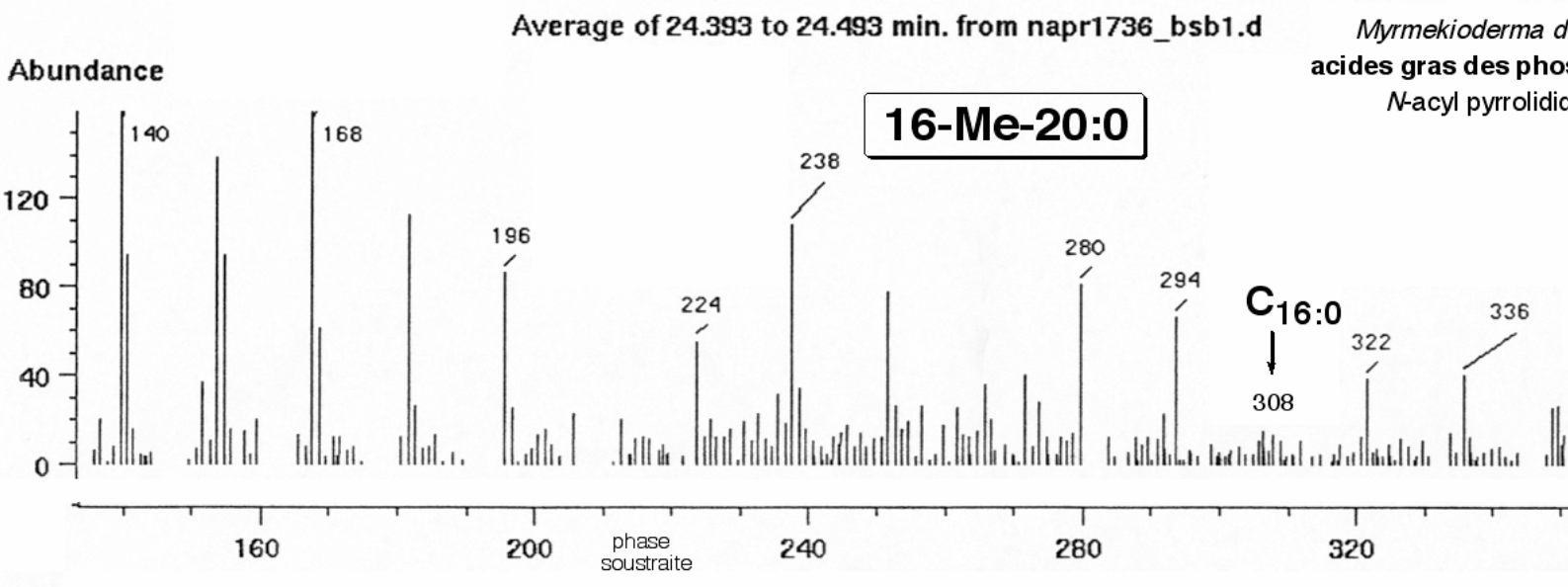

Average of 9.067 to 9.101 min. from r1736_bsb2.d
Average of 15.331 to 15.331 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
10-Me-16:0
140
168
182
210
C10:0
224
252
266
280
308
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
-4000
-6000
140
160
180
200
220
240
260
280
300
Mass/Charge

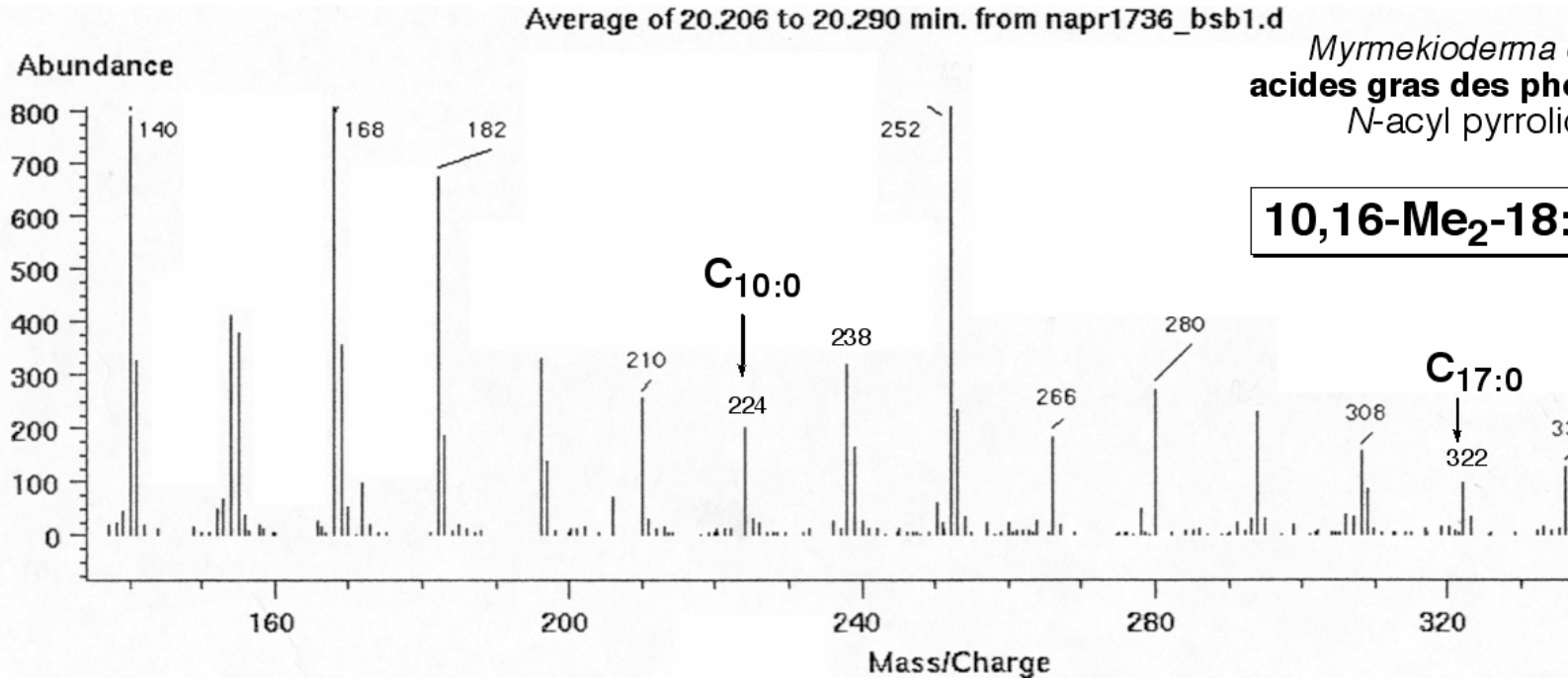

Average of 16.807 to 16.849 min. from napr1736_bsb1.d
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
13,14-Me2-16:0
Abundance
140
168
182
210
224
238
C13:0
13-Me
266
280
C15:0
14-Me
308
337
M+
800
400
0
140
160
180
200
220
240
260
280
300
320
Mass/Charge


Average of 10.466 to 10.496 min. from r1736_bsb2.d
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
8,8-Me2-16:0
Abundance
2800
2400
2000
1600
1200
800
400
0
74
43
143
199
255
M+
298
101
171
100
200
300


Average of 15.548 to 15.553 min. from napr1736_bsb1.d
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
8,8-Me2-16:0
Abundance
1600
1200
800
400
0
140
168
182
C8:0
C9:0
211
224
252
280
294
321
337
M+
140
160
180
200
220
240
260
280
300
320
340
Mass/Charge

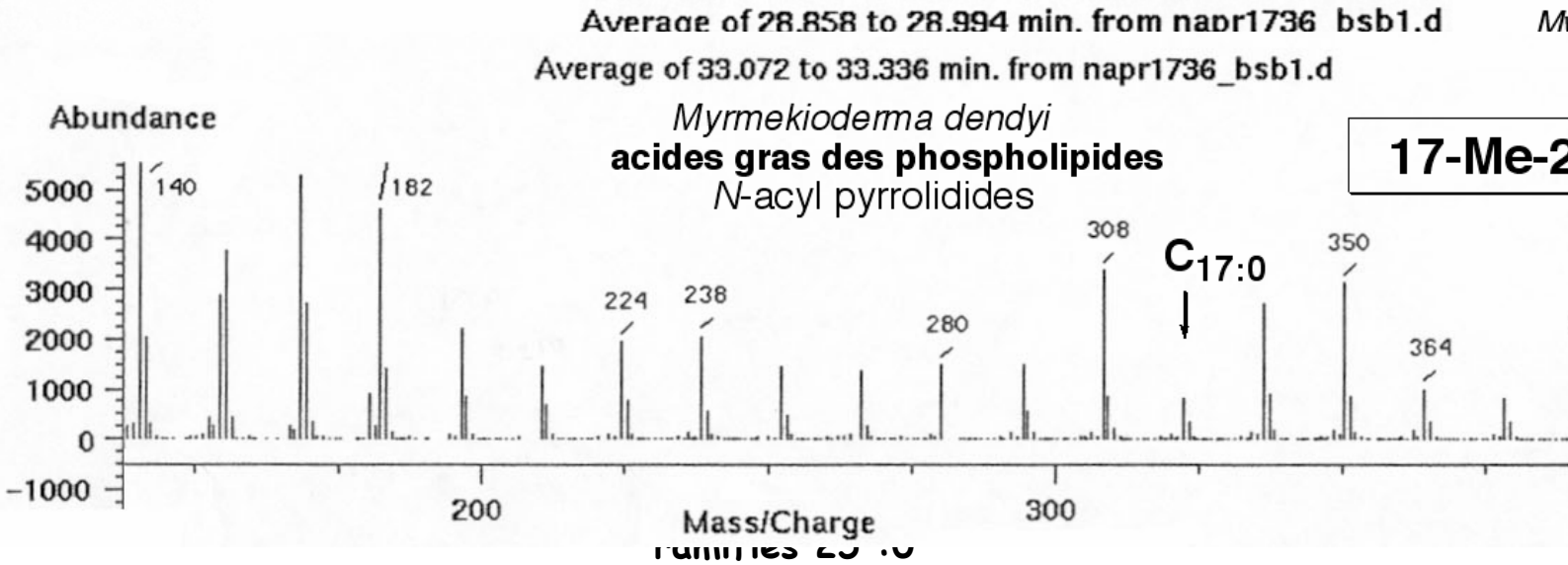

Average of 19.911 to 19.953 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
8-Me-18:0
10000
0
140
168
182
210
224
252
280
308
322
C8:0
160
200
240
280
320
Mass/Charge


Average of 24.393 to 24.493 min. from napr1736_bsb1.d
Myrmekioderma d
acides gras des phos
N-acyl pyrrolidid
Abundance
16-Me-20:0
120
80
40
0
140
168
196
224
238
280
294
C16:0
308
322
336
160
200
phase
soustraite
240
280
320



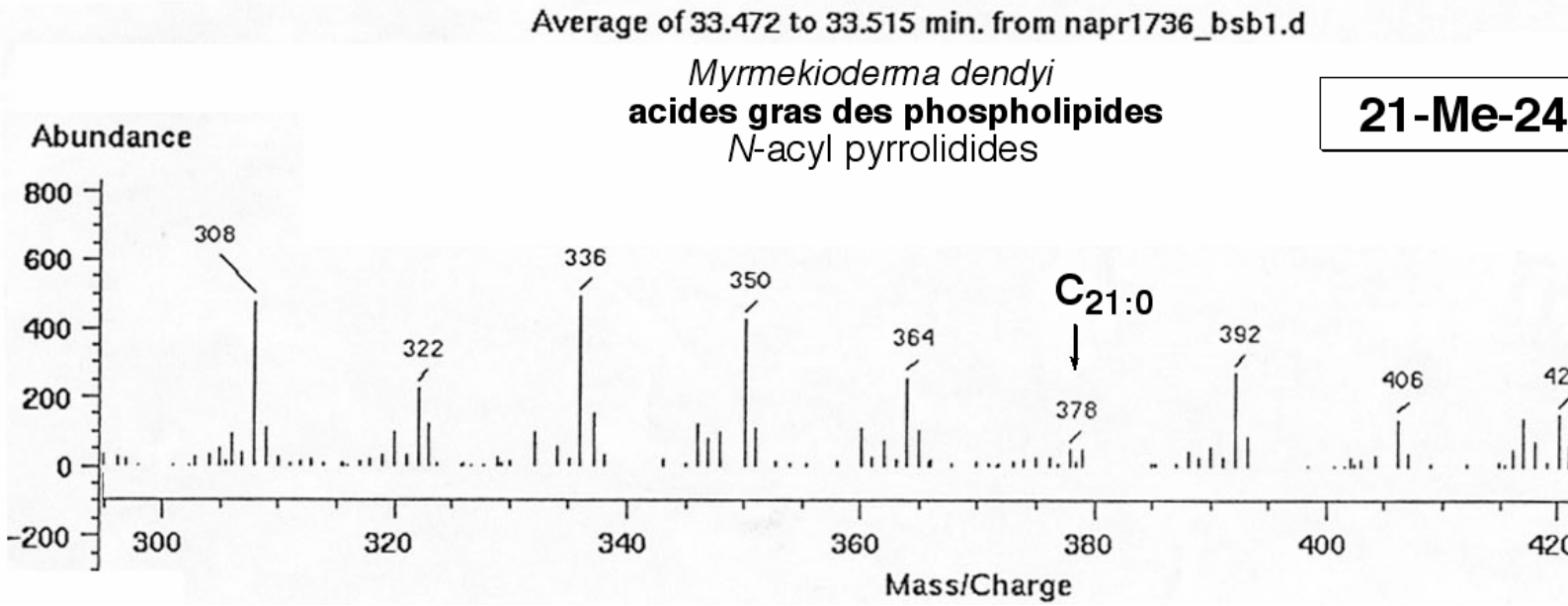
Myrmekioderma
acides gras des ph
N-acyl pyrroli

10,16-Me$_2$-18:



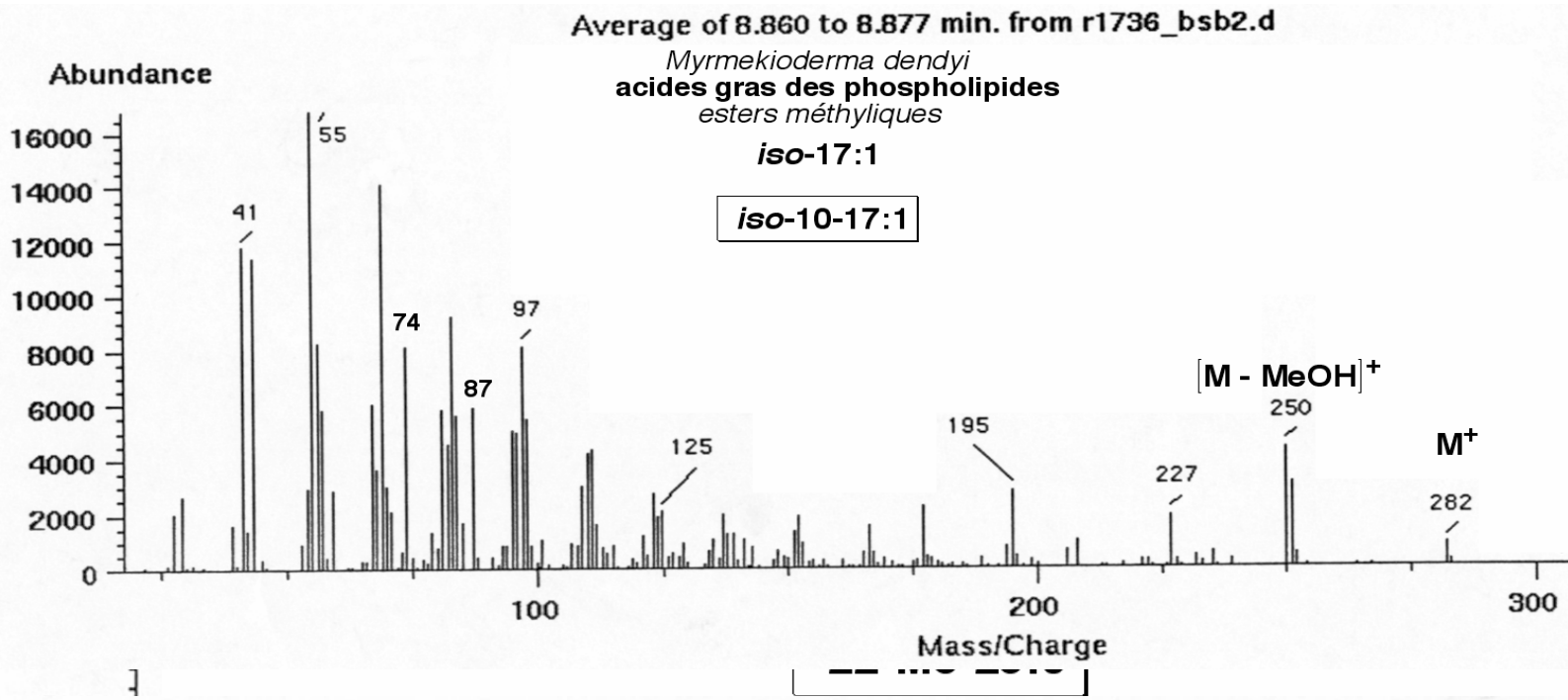
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides

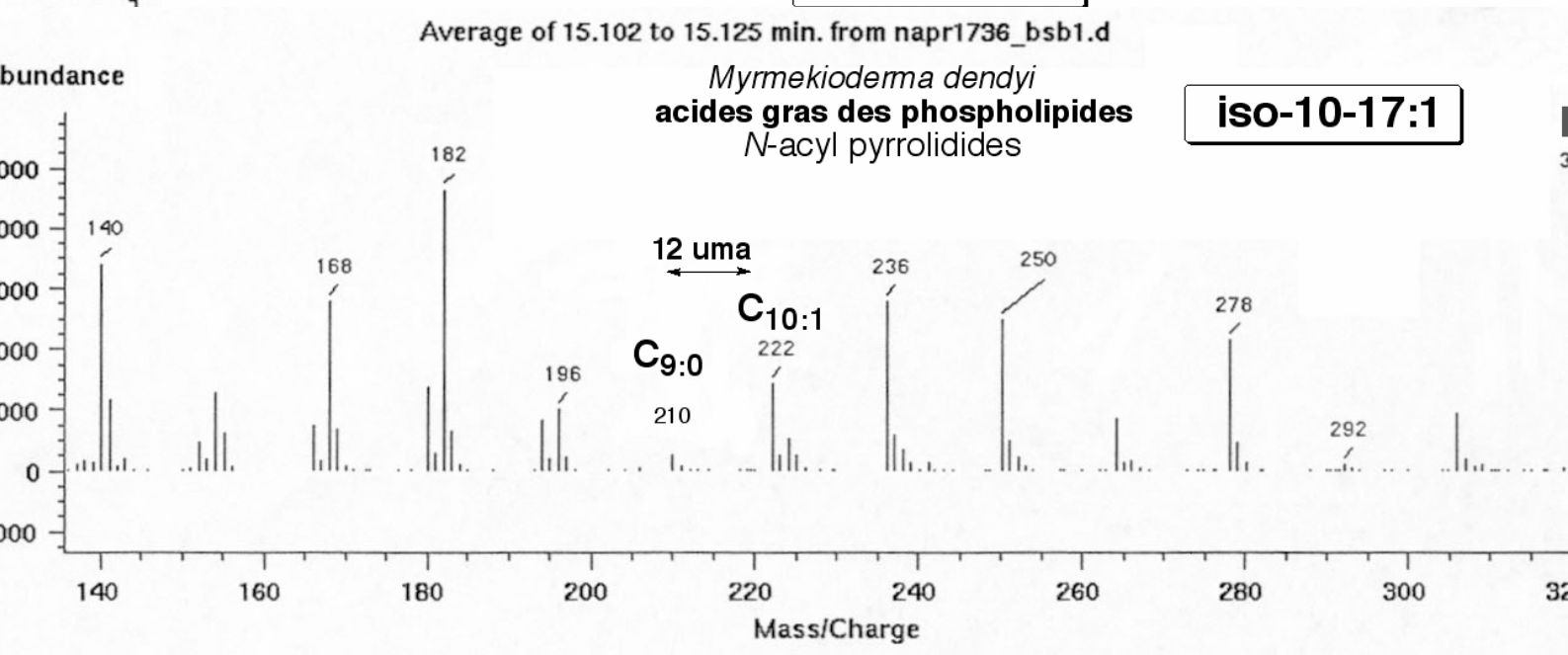
17-Me-2

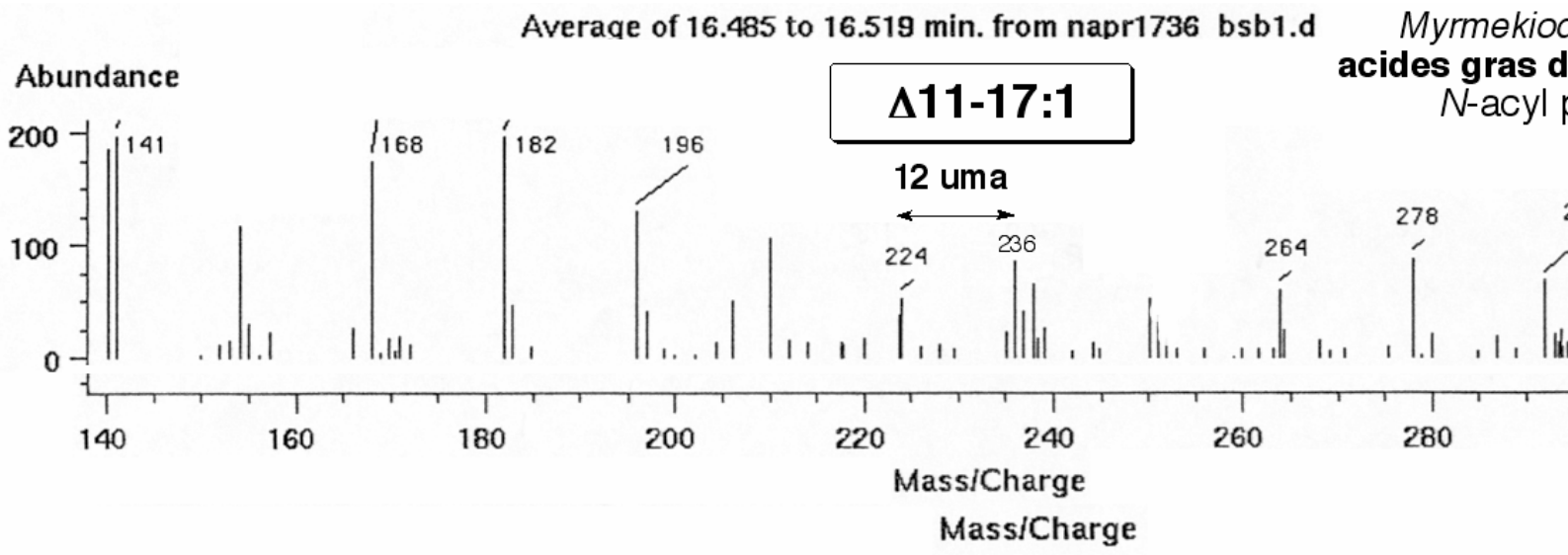


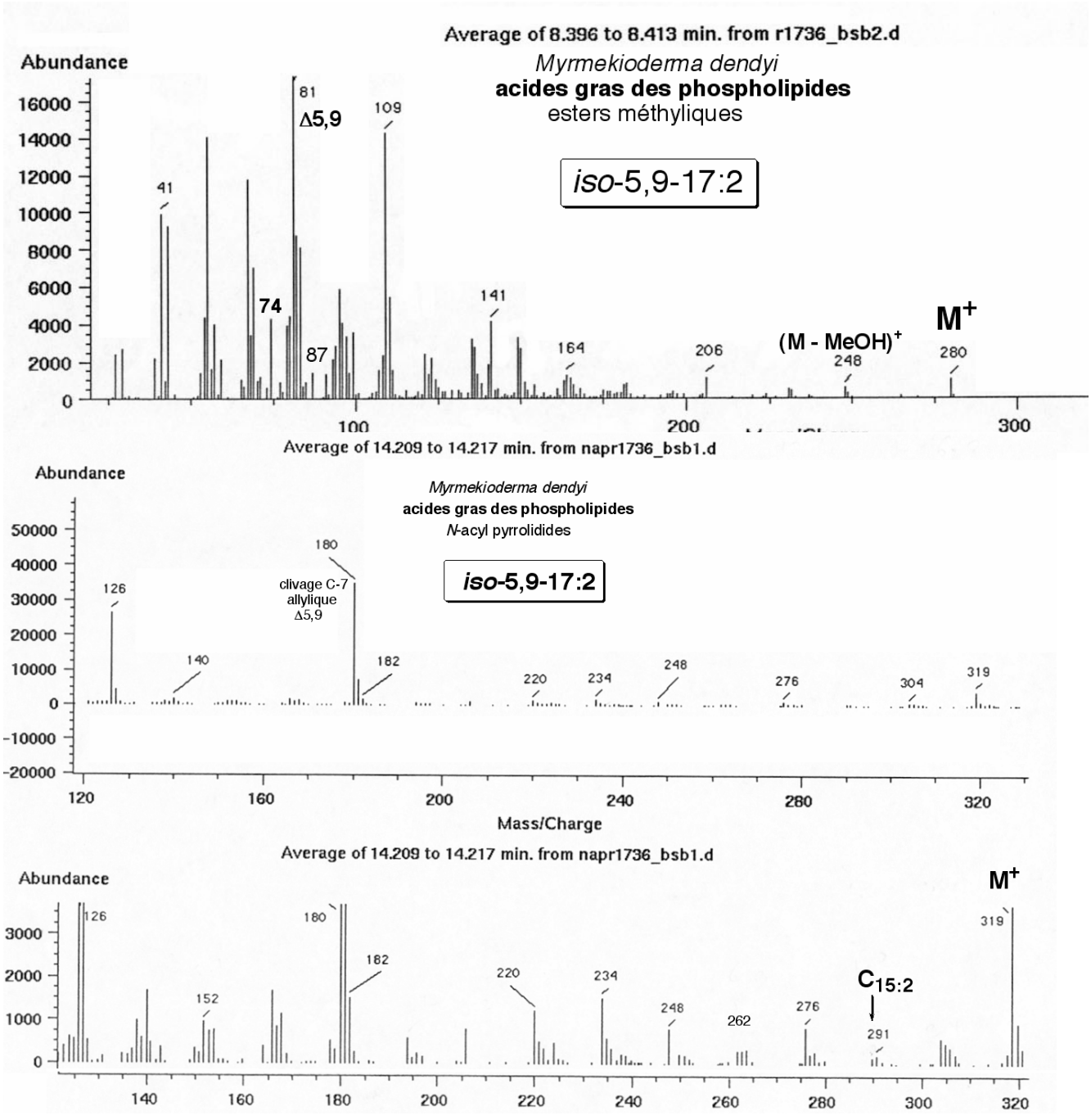
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides

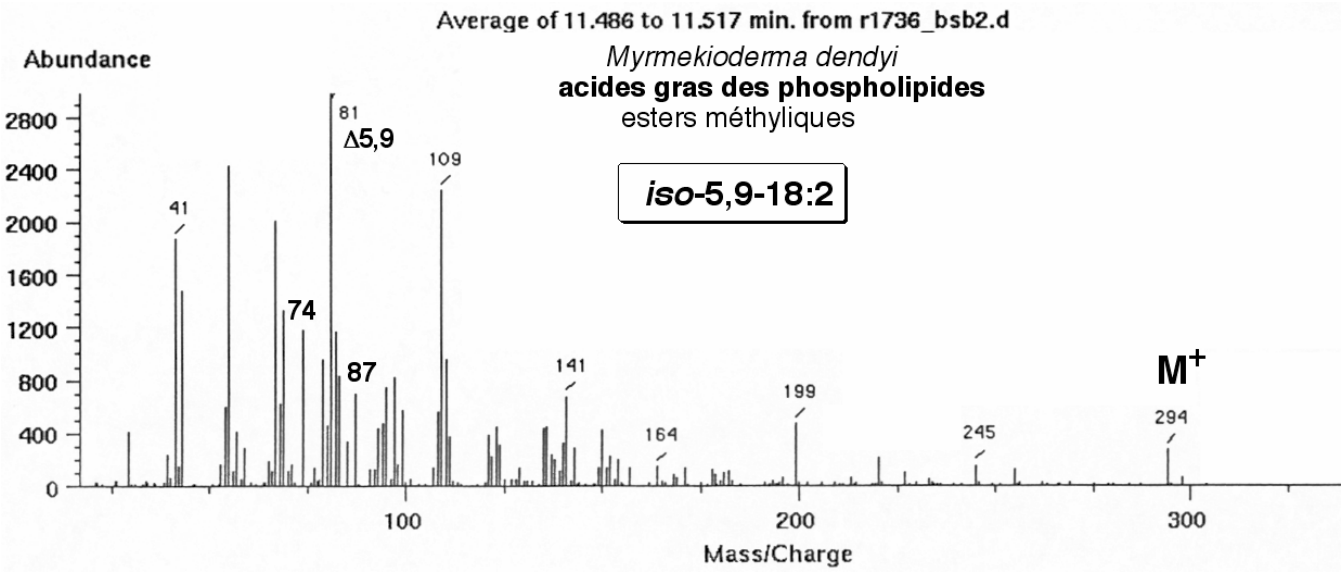
21-Me-24

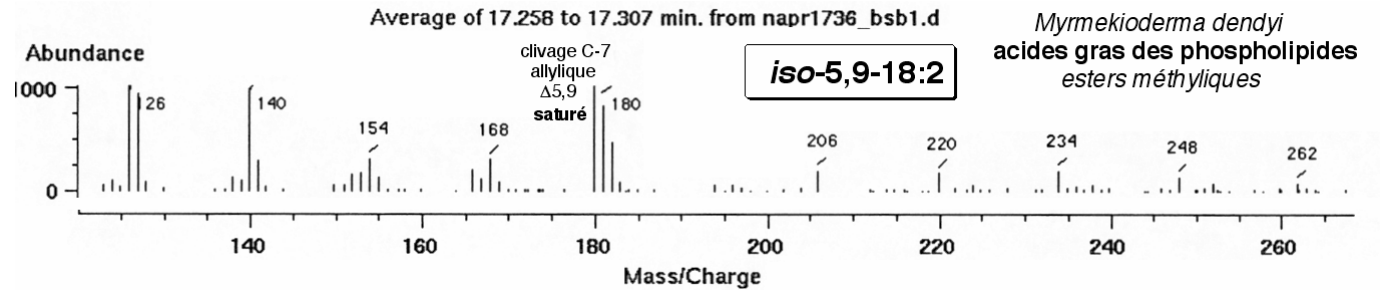

Average of 8.860 to 8.877 min. from r1736_bsb2.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
iso-17:1
iso-10-17:1
[M - MeOH]+
M+
Mass/Charge

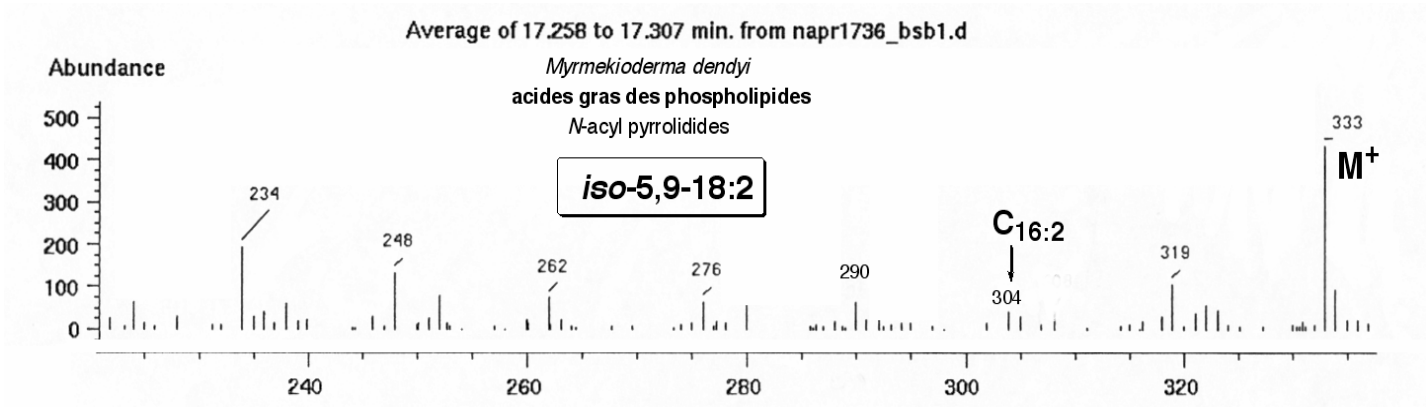

Average of 15.102 to 15.125 min. from napr1736_bsb1.d
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
iso-10-17:1
12 uma
C10:1
C9:0
210
Mass/Charge

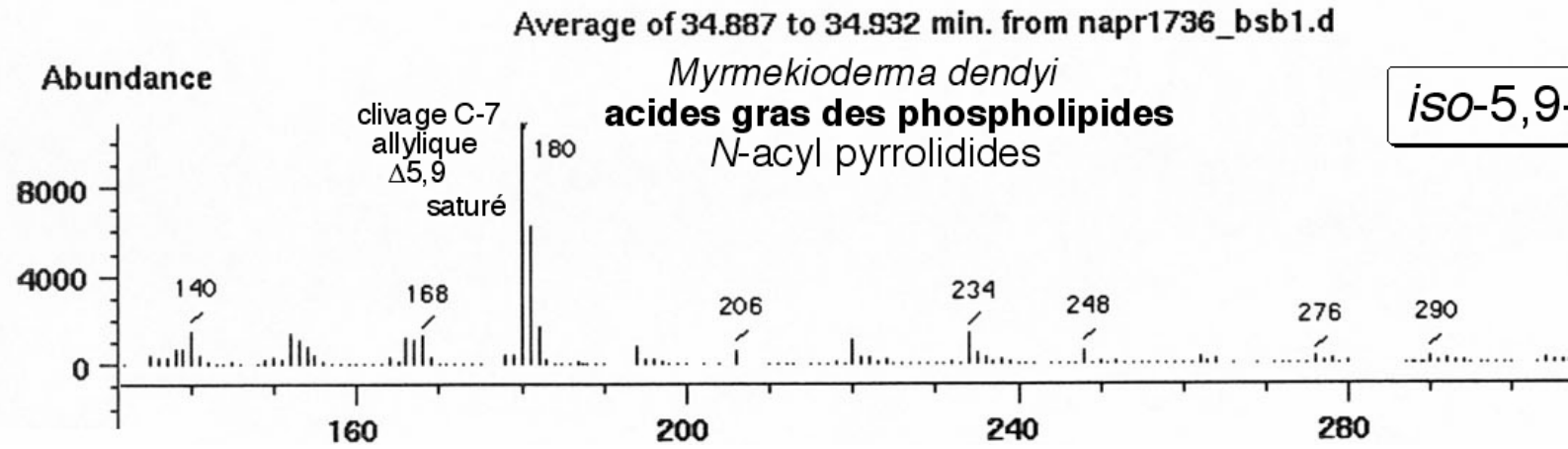

Average of 16.485 to 16.519 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
Δ11-17:1
12 uma
Mass/Charge
Mass/Charge

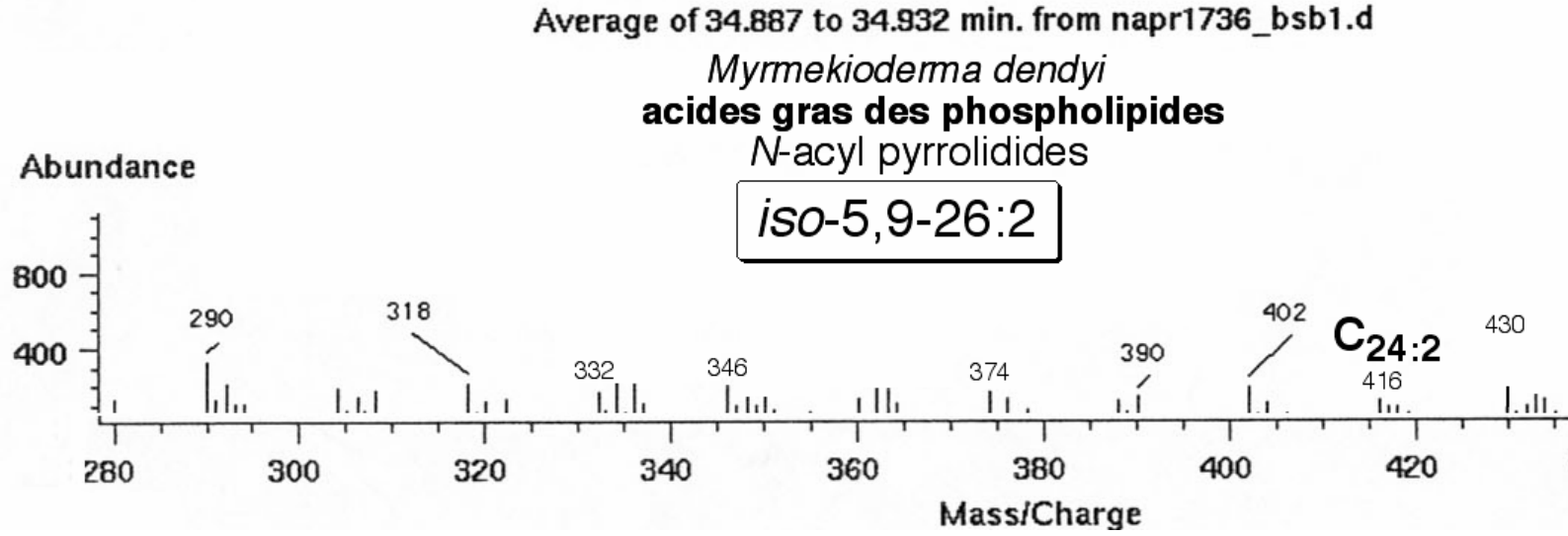

Average of 8.396 to 8.413 min. from r1736_bsb2.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
iso-5,9-17:2
81
Δ5,9
109
41
74
87
141
164
206
(M - MeOH)+
248
M+
280
Average of 14.209 to 14.217 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
iso-5,9-17:2
180
clivage C-7
allylique
Δ5,9
126
140
182
220
234
248
276
304
319
Mass/Charge
Average of 14.209 to 14.217 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
M+
126
180
182
152
220
234
248
262
276
291
319
C15:2

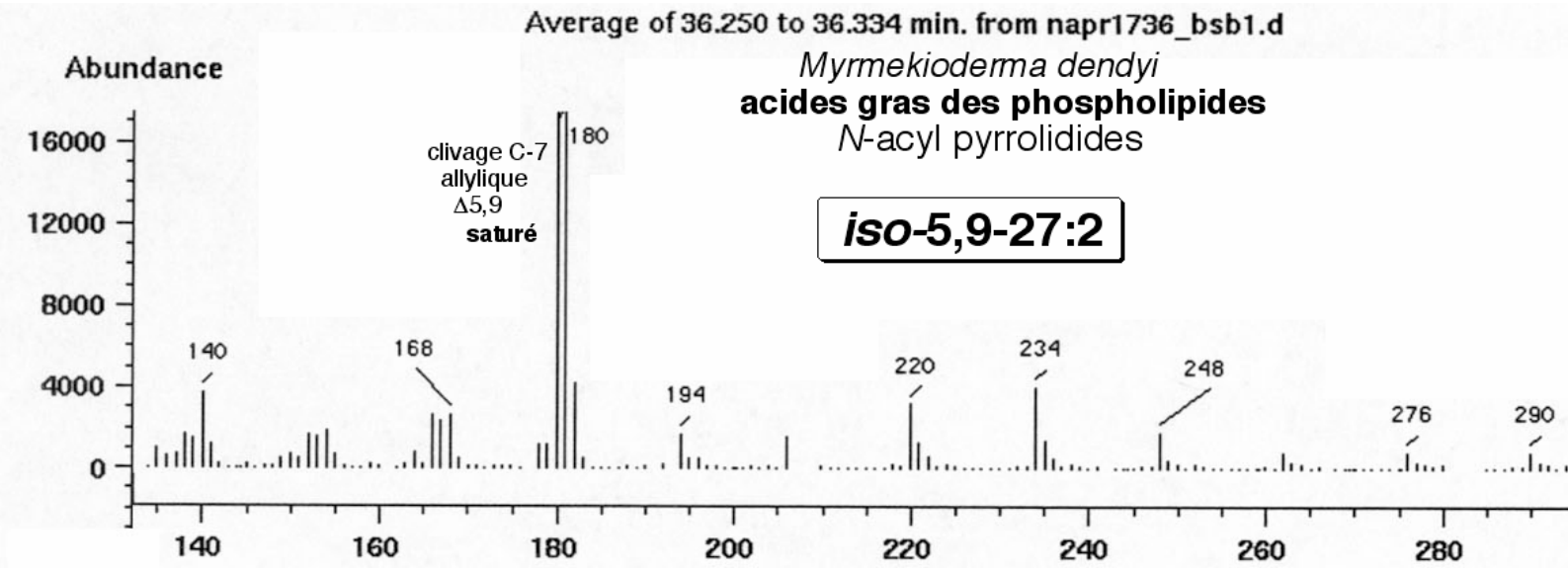

Average of 11.486 to 11.517 min. from r1736_bsb2.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
***iso*-5,9-18:2**
81
Δ5,9
109
41
74
87
141
199
164
245
294
M+
Mass/Charge

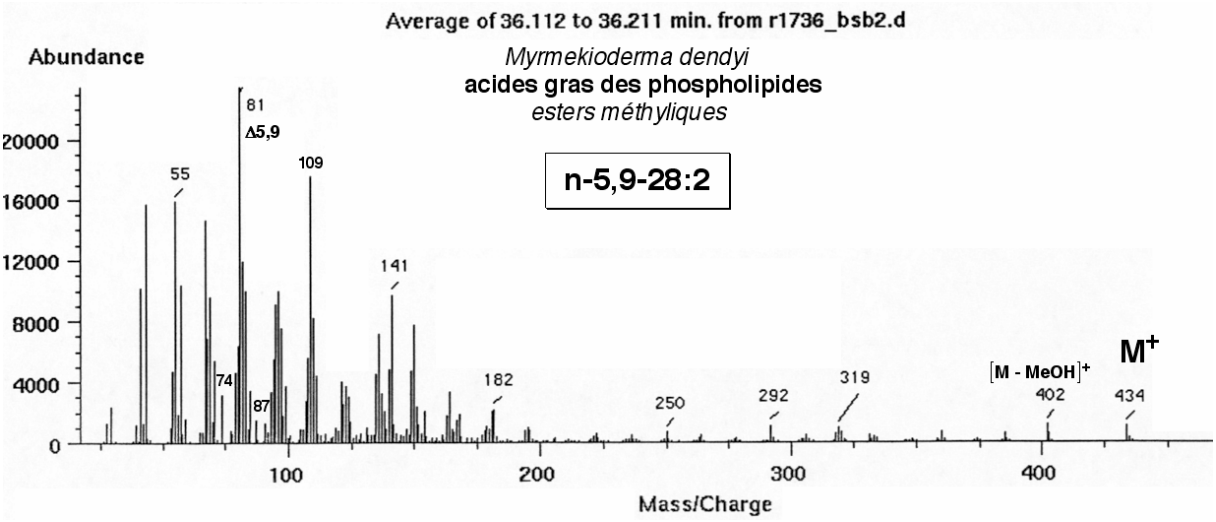

Average of 17.258 to 17.307 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
clivage C-7
allylique
Δ5,9
saturé
***iso*-5,9-18:2**
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
26
140
154
168
180
206
220
234
248
262
Mass/Charge

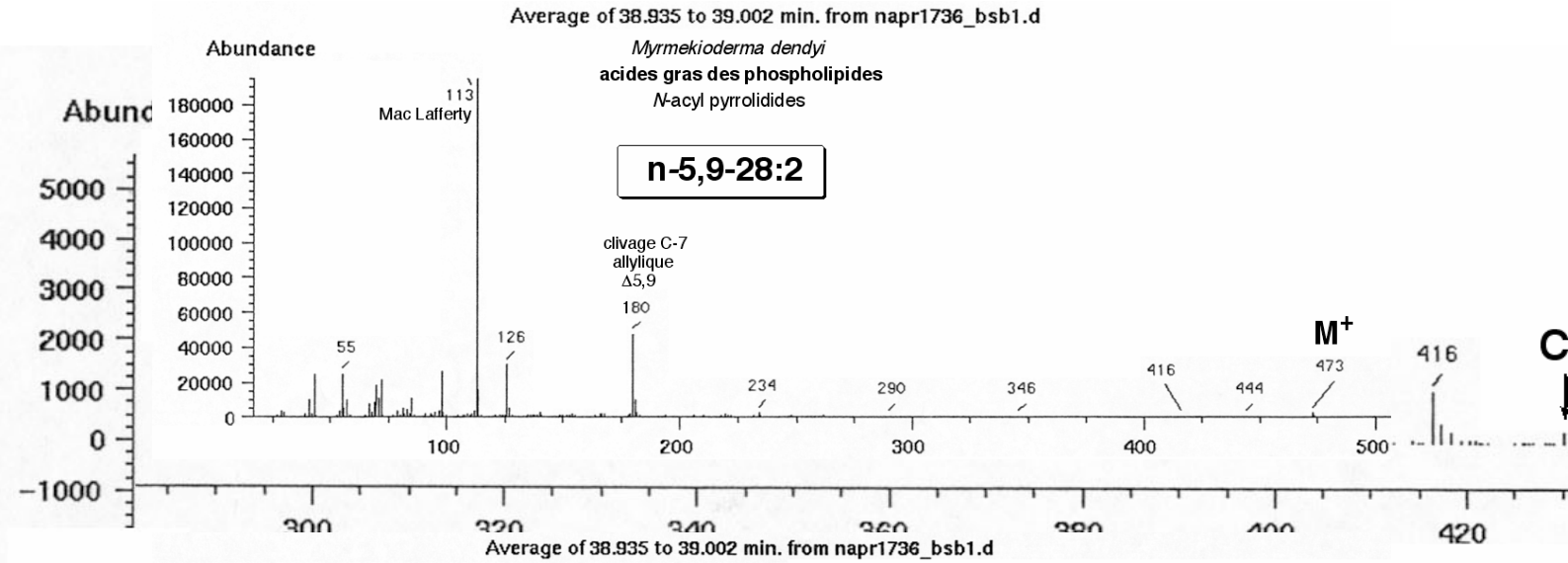

Average of 17.258 to 17.307 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
***iso*-5,9-18:2**
234
248
262
276
290
C16:2
304
319
333
M+

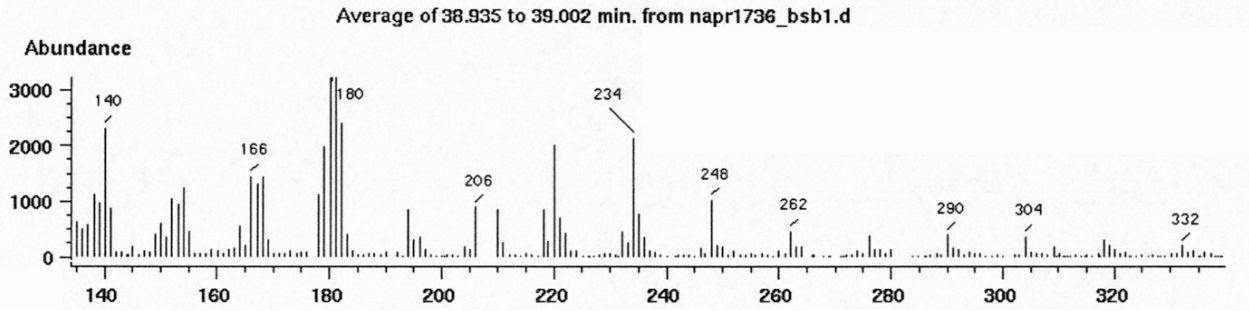

Average of 34.887 to 34.932 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
iso-5,9-
clivage C-7
allylique
Δ5,9
saturé
180
140
168
206
234
248
276
290
8000
4000
0
160
200
240
280

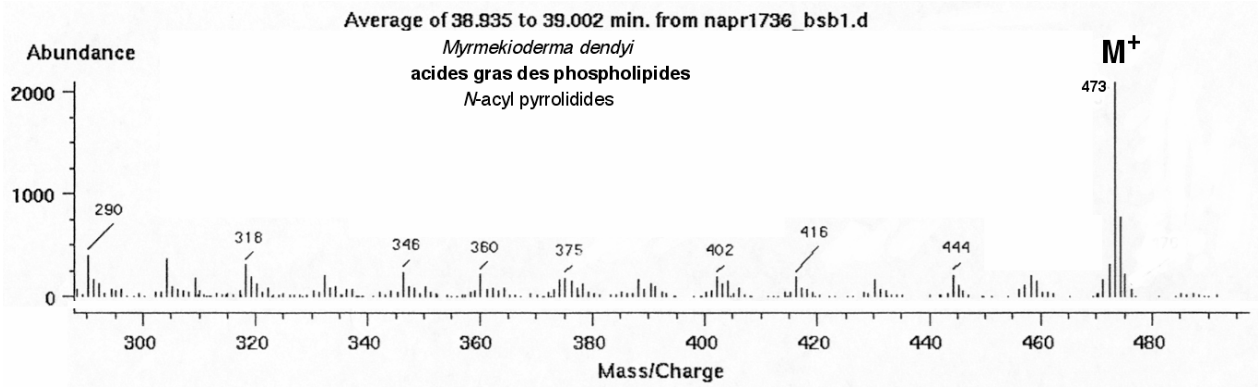

Average of 34.887 to 34.932 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
iso-5,9-26:2
290
318
332
346
374
390
402
C24:2
416
430
800
400
280
300
320
340
360
380
400
420
Mass/Charge

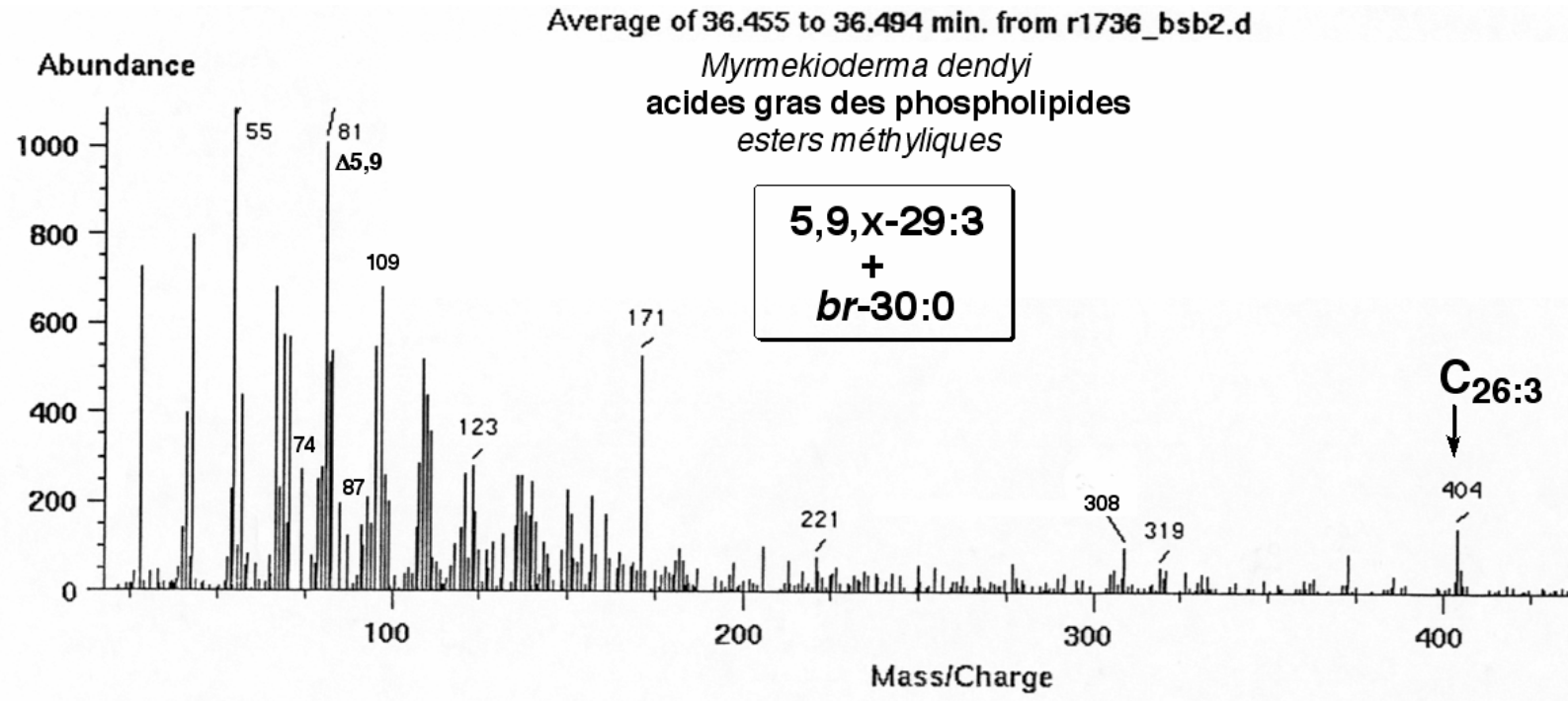

Average of 36.250 to 36.334 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
iso-5,9-27:2
clivage C-7
allylique
Δ5,9
saturé
180
140
168
194
220
234
248
276
290
16000
12000
8000
4000
0
140
160
180
200
220
240
260
280

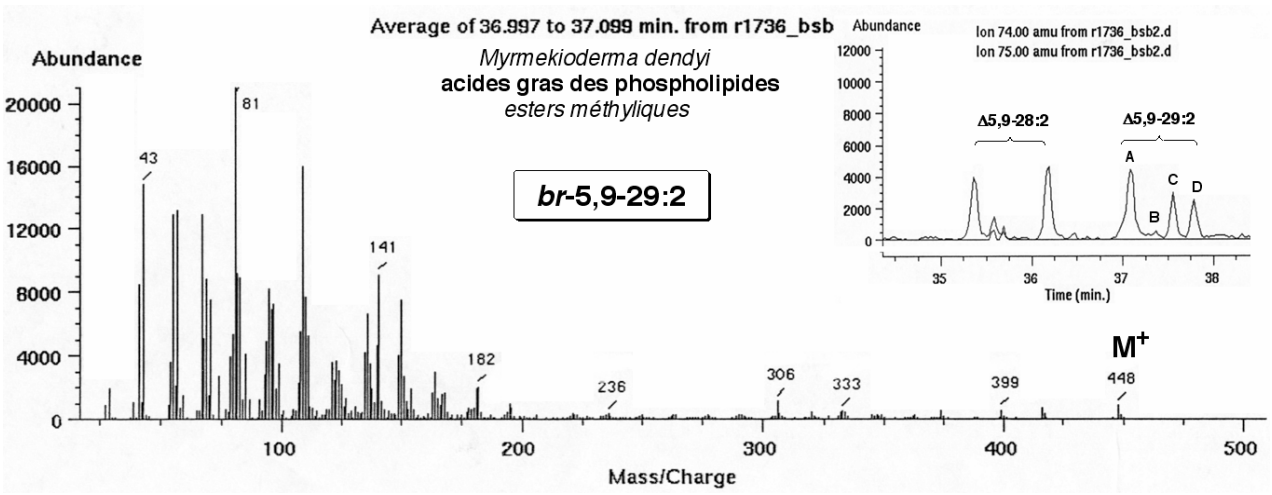

Average of 36.112 to 36.211 min. from r1736_bsb2.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
n-5,9-28:2
81
Δ5,9
55
109
141
74
87
182
250
292
319
[M - MeOH]+
402
434
M+
Mass/Charge

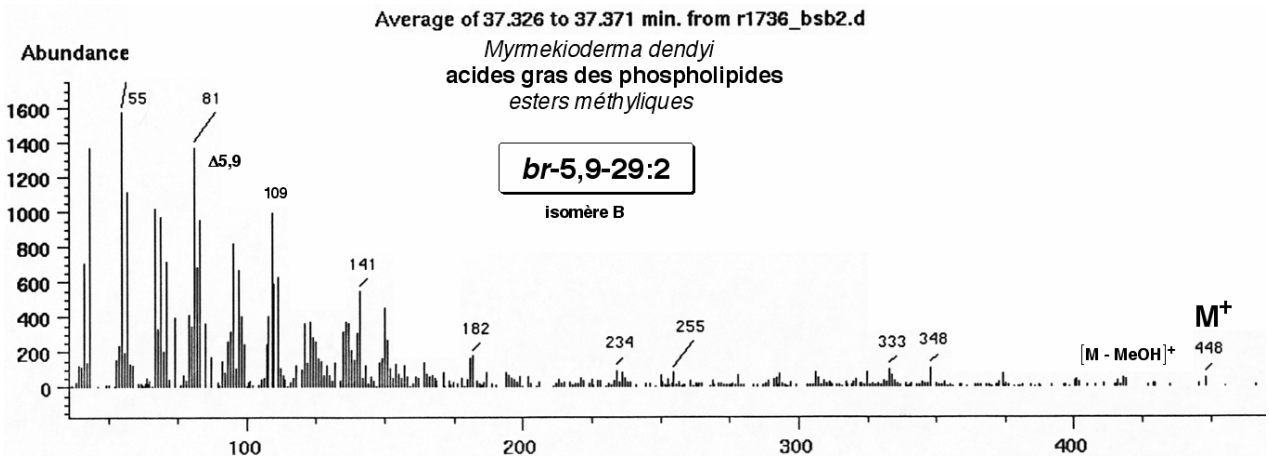

Average of 38.935 to 39.002 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
n-5,9-28:2
113
Mac Lafferty
clivage C-7
allylique
Δ5,9
180
55
126
234
290
346
416
444
473
M+
Mass/Charge

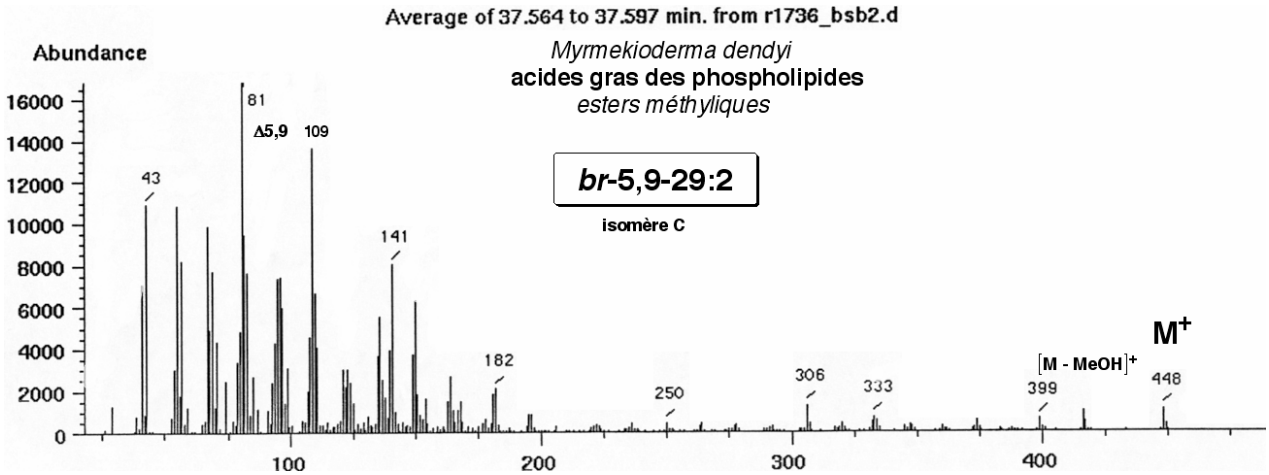

Average of 38.935 to 39.002 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
140
166
180
206
234
248
262
290
304
332

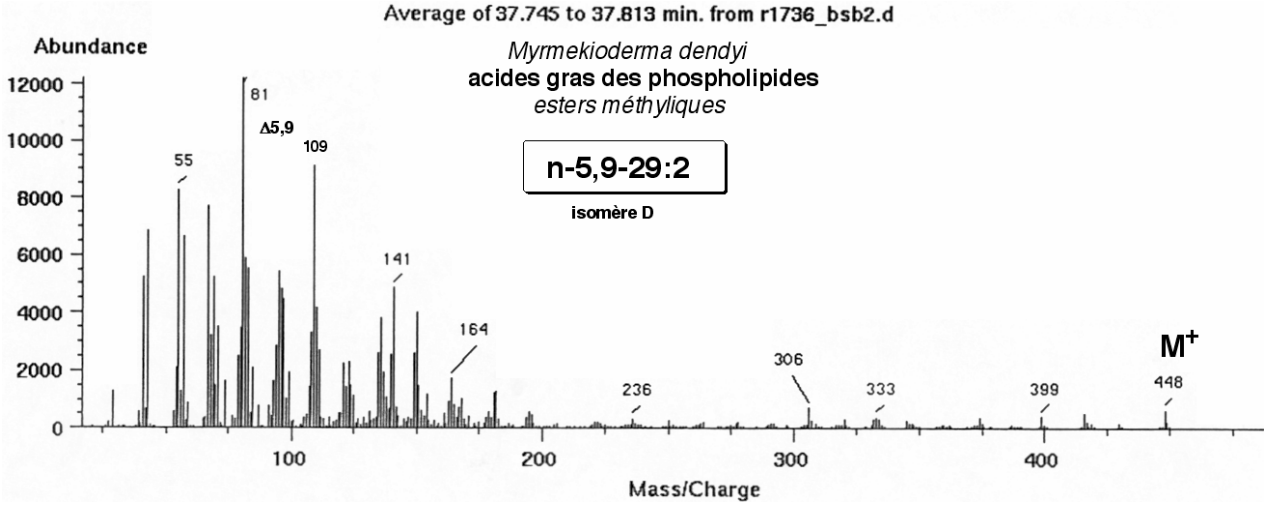

Average of 38.935 to 39.002 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
M+
473
290
318
346
360
375
402
416
444
Mass/Charge

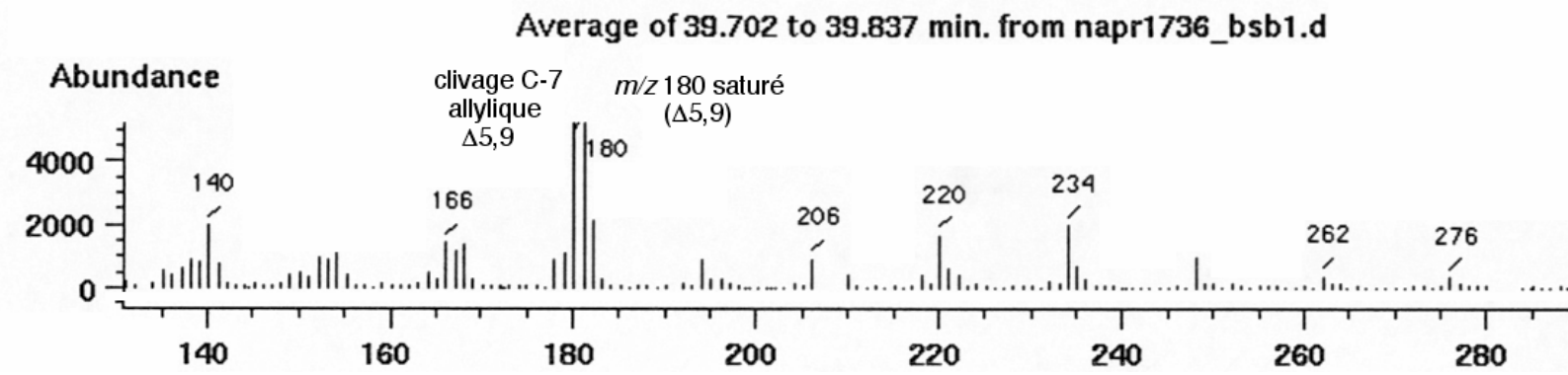

Average of 36.455 to 36.494 min. from r1736_bsb2.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
5,9,x-29:3
+
br-30:0
C26:3
55
81
Δ5,9
109
171
74
123
87
221
308
319
404
1000
800
600
400
200
0
100
200
300
400
Mass/Charge

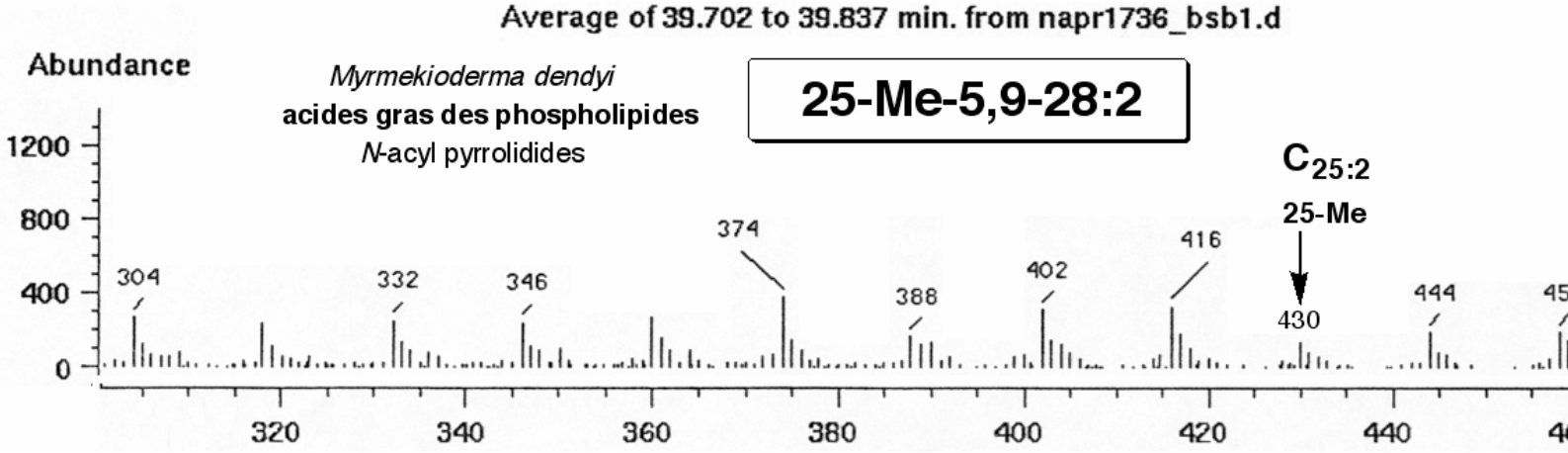

Average of 36.997 to 37.099 min. from r1736_bsb
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
br-5,9-29:2
Abundance
Ion 74.00 amu from r1736_bsb2.d
Ion 75.00 amu from r1736_bsb2.d
Δ5,9-28:2
Δ5,9-29:2
A
B
C
D
Time (min.)
M+
Mass/Charge

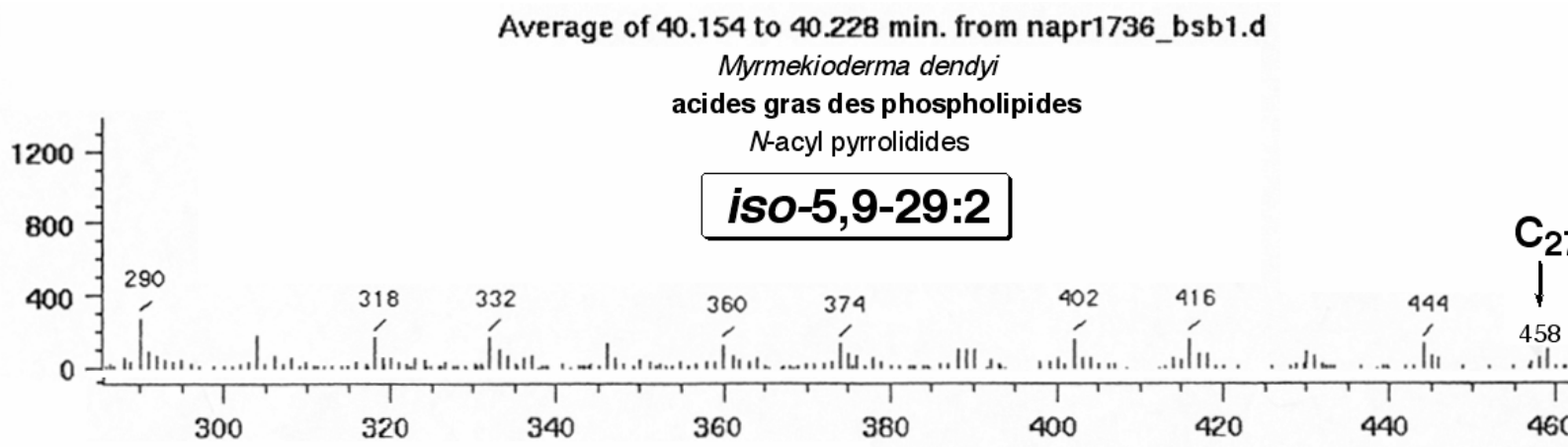

Average of 37.326 to 37.371 min. from r1736_bsb2.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
br-5,9-29:2
isomère B
Δ5,9
[M - MeOH]+
M+

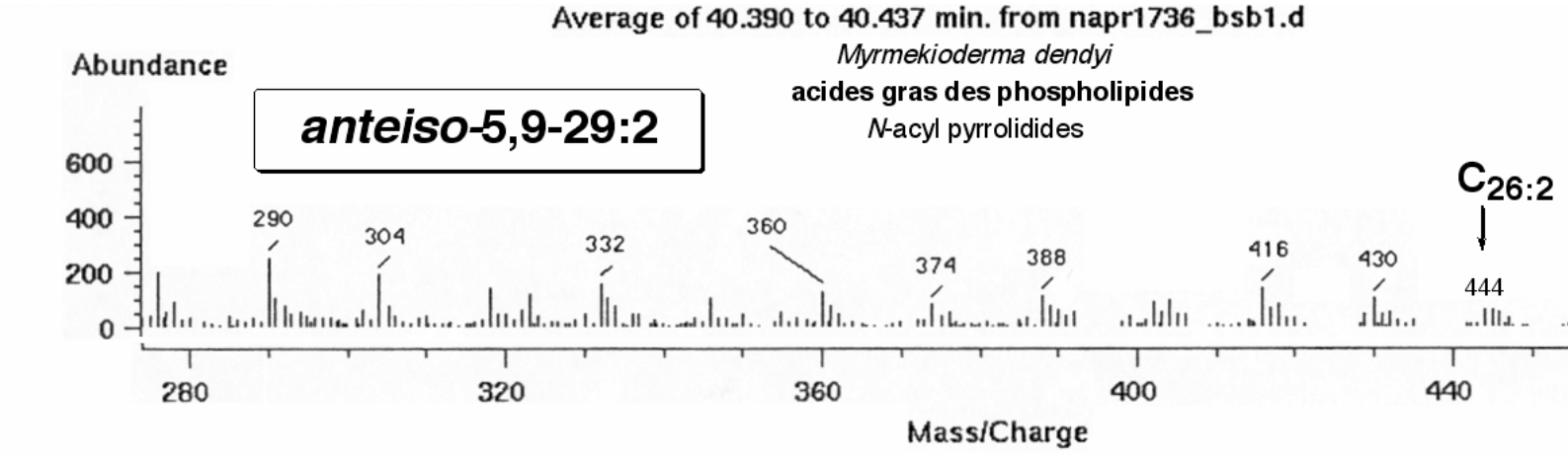

Average of 37.564 to 37.597 min. from r1736_bsb2.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
br-5,9-29:2
isomère C
Δ5,9
[M - MeOH]+
M+

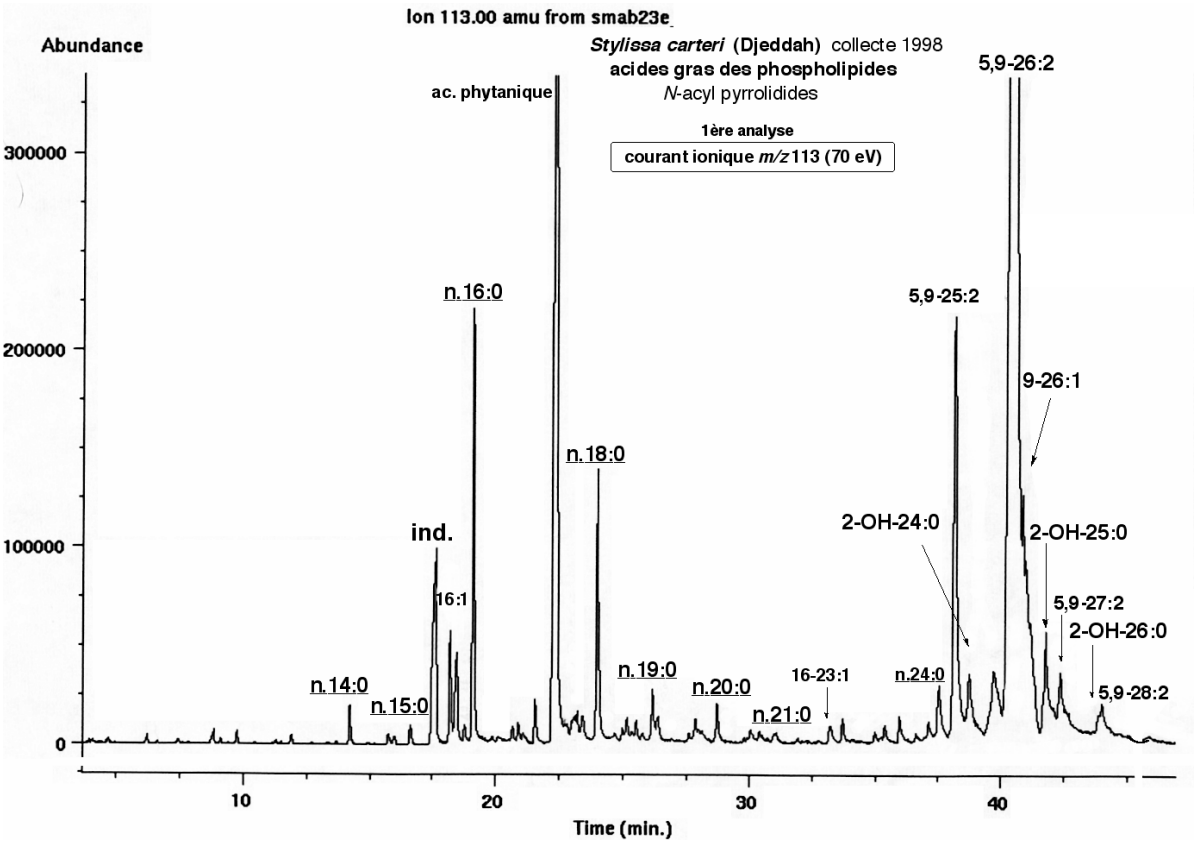

Average of 37.745 to 37.813 min. from r1736_bsb2.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
n-5,9-29:2
isomère D
Δ5,9
M+
Mass/Charge

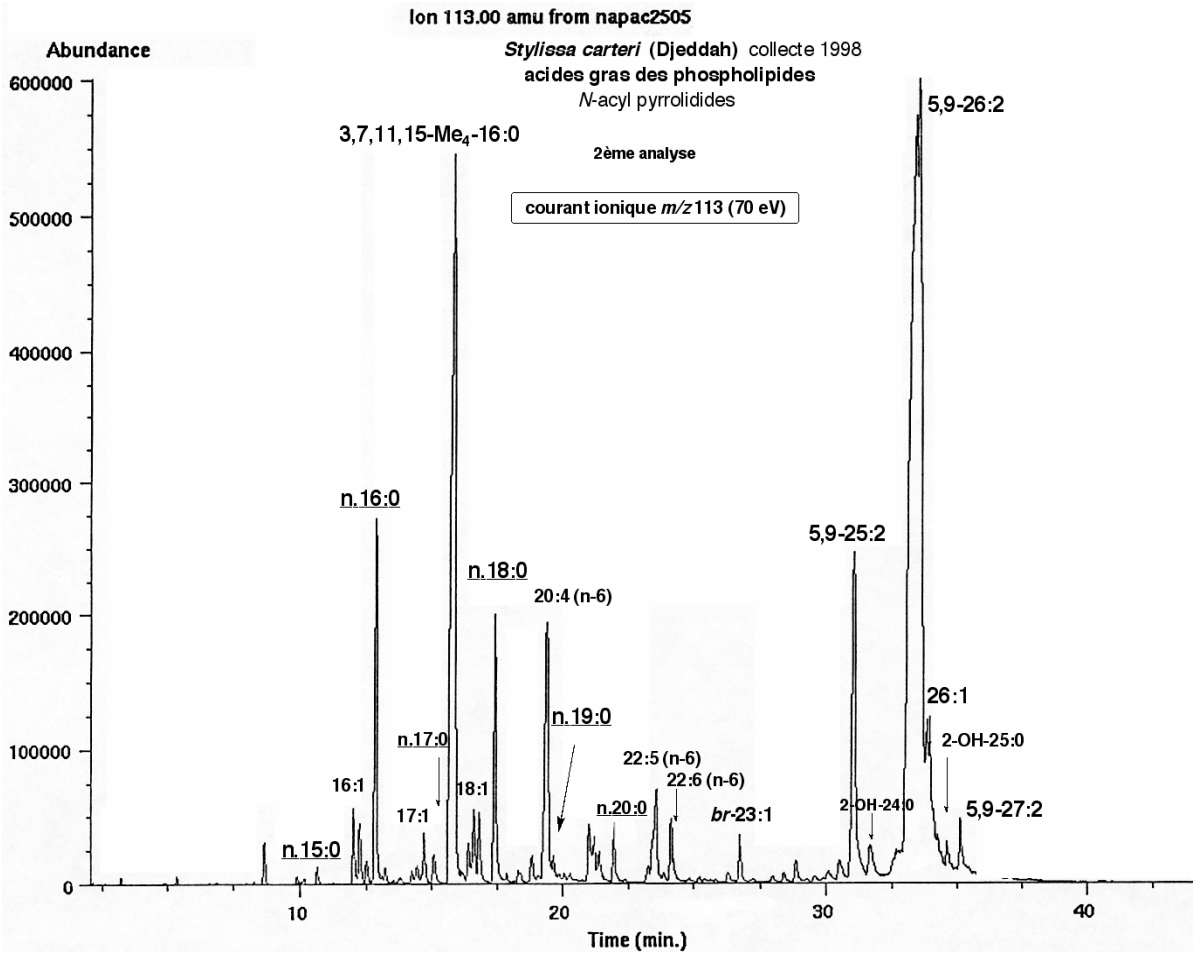

Average of 39.702 to 39.837 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
clivage C-7
allylique
Δ5,9
m/z 180 saturé
(Δ5,9)
140
166
180
206
220
234
262
276
4000
2000
0
140
160
180
200
220
240
260
280

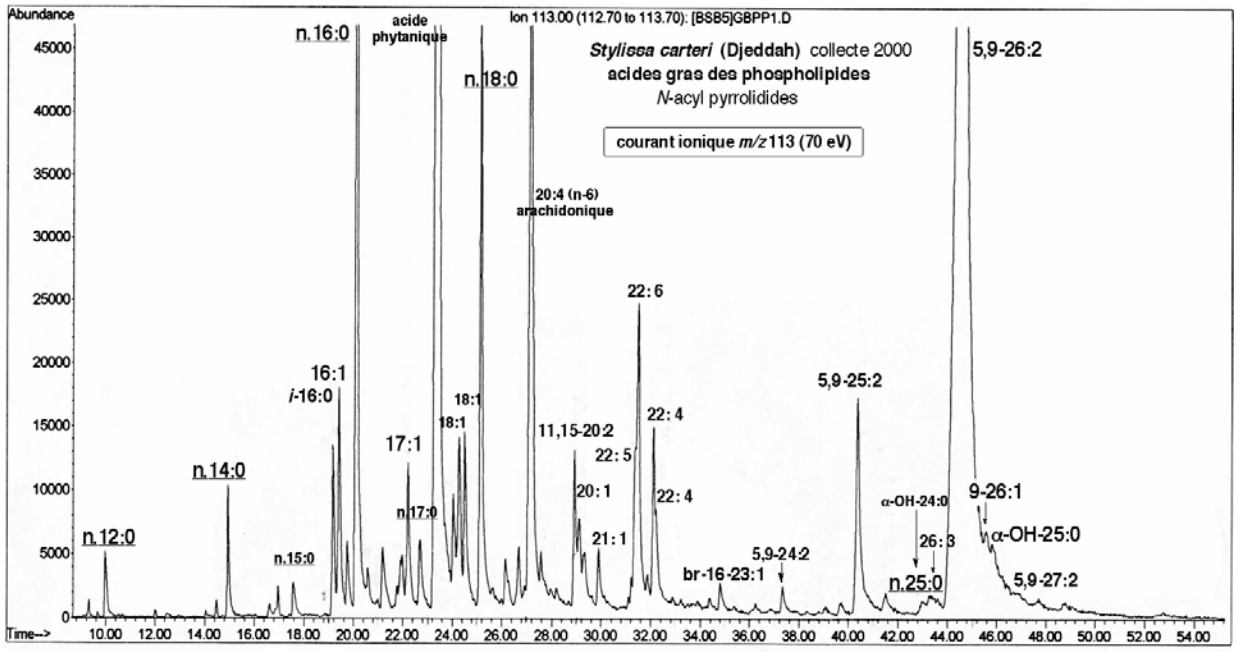

Average of 39.702 to 39.837 min. from napr1736_bsb1.d
Abundance
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
25-Me-5,9-28:2
C25:2
25-Me
304
332
346
374
388
402
416
430
444
1200
800
400
0
320
340
360
380
400
420
440

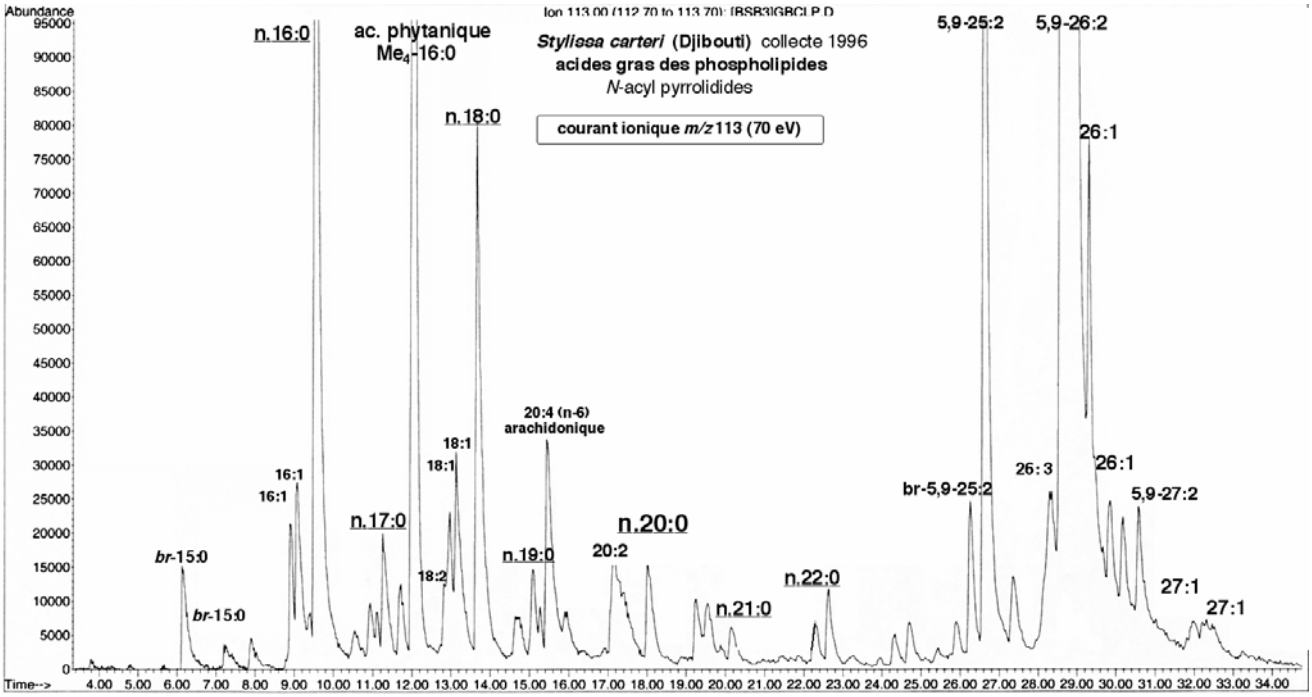

Average of 40.154 to 40.228 min. from napr1736_bsb1.d
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
iso-5,9-29:2
1200
800
400
0
290
318
332
360
374
402
416
444
458
300
320
340
360
380
400
420
440

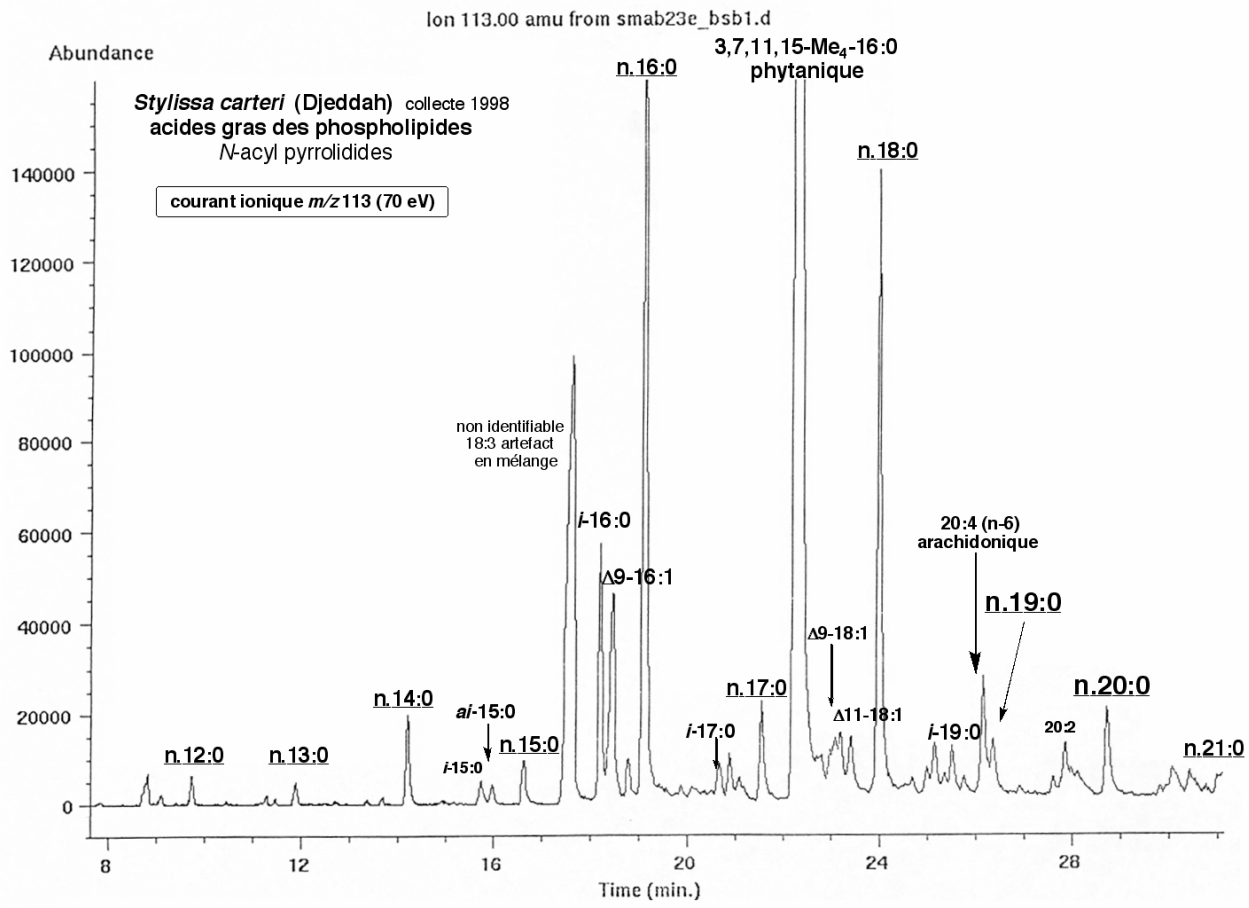

Average of 40.390 to 40.437 min. from napr1736_bsb1.d
Myrmekioderma dendyi
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
Abundance
anteiso-5,9-29:2
600
400
200
0
290
304
332
360
374
388
416
430
444
C26:2
280
320
360
400
440
Mass/Charge

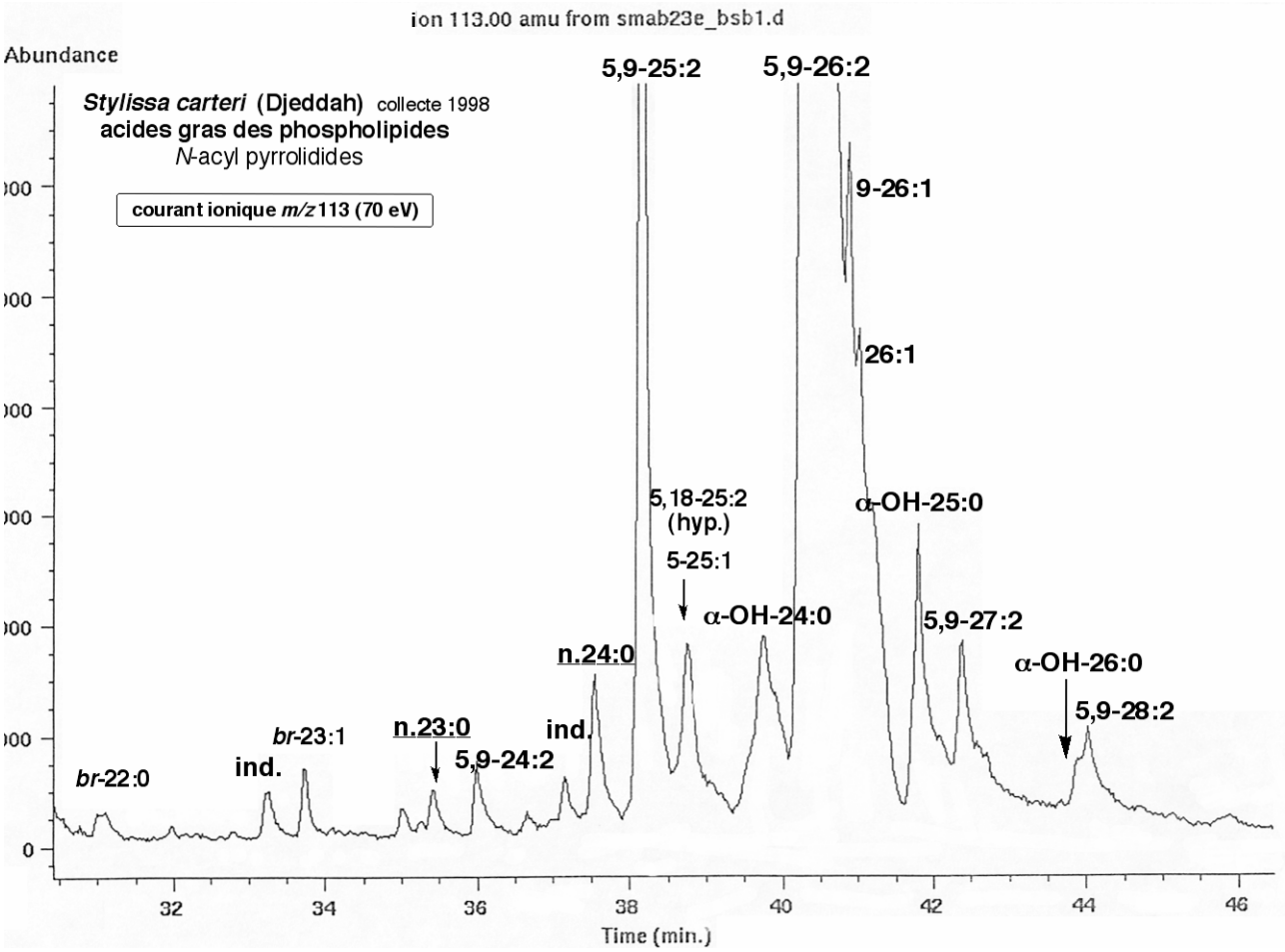

Ion 113.00 amu from smab23e
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
1ère analyse
courant ionique *m/z* 113 (70 eV)
ac. phytanique
n.16:0
n.18:0
ind.
16:1
n.14:0
n.15:0
n.19:0
n.20:0
n.21:0
16-23:1
n.24:0
5,9-25:2
5,9-26:2
9-26:1
2-OH-24:0
2-OH-25:0
5,9-27:2
2-OH-26:0
5,9-28:2
300000
200000
100000
0
10
20
30
40
Time (min.)

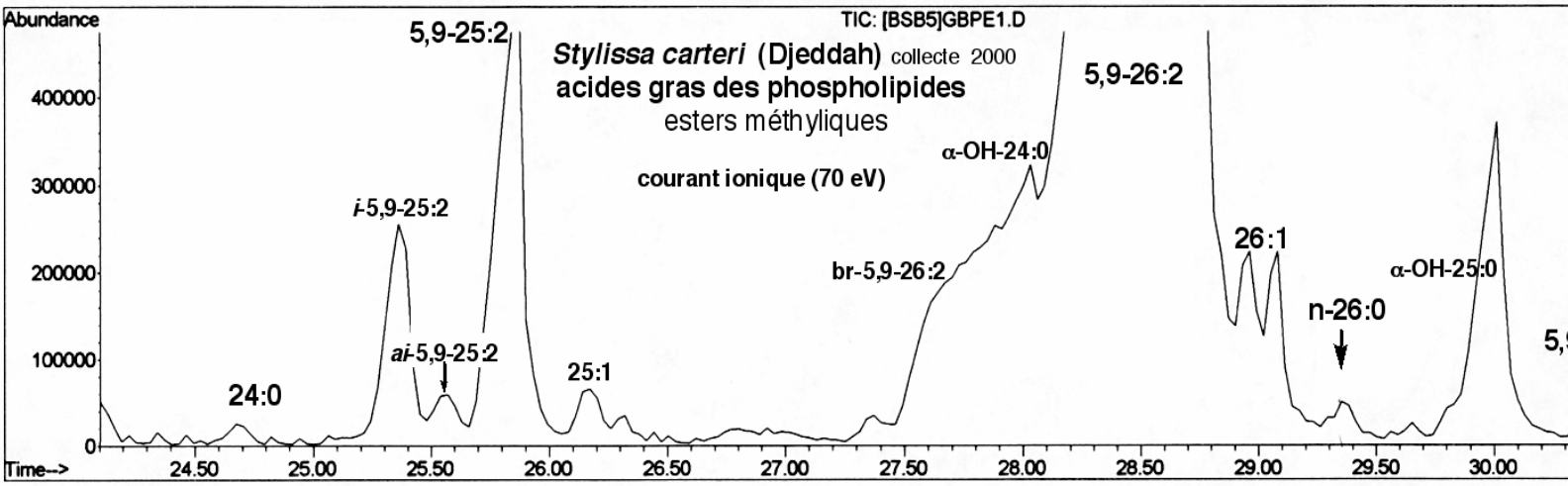

Ion 113.00 amu from napac2505
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
2ème analyse
courant ionique m/z 113 (70 eV)
3,7,11,15-Me4-16:0
5,9-26:2
n.16:0
5,9-25:2
n.18:0
20:4 (n-6)
26:1
n.19:0
2-OH-25:0
n.17:0
22:5 (n-6)
22:6 (n-6)
16:1
18:1
17:1
n.20:0
br-23:1
2-OH-24:0
5,9-27:2
n.15:0
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
10
20
30
40
Time (min.)

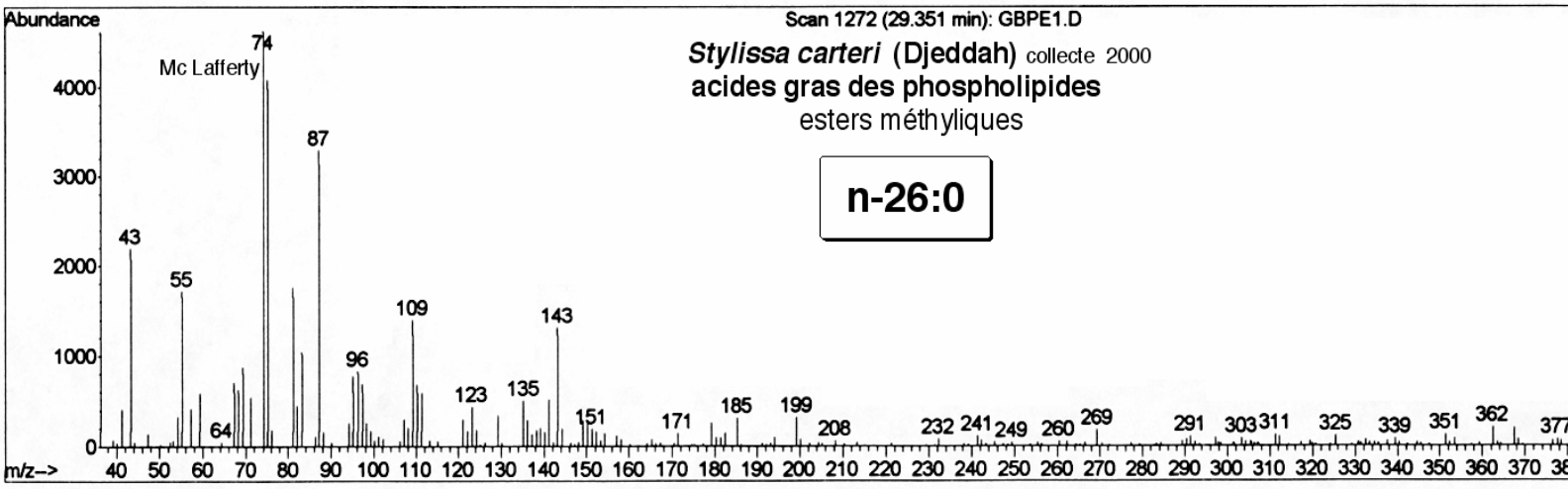

Abundance
Ion 113.00 (112.70 to 113.70): [BSB5]GBPP1.D
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 2000
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
courant ionique m/z 113 (70 eV)
n.16:0
acide phytanique
n.18:0
20:4 (n-6) arachidonique
5,9-26:2
22:6
16:1
i-16:0
18:1
18:1
5,9-25:2
17:1
22:4
11,15-20:2
22:5
n.14:0
20:1
22:4
α-OH-24:0
9-26:1
n.17:0
n.12:0
21:1
26:3
α-OH-25:0
n.15:0
5,9-24:2
br-16-23:1
n.25:0
5,9-27:2
Time-->

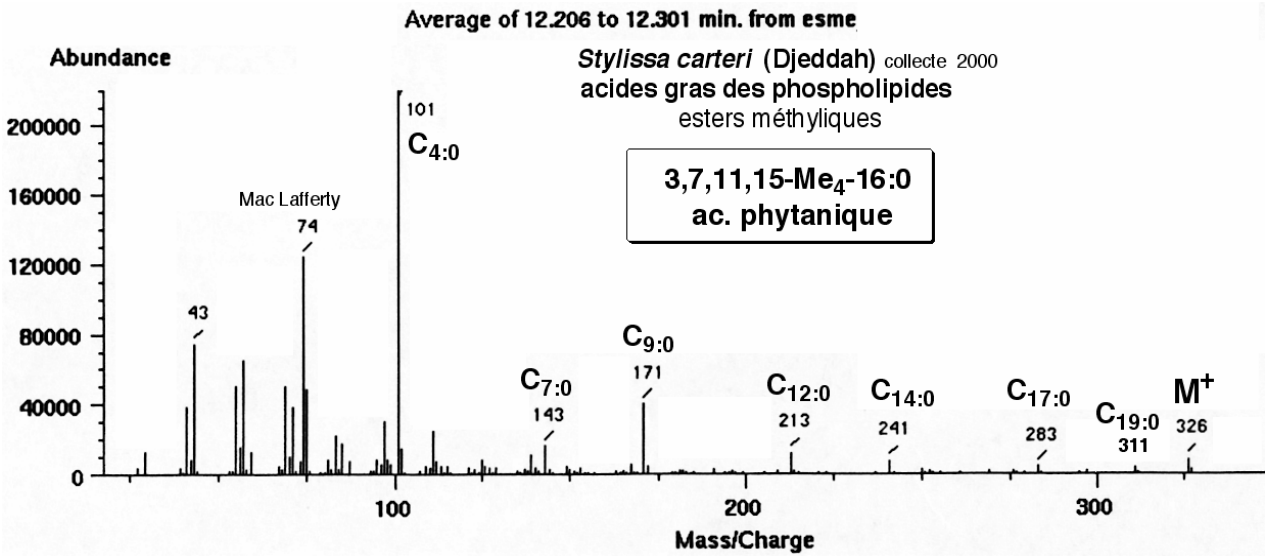

Abundance
Stylissa carteri (Djibouti) collecte 1996
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
courant ionique m/z 113 (70 eV)
n.16:0
ac. phytanique
Me4-16:0
n.18:0
5,9-25:2
5,9-26:2
26:1
20:4 (n-6) arachidonique
18:1
18:1
16:1
16:1
26:3
26:1
br-5,9-25:2
5,9-27:2
n.17:0
n.20:0
br-15:0
n.19:0
20:2
18:2
n.22:0
27:1
br-15:0
n.21:0
27:1
Time-->

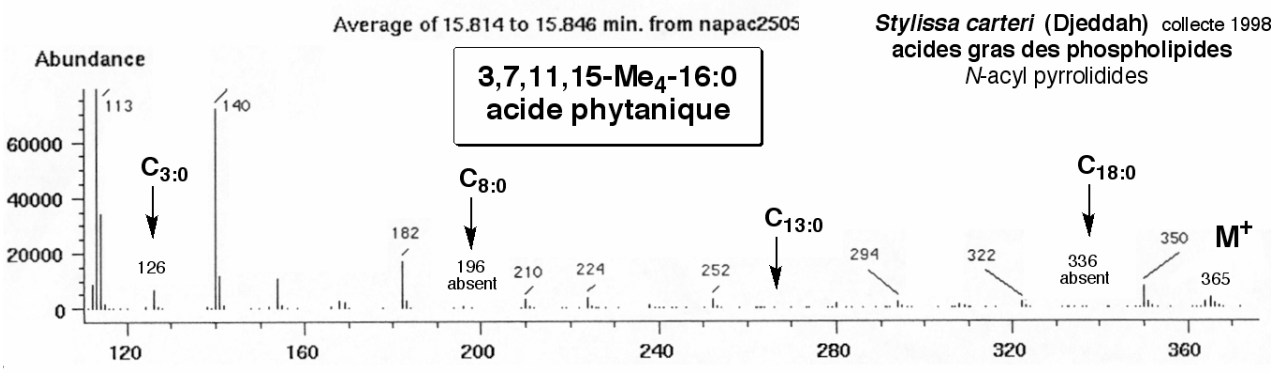

Ion 113.00 amu from smab23e_bsb1.d
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
courant ionique *m/z* 113 (70 eV)
n.16:0
3,7,11,15-Me4-16:0
phytanique
n.18:0
non identifiable
18:3 artefact
en mélange
i-16:0
Δ9-16:1
20:4 (n-6)
arachidonique
n.19:0
Δ9-18:1
n.17:0
n.20:0
n.14:0
ai-15:0
Δ11-18:1
i-17:0
i-19:0
20:2
n.12:0
n.13:0
i-15:0
n.15:0
n.21:0
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
8
12
16
20
24
28
Time (min.)

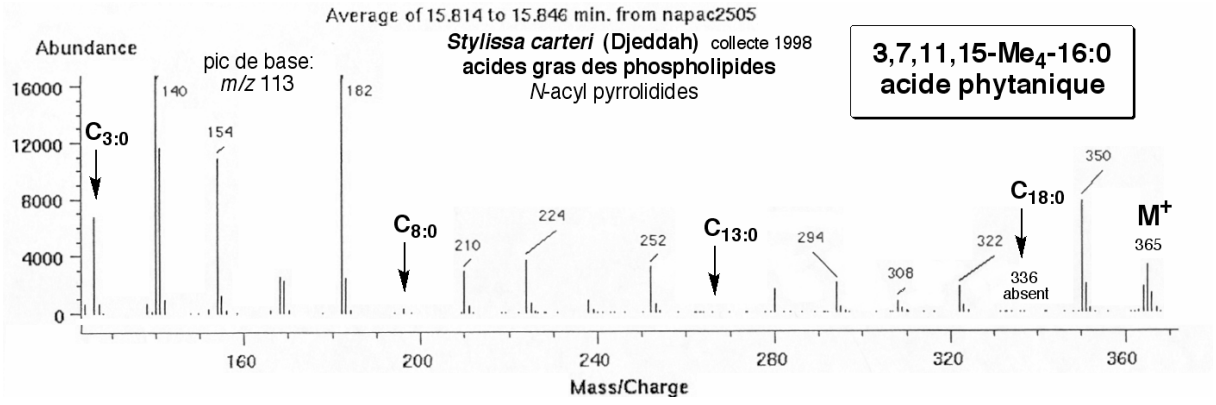

ion 113.00 amu from smab23e_bsb1.d
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
courant ionique m/z 113 (70 eV)
5,9-25:2
5,9-26:2
9-26:1
26:1
5,18-25:2
(hyp.)
5-25:1
α-OH-25:0
α-OH-24:0
5,9-27:2
α-OH-26:0
5,9-28:2
n.24:0
n.23:0
5,9-24:2
br-23:1
ind.
ind.
br-22:0
0
32
34
36
38
40
42
44
46
Time (min.)

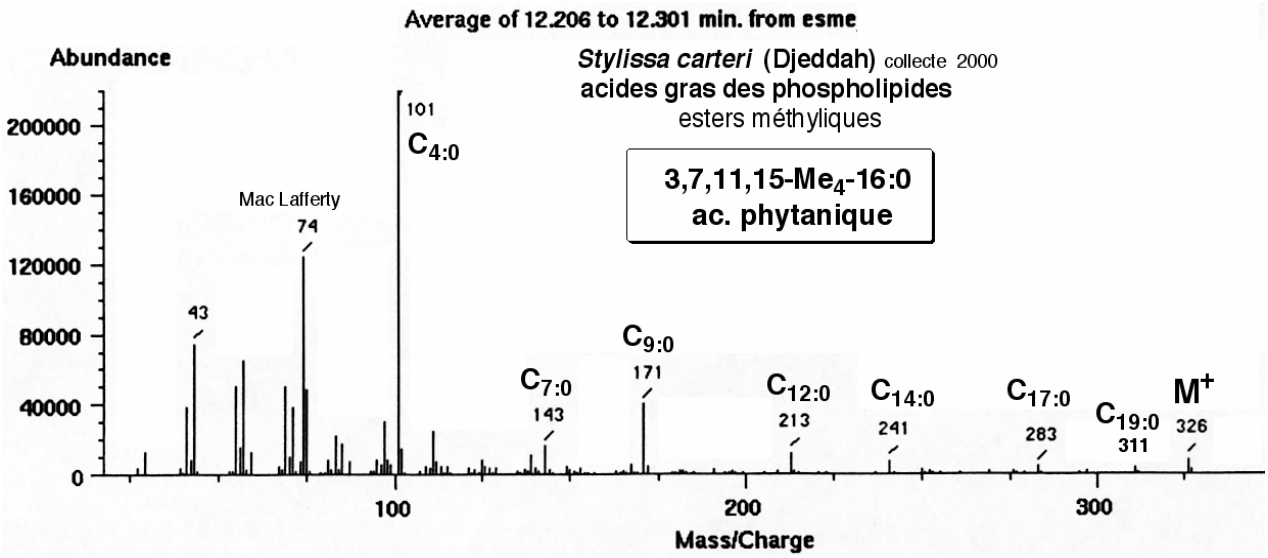

Abundance
TIC: [BSB5]GBPE1.D
5,9-25:2
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 2000
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
courant ionique (70 eV)
5,9-26:2
α-OH-24:0
i-5,9-25:2
br-5,9-26:2
26:1
α-OH-25:0
n-26:0
ai-5,9-25:2
25:1
24:0
Time-->

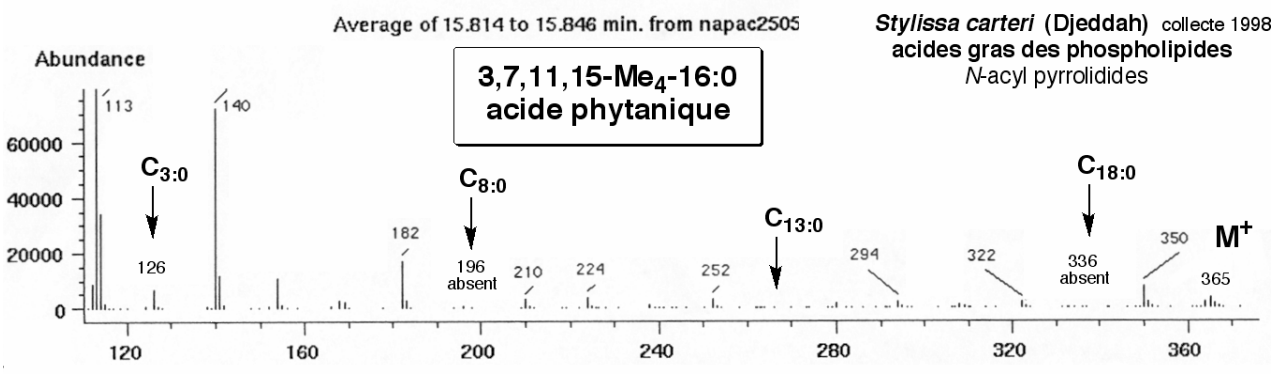

Abundance
Scan 1272 (29.351 min): GBPE1.D
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 2000
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
n-26:0
Mc Lafferty
m/z-->

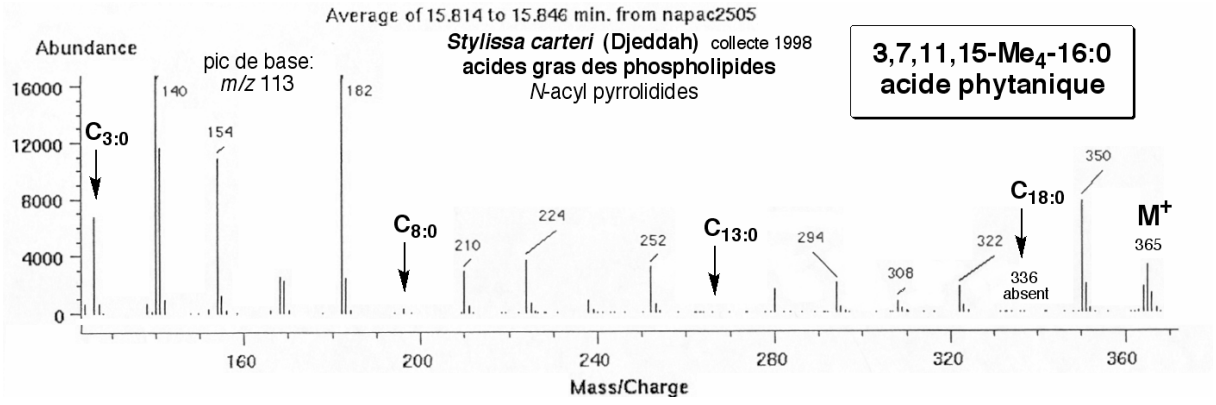

Average of 12.206 to 12.301 min. from esme
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 2000
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
3,7,11,15-Me4-16:0
ac. phytanique
Mac Lafferty
74
101
C4:0
43
C9:0
171
C7:0
143
C12:0
213
C14:0
241
C17:0
283
C19:0
311
M+
326
200000
160000
120000
80000
40000
0
100
200
300
Mass/Charge

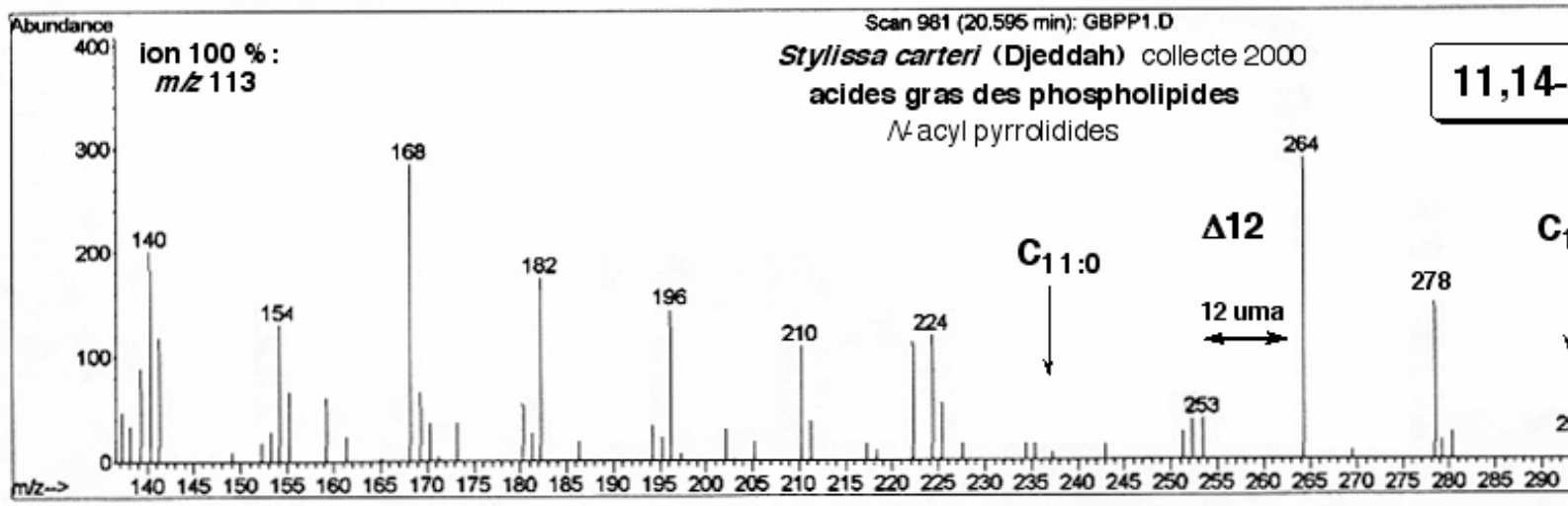

Average of 15.814 to 15.846 min. from napac2505
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
3,7,11,15-Me4-16:0
acide phytanique
113
140
C3:0
126
C8:0
196
absent
182
210
224
252
C13:0
294
322
C18:0
336
absent
350
M+
365
60000
40000
20000
0
120
160
200
240
280
320
360

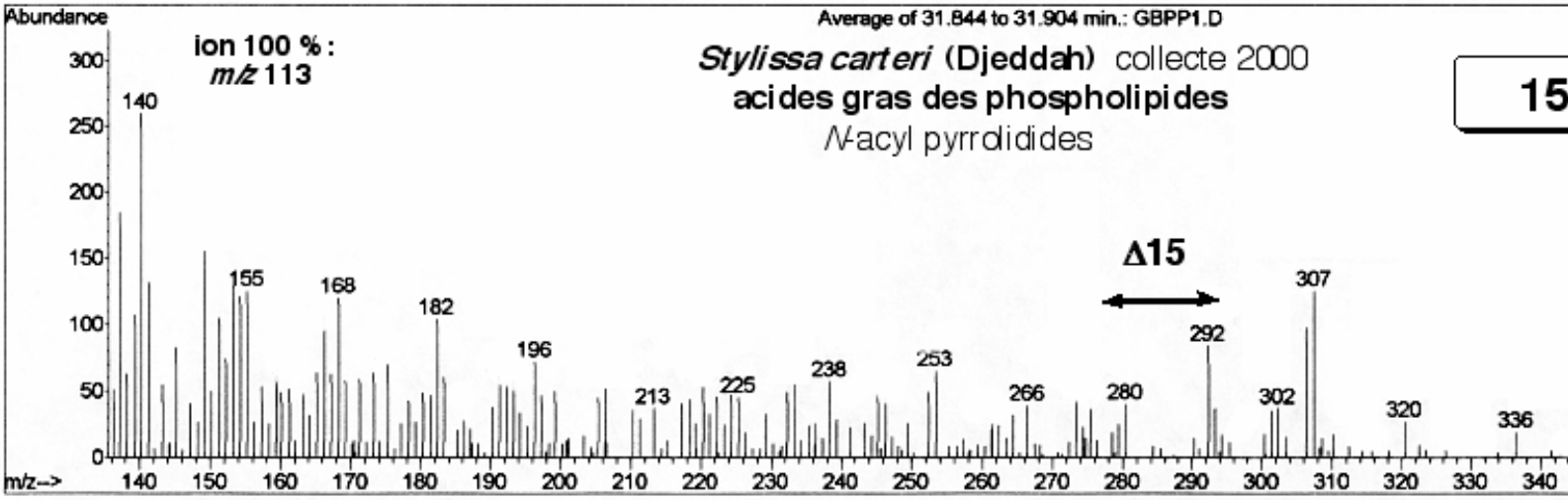

Average of 15.814 to 15.846 min. from napac2505
Abundance
pic de base:
m/z 113
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
3,7,11,15-Me4-16:0
acide phytanique
140
154
182
C3:0
C8:0
210
224
252
C13:0
294
308
322
C18:0
336
absent
350
M+
365
16000
12000
8000
4000
0
160
200
240
280
320
360
Mass/Charge

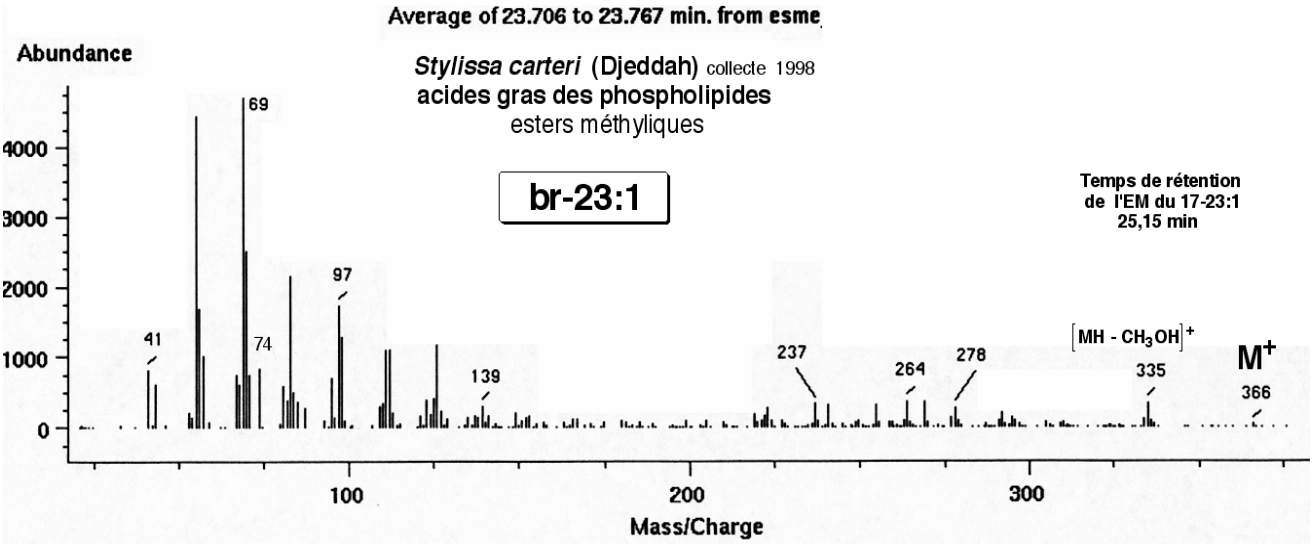

Average of 12.206 to 12.301 min. from esme
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 2000
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
3,7,11,15-Me4-16:0
ac. phytanique
Mac Lafferty
74
101
C4:0
43
C9:0
171
C7:0
143
C12:0
213
C14:0
241
C17:0
283
C19:0
311
M+
326
200000
160000
120000
80000
40000
0
100
200
300
Mass/Charge

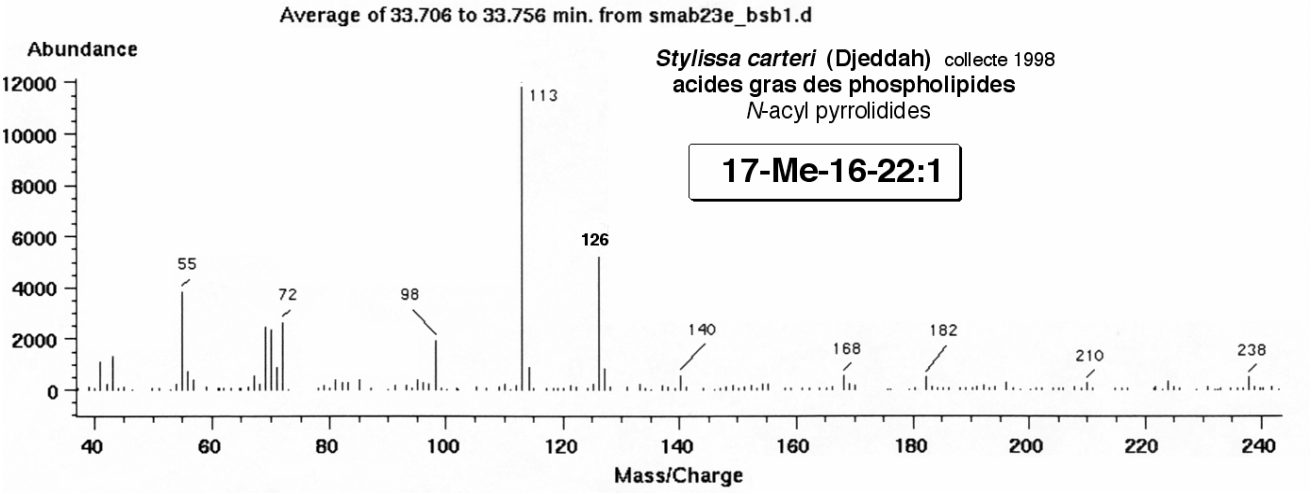

Average of 15.814 to 15.846 min. from napac2505
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
3,7,11,15-Me4-16:0
acide phytanique
113
140
C3:0
126
C8:0
196
absent
182
210
224
252
C13:0
294
322
C18:0
336
absent
350
M+
365
60000
40000
20000
0
120
160
200
240
280
320
360

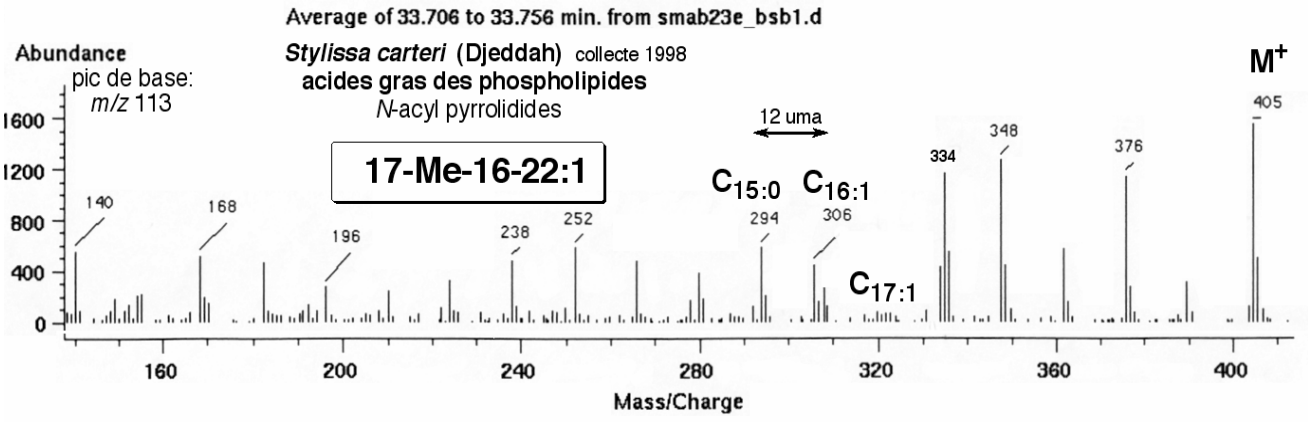

Average of 15.814 to 15.846 min. from napac2505
Abundance
pic de base:
m/z 113
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
3,7,11,15-Me4-16:0
acide phytanique
140
154
182
C3:0
C8:0
210
224
252
C13:0
294
308
322
C18:0
336
absent
350
M+
365
16000
12000
8000
4000
0
160
200
240
280
320
360
Mass/Charge

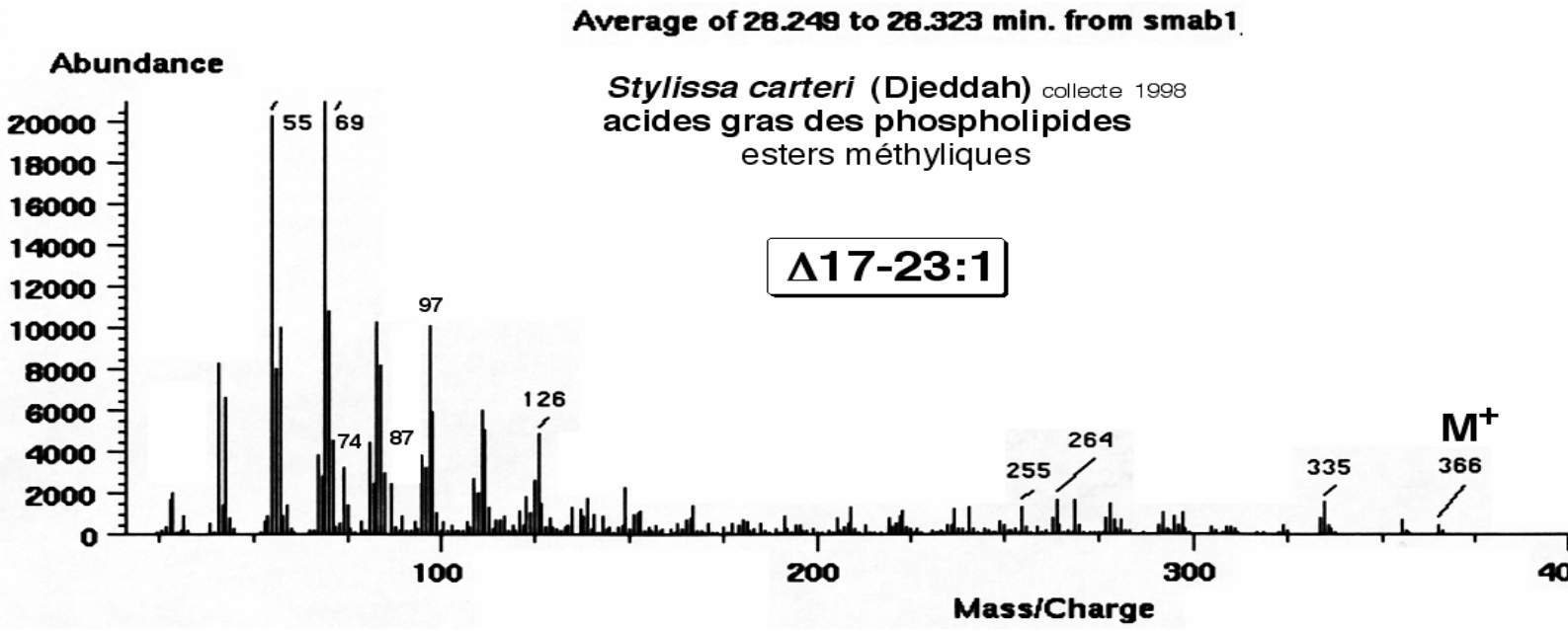

Abundance
Scan 981 (20.595 min): GBPP1.D
ion 100 % :
m/z 113
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 2000
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
11,14-
Δ12
C11:0
12 uma
m/z-->

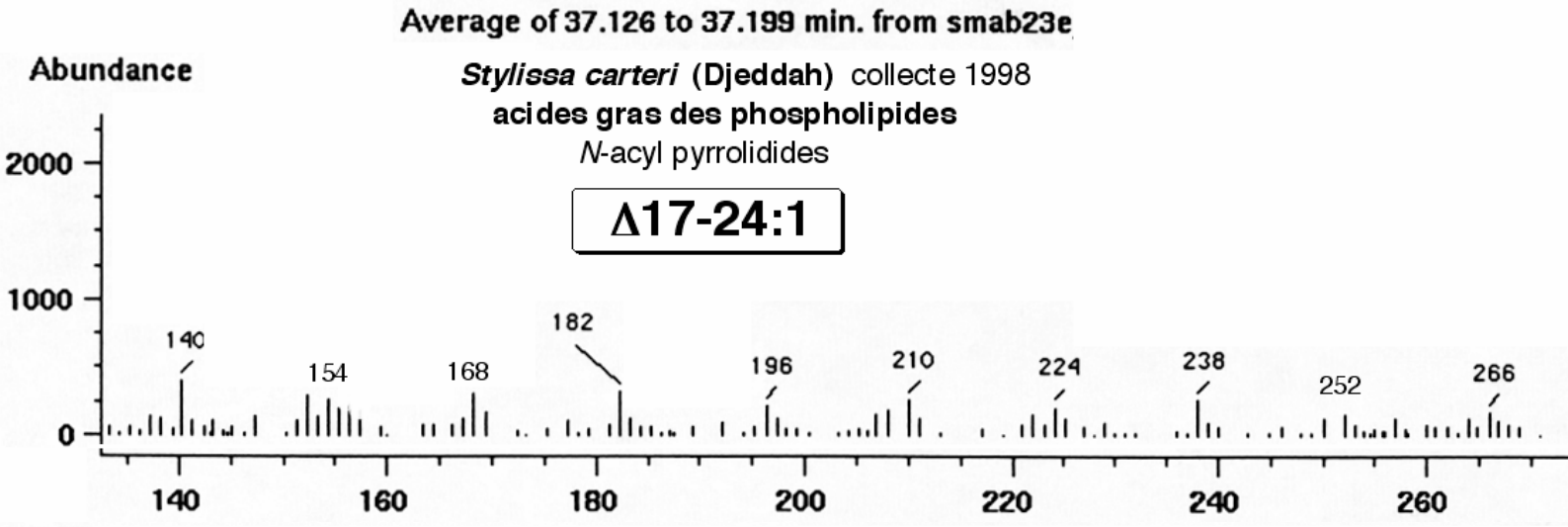

Abundance
Average of 31.844 to 31.904 min.: GBPP1.D
ion 100 % :
m/z 113
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 2000
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
15
Δ15
m/z-->

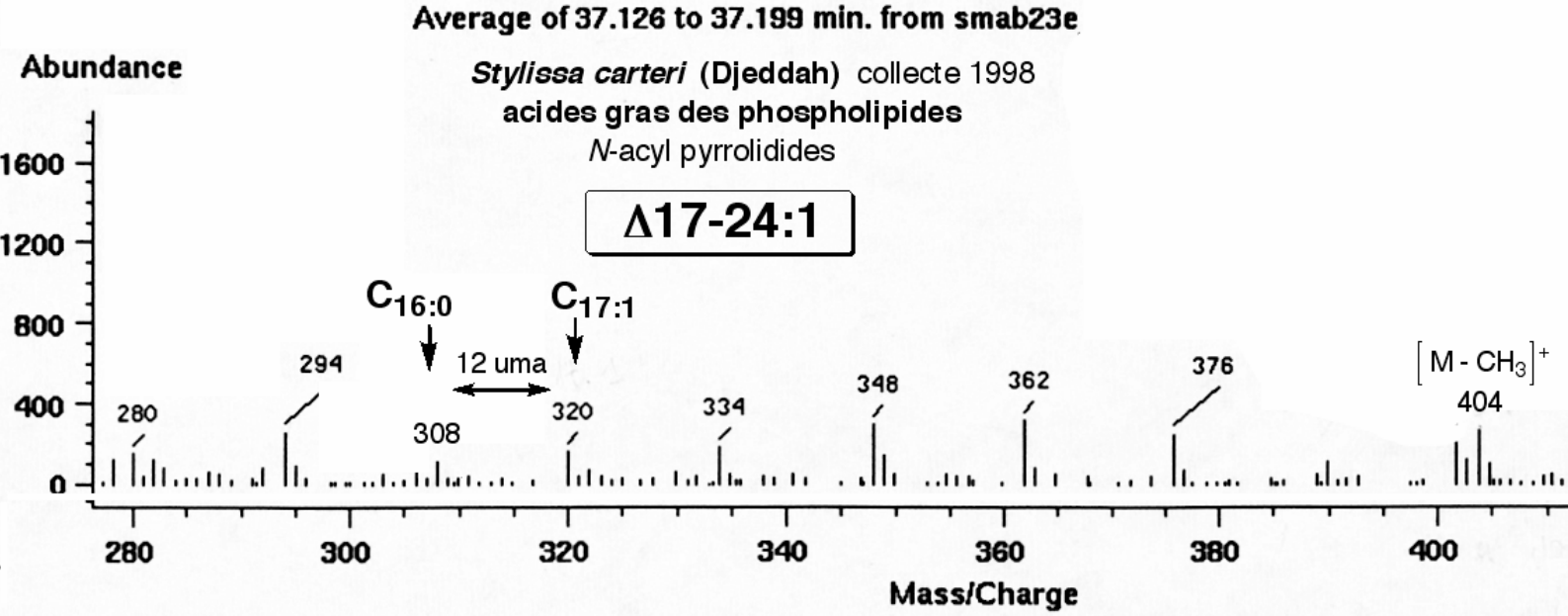

Average of 23.706 to 23.767 min. from esme
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
br-23:1
Temps de rétention
de l'EM du 17-23:1
25,15 min
69
97
41
74
139
237
264
278
335
366
[MH - CH3OH]+
M+
4000
3000
2000
1000
0
100
200
300
Mass/Charge

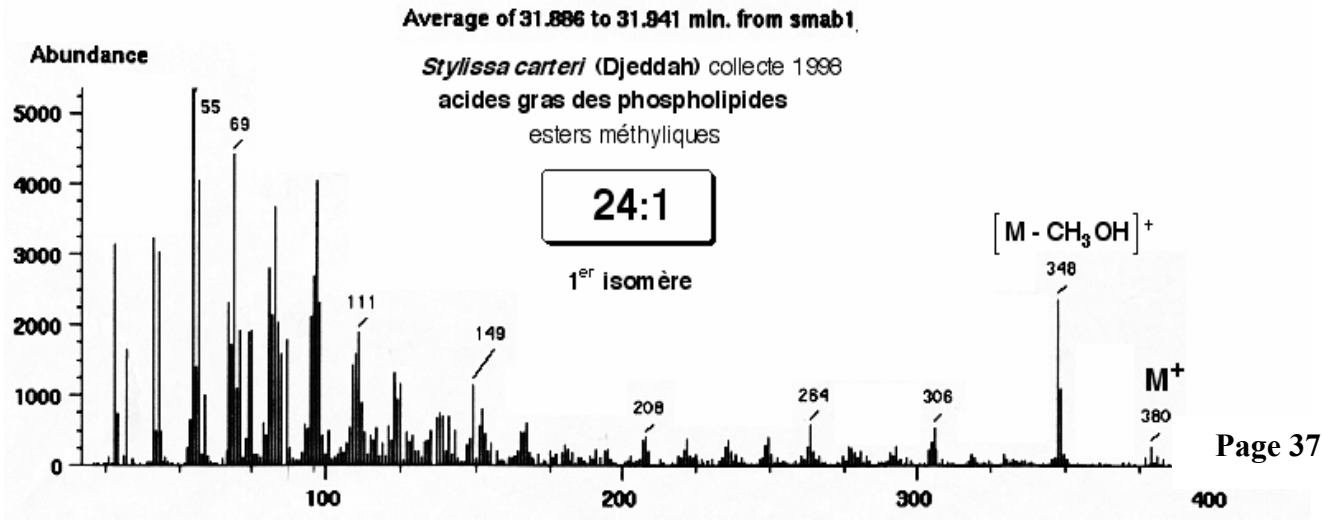

Average of 33.706 to 33.756 min. from smab23e_bsb1.d
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
17-Me-16-22:1
113
126
55
72
98
140
168
182
210
238
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
Mass/Charge

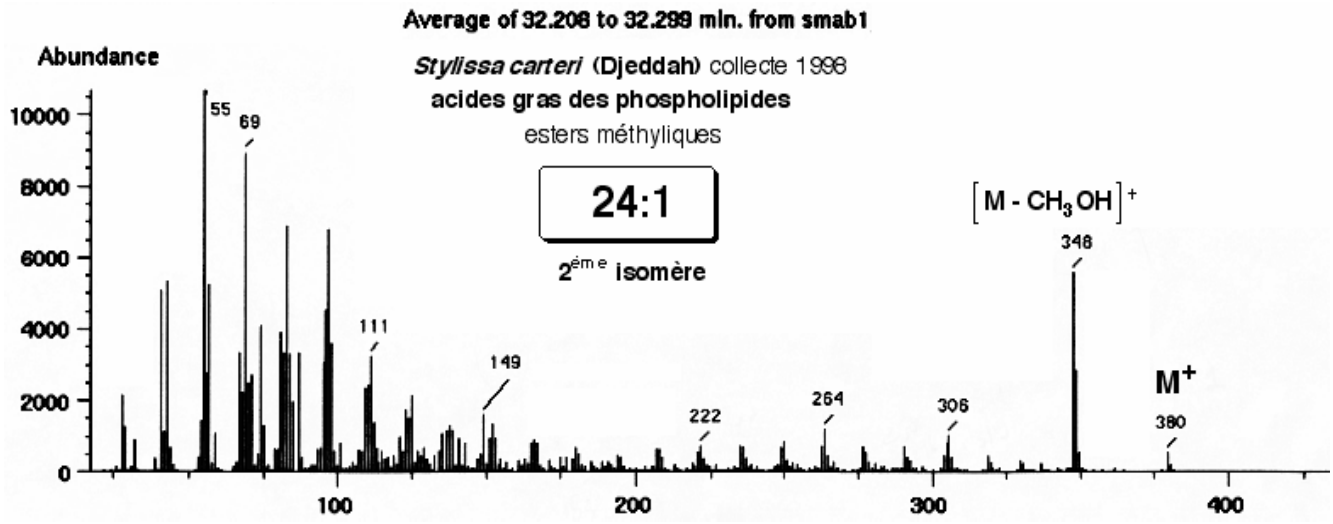

Average of 33.706 to 33.756 min. from smab23e_bsb1.d
Abundance
pic de base:
m/z 113
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
17-Me-16-22:1
12 uma
C15:0
C16:1
C17:1
M+
405
348
334
376
294
306
140
168
196
238
252
1600
1200
800
400
0
160
200
240
280
320
360
400
Mass/Charge

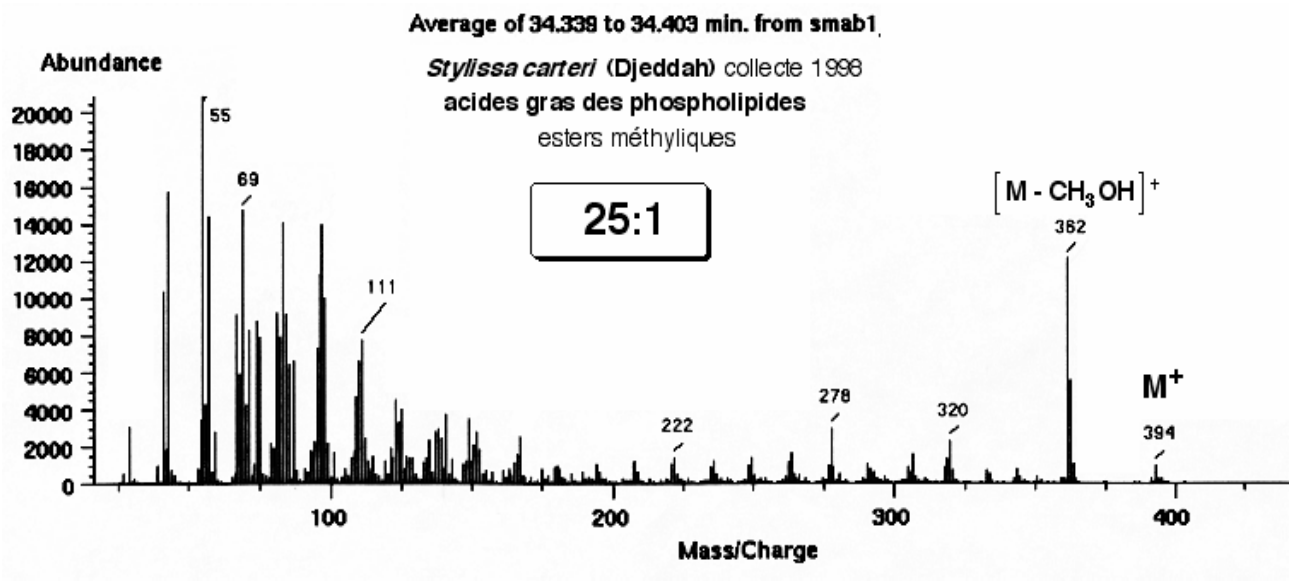

Average of 28.249 to 28.323 min. from smab1
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
Δ17-23:1
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
55
69
97
74
87
126
255
264
335
366
M+
100
200
300
Mass/Charge

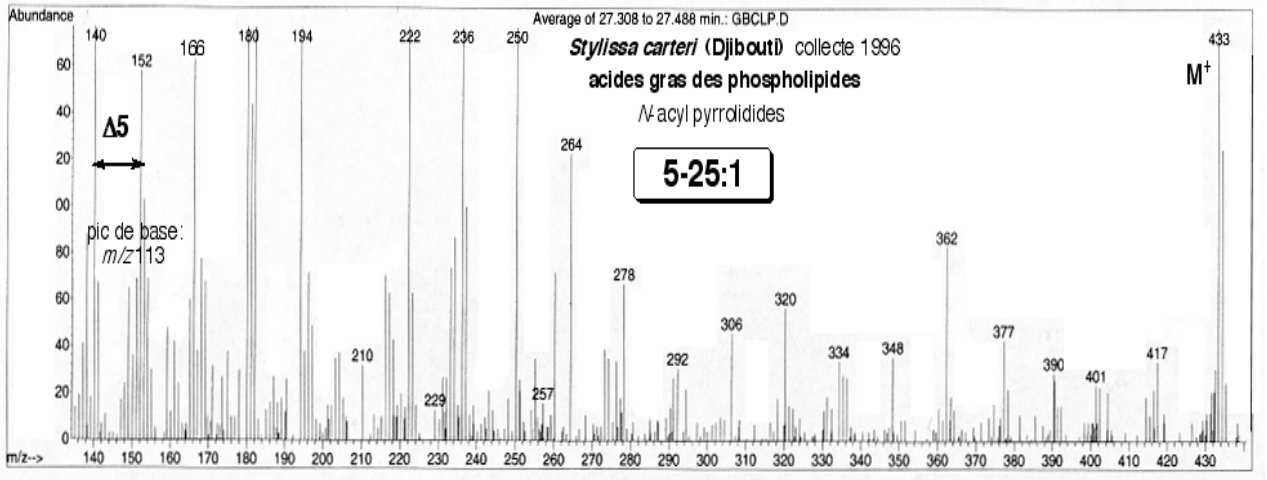

Average of 37.126 to 37.199 min. from smab23e
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
Δ17-24:1
2000
1000
0
140
154
168
182
196
210
224
238
252
266
140
160
180
200
220
240
260

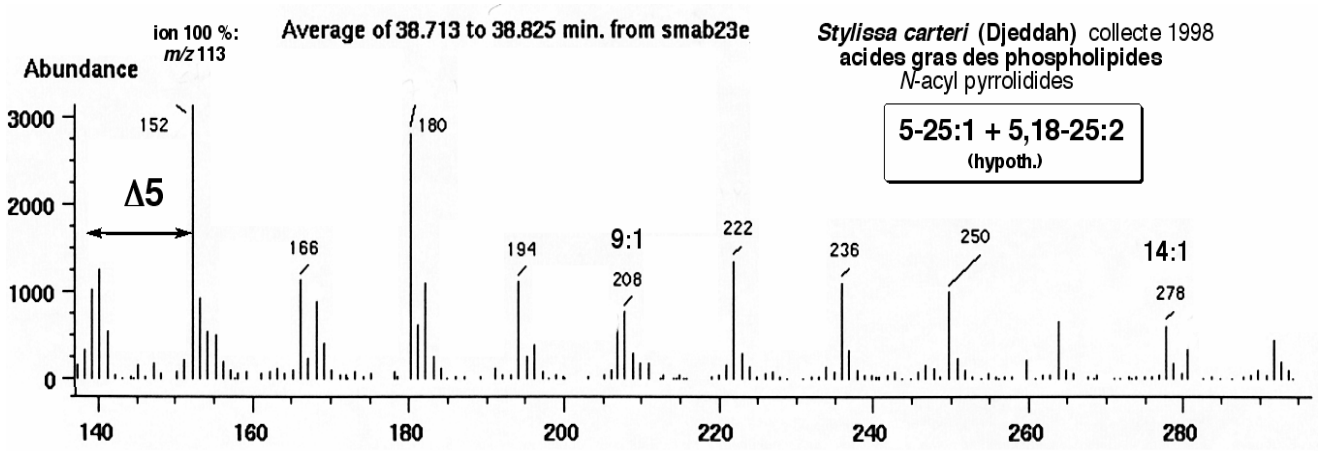

Average of 37.126 to 37.199 min. from smab23e
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
Δ17-24:1
C16:0
C17:1
12 uma
1600
1200
800
400
0
280
294
308
320
334
348
362
376
[M - CH3]+
404
280
300
320
340
360
380
400
Mass/Charge

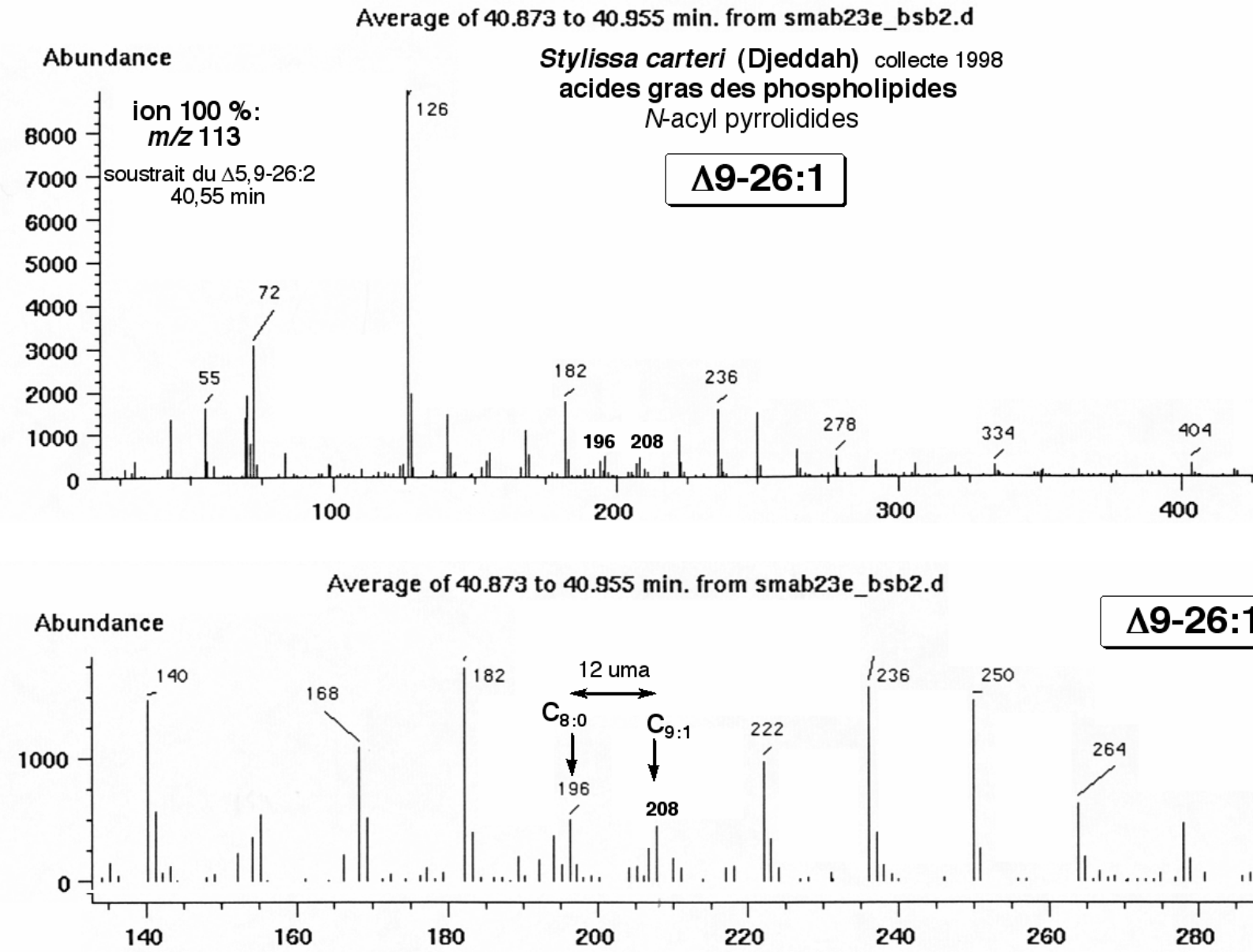

Average of 31.886 to 31.941 min. from smab1
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
24:1
1er isomère
[M - CH3OH]+
348
M+
380
55
69
111
149
208
264
306
5000
4000
3000
2000
1000
0
100
200
300
400


Average of 32.208 to 32.299 min. from smab1
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
24:1
2ème isomère
[M - CH3OH]+
348
M+
380
55
69
111
149
222
264
306
10000
8000
6000
4000
2000
0
100
200
300
400

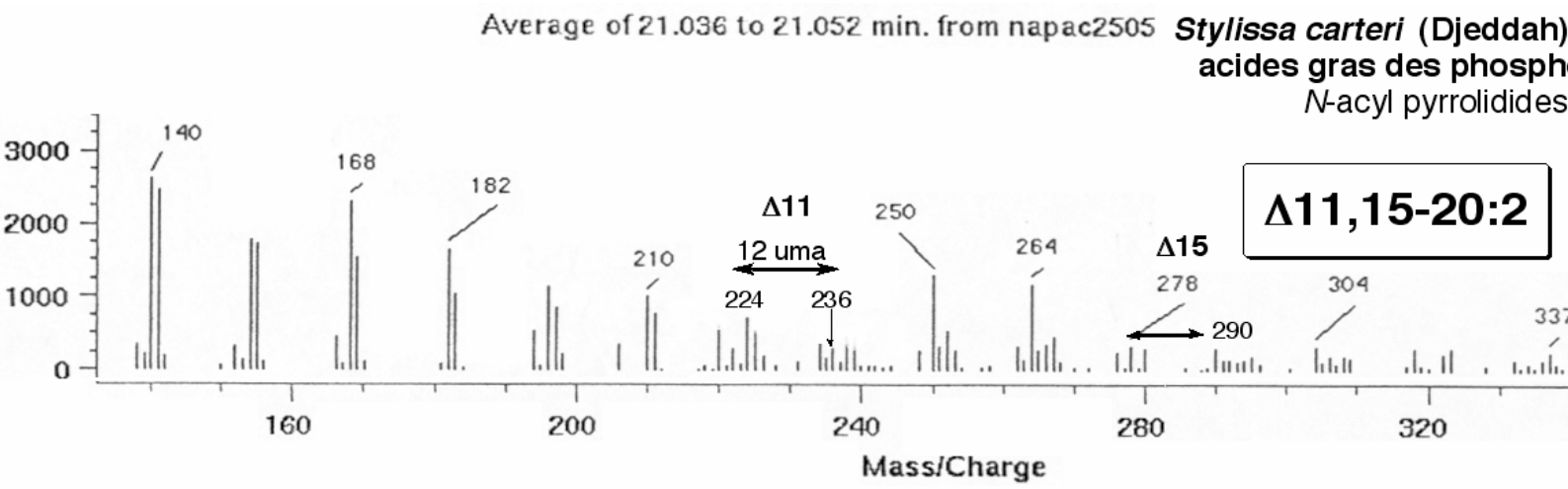

Average of 34.338 to 34.403 min. from smab1
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
25:1
[M - CH3OH]+
M+
55
69
111
222
278
320
362
394
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
100
200
300
400
Mass/Charge

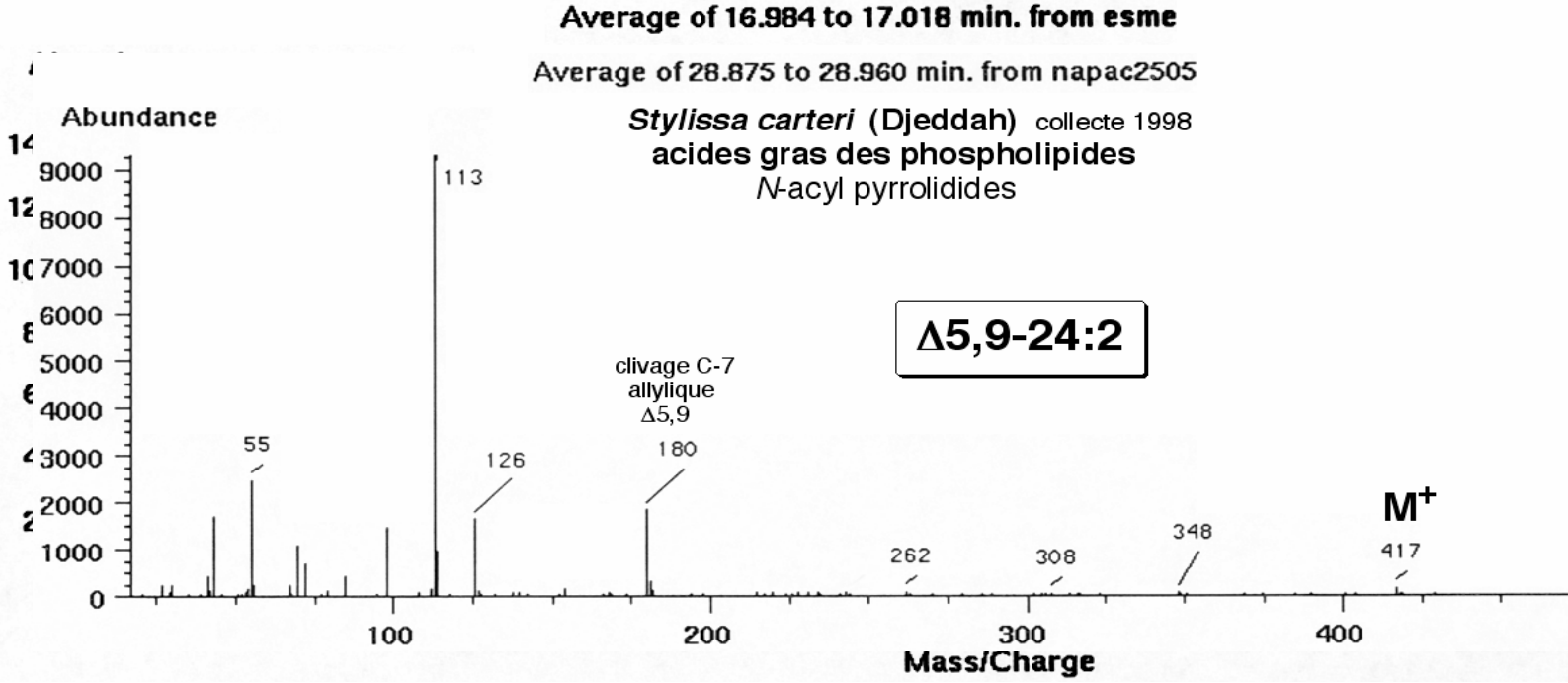

Abundance
Average of 27.308 to 27.488 min.: GBCLP.D
Stylissa carteri (Djibouti) collecte 1996
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
5-25:1
Δ5
pic de base:
m/z 113
M+
m/z-->
140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430

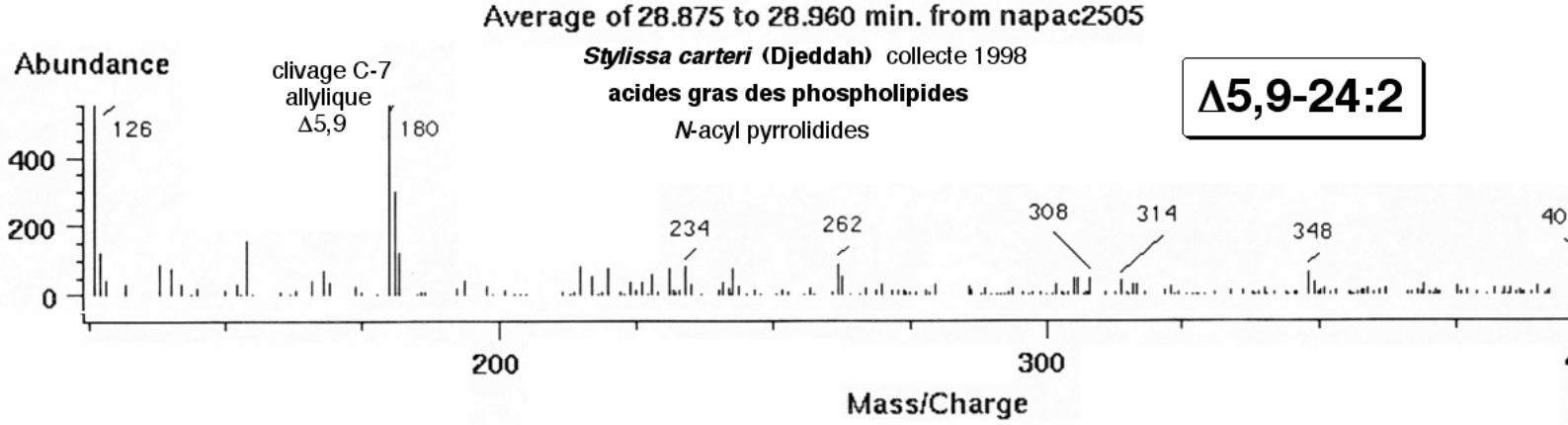

ion 100 %:
m/z 113
Average of 38.713 to 38.825 min. from smab23e
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
5-25:1 + 5,18-25:2
(hypoth.)
Abundance
Δ5
9:1
14:1
3000
2000
1000
0
140 160 180 200 220 240 260 280

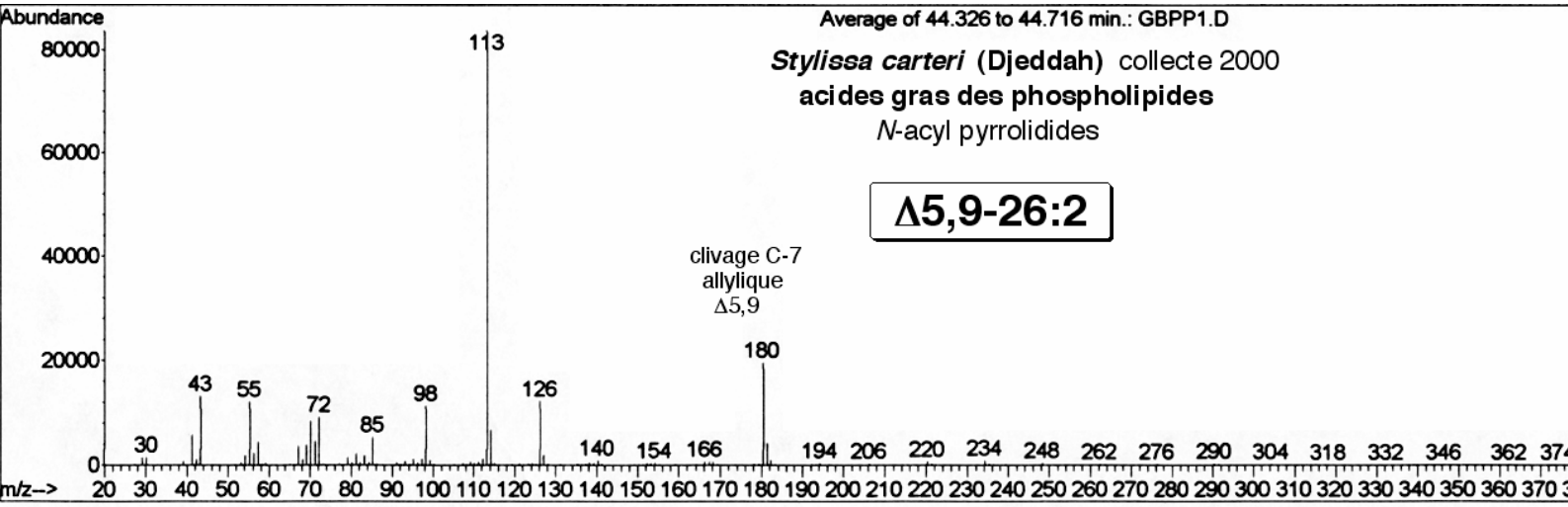

Average of 40.873 to 40.955 min. from smab23e_bsb2.d
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
ion 100 %:
m/z 113
soustrait du Δ5,9-26:2
40,55 min
Δ9-26:1
126
72
55
182
236
278
334
404
196
208
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
100
200
300
400

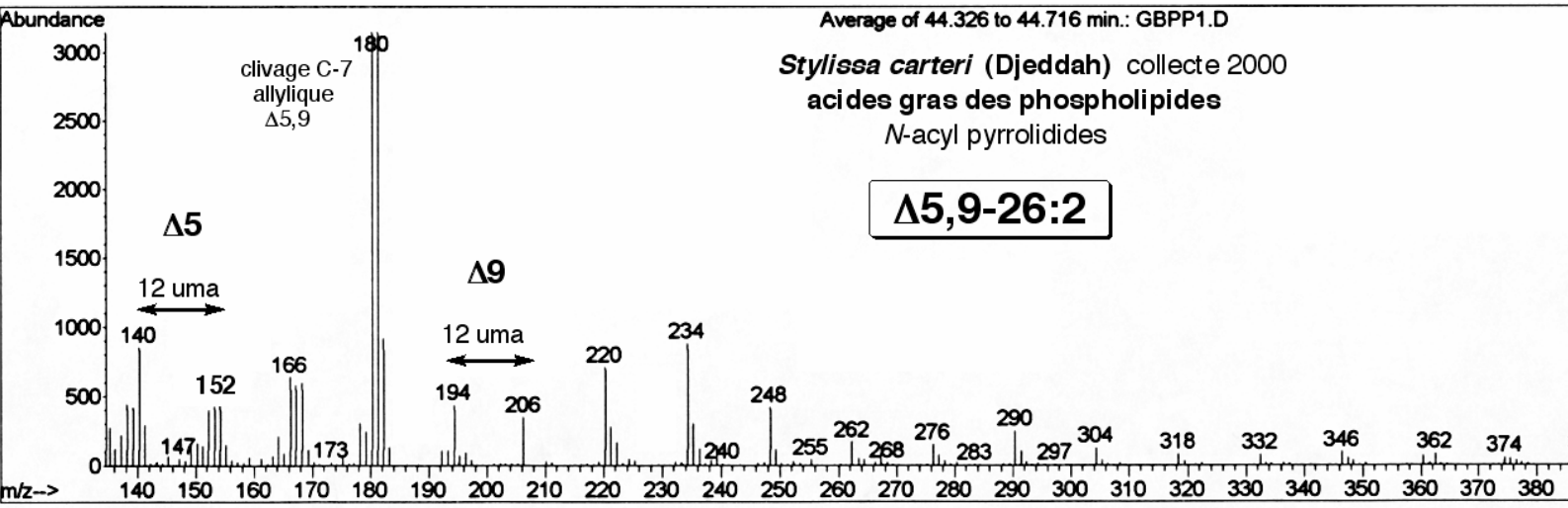
Average of 40.873 to 40.955 min. from smab23e_bsb2.d
Abundance
Δ9-26:1
140
168
182
12 uma
C8:0
C9:1
196
208
222
236
250
264
1000
0
140
160
180
200
220
240
260
280


Average of 21.036 to 21.052 min. from napac2505
Stylissa carteri (Djeddah)
acides gras des phosph
N-acyl pyrrolidides
Δ11,15-20:2
Abundance
3000
2000
1000
0
140
168
182
210
Δ11
12 uma
224
236
250
264
Δ15
278
290
304
160
200
240
280
320
Mass/Charge


Average of 16.984 to 17.018 min. from esme
Average of 28.875 to 28.960 min. from napac2505
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
Δ5,9-24:2
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
113
55
126
clivage C-7
allylique
Δ5,9
180
262
308
348
M+
417
100
200
300
400
Mass/Charge

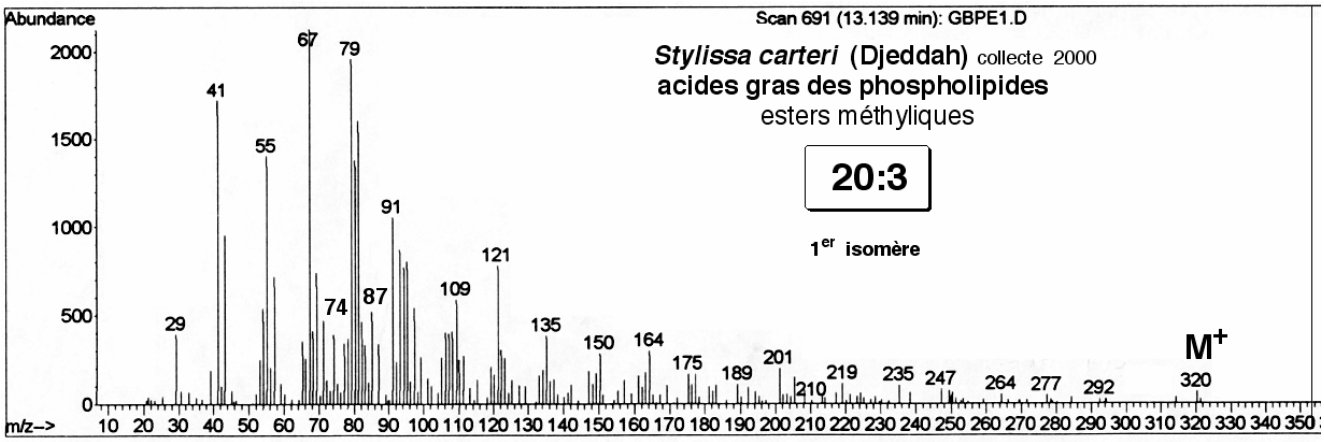

Average of 28.875 to 28.960 min. from napac2505
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
Δ5,9-24:2
clivage C-7
allylique
Δ5,9
126
180
400
200
0
234
262
308
314
348
200
300
Mass/Charge

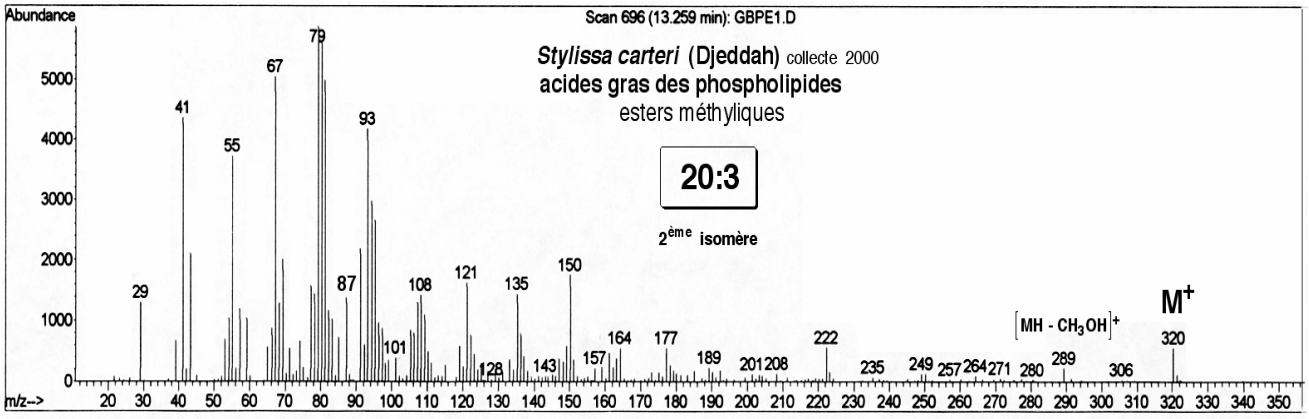

Abundance
Average of 44.326 to 44.716 min.: GBPP1.D
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 2000
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
Δ5,9-26:2
clivage C-7
allylique
Δ5,9
113
180
43
55
72
85
98
126
30
140
154
166
194
206
220
234
248
262
276
290
304
318
332
346
362
m/z-->

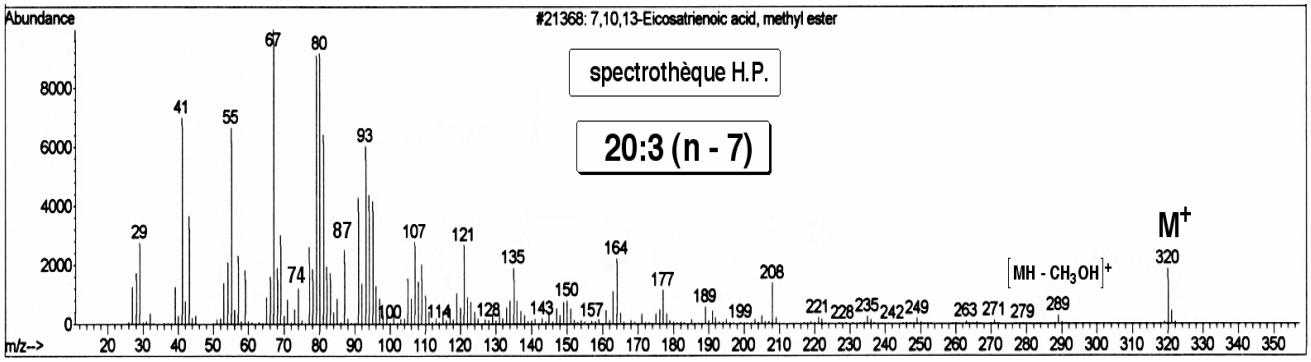

Abundance
Average of 44.326 to 44.716 min.: GBPP1.D
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 2000
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
Δ5,9-26:2
clivage C-7
allylique
Δ5,9
180
Δ5
12 uma
Δ9
12 uma
140
152
166
147
173
194
206
220
234
240
248
255
262
268
276
283
290
297
304
318
332
346
362
374
m/z-->

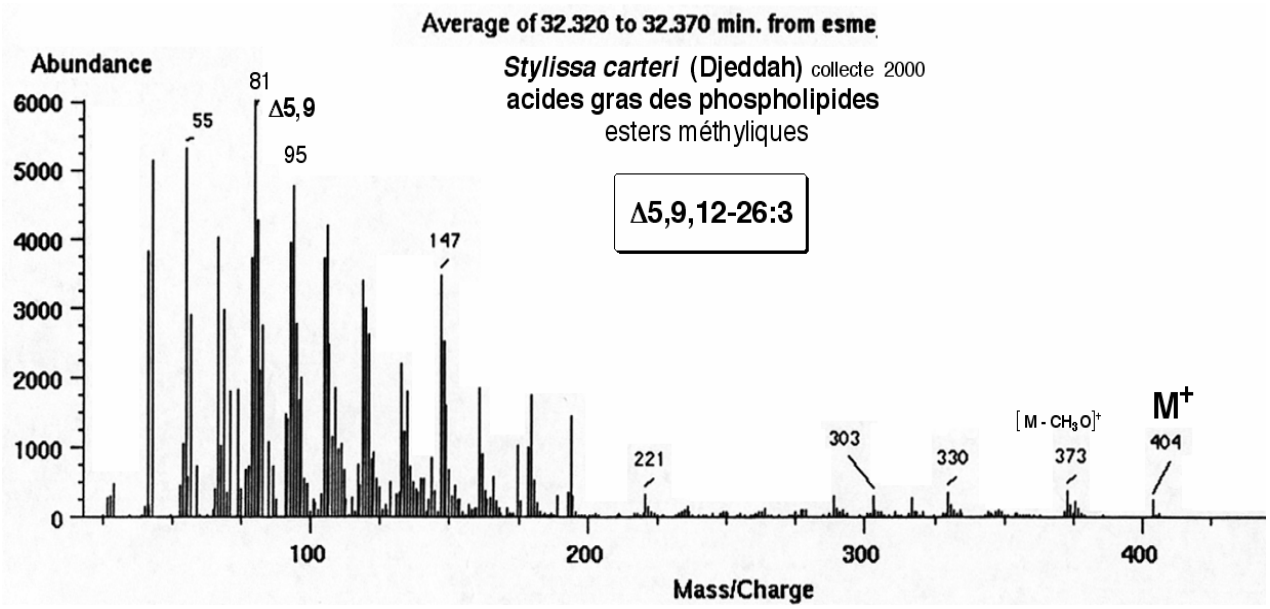
Spectres de masse de deux acides eicosatriènoïques 20 :3 (EMAG)

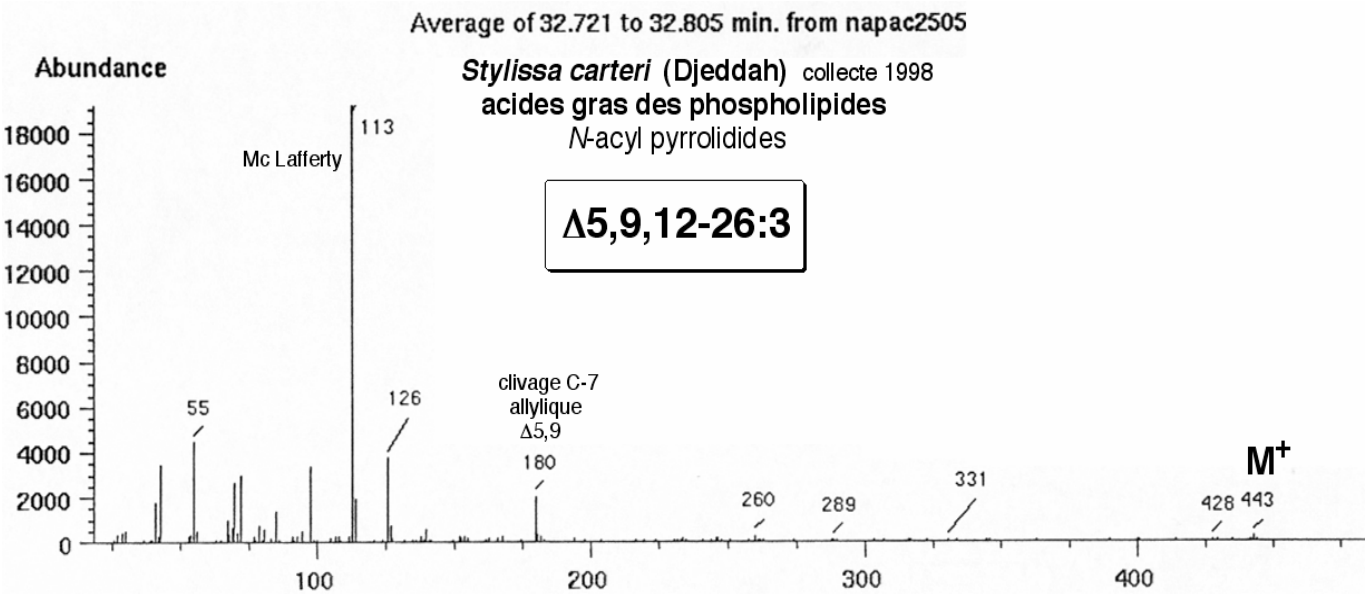
Comparaison avec un spectre de référence

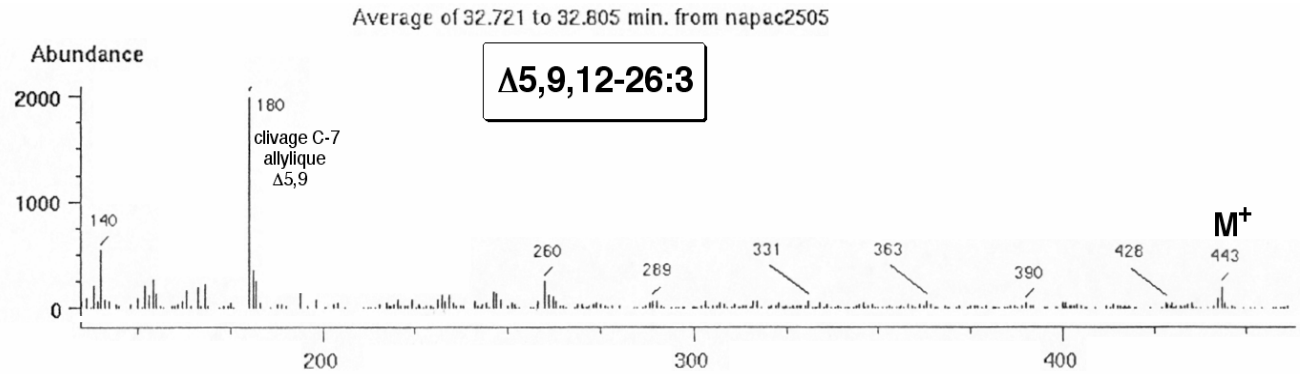


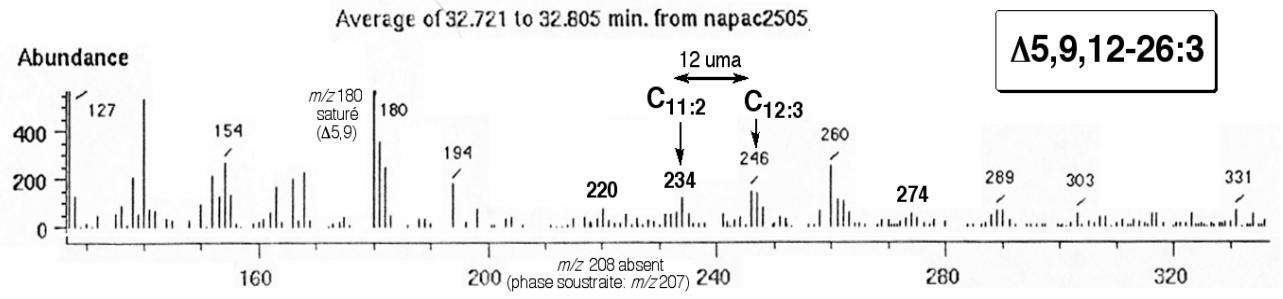


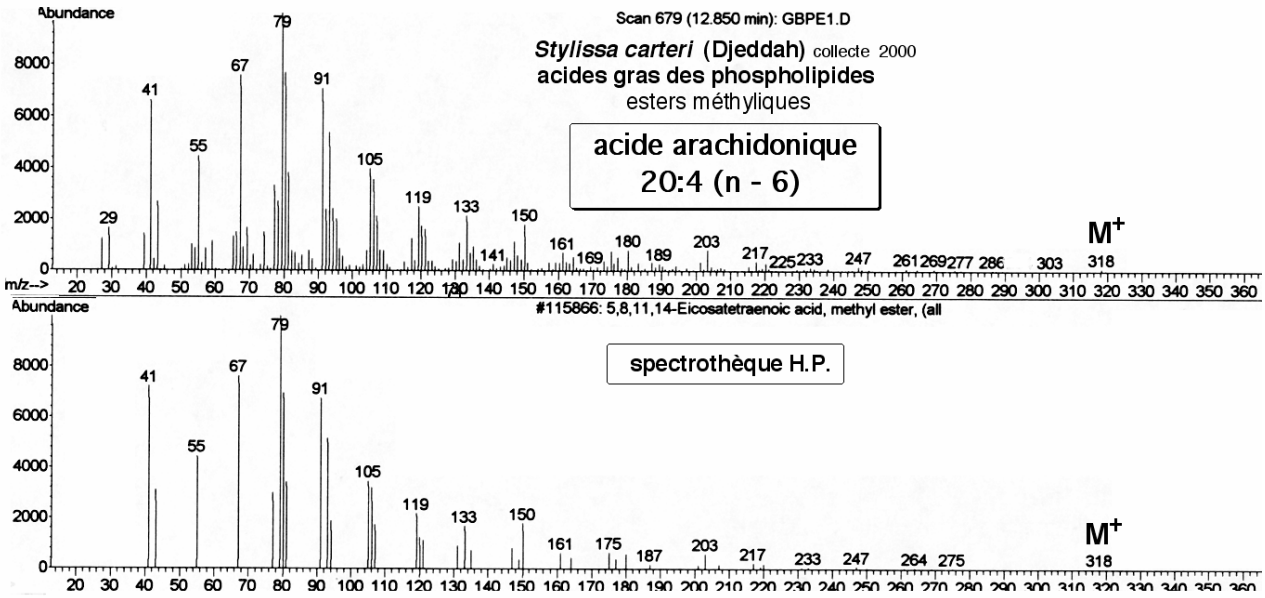

Abundance
#21368: 7,10,13-Eicosatrienoic acid, methyl ester
spectrothèque H.P.
20:3 (n - 7)
M+
320
[MH - CH3OH]+
m/z-->
8000
6000
4000
2000
0
29
41
55
67
74
80
87
93
100
107
114
121
128
135
143
150
157
164
177
189
199
208
221
228
235
242
249
263
271
279
289
20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350

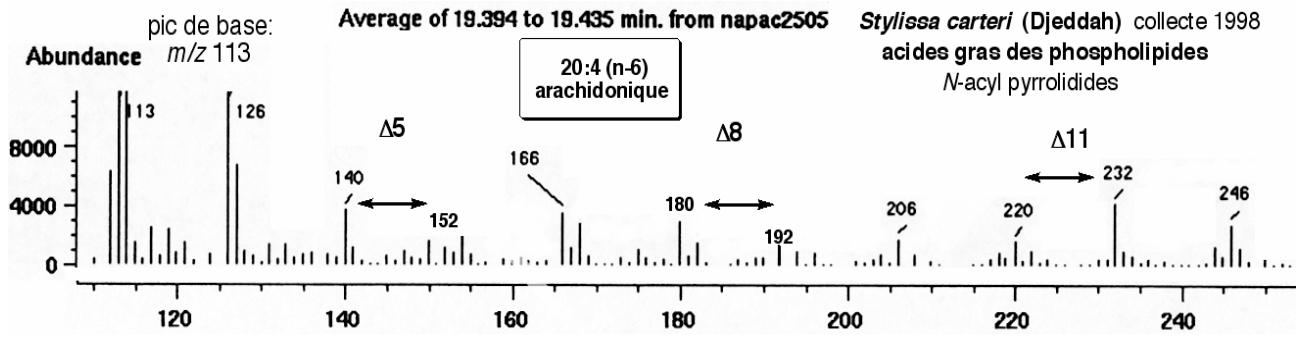

Average of 32.320 to 32.370 min. from esme
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 2000
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
Δ5,9,12-26:3
81
Δ5,9
55
95
147
221
303
330
[M - CH3O]+
373
M+
404
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
100
200
300
400
Mass/Charge

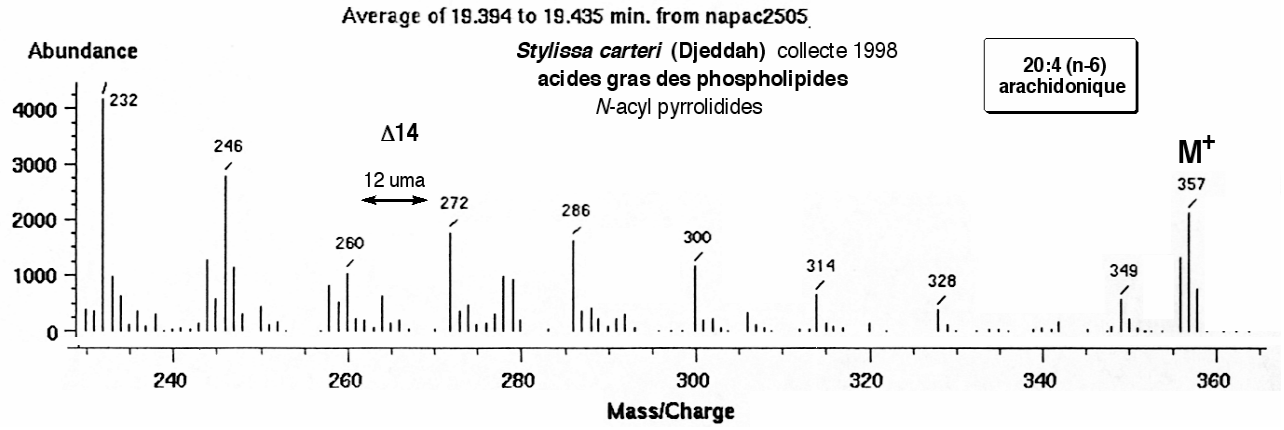

Average of 32.721 to 32.805 min. from napac2505
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
Δ5,9,12-26:3
Mc Lafferty
113
55
126
clivage C-7
allylique
Δ5,9
180
260
289
331
428
443
M+
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
100
200
300
400

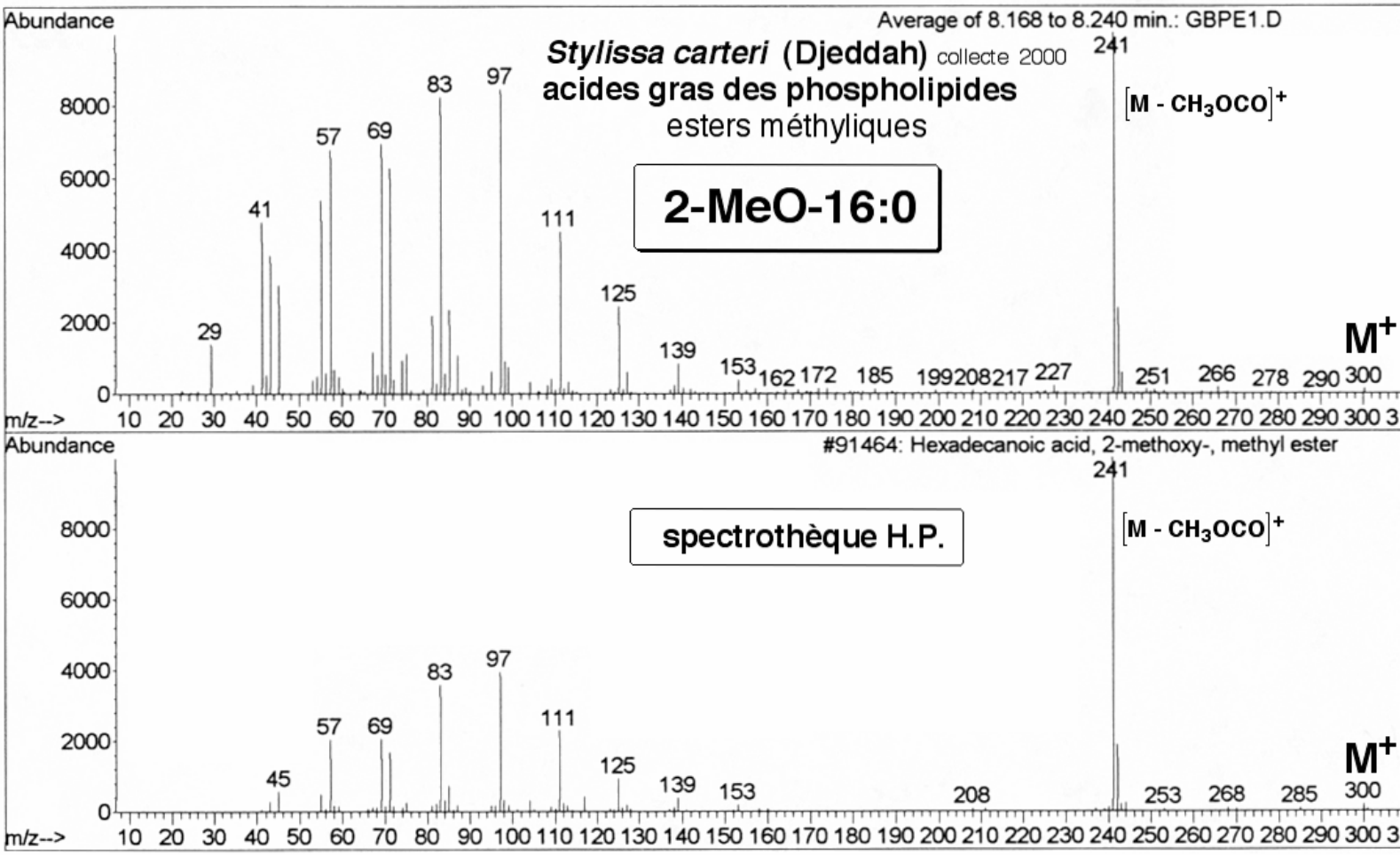

Average of 32.721 to 32.805 min. from napac2505
Abundance
Δ5,9,12-26:3
2000
1000
0
180
clivage C-7
allylique
Δ5,9
140
260
289
331
363
390
428
443
M+
200
300
400

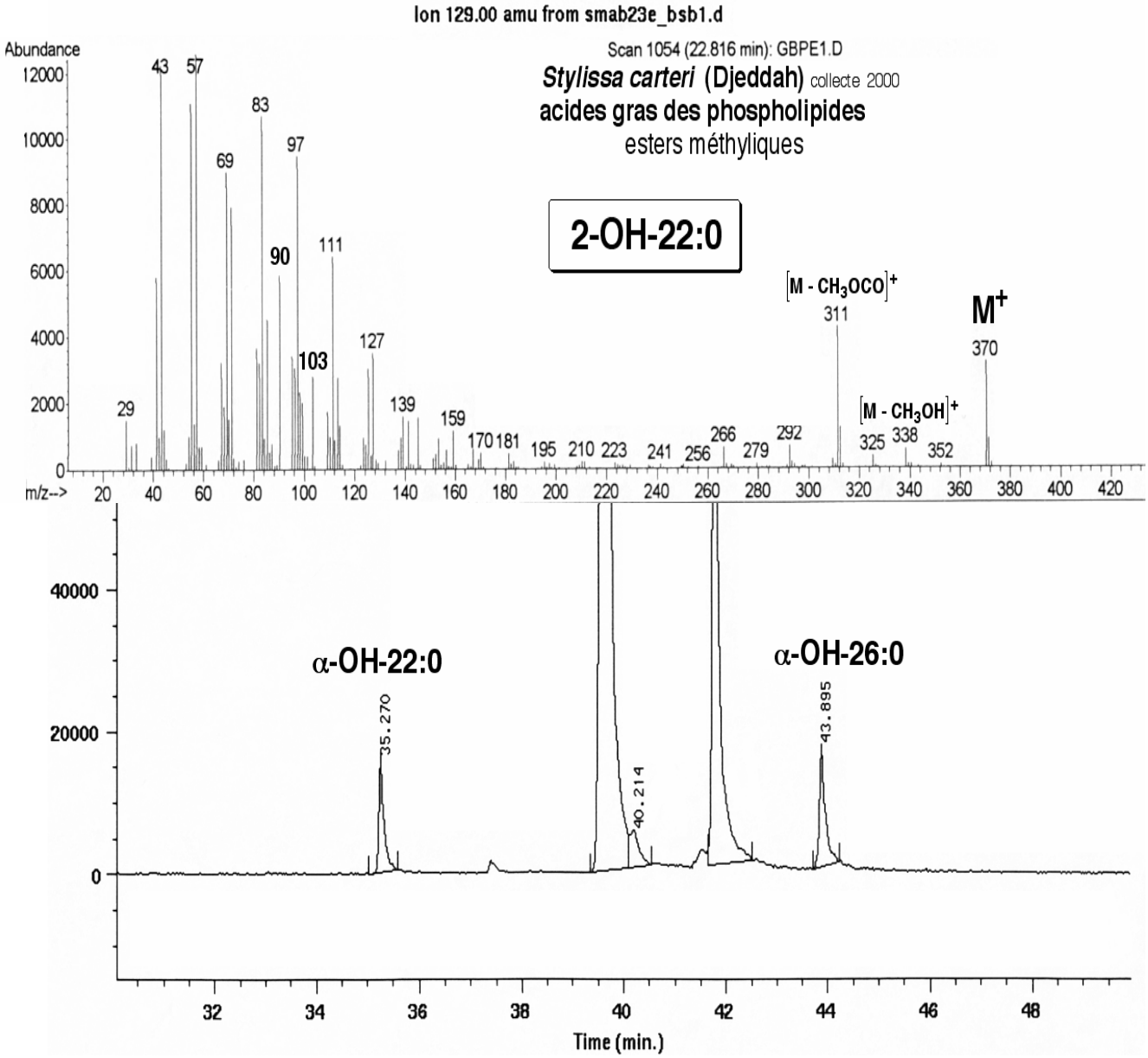

Average of 32.721 to 32.805 min. from napac2505
Abundance
Δ5,9,12-26:3
12 uma
C11:2
C12:3
m/z 180
saturé
(Δ5,9)
127
154
180
194
220
234
246
260
274
289
303
331
400
200
0
160
200
240
280
320
m/z 208 absent
(phase soustraite: m/z 207)

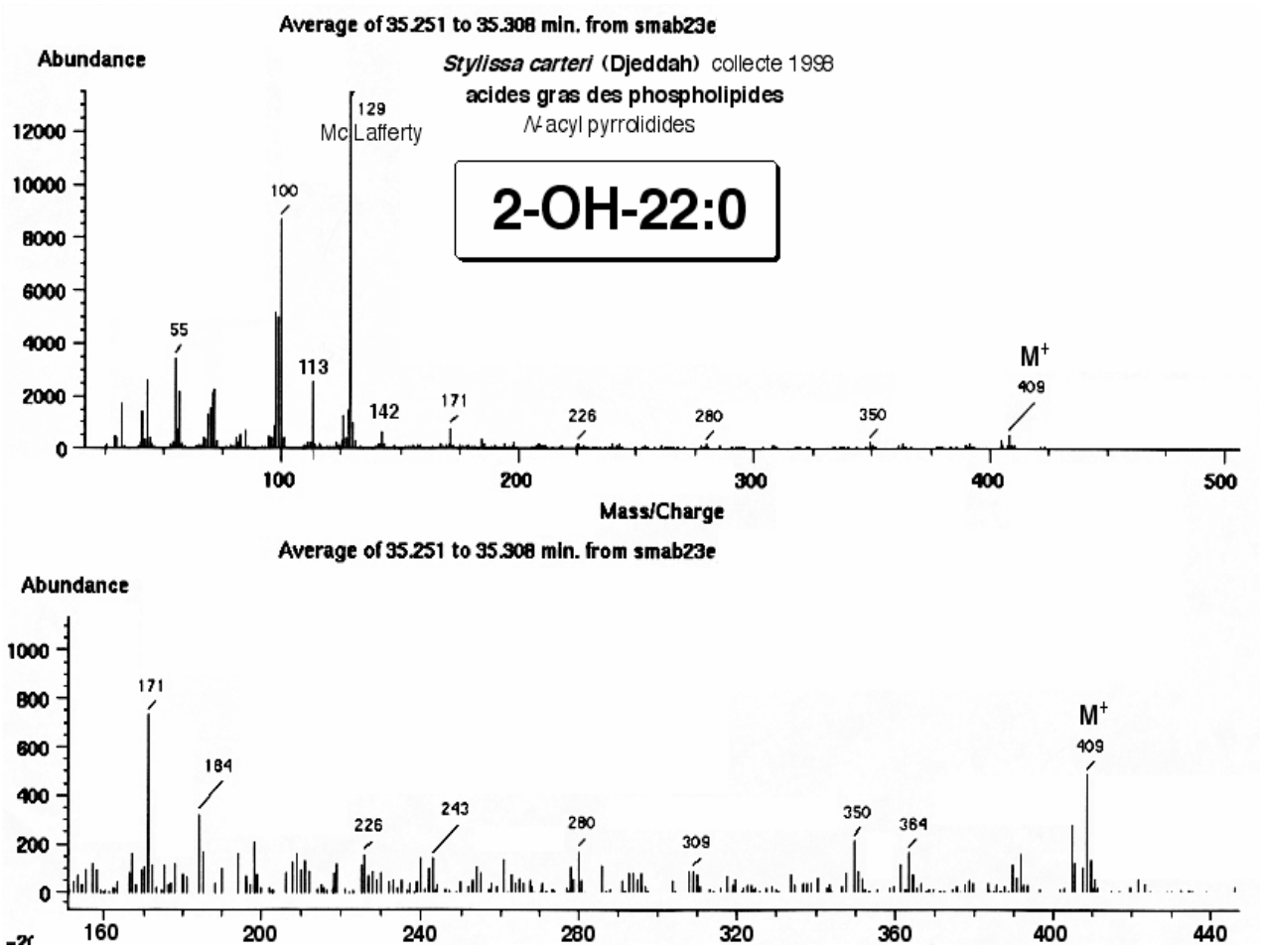

Abundance
Scan 679 (12.850 min): GBPE1.D
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 2000
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
acide arachidonique
20:4 (n - 6)
M+
m/z-->
Abundance
#115866: 5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid, methyl ester, (all
spectrothèque H.P.
M+

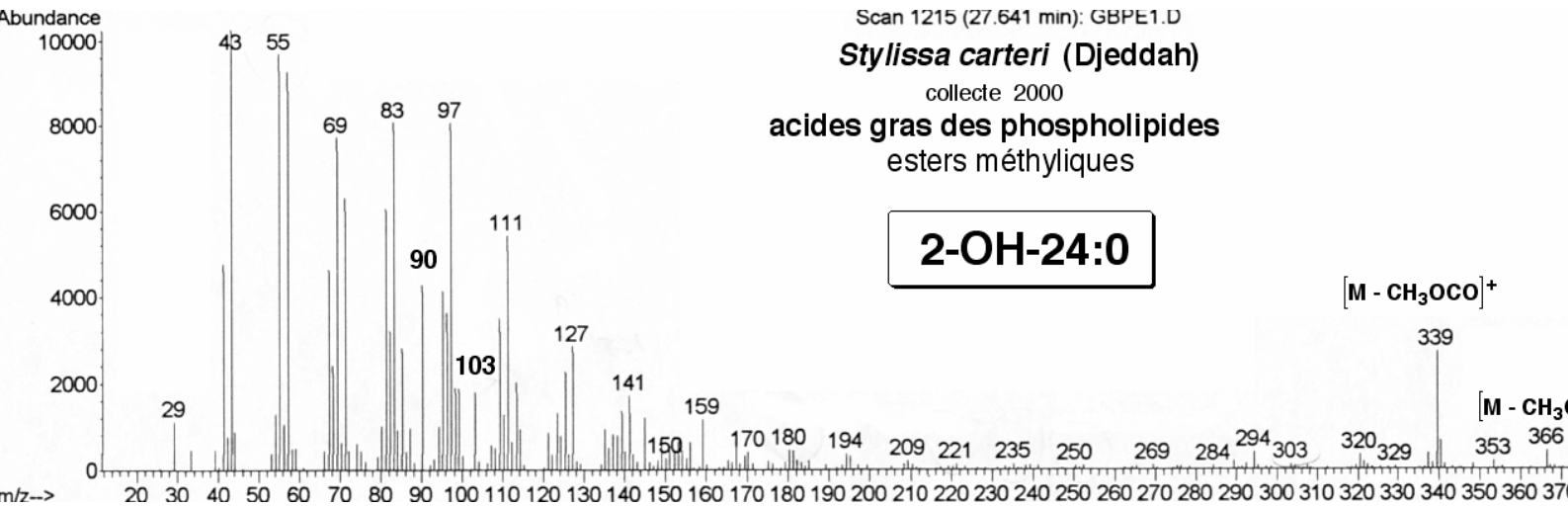

pic de base:
m/z 113
Average of 19.394 to 19.435 min. from napac2505
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
20:4 (n-6)
arachidonique
Abundance
Δ5
Δ8
Δ11
113
126
140
152
166
180
192
206
220
232
246
8000
4000
0
120
140
160
180
200
220
240

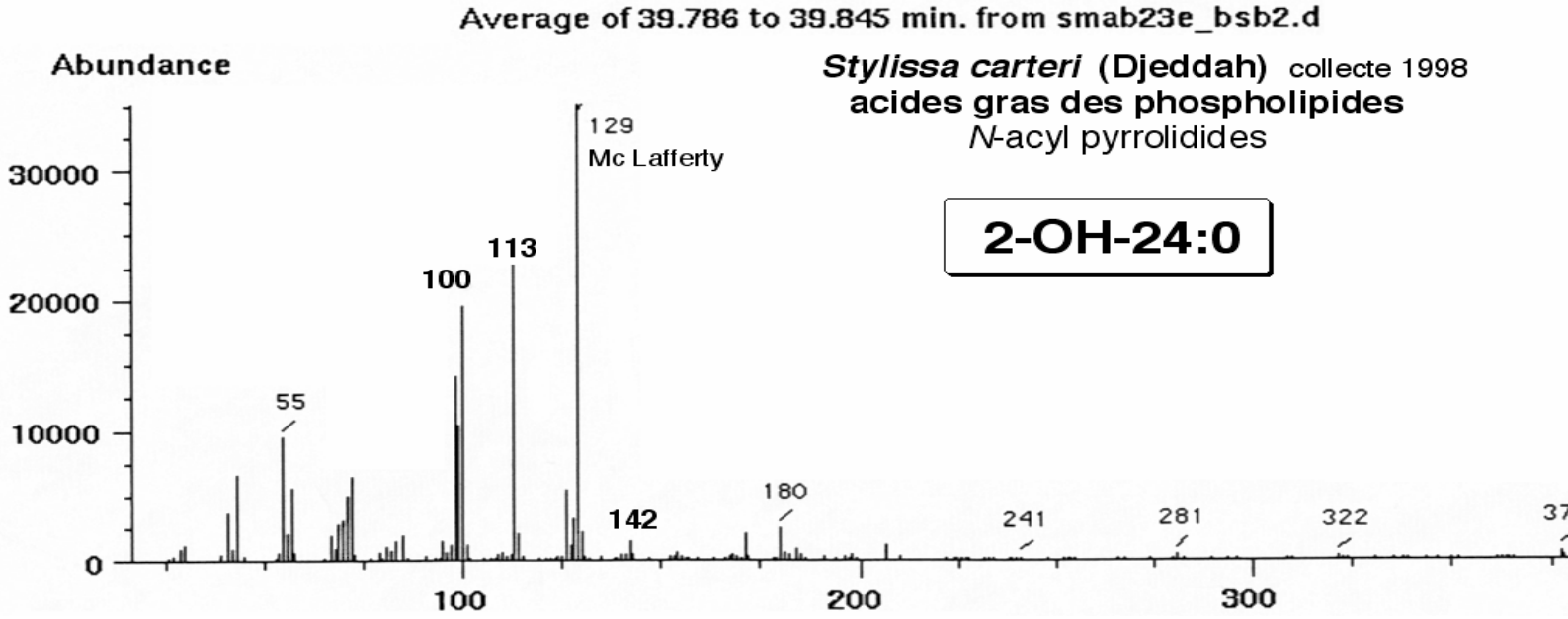

Average of 19.394 to 19.435 min. from napac2505
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
20:4 (n-6)
arachidonique
Δ14
12 uma
M+
232
246
260
272
286
300
314
328
349
357
4000
3000
2000
1000
0
240
260
280
300
320
340
360
Mass/Charge

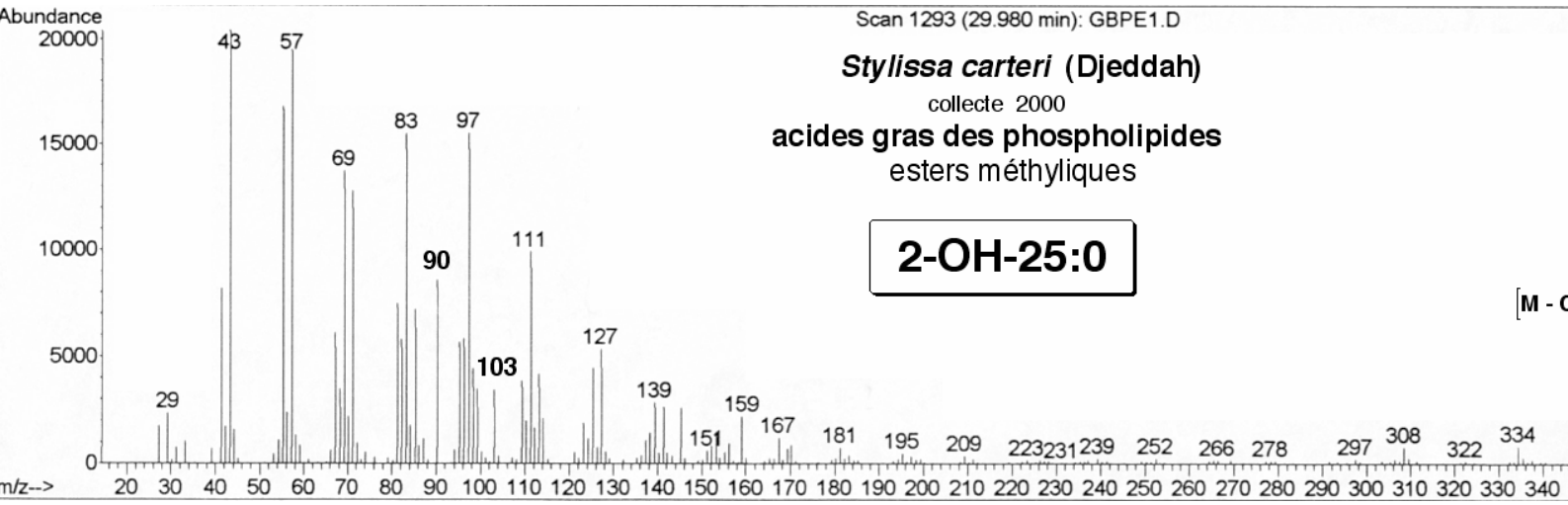

Abundance
Average of 8.168 to 8.240 min.: GBPE1.D
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 2000
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
2-MeO-16:0
[M - CH3OCO]+
M+
m/z-->
Abundance
#91464: Hexadecanoic acid, 2-methoxy-, methyl ester
spectrothèque H.P.
[M - CH3OCO]+
M+
m/z-->

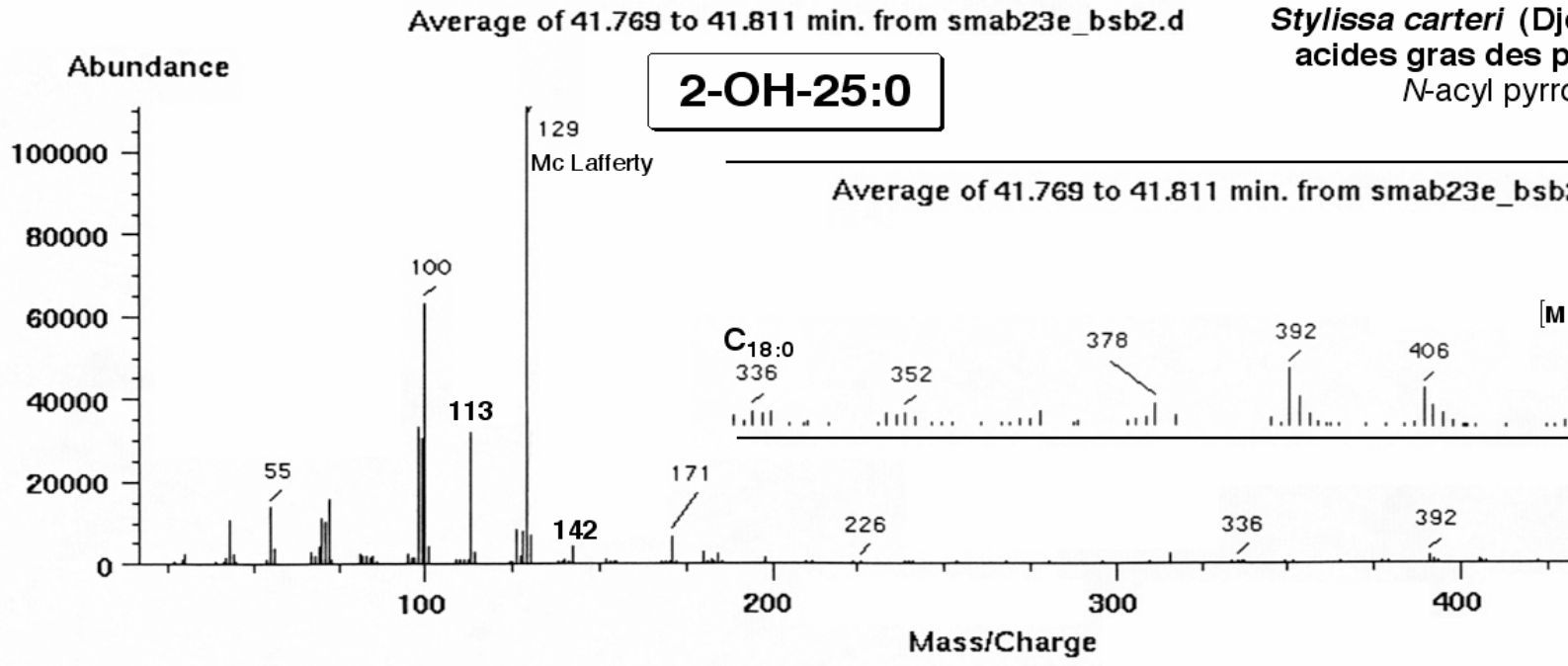

Ion 129.00 amu from smab23e_bsb1.d
Scan 1054 (22.816 min): GBPE1.D
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 2000
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
2-OH-22:0
Abundance
m/z-->
[M - CH3OCO]+
311
M+
370
[M - CH3OH]+
α-OH-22:0
α-OH-26:0
35.270
40.214
43.895
Time (min.)

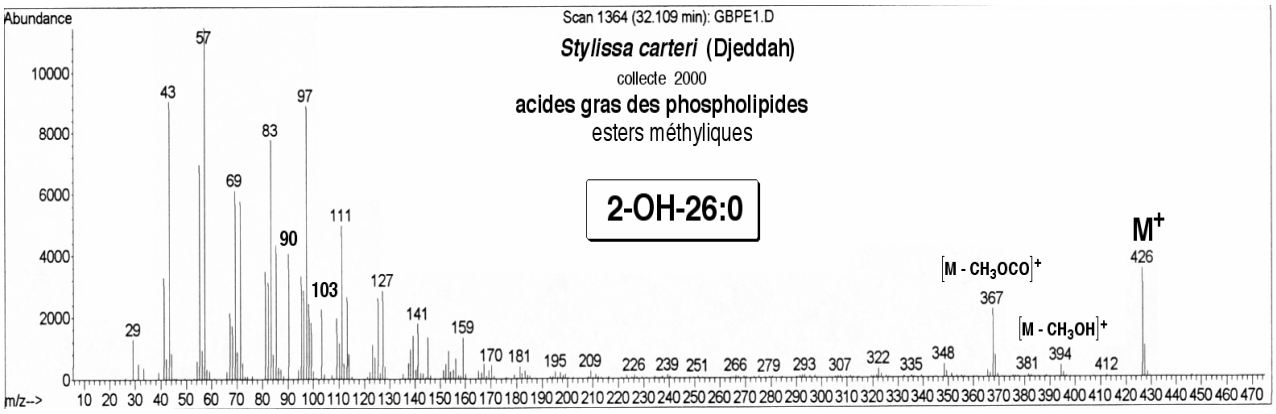

Average of 35.251 to 35.308 min. from smab23e
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
2-OH-22:0
129
McLafferty
100
55
113
142
171
226
280
350
M+
409
Mass/Charge
Average of 35.251 to 35.308 min. from smab23e
Abundance
171
184
226
243
280
309
350
364
M+
409

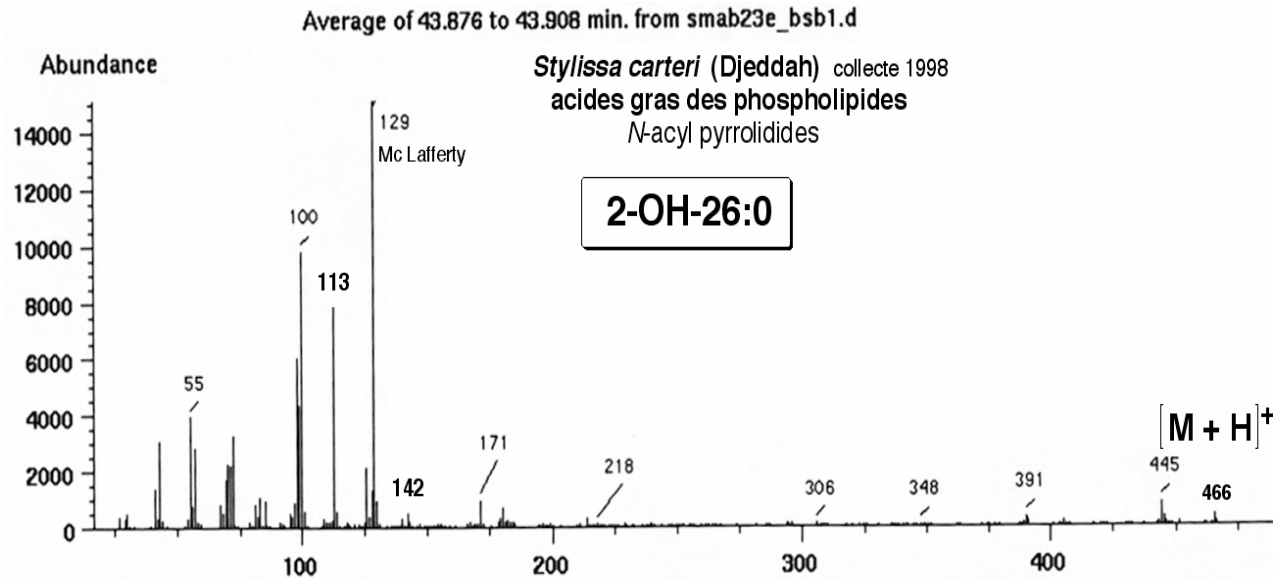

Abundance
Scan 1215 (27.641 min): GBPE1.D
Stylissa carteri (Djeddah)
collecte 2000
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
2-OH-24:0
[M - CH3OCO]+
m/z-->

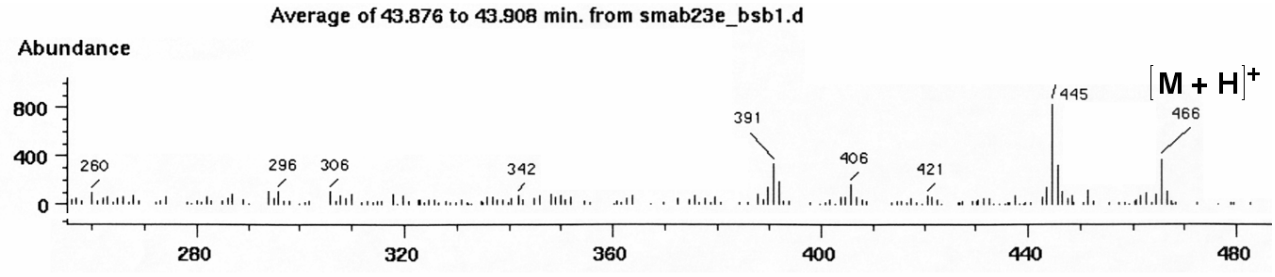

Average of 39.786 to 39.845 min. from smab23e_bsb2.d
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
2-OH-24:0
129
Mc Lafferty

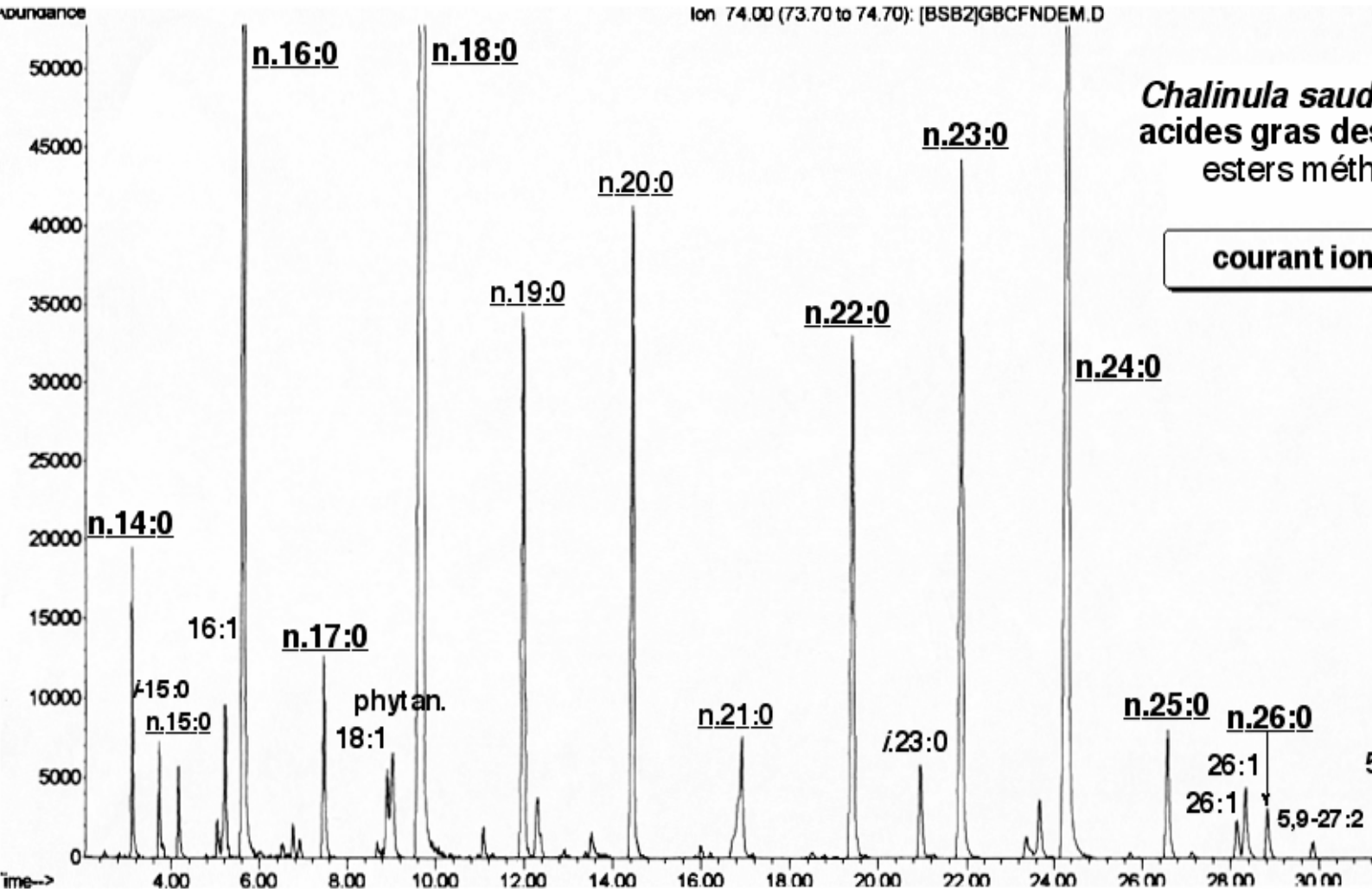

Abundance
Scan 1293 (29.980 min): GBPE1.D
Stylissa carteri (Djeddah)
collecte 2000
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
2-OH-25:0
m/z-->

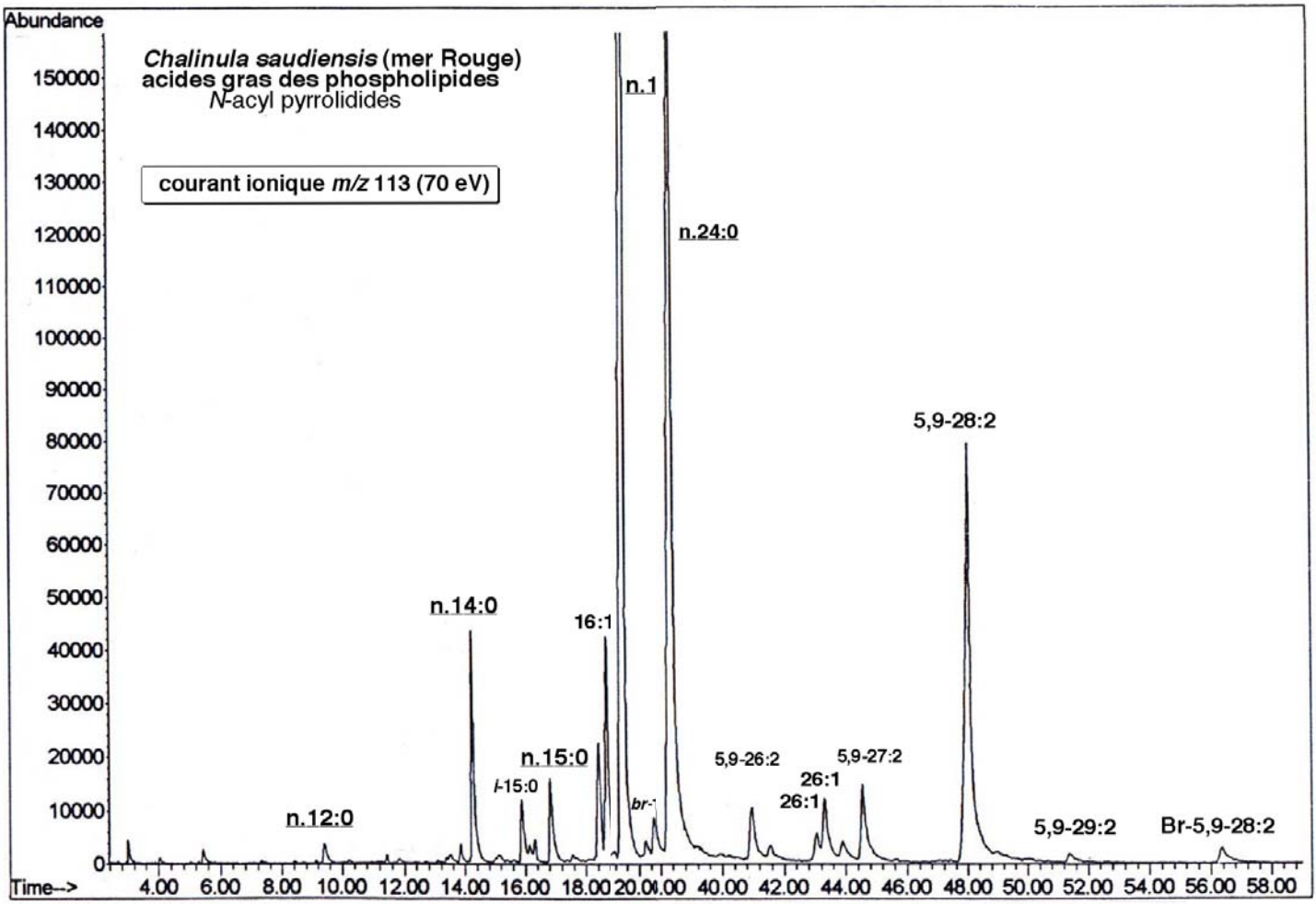

Average of 41.769 to 41.811 min. from smab23e_bsb2.d
Stylissa carteri (Dj
acides gras des p
N-acyl pyrr
2-OH-25:0
Abundance
Mc Lafferty
Average of 41.769 to 41.811 min. from smab23e_bsb
C18:0
Mass/Charge

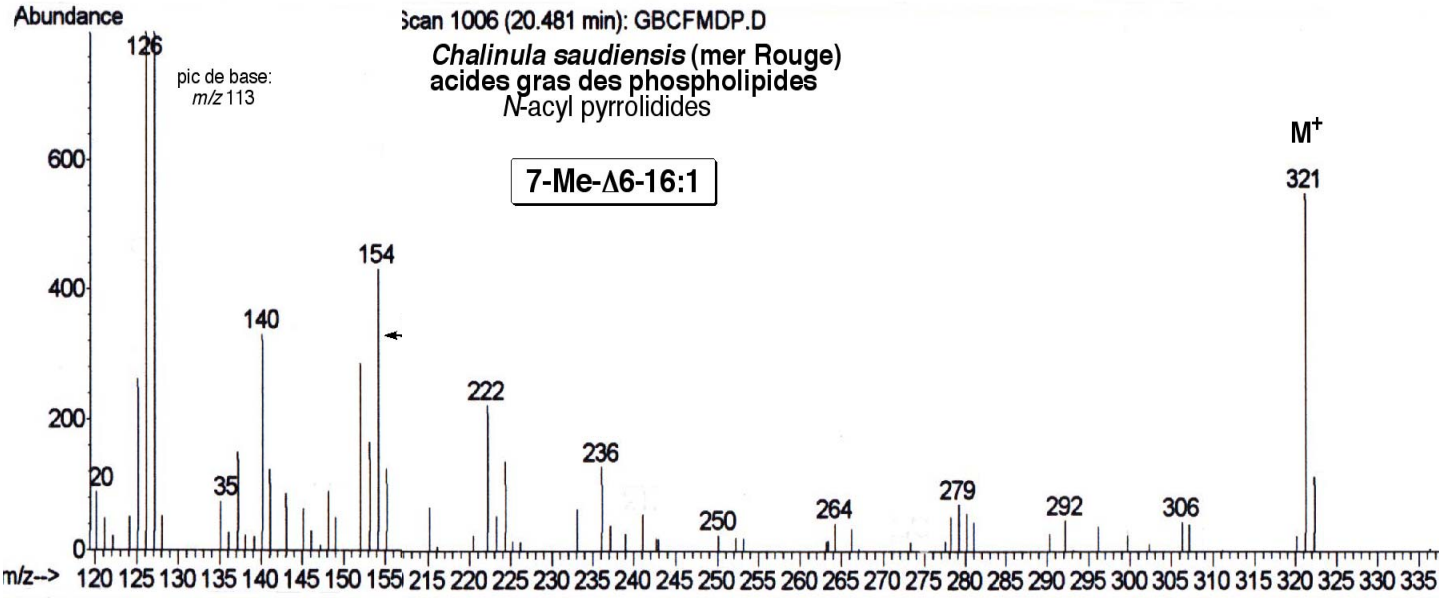

Abundance
Scan 1364 (32.109 min): GBPE1.D
Stylissa carteri (Djeddah)
collecte 2000
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
2-OH-26:0
M+
426
[M - CH3OCO]+
367
[M - CH3OH]+
m/z-->

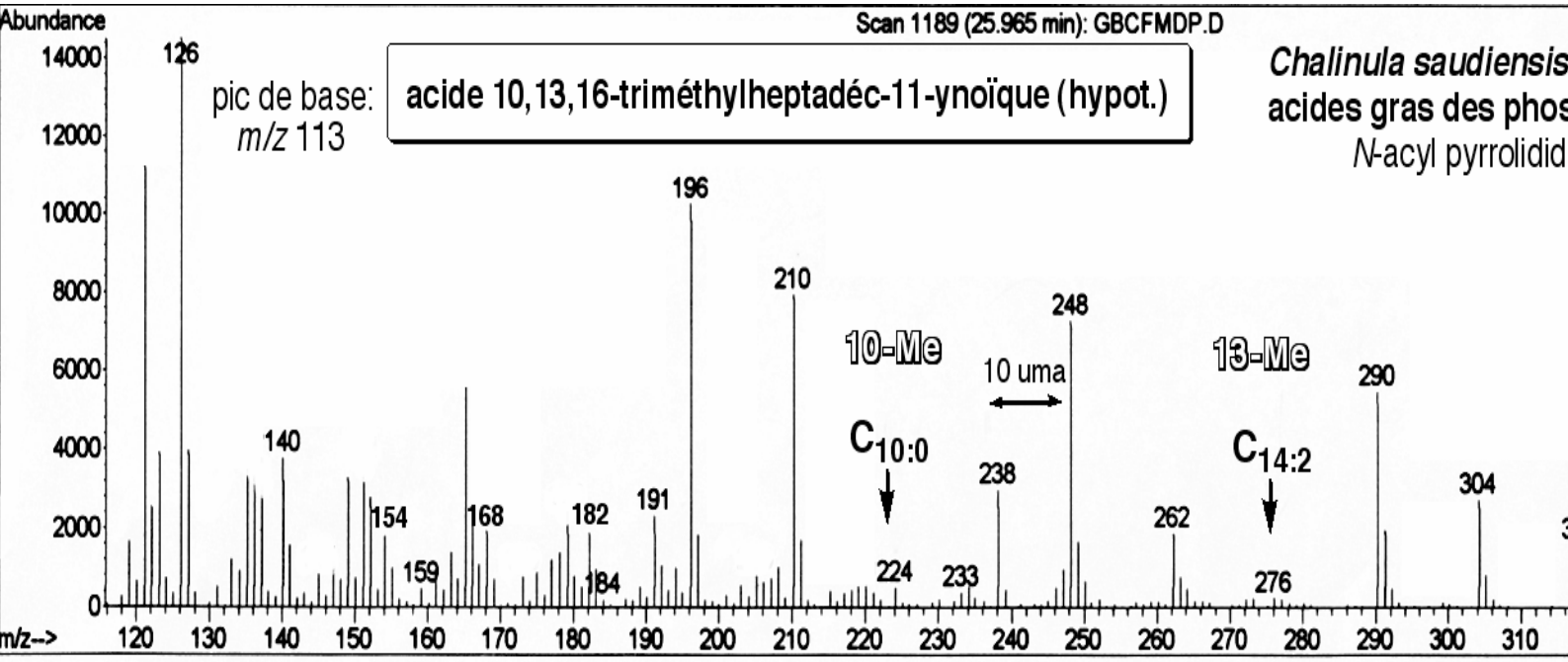

Average of 43.876 to 43.908 min. from smab23e_bsb1.d
Abundance
Stylissa carteri (Djeddah) collecte 1998
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
2-OH-26:0
129
Mc Lafferty
[M + H]+
445
466

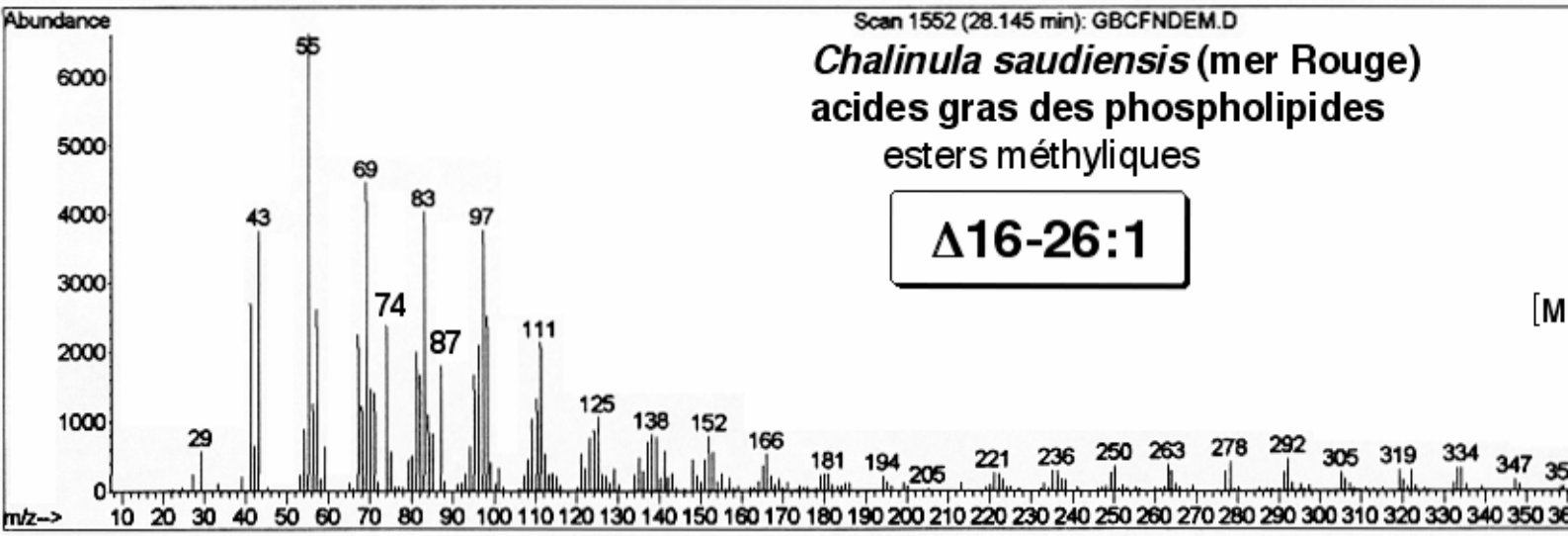

Average of 43.876 to 43.908 min. from smab23e_bsb1.d
Abundance
800
400
0
260
296
306
342
391
406
421
445
466
[M + H]+
280
320
360
400
440
480

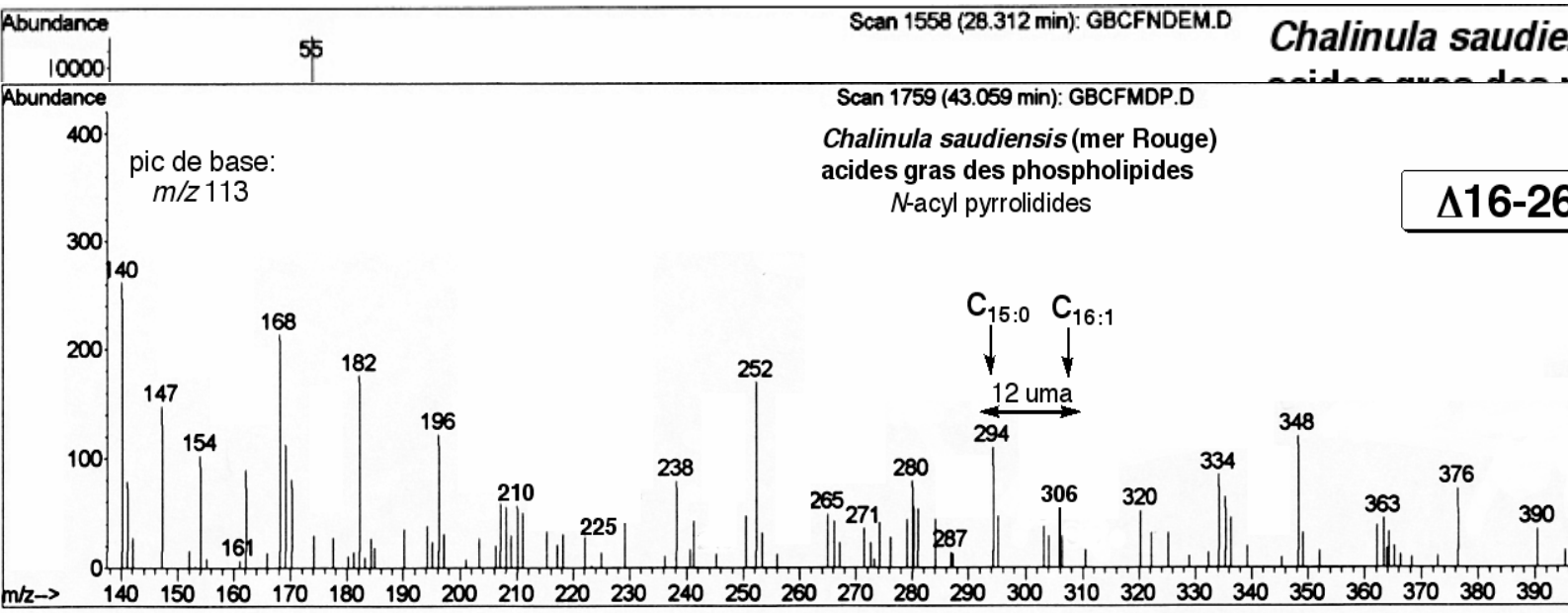

Abundance
Ion 74.00 (73.70 to 74.70): [BSB2]GBCFNDEM.D
Chalinula saud
acides gras des
esters méth
courant ion
n.14:0
i-15:0
n.15:0
16:1
n.16:0
n.17:0
phytan.
18:1
n.18:0
n.19:0
n.20:0
n.21:0
n.22:0
i.23:0
n.23:0
n.24:0
n.25:0
n.26:0
26:1
26:1
5,9-27:2
Time-->

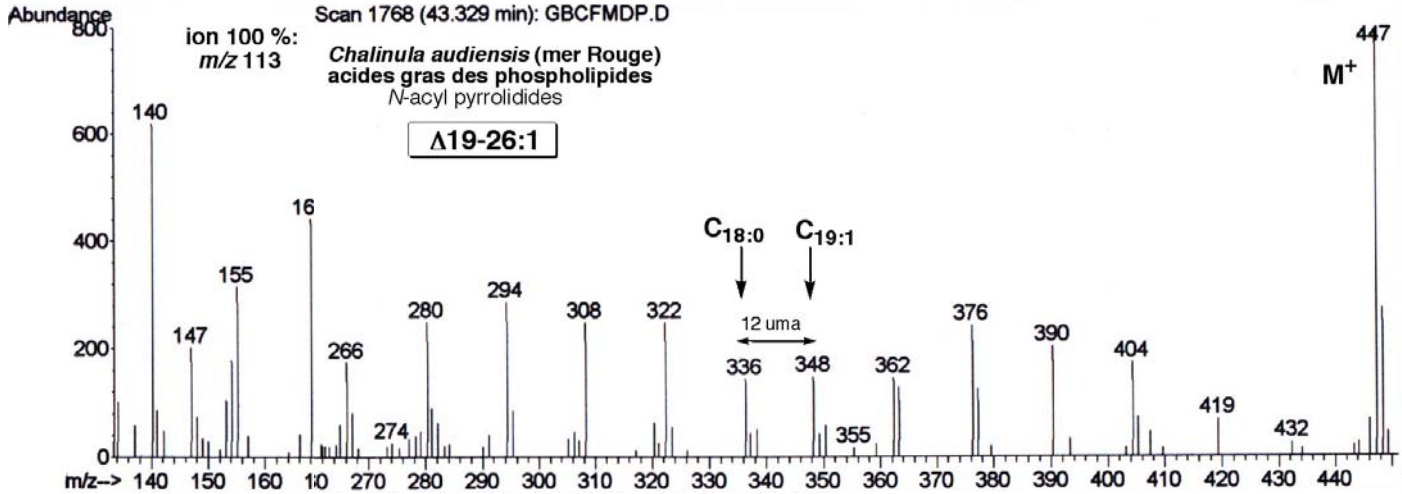

Abundance
Chalinula saudiensis (mer Rouge)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
courant ionique m/z 113 (70 eV)
n.1
n.24:0
5,9-28:2
n.14:0
16:1
n.15:0
i-15:0
br-
5,9-26:2
26:1
26:1
5,9-27:2
n.12:0
5,9-29:2
Br-5,9-28:2
Time-->
150000
140000
130000
120000
110000
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
4.00 6.00 8.00 10.00 12.00 14.00 16.00 18.00 20.00 40.00 42.00 44.00 46.00 48.00 50.00 52.00 54.00 56.00 58.00

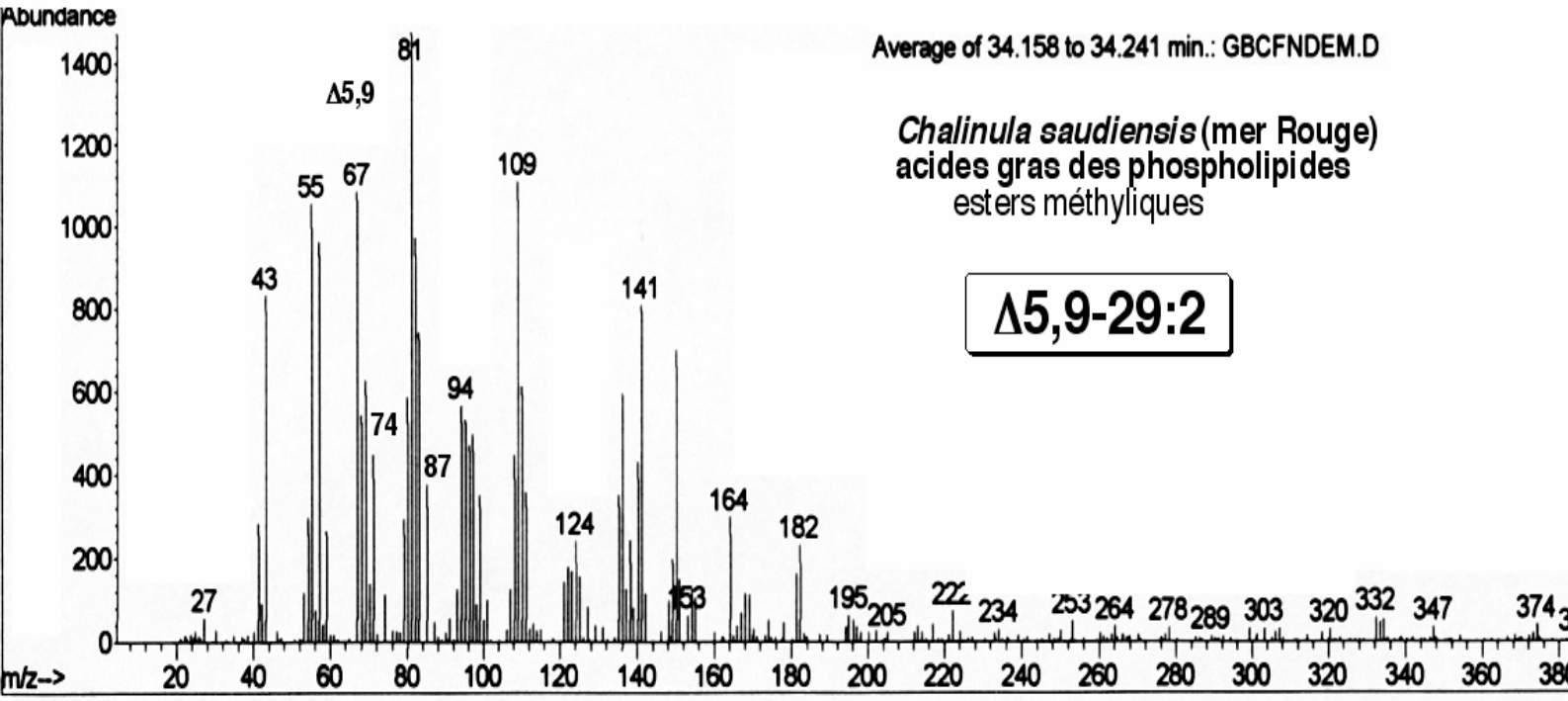

Abundance
Scan 1006 (20.481 min): GBCFMDP.D
Chalinula saudiensis (mer Rouge)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
pic de base:
m/z 113
7-Me-Δ6-16:1
M+
321
126
154
140
222
236
20
35
250
264
279
292
306
600
400
200
0
m/z-->
120 125 130 135 140 145 150 155 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335

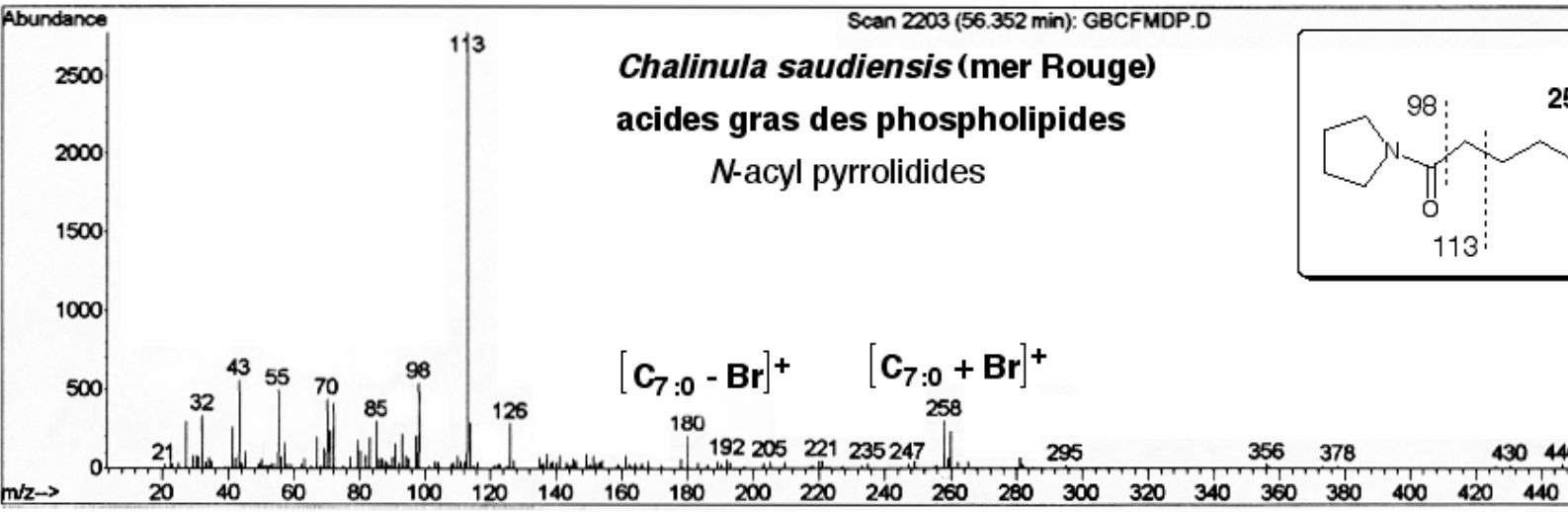

Abundance
Scan 1189 (25.965 min): GBCFMDP.D
pic de base:
m/z 113
acide 10,13,16-triméthylheptadéc-11-ynoïque (hypot.)
Chalinula saudiensis
acides gras des phos
N-acyl pyrrolidid
10-Me
10 uma
13-Me
C10:0
C14:2
m/z-->

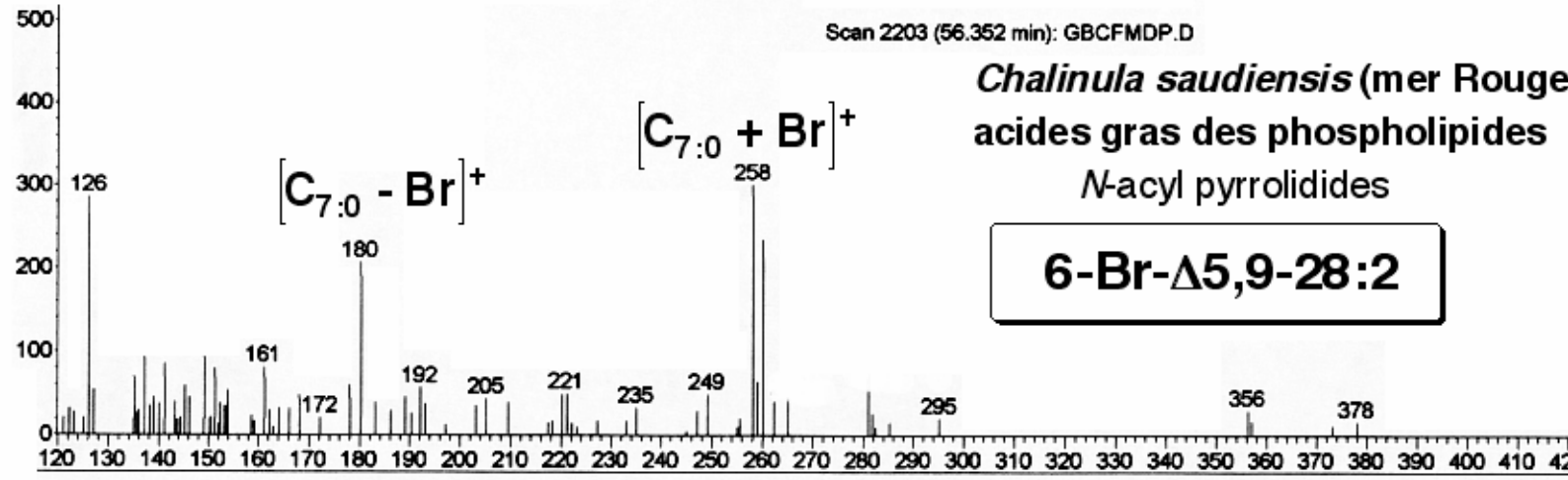

Abundance
Scan 1552 (28.145 min): GBCFNDEM.D
Chalinula saudiensis (mer Rouge)
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
Δ16-26:1
[M
m/z-->

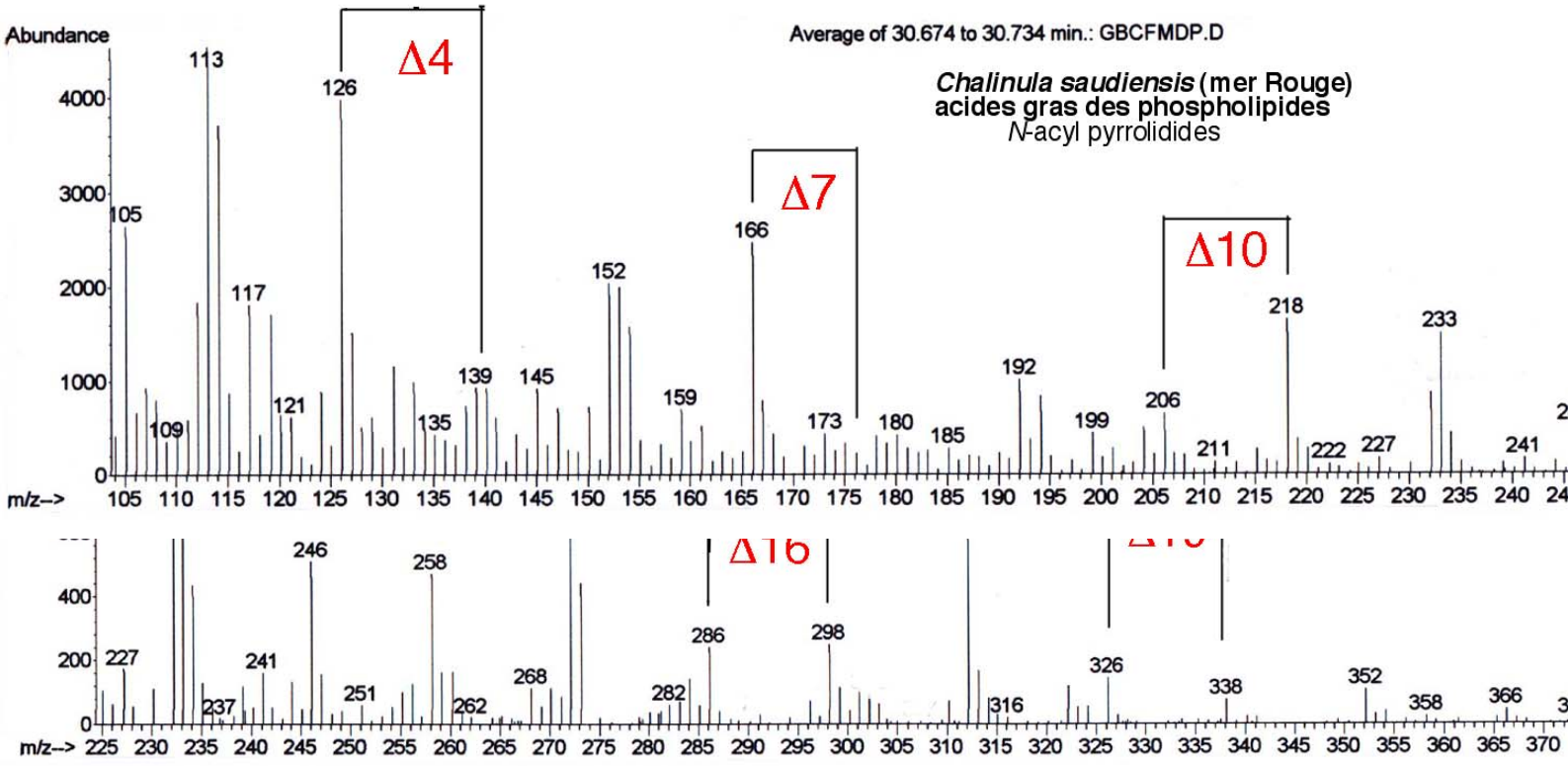

Abundance
Scan 1558 (28.312 min): GBCFNDEM.D
Chalinula saudie
Abundance
Scan 1759 (43.059 min): GBCFMDP.D
pic de base:
m/z 113
Chalinula saudiensis (mer Rouge)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
Δ16-26
C15:0
C16:1
12 uma
m/z-->

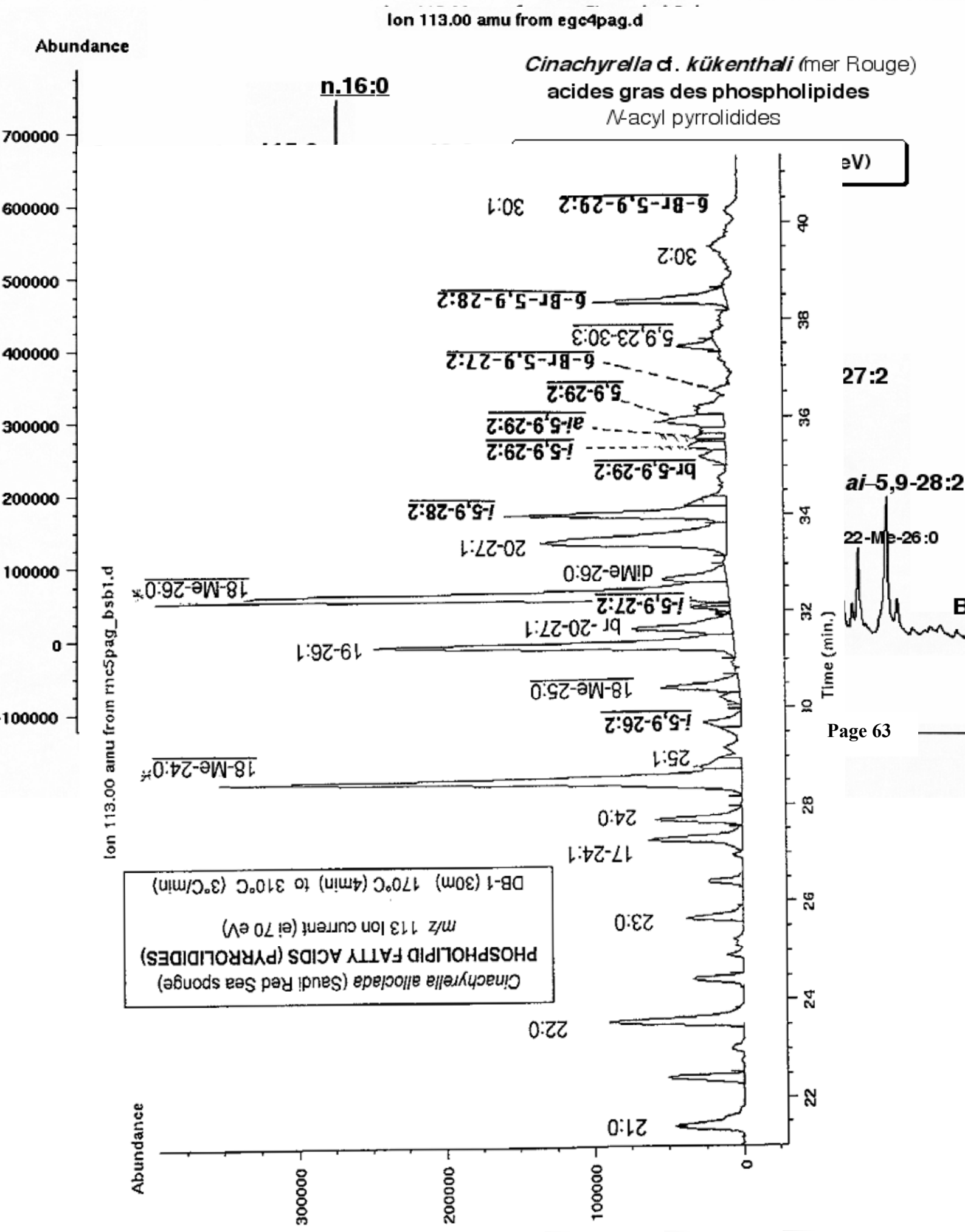

Abundance
Scan 1768 (43.329 min): GBCFMDP.D
ion 100 %:
m/z 113
Chalinula audiensis (mer Rouge)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
Δ19-26:1
C18:0
C19:1
12 uma
M+
m/z-->

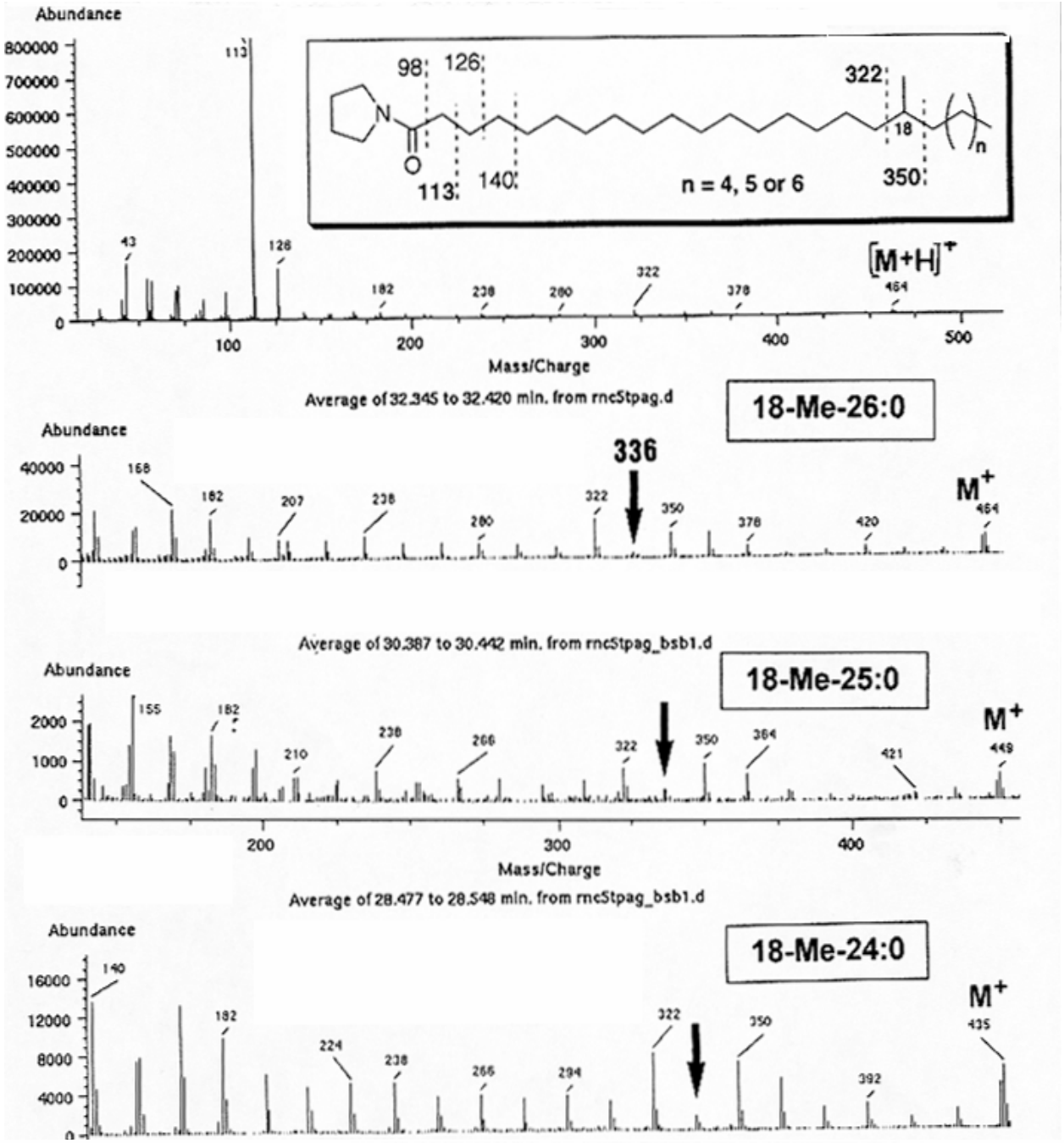

Abundance
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
m/z-->
20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300 320 340 360
Δ5,9
81
55
67
109
43
141
94
74
87
124
164
182
27
195
205
234
264
278
289
303
320
332
347
374
Average of 34.158 to 34.241 min.: GBCFNDEM.D
Chalinula saudiensis (mer Rouge)
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
Δ5,9-29:2


Abundance
Scan 2203 (56.352 min): GBCFMDP.D
Chalinula saudiensis (mer Rouge)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
98
113
[C7:0 - Br]+
[C7:0 + Br]+
m/z-->


Scan 2203 (56.352 min): GBCFMDP.D
Chalinula saudiensis (mer Rouge
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
6-Br-Δ5,9-28:2
[C7:0 + Br]+
[C7:0 - Br]+


Abundance
Average of 30.674 to 30.734 min.: GBCFMDP.D
Chalinula saudiensis (mer Rouge)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
Δ4
Δ7
Δ10
Δ16
m/z-->


Ion 113.00 amu from egc4pag.d
Abundance
Cinachyrella cf. kükenthali (mer Rouge)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
n.16:0
Ion 113.00 amu from mc5pag_bsb1.d
Time (min.)
Cinachyrella alloclada (Saudi Red Sea sponge)
PHOSPHOLIPID FATTY ACIDS (PYRROLIDIDES)
m/z 113 Ion current (ei 70 eV)
DB-1 (30m) 170°C (4min) to 310°C (3°C/min)
21:0
22:0
23:0
17-24:1
24:0
18-Me-24:0*
25:1
i-5,9-26:2
18-Me-25:0
19-26:1
br-20-27:1
i-5,9-27:2
18-Me-26:0*
diMe-26:0
20-27:1
i-5,9-28:2
br-5,9-29:2
i-5,9-29:2
ai-5,9-29:2
5,9-29:2
6-Br-5,9-27:2
5,9,23-30:3
6-Br-5,9-28:2
30:2
6-Br-5,9-29:2
30:1
ai-5,9-28:2
22-Me-26:0
27:2



pic de base:
*m/z*113

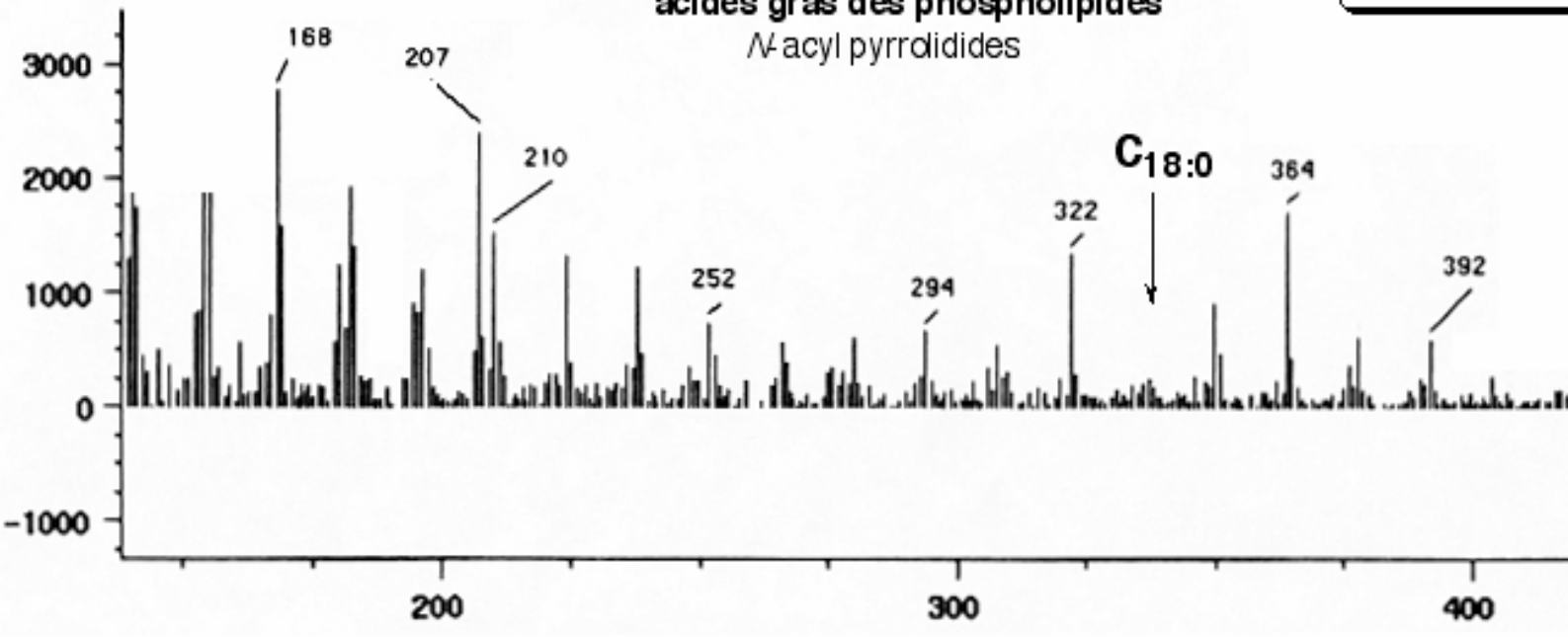
Average of 32.675 to 32.706 min. from rnc5tpag

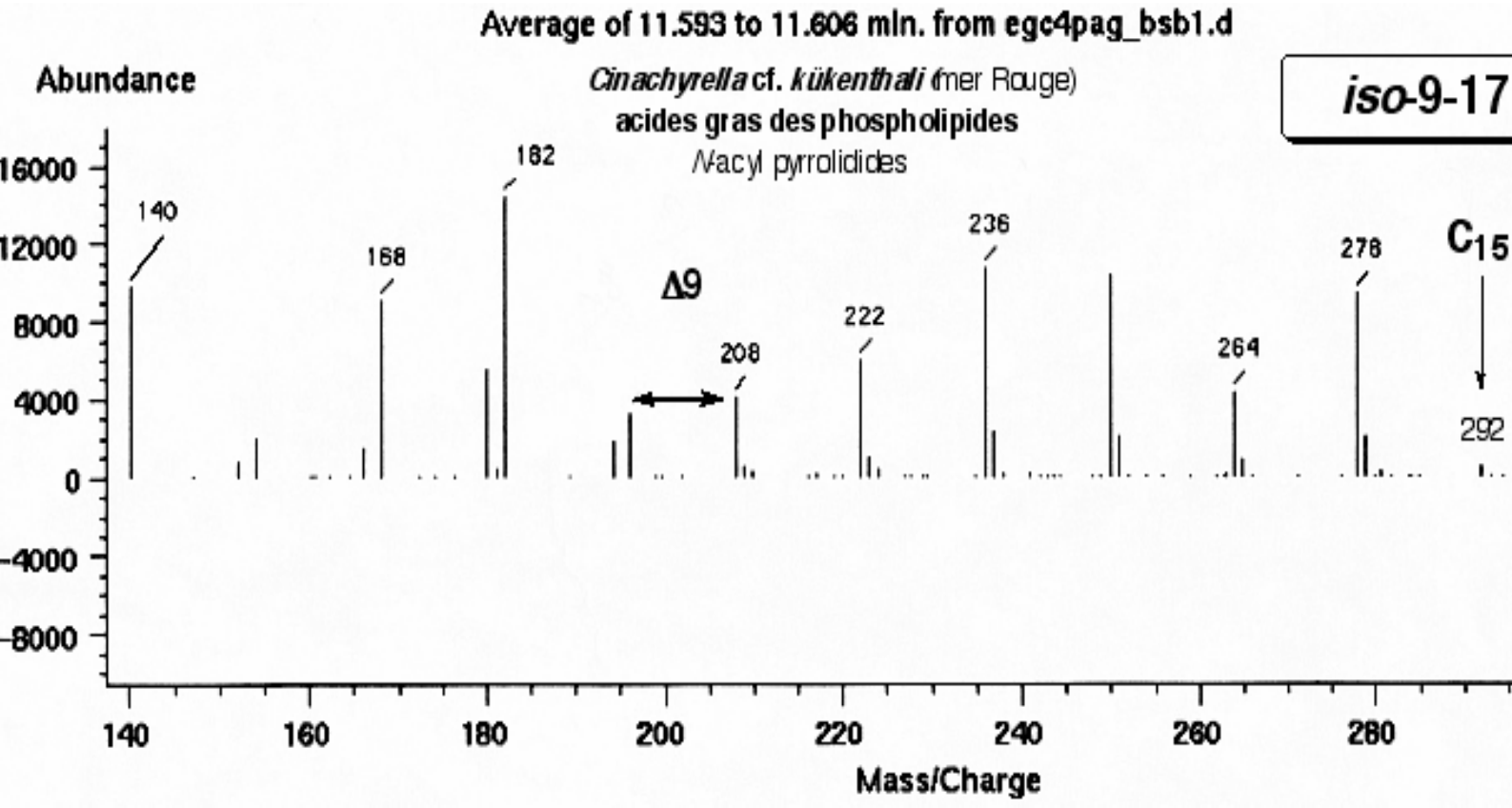
Cinachyrella* cf. *alloclada (mer Rouge)

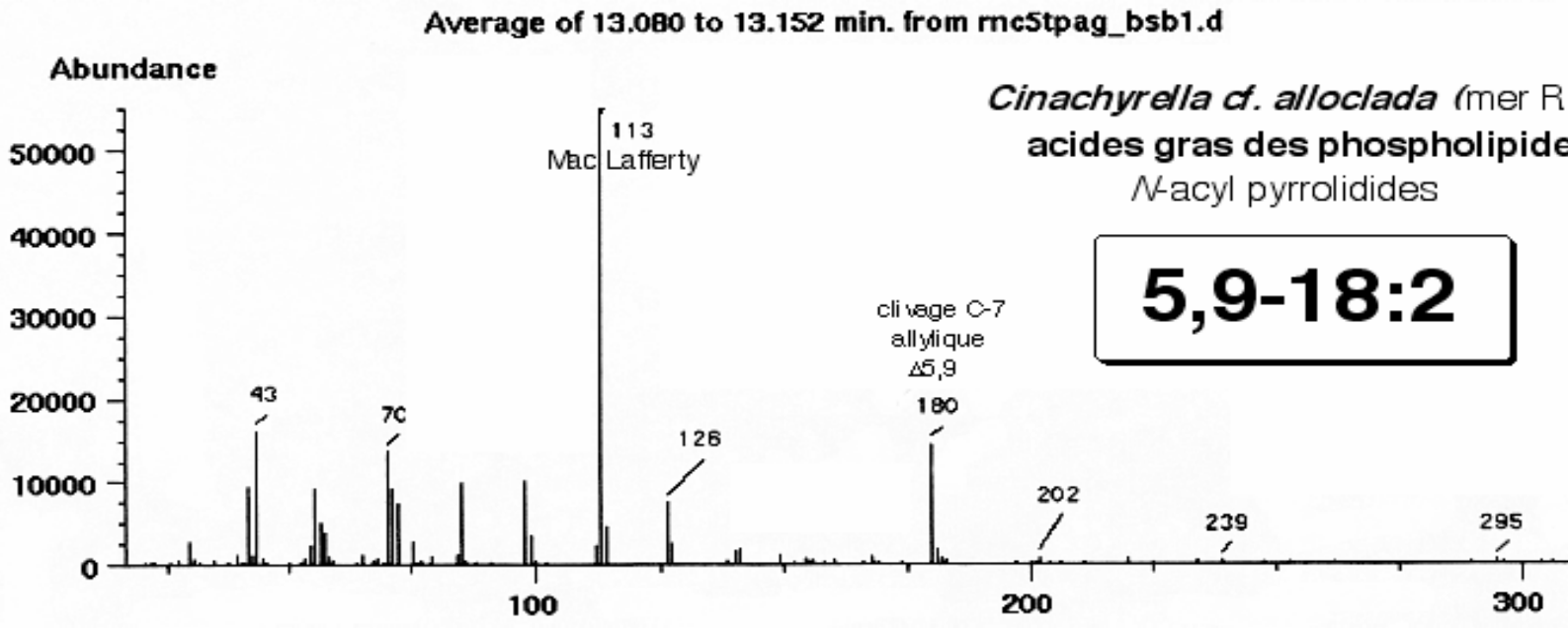
acides gras des phospholipides

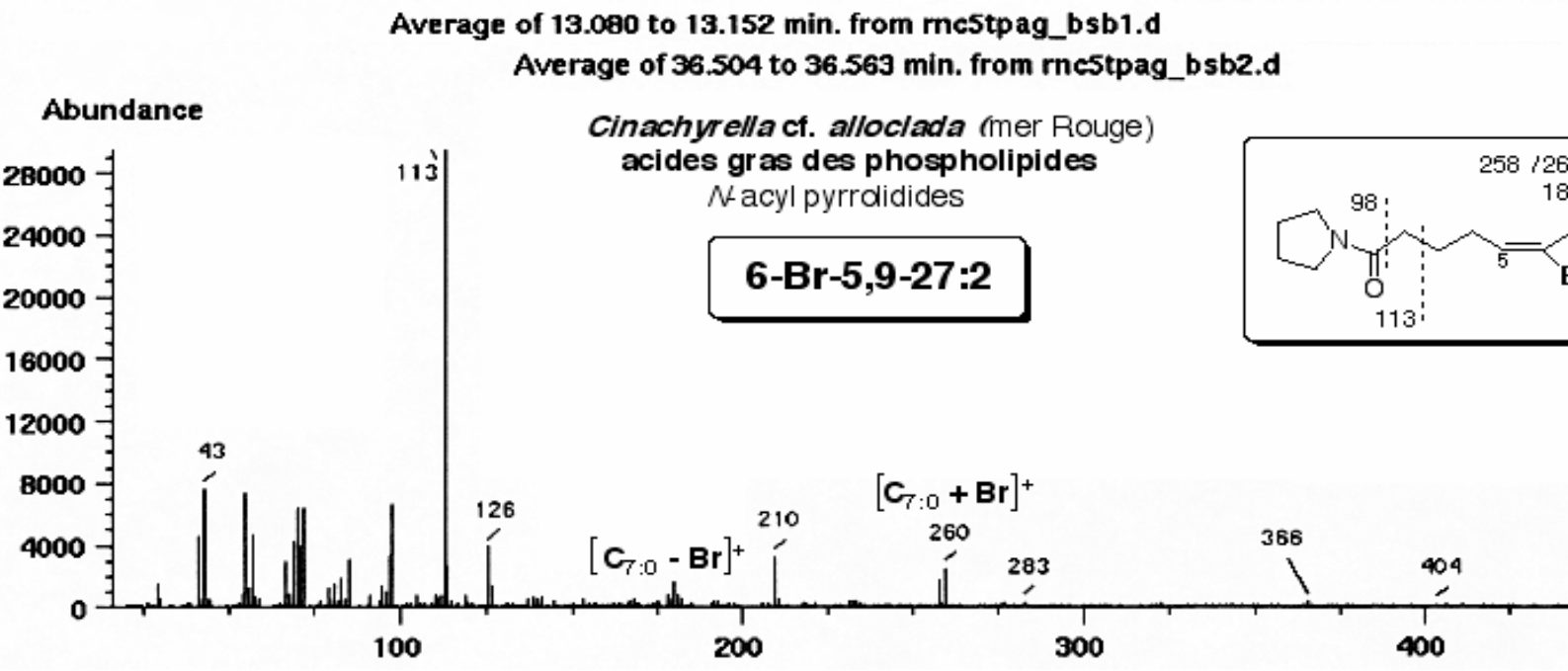
N-acyl pyrrolidides

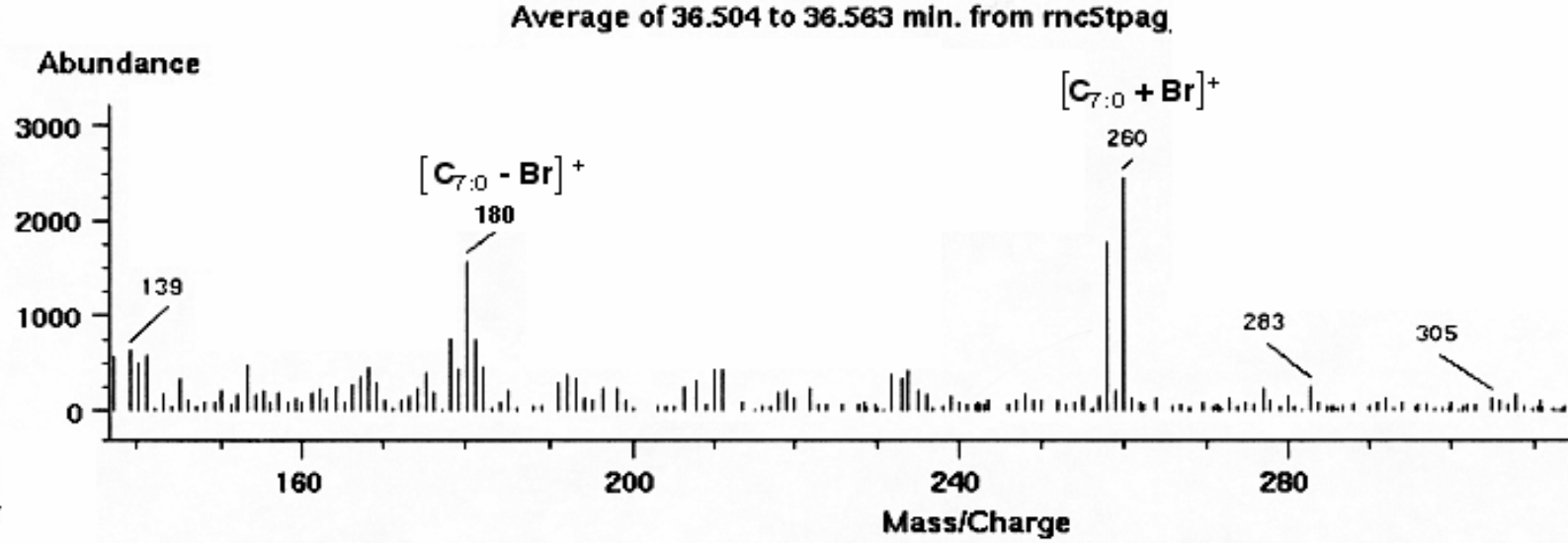
18,24-Me

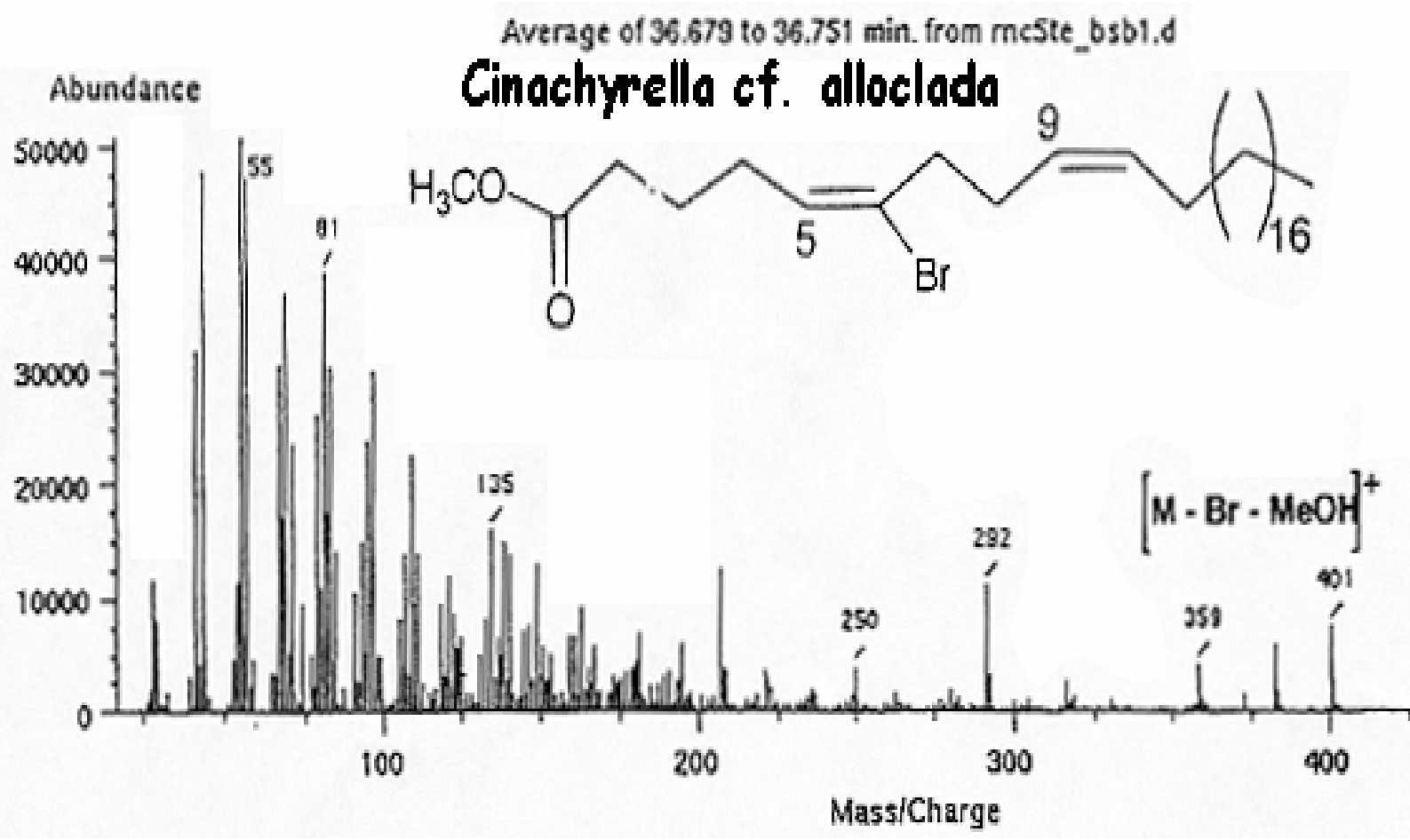


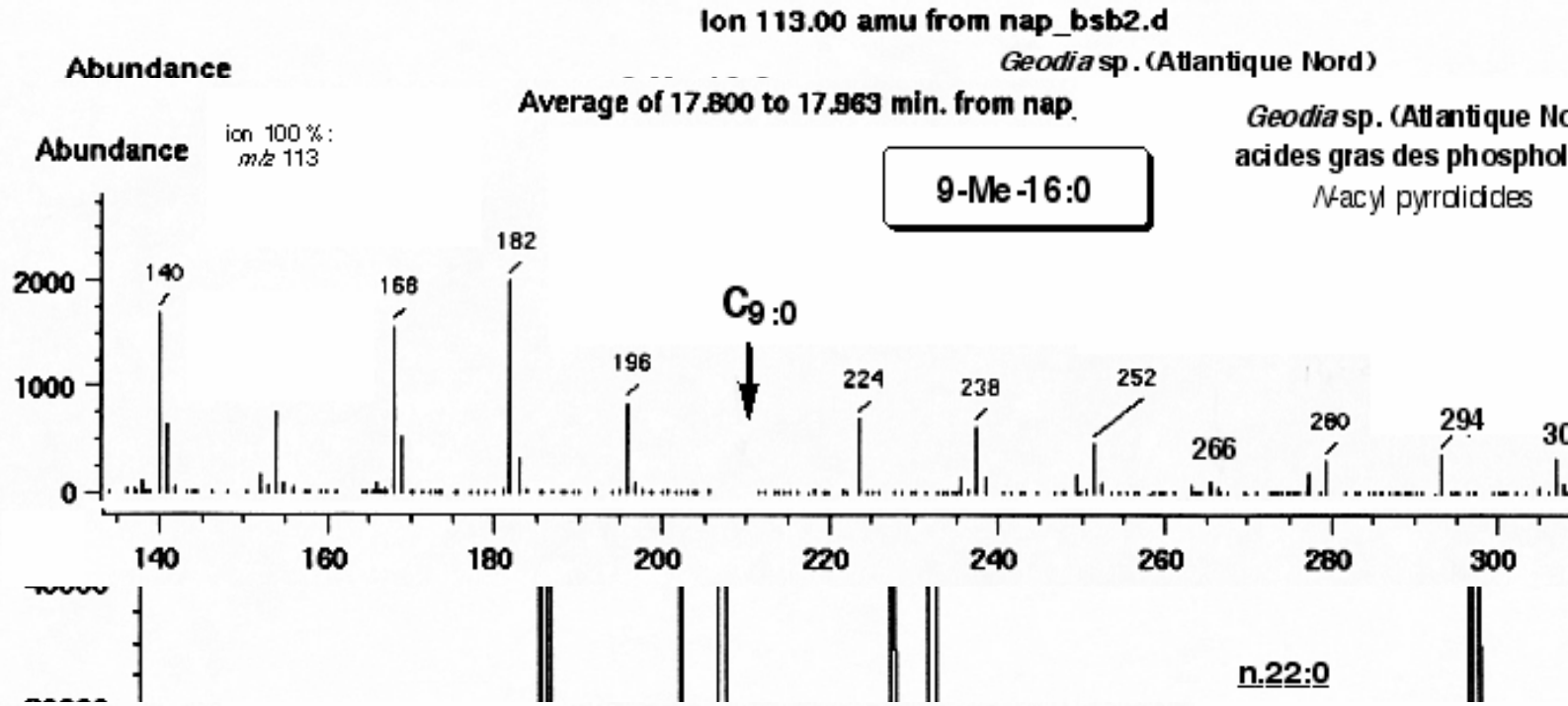

Average of 11.593 to 11.606 min. from egc4pag_bsb1.d
Abundance
Cinachyrella cf. kükenthali (mer Rouge)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
iso-9-17
16000
12000
8000
4000
0
-4000
-8000
140
168
182
Δ9
208
222
236
264
278
C15
292
140
160
180
200
220
240
260
280
Mass/Charge

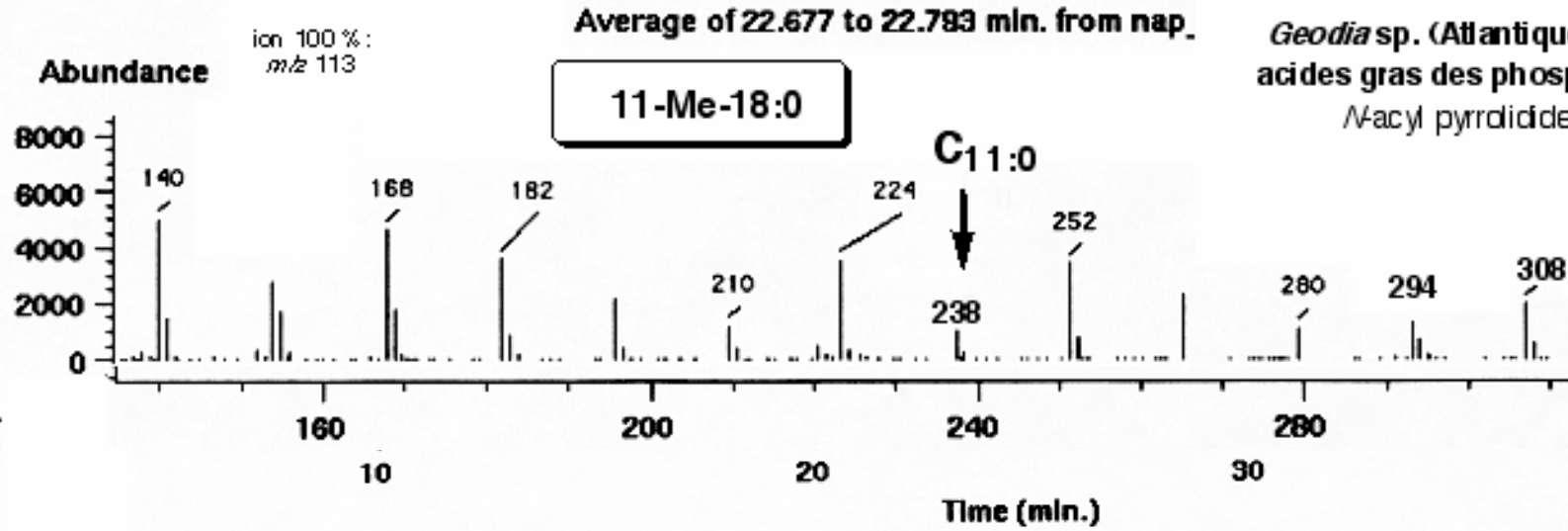

Average of 13.080 to 13.152 min. from rnc5tpag_bsb1.d
Abundance
Cinachyrella cf. alloclada (mer R
acides gras des phospholipide
N-acyl pyrrolidides
5,9-18:2
113
Mac Lafferty
clivage C-7
allylique
Δ5,9
180
43
70
126
202
239
295
50000
40000
30000
20000
10000
0
100
200
300

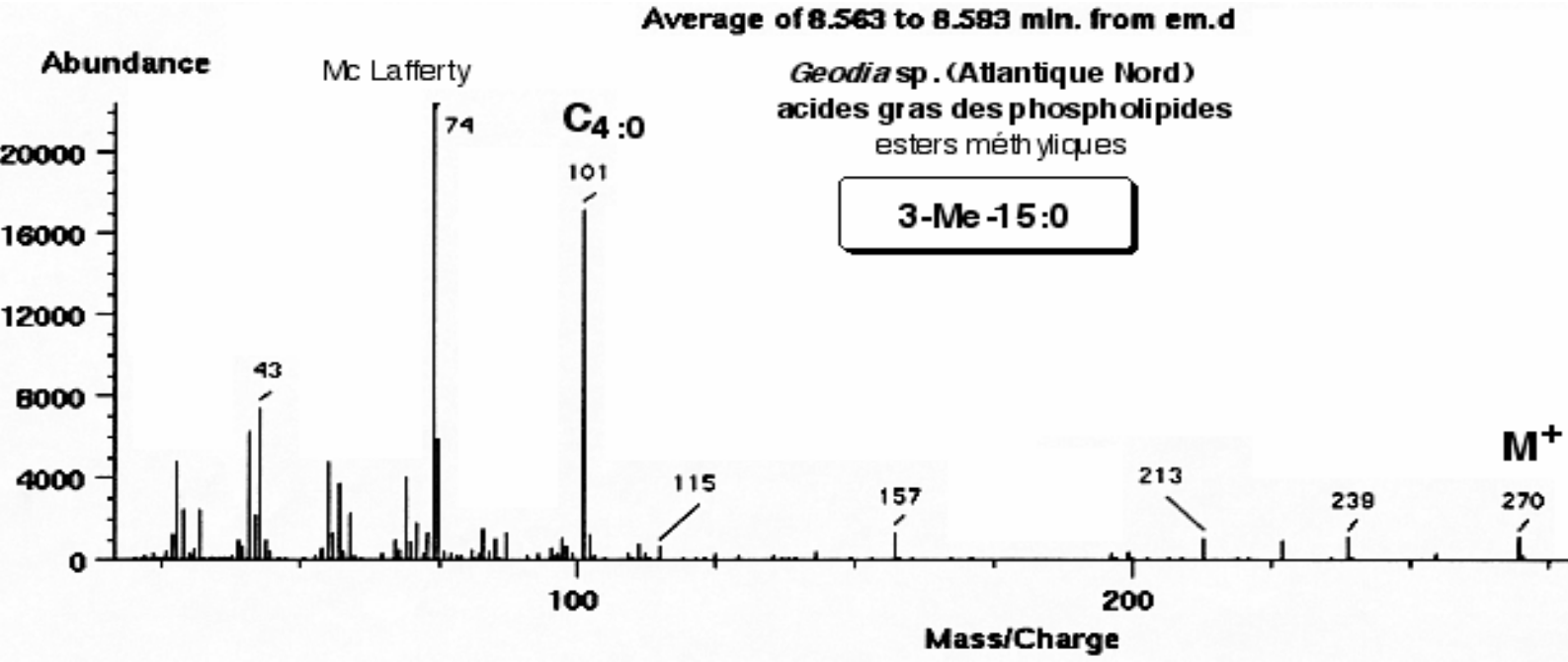

Average of 13.080 to 13.152 min. from rnc5tpag_bsb1.d
Average of 36.504 to 36.563 min. from rnc5tpag_bsb2.d
Abundance
Cinachyrella cf. alloclada (mer Rouge)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
6-Br-5,9-27:2
258 /26
18
98
113
5
113
43
126
210
[C7:0 - Br]+
[C7:0 + Br]+
260
283
366
404
28000
24000
20000
16000
12000
8000
4000
0
100
200
300
400

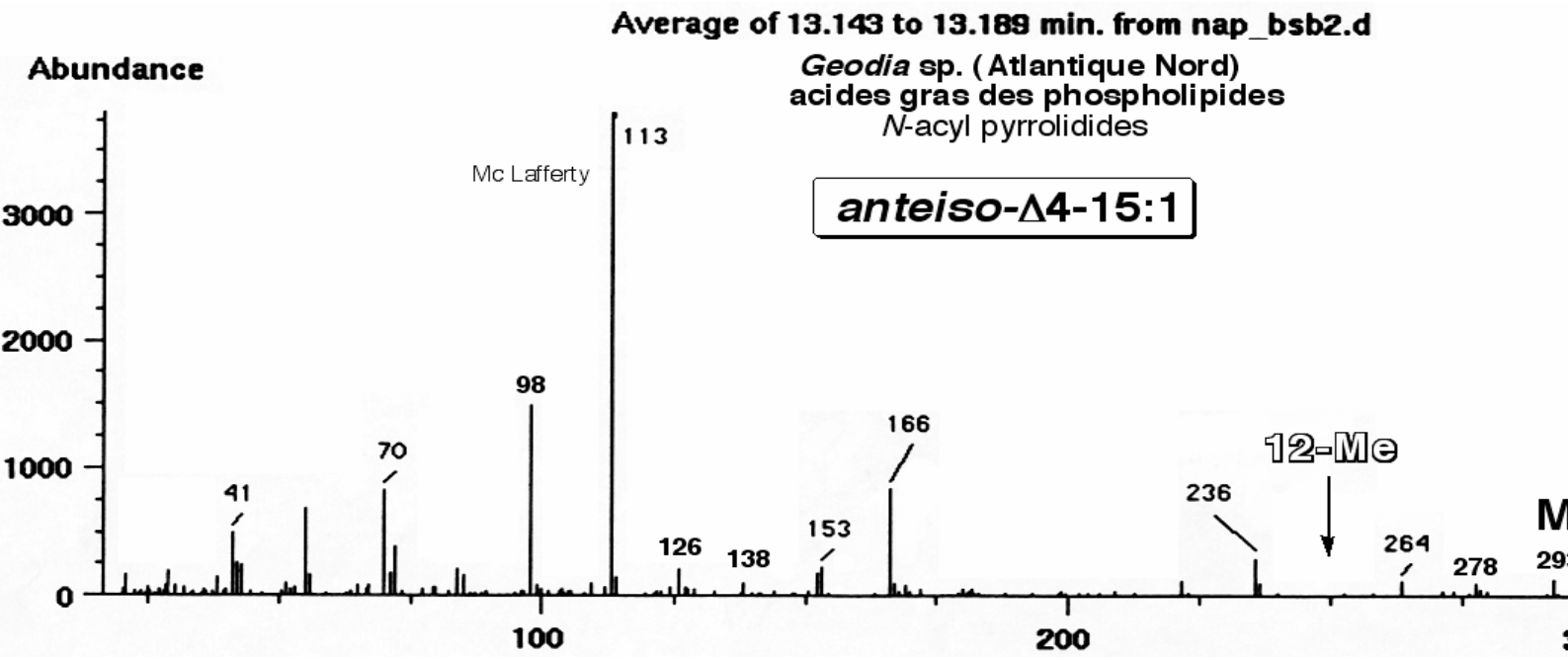

Average of 36.504 to 36.563 min. from rnc5tpag
Abundance
[C7:0 + Br]+
260
[C7:0 - Br]+
180
139
283
305
3000
2000
1000
0
160
200
240
280
Mass/Charge

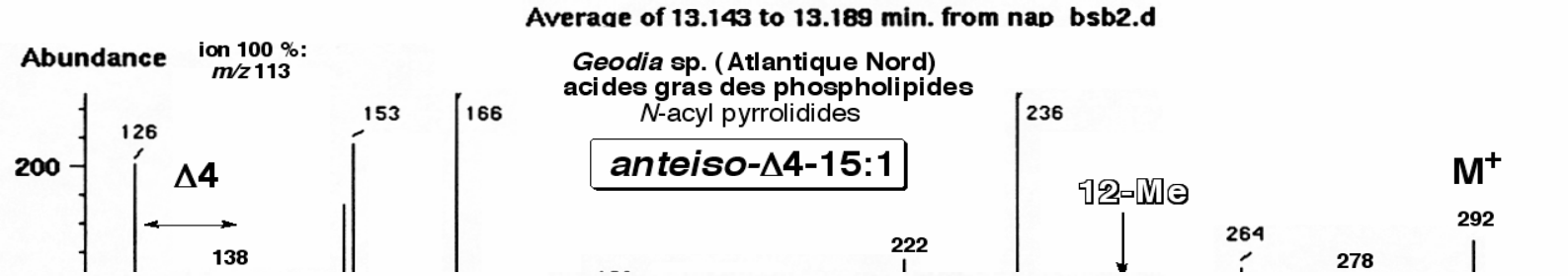

Average of 36.679 to 36.751 min. from mcSte_bsb1.d
Cinachyrella cf. alloclada
Abundance
50000
40000
30000
20000
10000
0
55
81
135
250
292
359
401
100
200
300
400
Mass/Charge
H3CO
O
5
Br
9
16
[M - Br - MeOH]+

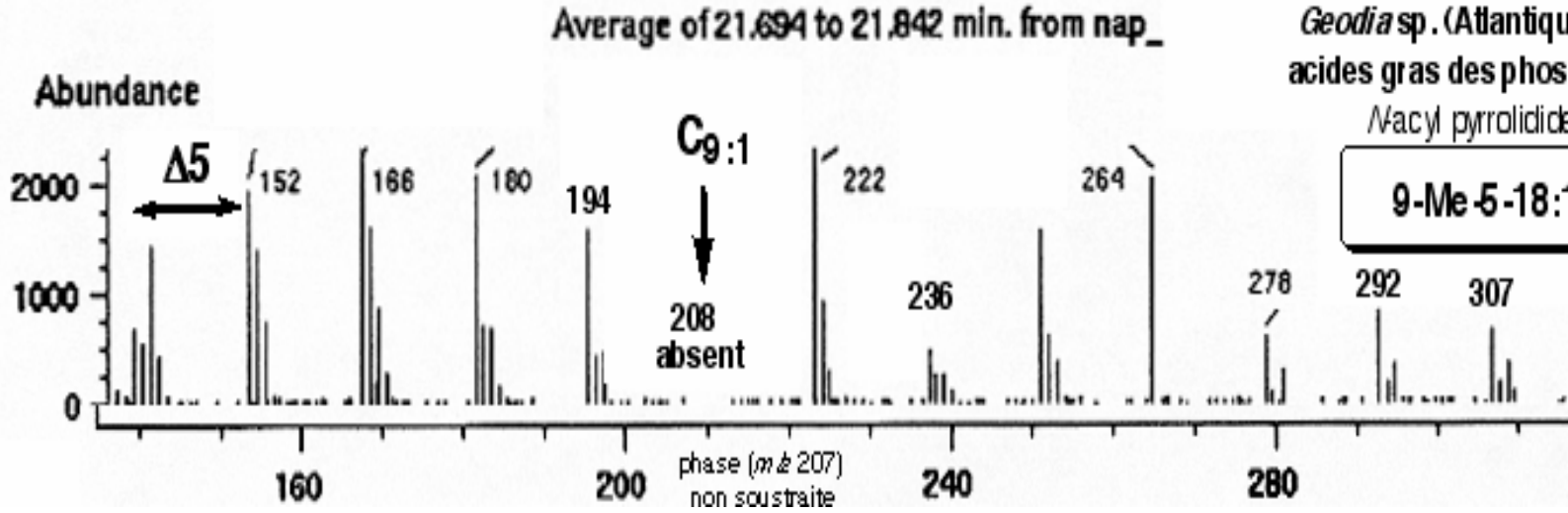

Ion 113.00 amu from nap_bsb2.d
Abundance
Geodia sp. (Atlantique Nord)
Average of 17.800 to 17.963 min. from nap
Abundance
ion 100 % : m/z 113
9-Me-16:0
Geodia sp. (Atlantique No
acides gras des phospho
N-acyl pyrrolidides
140
168
182
196
C9 :0
224
238
252
266
280
294
2000
1000
0
140
160
180
200
220
240
260
280
300
n.22:0

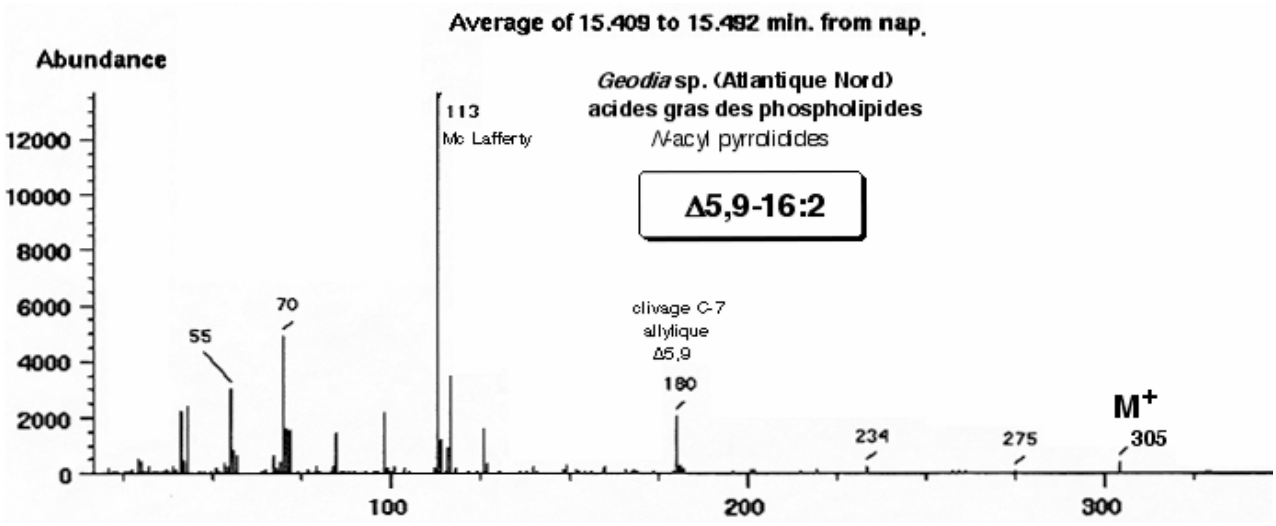

Average of 22.677 to 22.793 min. from nap
ion 100 % : m/z 113
Abundance
11-Me-18:0
Geodia sp. (Atlantiqu
acides gras des phosp
N-acyl pyrrolidide
140
168
182
210
224
C11 :0
238
252
280
294
308
8000
6000
4000
2000
0
160
200
240
280
10
20
30
Time (min.)

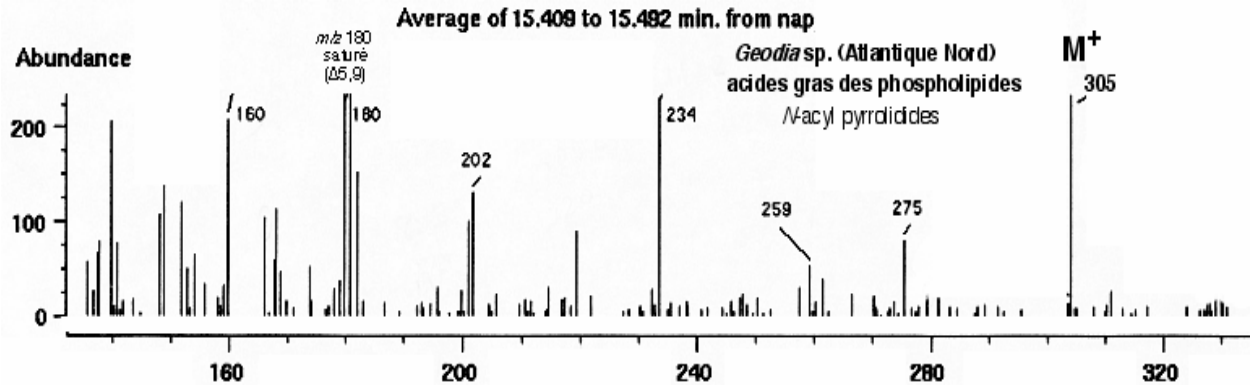

Average of 8.563 to 8.583 min. from em.d
Abundance
Mc Lafferty
Geodia sp. (Atlantique Nord)
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
3-Me-15:0
74
C4 :0
101
43
115
157
213
239
270
M+
20000
16000
12000
8000
4000
0
100
200
Mass/Charge

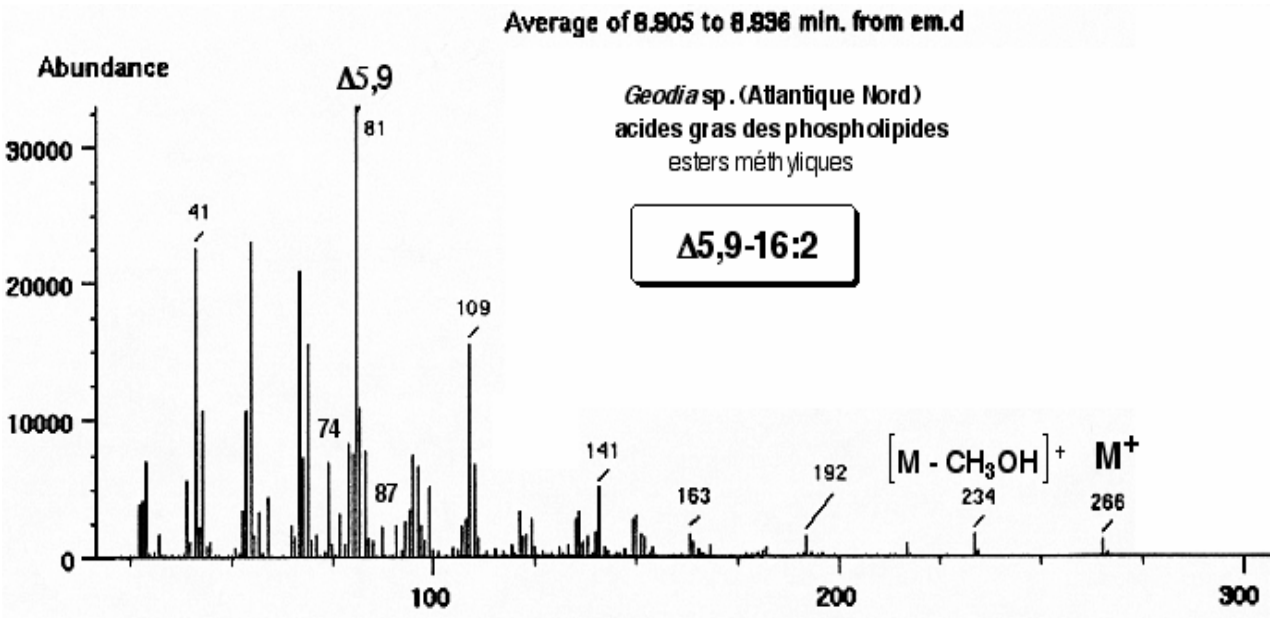

Average of 13.143 to 13.189 min. from nap_bsb2.d
Abundance
Geodia sp. (Atlantique Nord)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
Mc Lafferty
***anteiso*-Δ4-15:1**
12-Me
3000
2000
1000
0
113
98
166
70
41
126
138
153
236
264
278
100
200

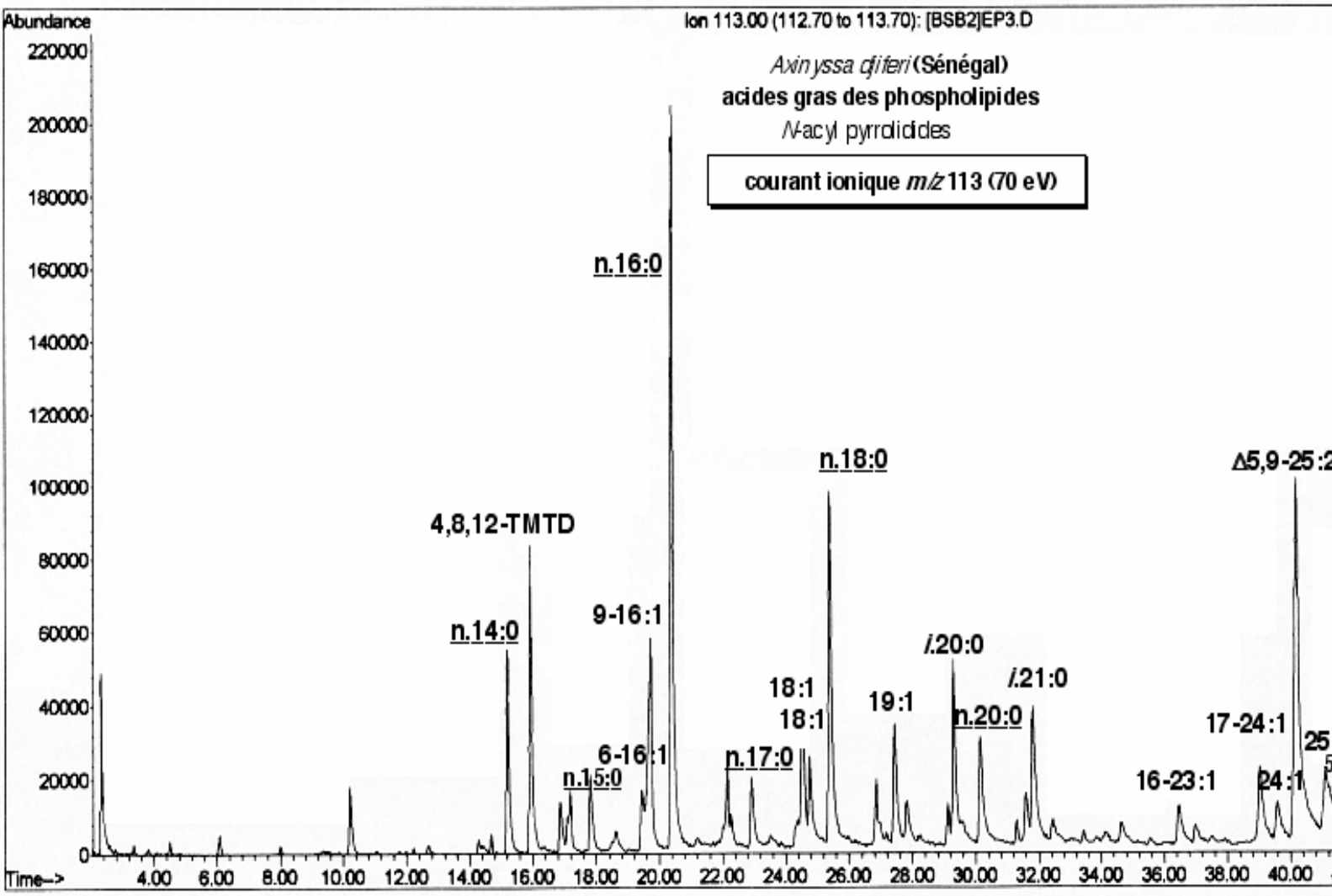

Average of 13.143 to 13.189 min. from nap_bsb2.d
Abundance
ion 100 %:
m/z 113
Geodia sp. (Atlantique Nord)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
***anteiso*-Δ4-15:1**
Δ4
12-Me
M+
200
126
153
166
138
222
236
264
278
292

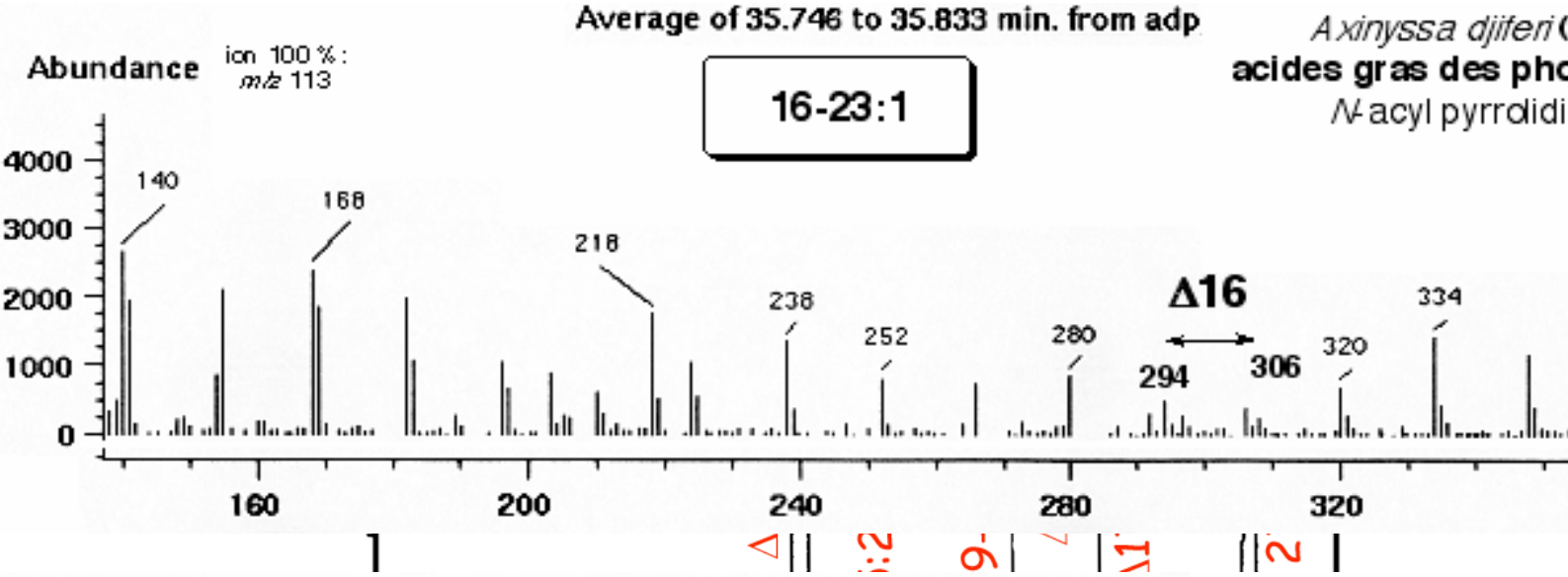

Average of 21.694 to 21.842 min. from nap_
Geodia sp. (Atlantiqu
acides gras des phos
N-acyl pyrrolidid
9-Me-5-18:
Abundance
Δ5
C_{9}:1
208
absent
2000
1000
0
152
166
180
194
222
236
264
278
292
307
160
200
240
280
phase (*m/z* 207)
non soustraite


Average of 15.409 to 15.492 min. from nap
Abundance
Geodia sp. (Atlantique Nord)
acides gras des phospholipides
/V-acyl pyrrolidides
113
Mc Lafferty
Δ5,9-16:2
70
55
clivage C-7
allylique
Δ5,9
180
234
275
M+
305
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
100
200
300

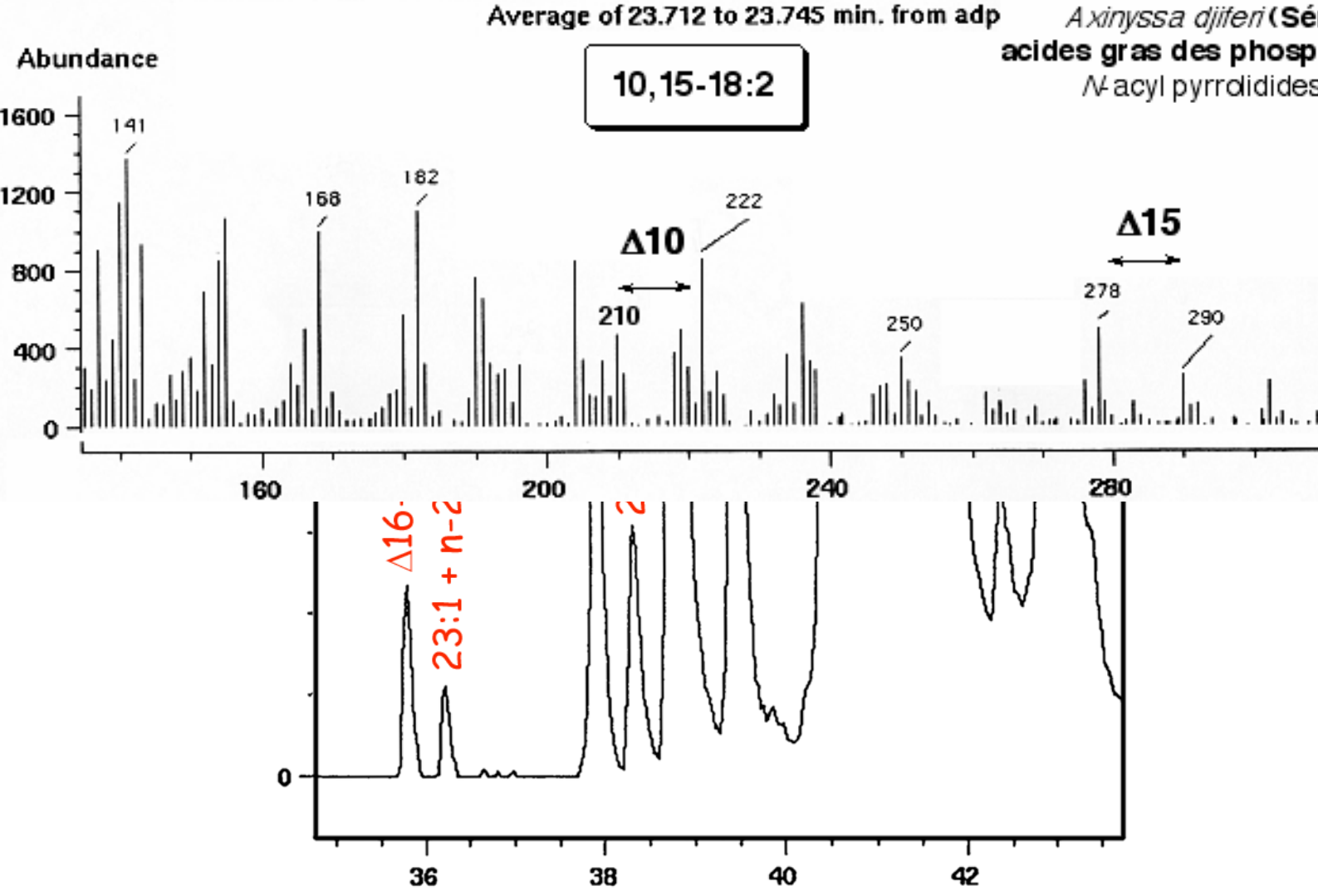

Average of 15.409 to 15.492 min. from nap
Abundance
m/z 180
saturé
(Δ5,9)
160
180
202
234
259
275
M+
305
Geodia sp. (Atlantique Nord)
acides gras des phospholipides
/V-acyl pyrrolidides
200
100
0
160
200
240
280
320


Average of 8.905 to 8.936 min. from em.d
Abundance
Δ5,9
81
30000
20000
10000
0
41
109
74
87
141
163
192
[M - CH3OH]+
234
M+
266
100
200
300
Geodia sp. (Atlantique Nord)
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
Δ5,9-16:2

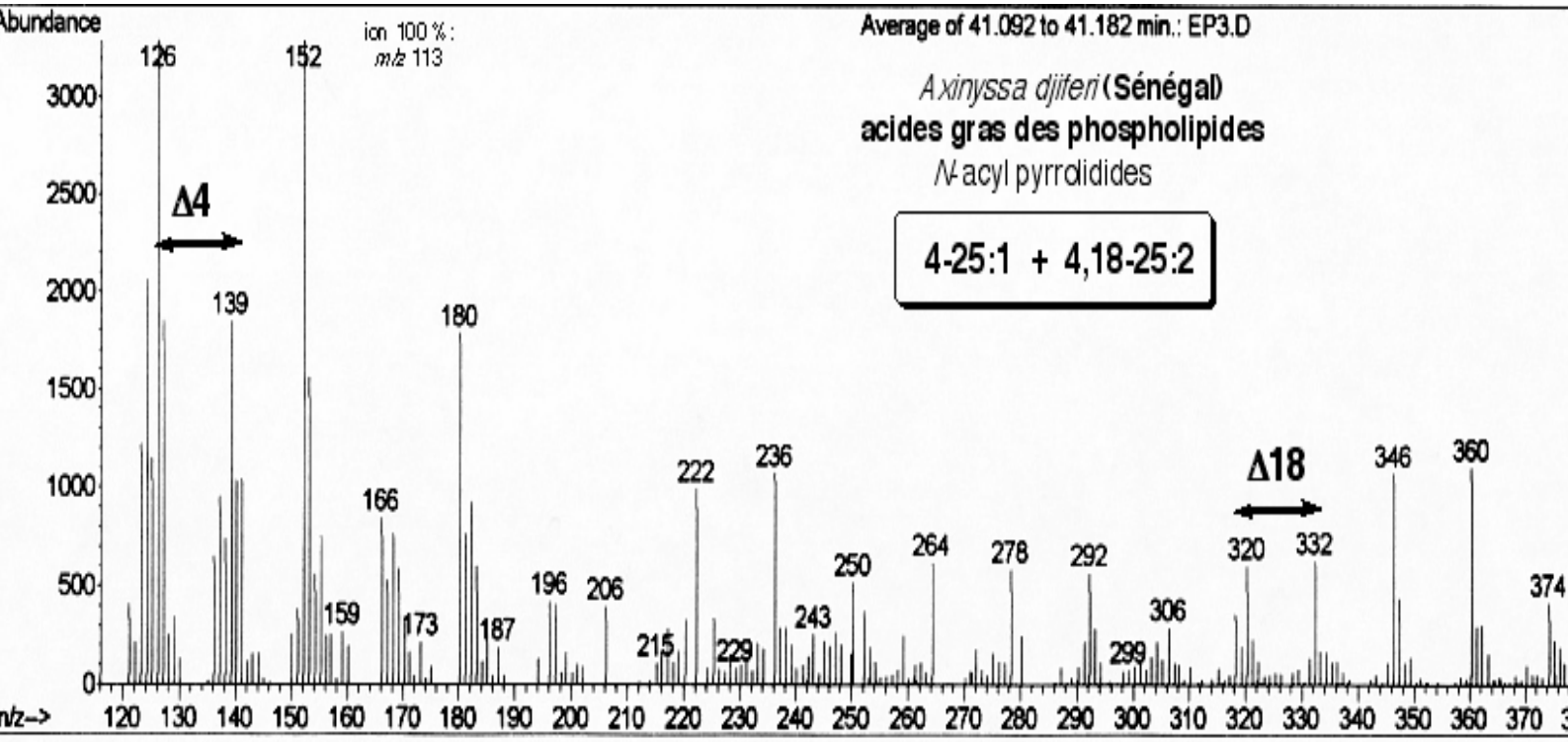

Abundance
Ion 113.00 (112.70 to 113.70): [BSB2]EP3.D
Axinyssa djiferi (Sénégal)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
courant ionique m/z 113 (70 eV)
n.16:0
n.18:0
4,8,12-TMTD
n.14:0
9-16:1
i.20:0
i.21:0
18:1
18:1
19:1
n.20:0
6-16:1
n.17:0
n.15:0
17-24:1
16-23:1
24:1
Δ5,9-25:2
Time-->



Axinyssa djiferi (
acides gras des pho
N-acyl pyrrolidi

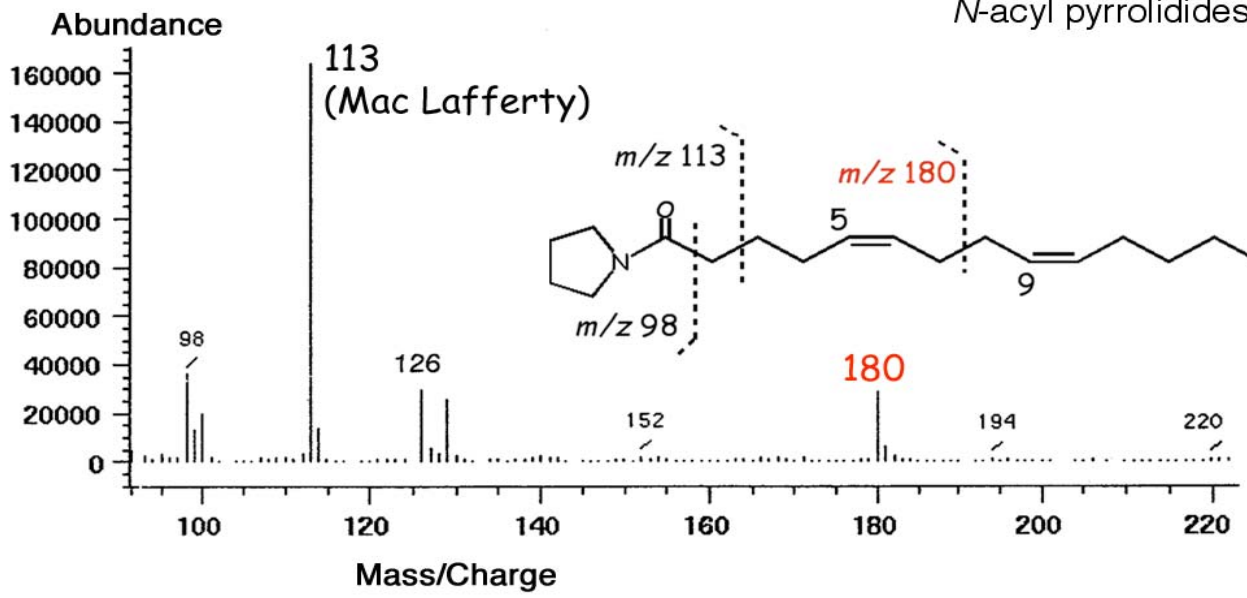


Axinyssa djiferi (Sé
acides gras des phosp
N-acyl pyrrolidides

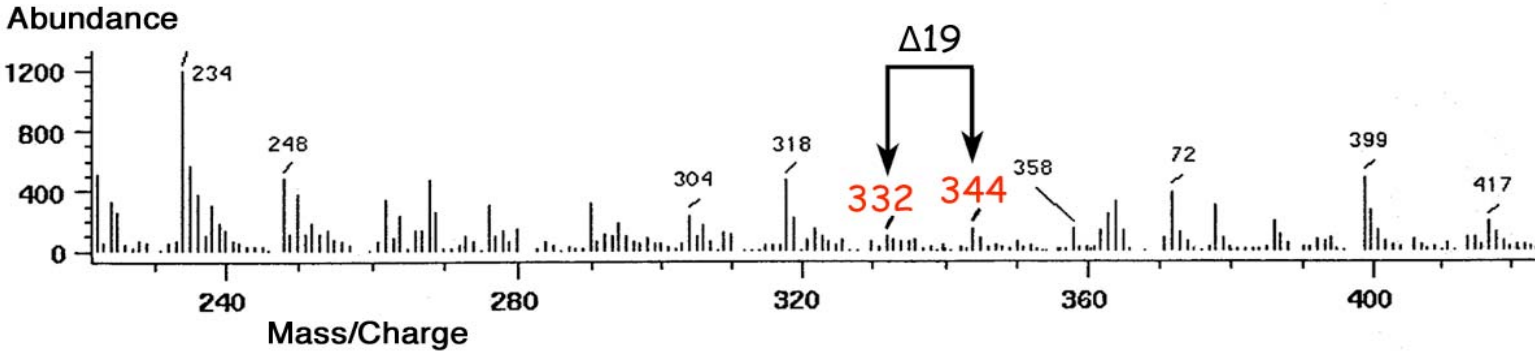

Abundance
ion 100 % :
m/z 113
Average of 41.092 to 41.182 min.: EP3.D
Axinyssa djiferi (Sénégal)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
4-25:1 + 4,18-25:2
Δ4
Δ18
126
152
139
180
166
222
236
159
173
187
196
206
215
229
243
250
264
278
292
299
306
320
332
346
360
374
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
m/z-->
120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370

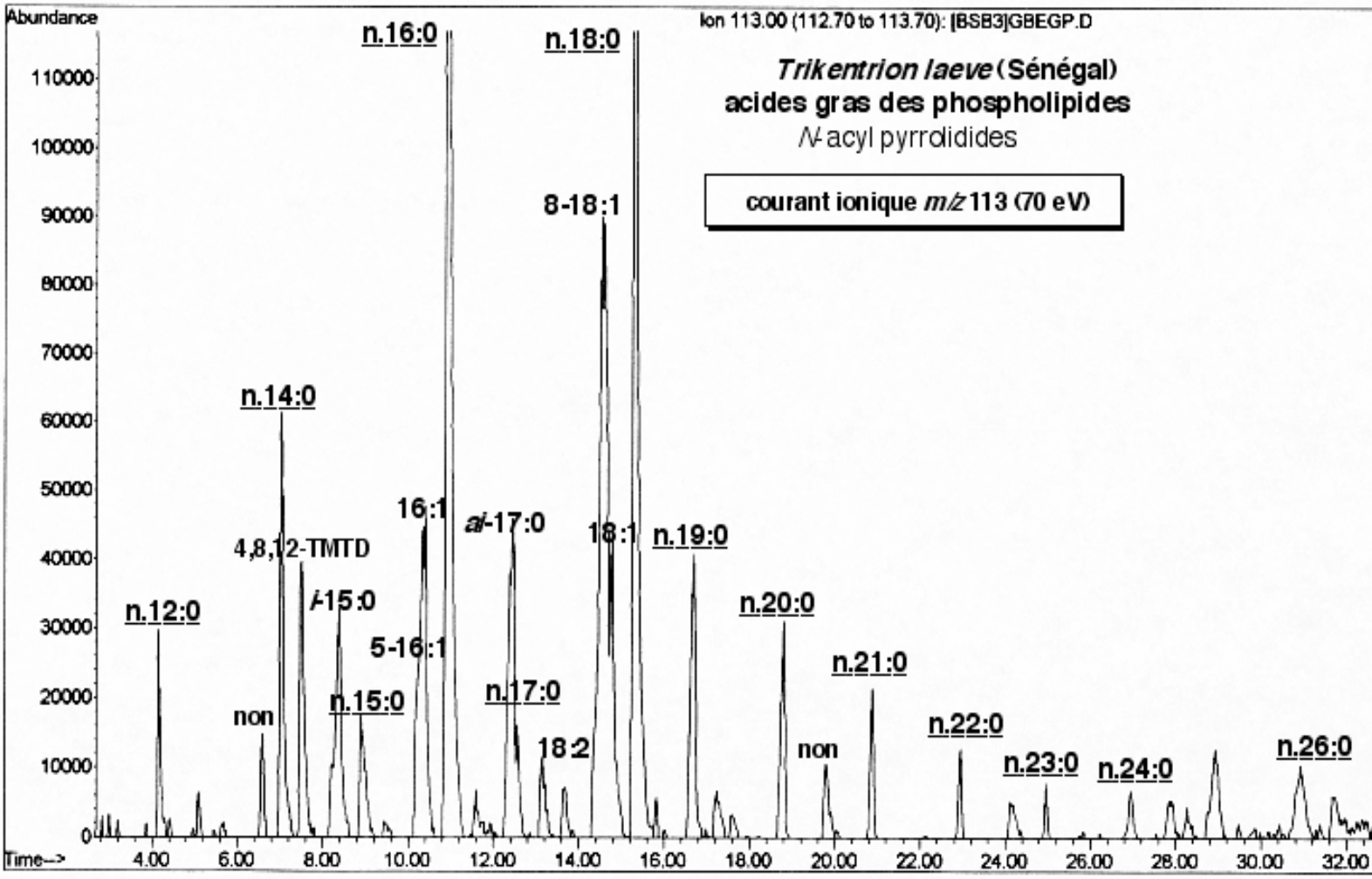
Average of 40.401 to 40.516 min.

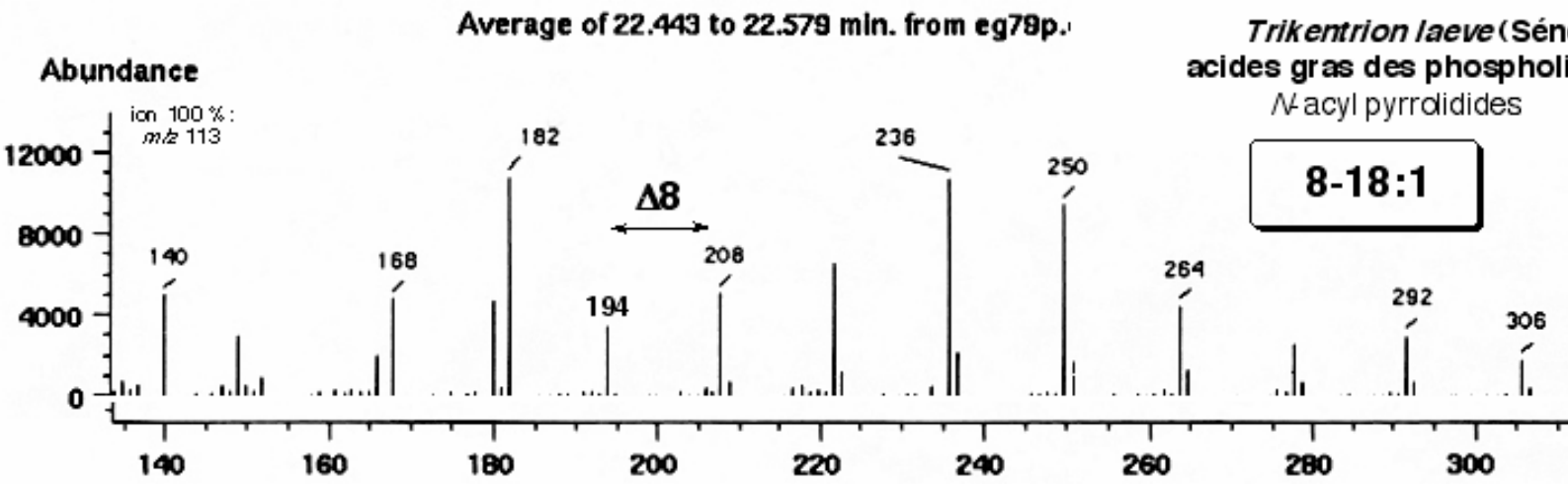
Axinyssa djiferi **(Sénégal)**
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides

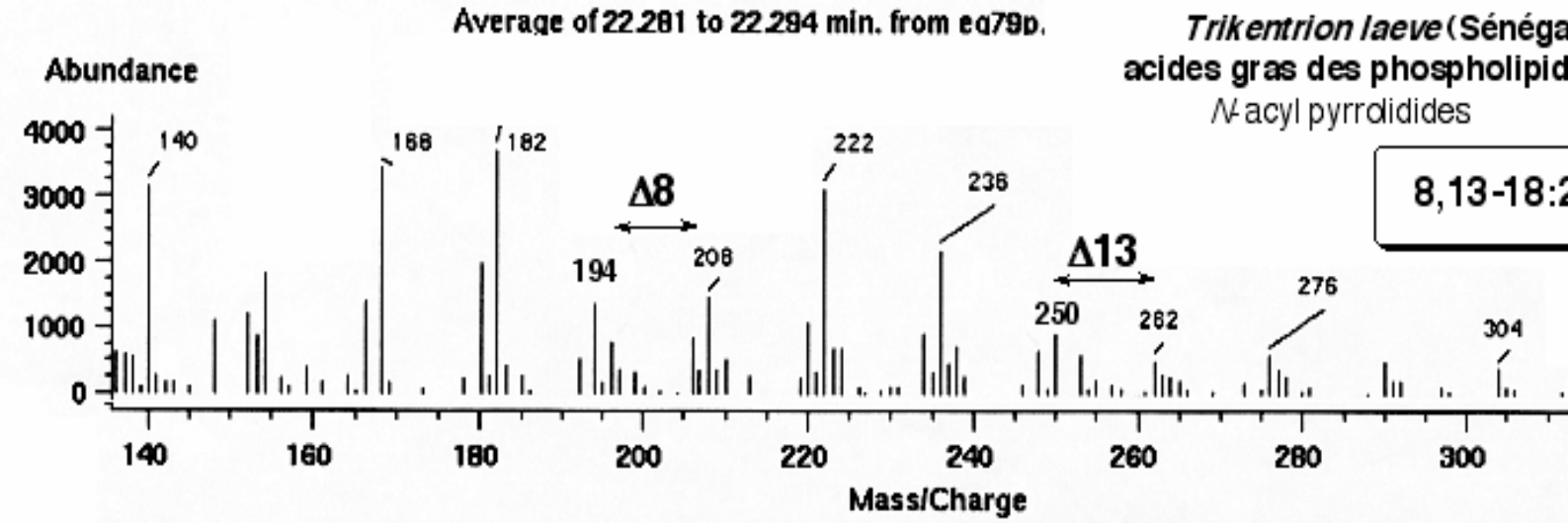


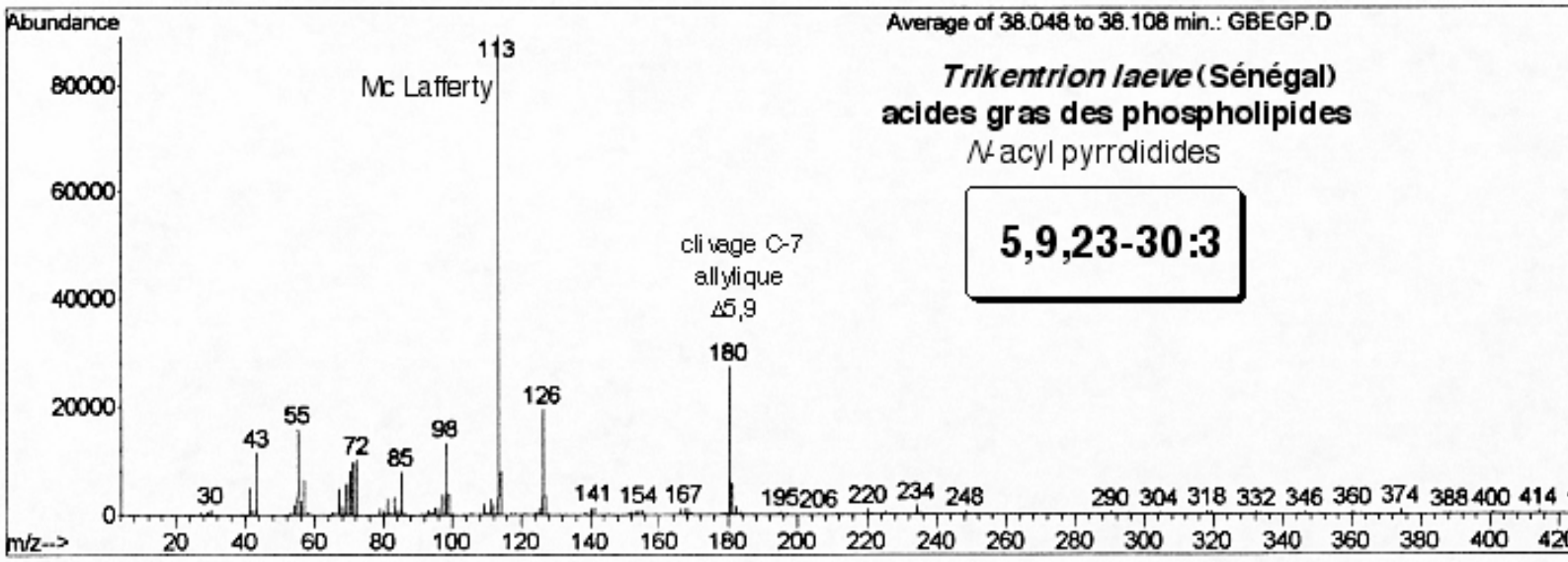
Δ5,9,19-

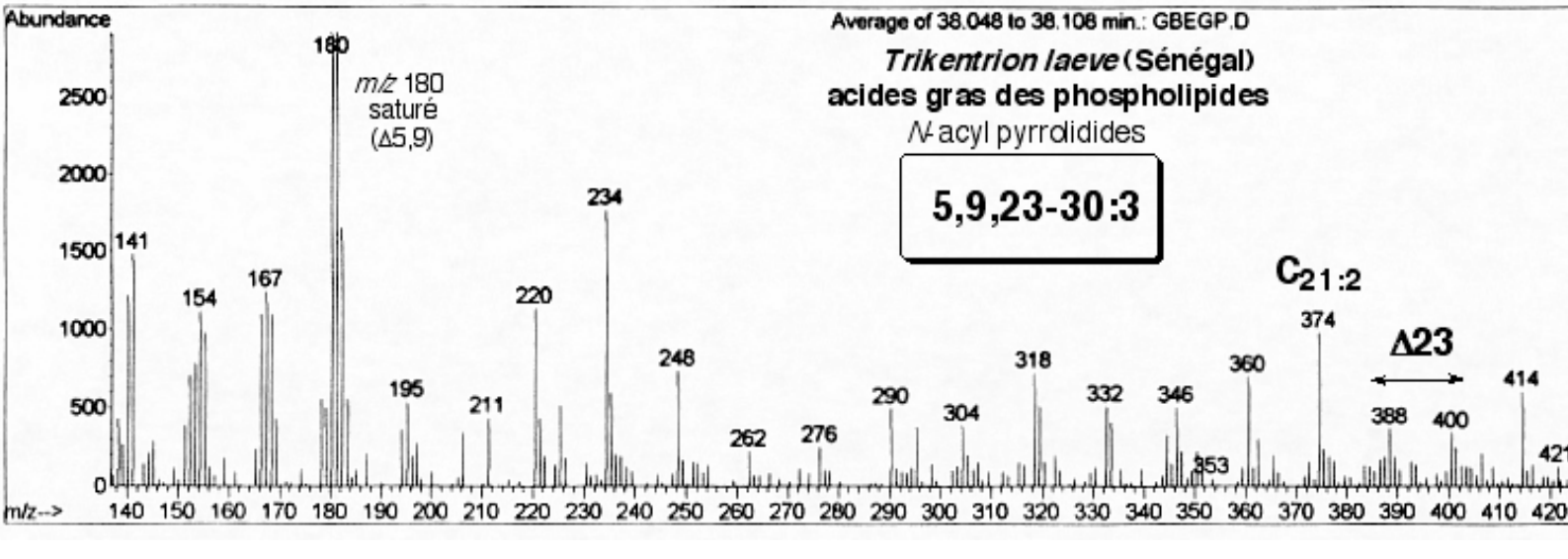


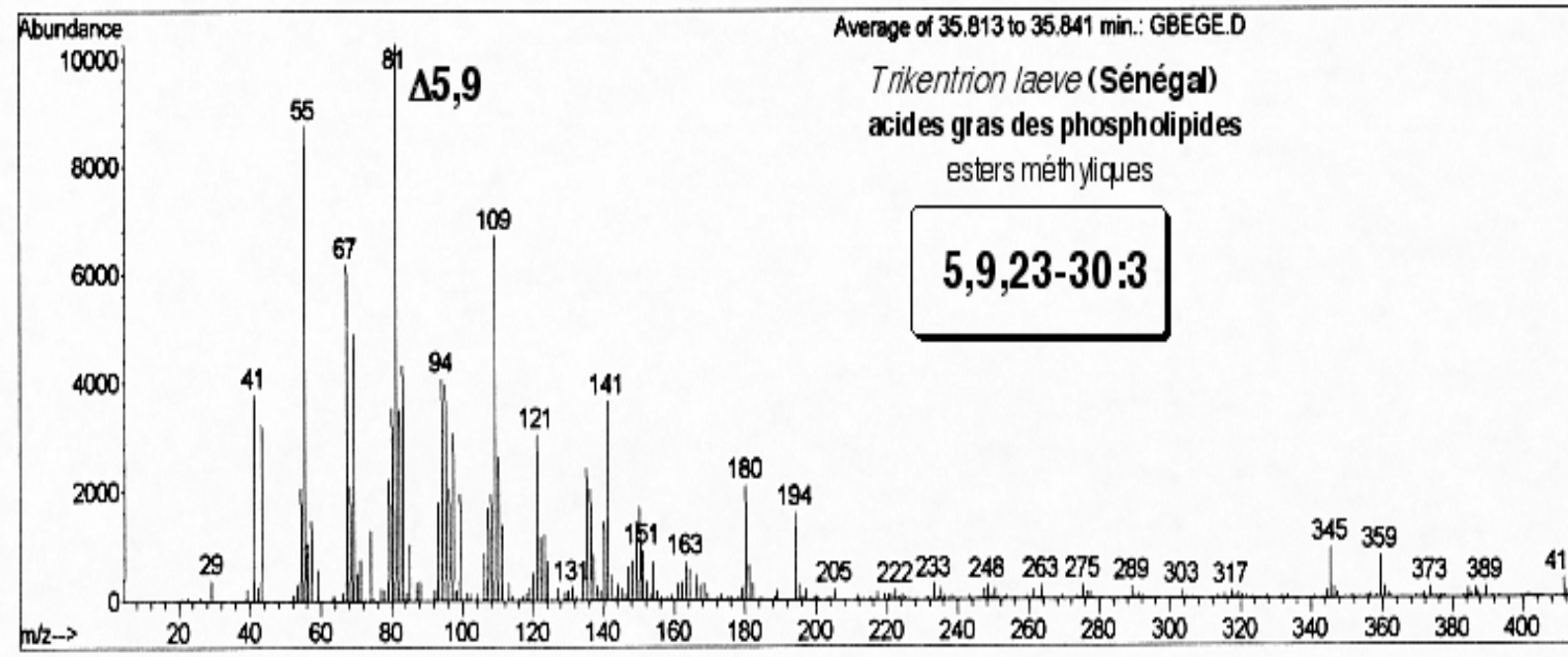

Abundance
Ion 113.00 (112.70 to 113.70): [BSB3]GBEGP.D
Trikentrion laeve (Sénégal)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
courant ionique m/z 113 (70 eV)
n.16:0
n.18:0
8-18:1
n.14:0
16:1
ai-17:0
18:1
n.19:0
4,8,12-TMTD
i-15:0
n.12:0
n.20:0
5-16:1
n.21:0
n.17:0
n.15:0
non
18:2
n.22:0
non
n.23:0
n.24:0
n.26:0
Time-->

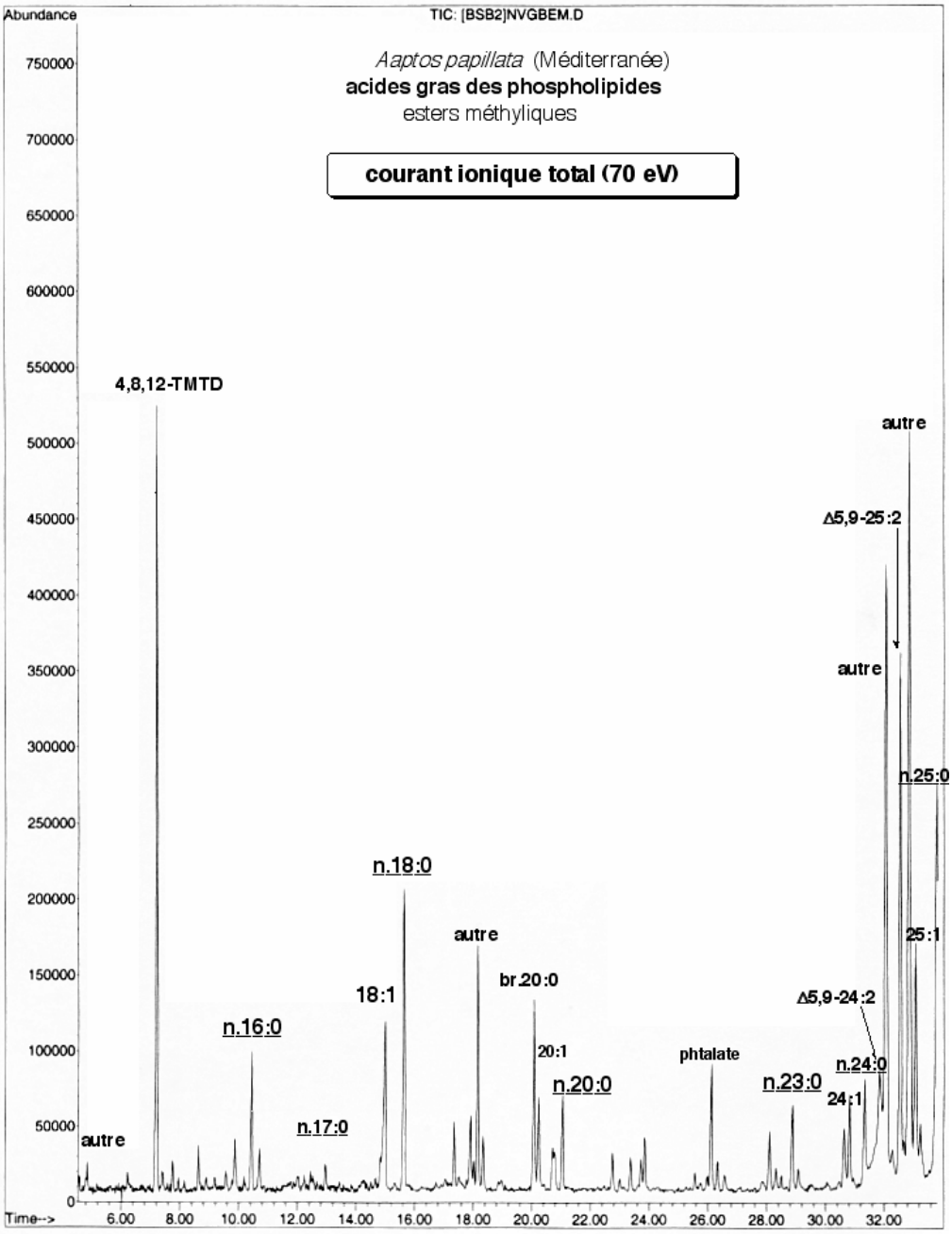

Average of 22.443 to 22.579 min. from eg79p.
Trikentrion laeve (Sén
acides gras des phospholi
N-acyl pyrrolidides
Abundance
ion 100 % : m/z 113
8-18:1
Δ8
140
168
182
194
208
236
250
264
292
306
12000
8000
4000
0
140
160
180
200
220
240
260
280
300

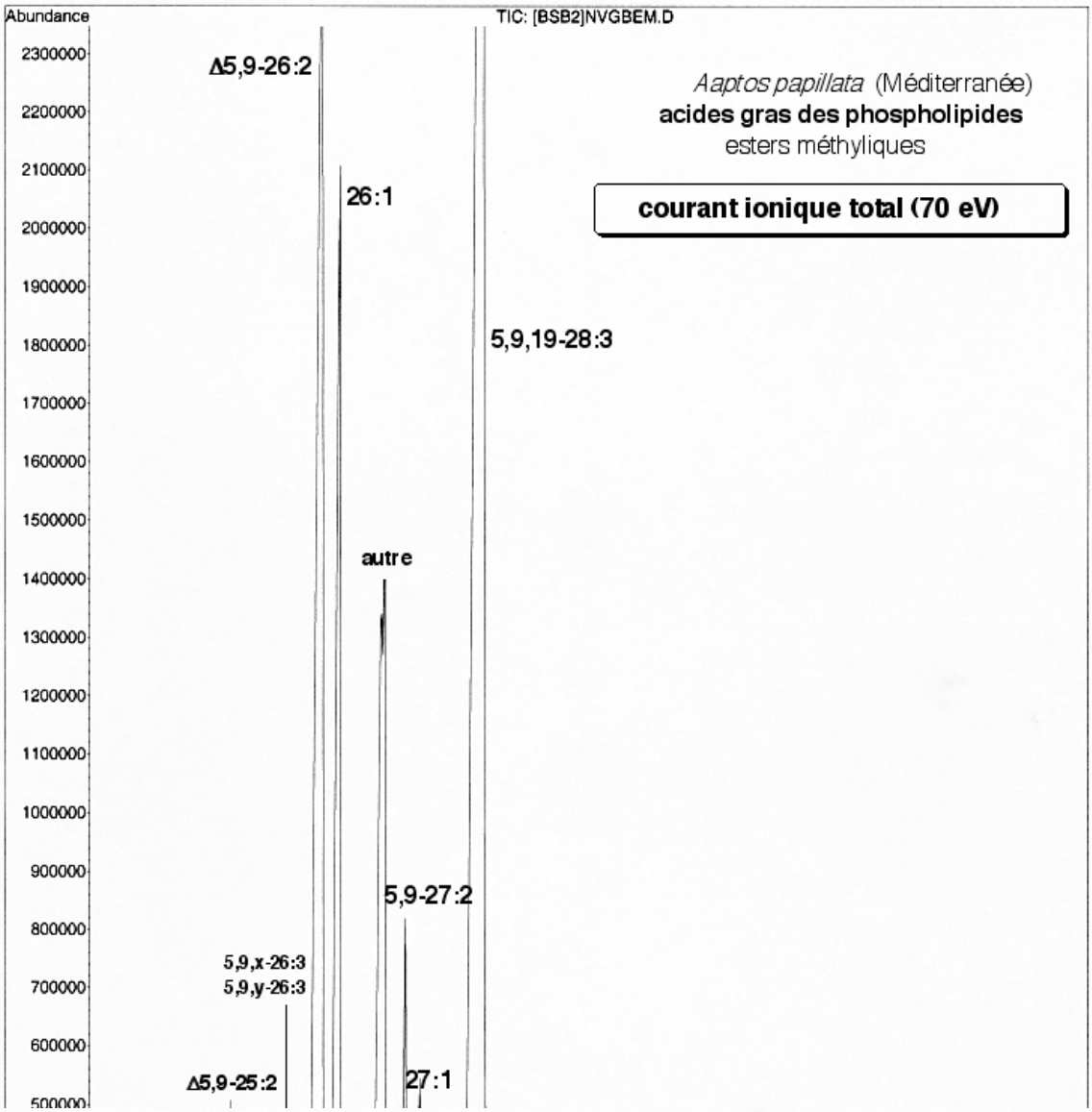

Average of 22.281 to 22.294 min. from eg79p.
Trikentrion laeve (Sénéga
acides gras des phospholipid
N-acyl pyrrolidides
Abundance
8,13-18:2
Δ8
Δ13
140
168
182
194
208
222
236
250
262
276
304
4000
3000
2000
1000
0
140
160
180
200
220
240
260
280
300
Mass/Charge

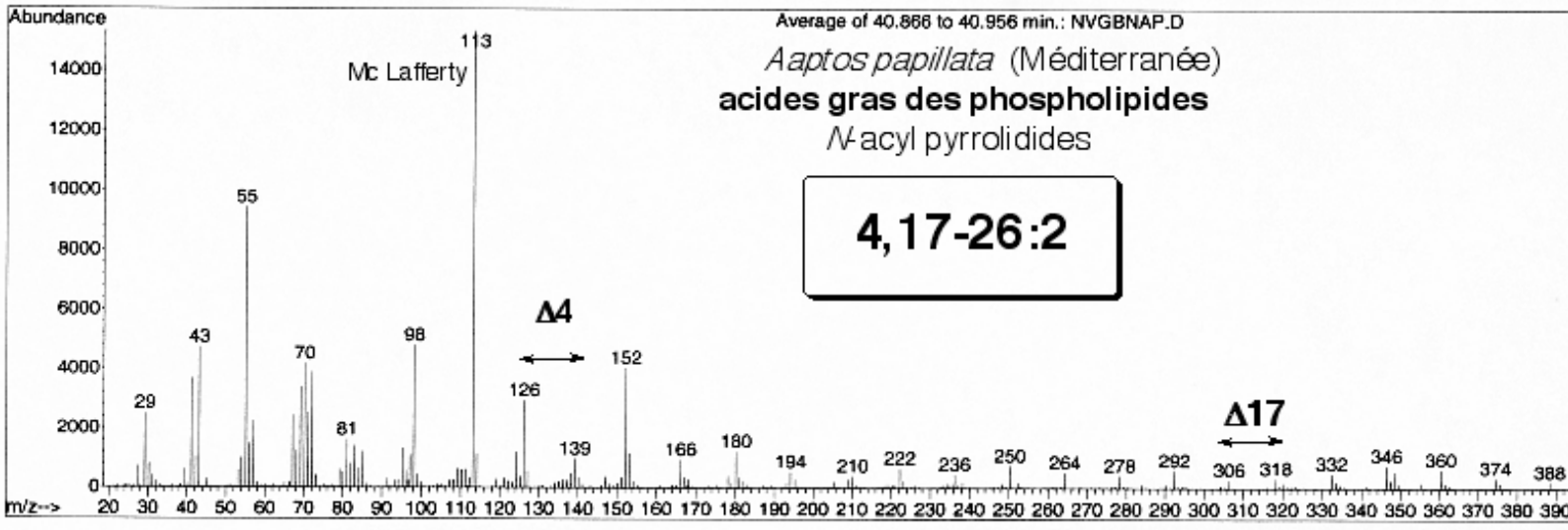

Abundance
Average of 38.048 to 38.108 min.: GBEGP.D
Mc Lafferty
113
180
126
98
55
43
72
85
30
clivage C-7
allylique
Δ5,9
Trikentrion laeve (Sénégal)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
5,9,23-30:3
m/z-->

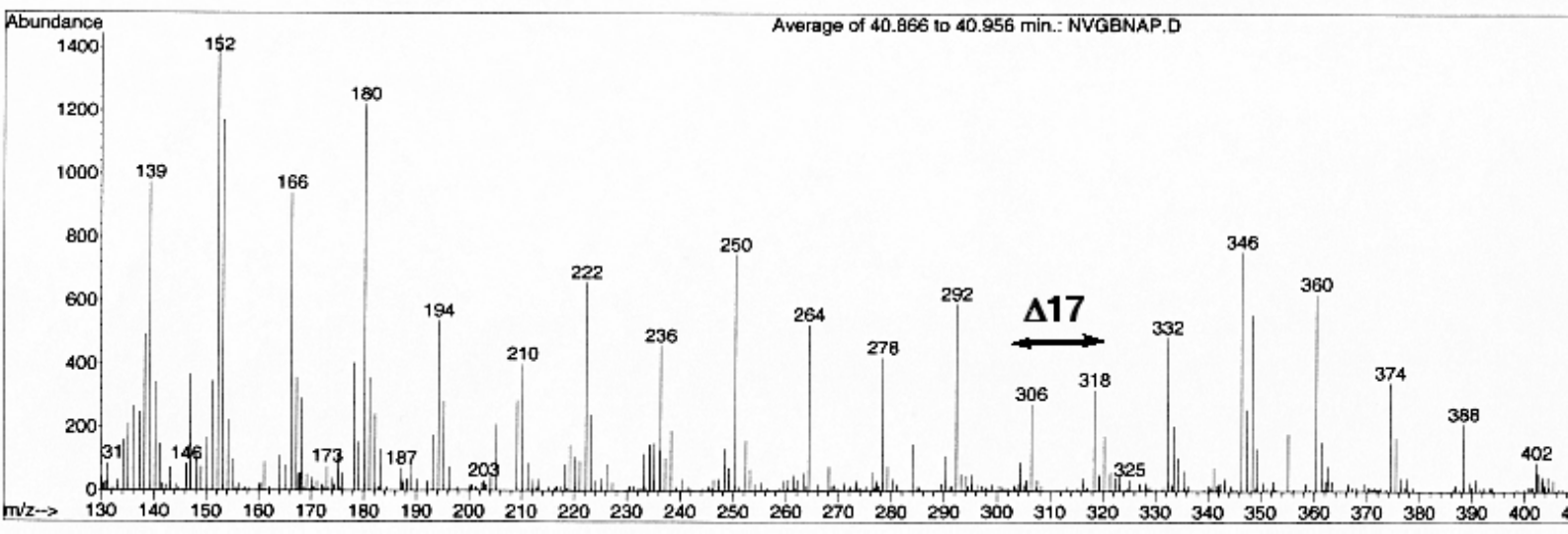

Abundance
Average of 38.048 to 38.108 min.: GBEGP.D
180
m/z 180
saturé
(Δ5,9)
234
141
167
154
220
248
195
211
262
276
290
304
318
332
346
360
374
Δ23
388
400
414
C21:2
Trikentrion laeve (Sénégal)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
5,9,23-30:3
m/z-->

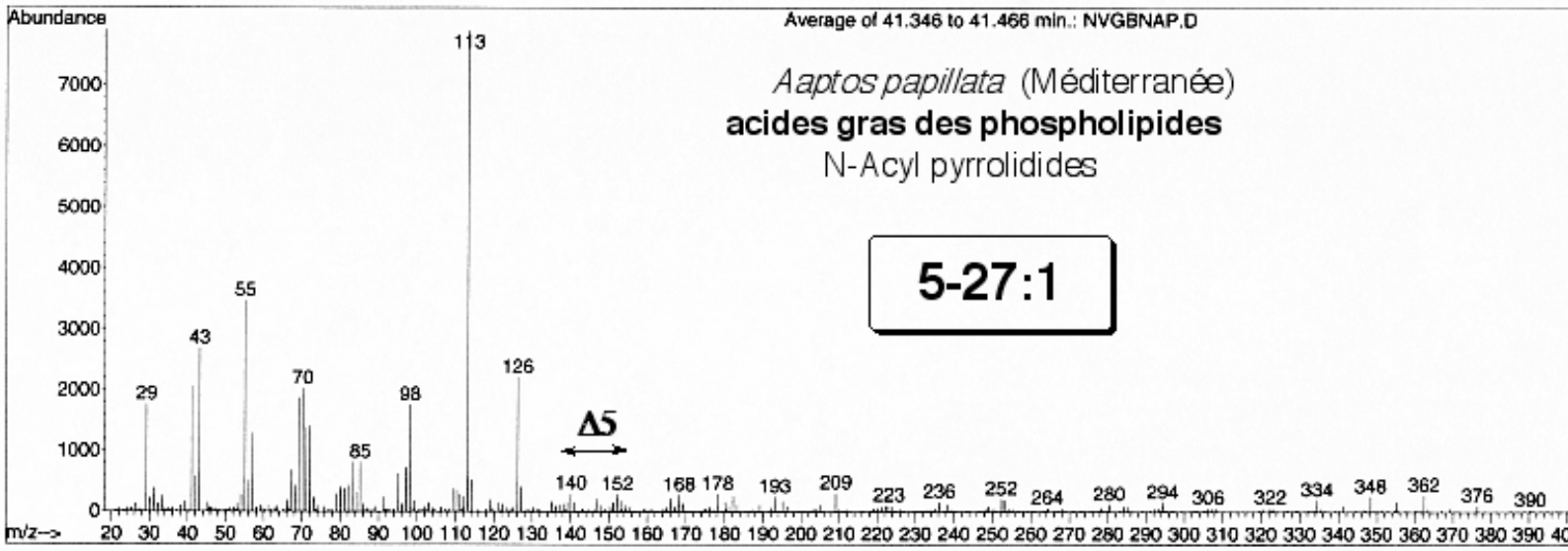

Abundance
Average of 35.813 to 35.841 min.: GBEGE.D
81
Δ5,9
55
67
109
41
94
141
121
180
194
29
151
163
131
205
222
233
248
263
275
289
303
317
345
359
373
389
Trikentrion laeve (Sénégal)
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
5,9,23-30:3
m/z-->

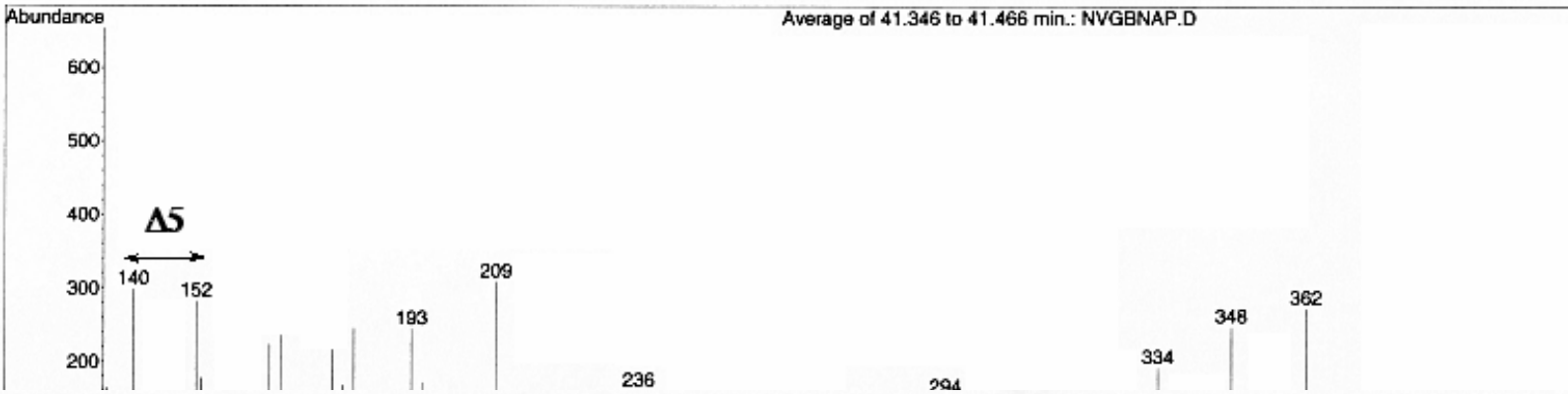

Abundance
TIC: [BSB2]NVGBEM.D
Aaptos papillata (Méditerranée)
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
courant ionique total (70 eV)
4,8,12-TMTD
autre
Δ5,9-25:2
autre
n.25:0
25:1
n.18:0
autre
18:1
br.20:0
Δ5,9-24:2
n.16:0
20:1
phtalate
n.24:0
n.23:0
n.20:0
24:1
n.17:0
autre
Time-->
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
20.00
22.00
24.00
26.00
28.00
30.00
32.00

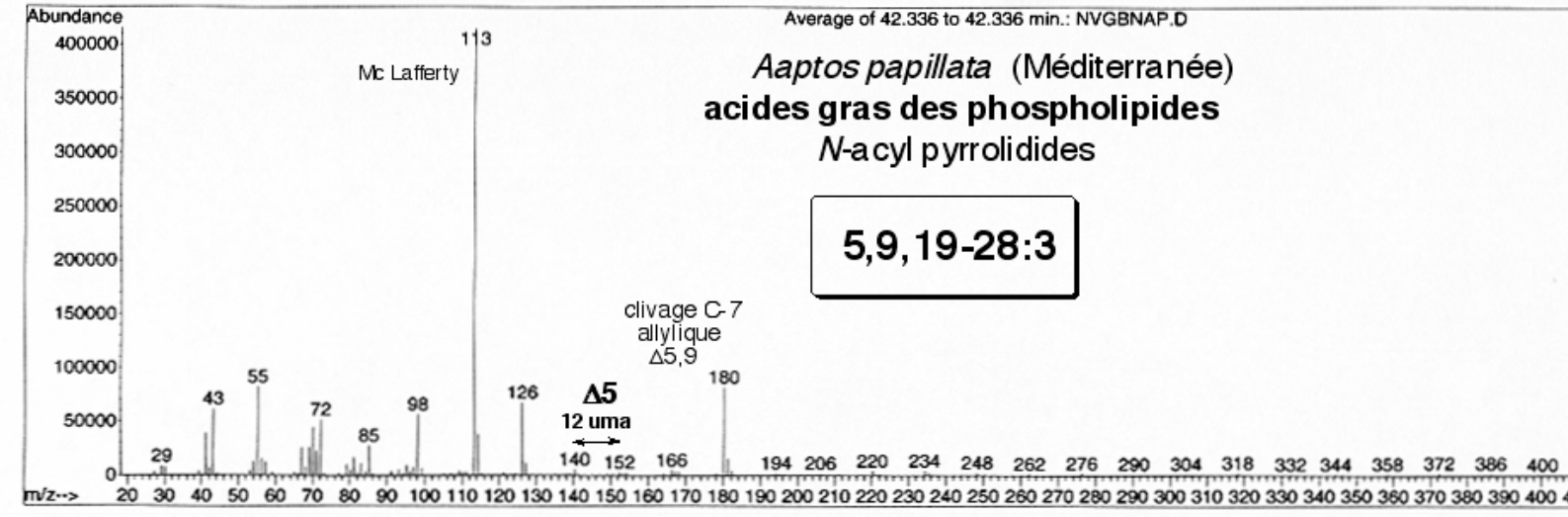

Abundance
TIC: [BSB2]NVGBEM.D
Δ5,9-26:2
26:1
5,9,19-28:3
autre
5,9-27:2
5,9,x-26:3
5,9,y-26:3
Δ5,9-25:2
27:1
Aaptos papillata (Méditerranée)
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
courant ionique total (70 eV)

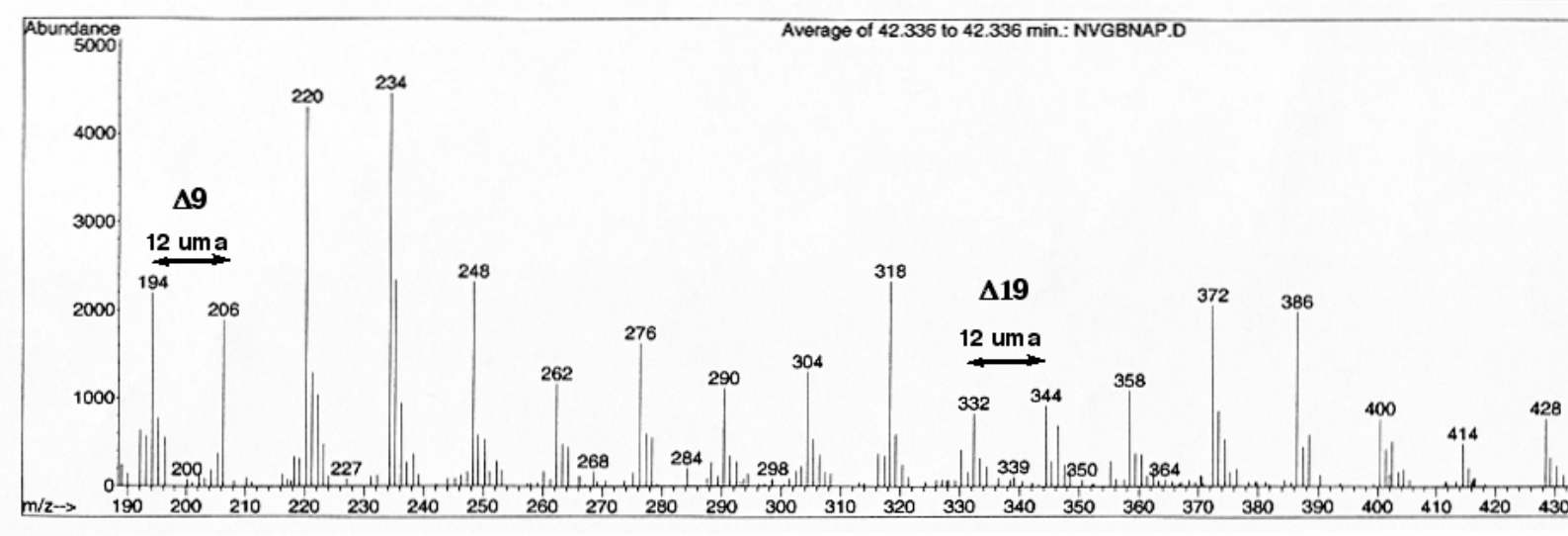

Abundance
Average of 40.866 to 40.956 min.: NVGBNAP.D
Mc Lafferty
113
Aaptos papillata (Méditerranée)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
4,17-26:2
Δ4
Δ17
m/z-->

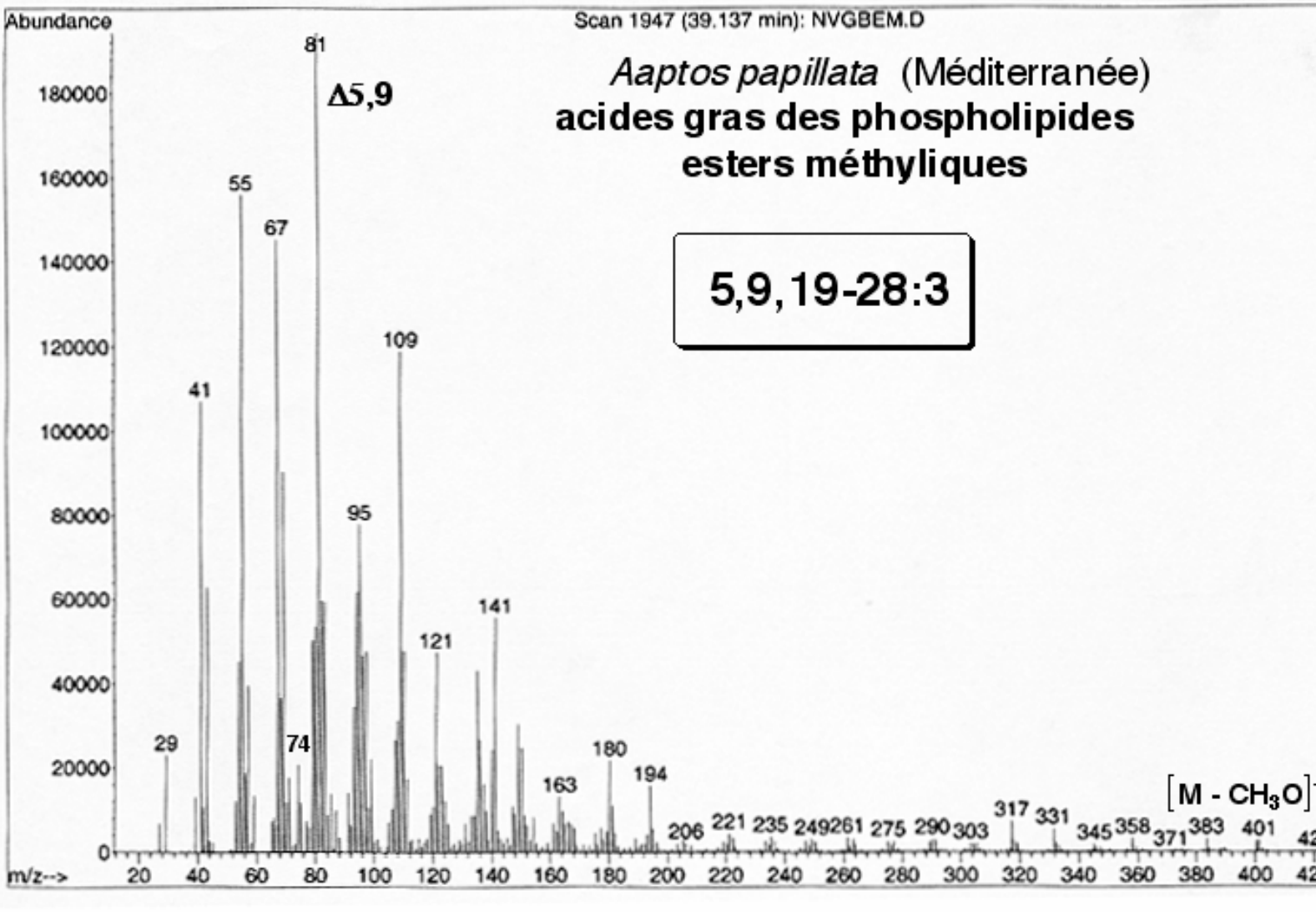

Abundance
Average of 40.866 to 40.956 min.: NVGBNAP.D
Δ17
m/z-->


Abundance
Average of 41.346 to 41.466 min.: NVGBNAP.D
Aaptos papillata (Méditerranée)
acides gras des phospholipides
N-Acyl pyrrolidides
5-27:1
Δ5
m/z-->

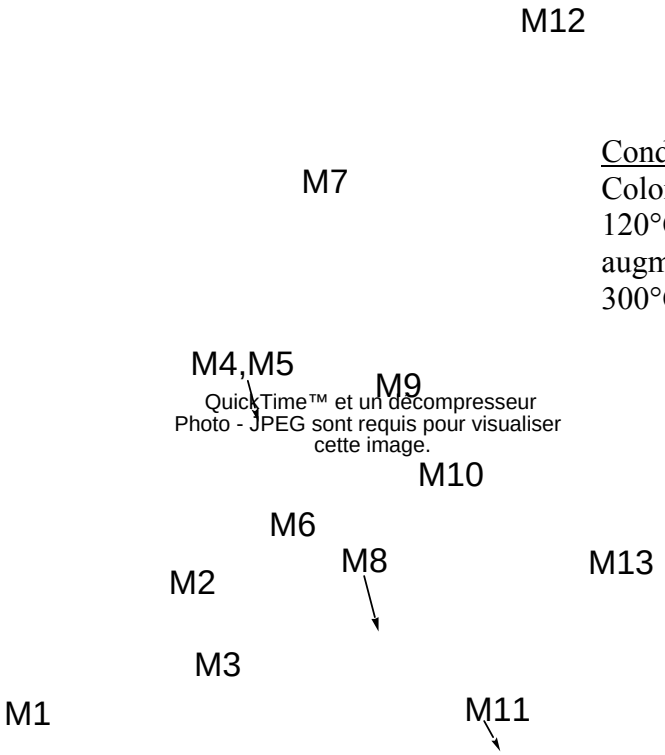

Abundance
Average of 41.346 to 41.466 min.: NVGBNAP.D
Δ5


Abundance
Average of 42.336 to 42.336 min.: NVGBNAP.D
Mc Lafferty
Aaptos papillata (Méditerranée)
acides gras des phospholipides
N-acyl pyrrolidides
5,9,19-28:3
clivage C-7
allylique
Δ5,9
Δ5
12 uma
m/z-->


Abundance
Average of 42.336 to 42.336 min.: NVGBNAP.D
Δ9
12 uma
Δ19
12 uma
m/z-->


Abundance
Scan 1947 (39.137 min): NVGBEM.D
Aaptos papillata (Méditerranée)
acides gras des phospholipides
esters méthyliques
5,9,19-28:3
Δ5,9
[M - CH3O]
m/z-->
81
55
67
41
109
95
141
121
29
74
180
194
163
317
331
345
358
371
383
401
206
221
235
249
261
275
290
303

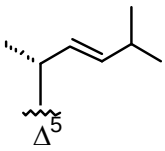
Chromatogramme en CPG/SM de stérols acétylés de *Myrmekioderma dendyi*
Structures de la chaîne latérale des stérols conventionnels correspondants



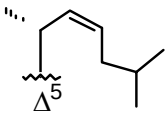
Condition de CPG/SM :
Colonne : DB 1
120°C pendant 4 min, puis on augmente 3°C/min jusqu'à 300°C

Δ^5 : Noyau stérolique saturé en position 5 ; Δ^0 : Noyau stanolique

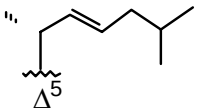
M1



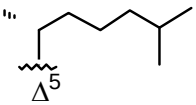
M2



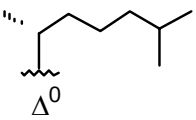
M3



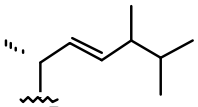
M4



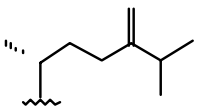
M5



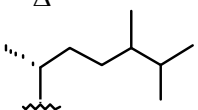
M6 Δ^5(C27:2)



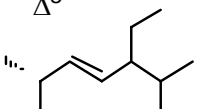
M7



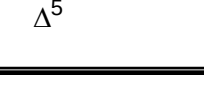
M8



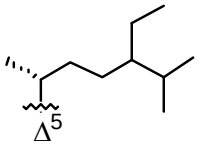
M9



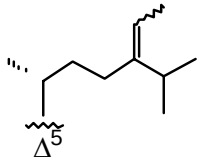
M10



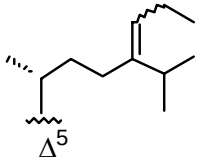
M11



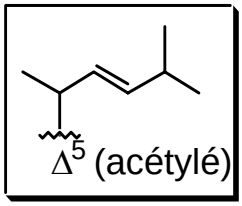
M12



M13



Composé M1 : 24ξ-*nor*cholesta-5,22-dièn-3β-ol acétylé de



[M-AcOH-C.L.]

QuickTime™ et un décompresseur
Photo - JPEG sont requis pour visualiser
cette image.

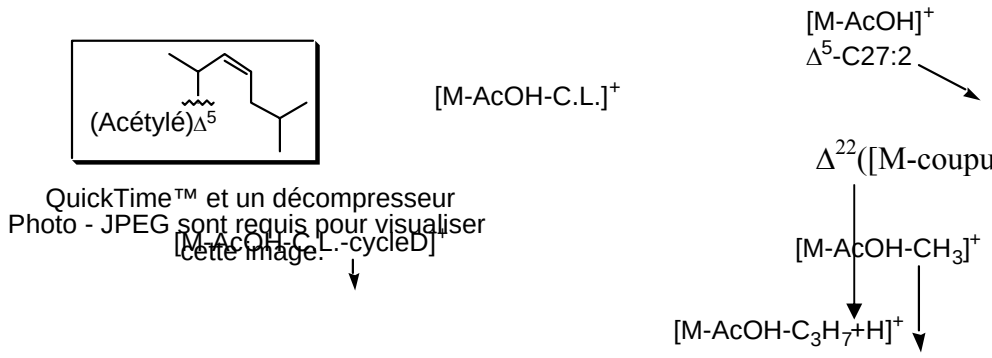
[M-AcOH-C.L.-cycleD]

[M

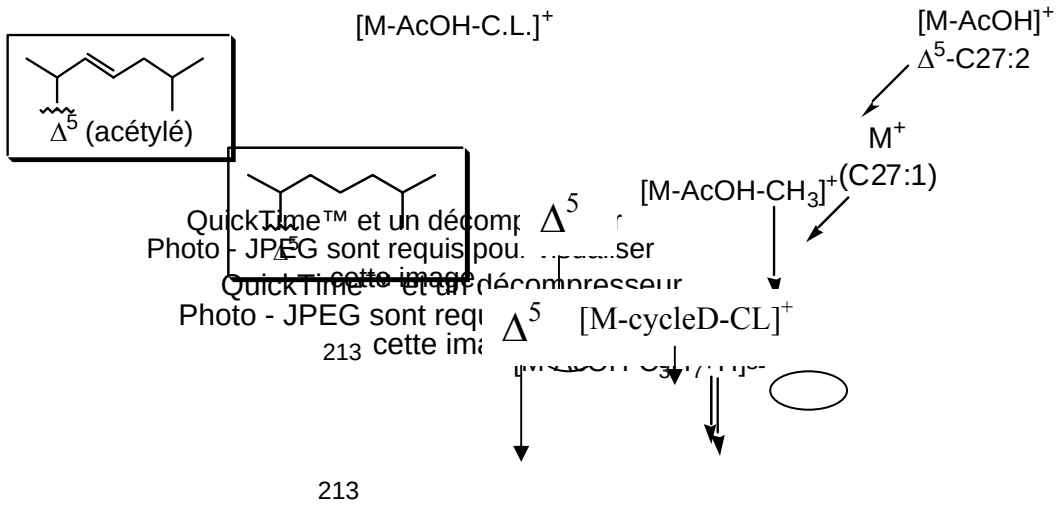
[M-AcOH-

Myrmekioderma dendyi

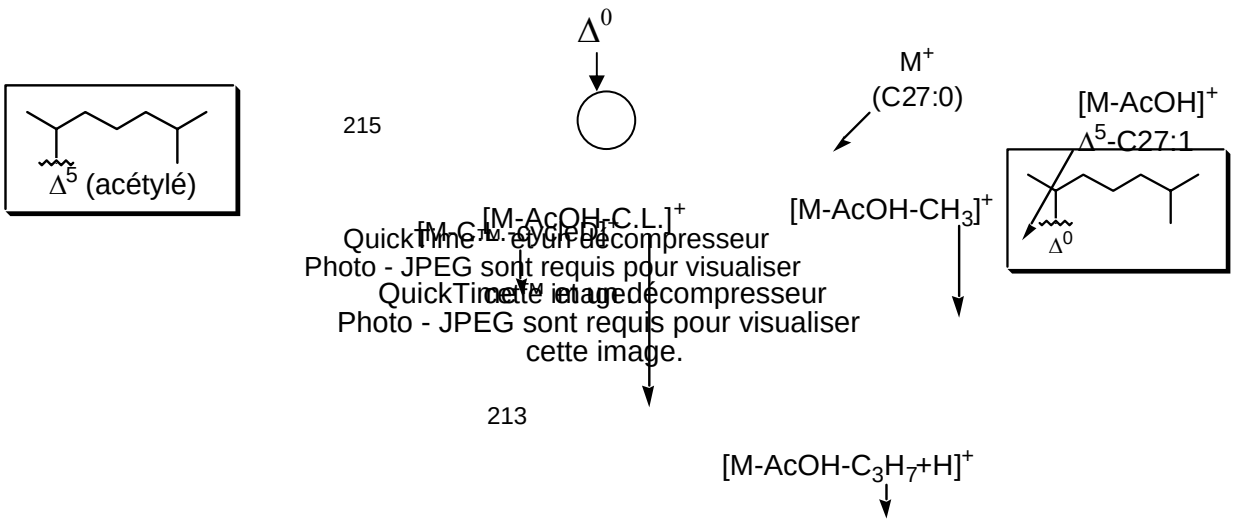
Composé M2 : (22*Z*)-Déhydrocholestérol acétylé de *Myrmekioderma dendyi*



Composé M3 : (22*E*)-Déhydrocholestérol acétylé de *Myrmekioderma dendyi*

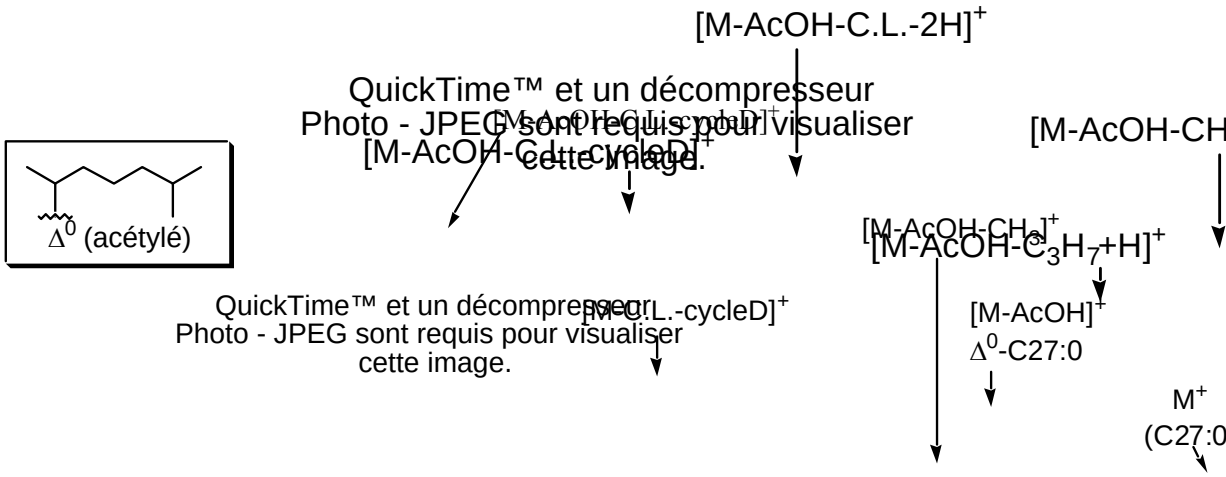


Composé M4 : Cholestérol de *Myrmekioderma dendyi*
Composé M4 : Acétate de cholestéryl de *Myrmekioderma dendyi*
Composé M5 : Cholestanol de *Myrmekioderma dendyi*

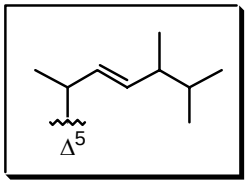


Composé M5 : Acétate de cholestanol de *Myrmekioderma dendyi*

Composé M6 : Stérol Δ^5C27:2 ($2^{ème}$ insaturation non localisé sur CPG/SM)



Composé M7 : Crinostérol ou Brassicastérol de *Myrmekioderma dendyi*



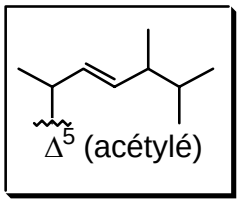
[M-CL-2H]+

[M-CL-H2O]+

Δ5

QuickTime™ et un décompresseur
Photo - JPEG sont requis pour visualiser
cette image.

Composé M7 : Crinostérol ou Brassicastérol acétylés de



[M-AcOH-C.L.]+

[M-

Δ5

[M-AcOH-C3H

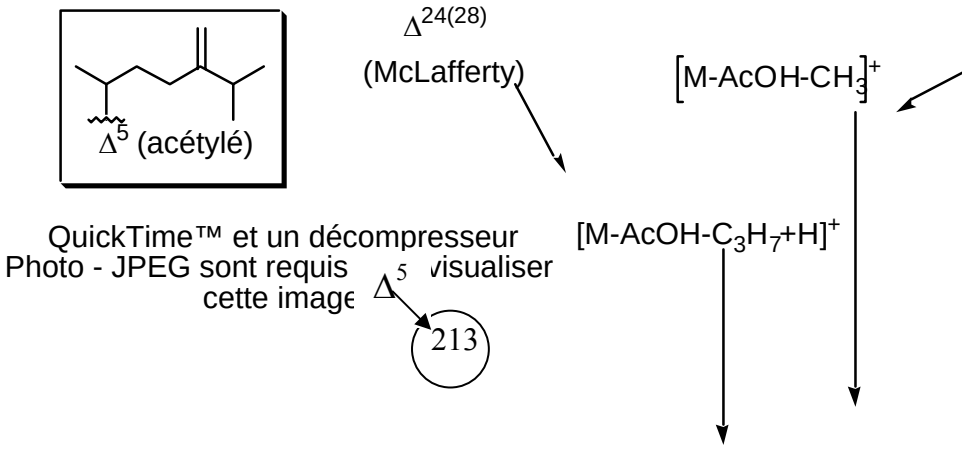
Δ22

282

QuickTime™ et un décompresseur
Photo - JPEG sont requis pour visualiser
cette image.

Myrmekioderma dendyi

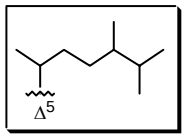
Composé M8 : Acétate du 24-méthylène cholestérol de *Myrmekioderma dendyi*



Composé M9 : Campestérol ou 22-Dihydrobrassicastérol de

43

M^+
(C28:1)



QuickTime™ et un décompresseur
Photo - JPEG sont requis pour visualiser
cette image.

Myrmekioderma dendyi

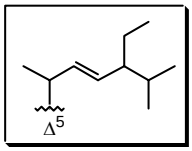
Composé M9 : Campestérol ou 22-Dihydrobrassicastérol acétylés de

Myrmekioderma dendyi

Composé M10 : Stigmastérol ou Poriférastérol

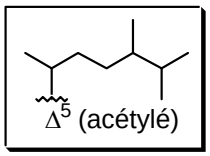
55

M^+
(C29:2)



QuickTime™ et un décompresseur
Photo - JPEG sont requis pour visualiser
cette image.

43



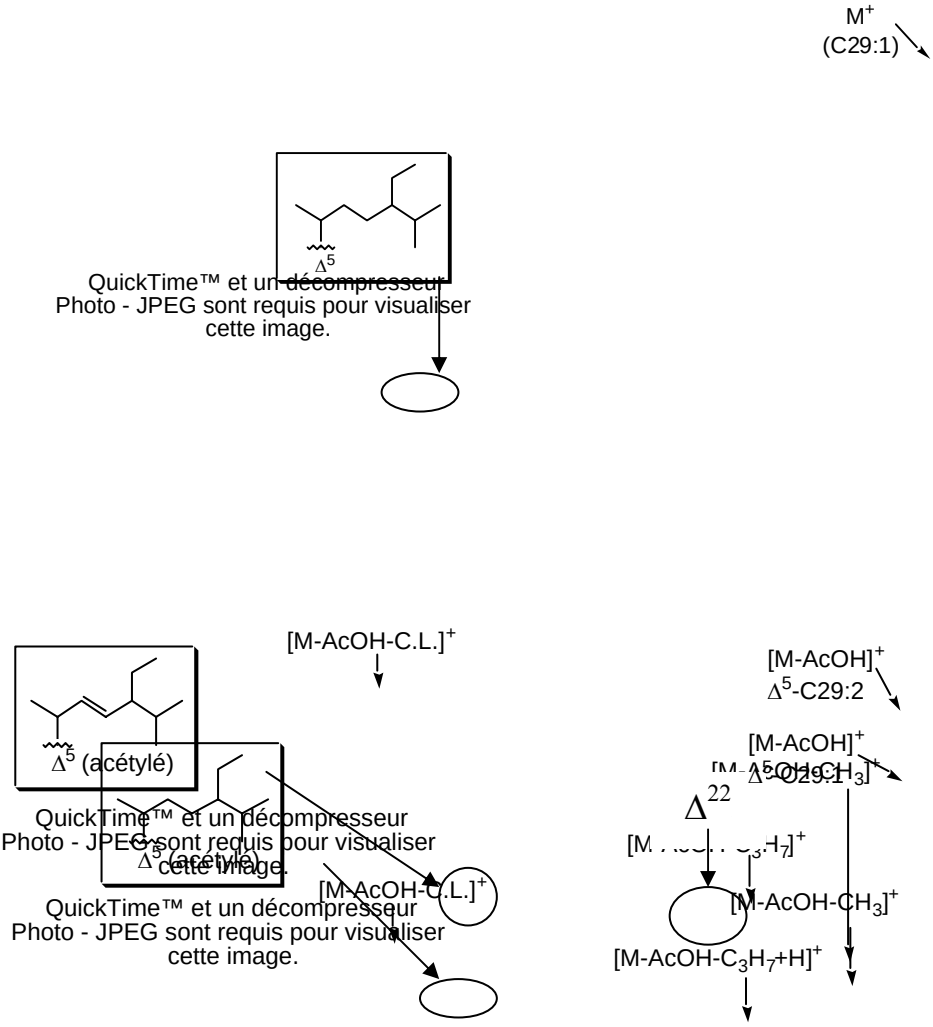
QuickTime™ et un décompresseur
Photo - JPEG sont requis pour visualiser
cette image.

$[M\text{-}AcOH]^+$
Δ^5-C28:1

$[M\text{-}AcOH\text{-}CH_3]^+$

$[M\text{-}AcOH\text{-}C_3H_7\text{+}H]^+$

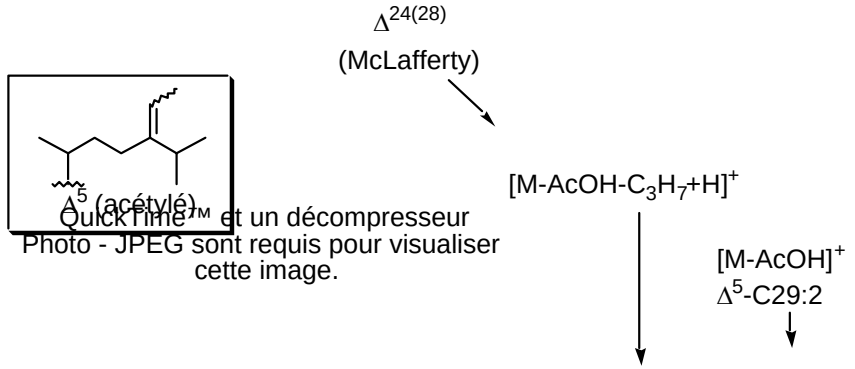
Composé M10 : Stigmastérol ou Poriférastérol acétylés
Composé M11 : Sitostérol ou Clionastérol de *Myrmekioderma dendyi*



Composé M11 : Sitostérol ou Clionastérol acétylé de *Myrmekioderma dendyi*

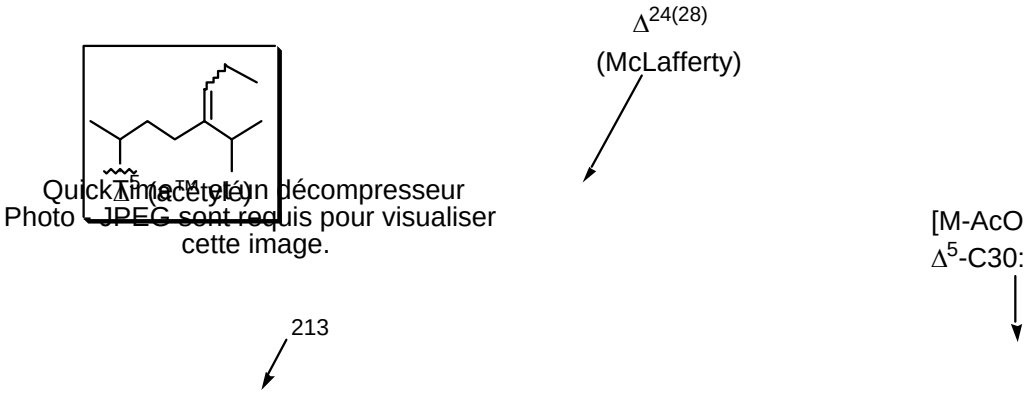
Composé M12 : Fucostérol ou Isofucostérol acétylés de *Myrmekioderma dendyi*

Composé M13 : 29-Méthylfucostérol ou 29-Méthylisofucostérol de



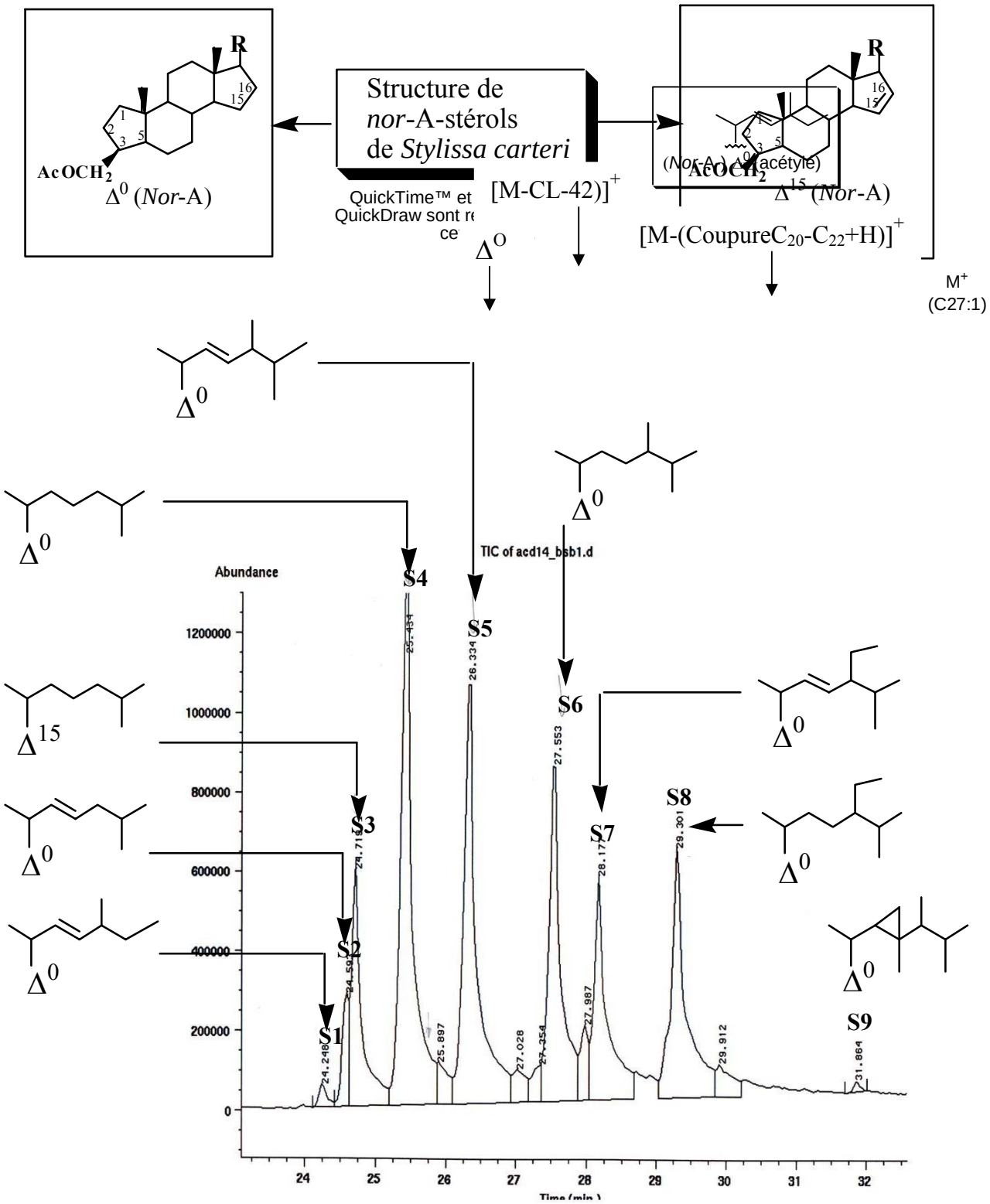
QuickTime™ et un décompresseur
Photo - JPEG sont requis pour visualiser
cette image.

Myrmekioderma dendyi



QuickTime™ et un décompresseur
Photo - JPEG sont requis pour visualiser
cette image.

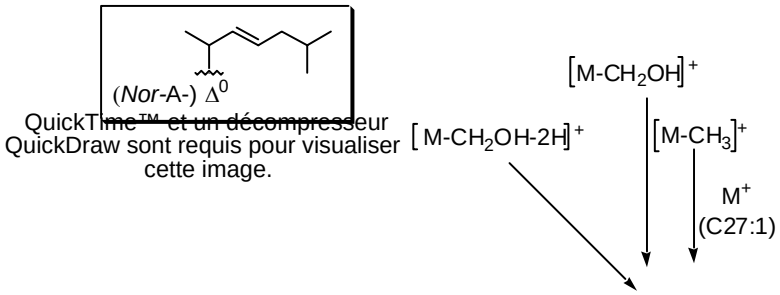
Chromatogramme en CPG/SM de stérols acétylés de *Stylissa carteri*



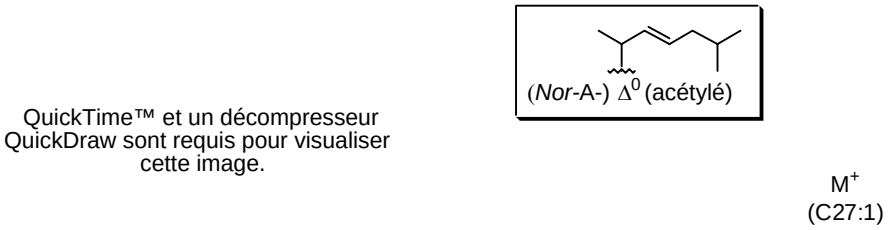
CONDITION CPG/SM :
220 °C (2min), on augmente de 3°C/min jusqu'à 300°C

Composé S1 : 3ξ-Acétoxyméthyl-24ξ-méthyl-*nor*-27-*nor*-A-5α-cholest-22*E*-ène (*Nor*-A-patinostérol acétylé) de *Stylissa carteri*

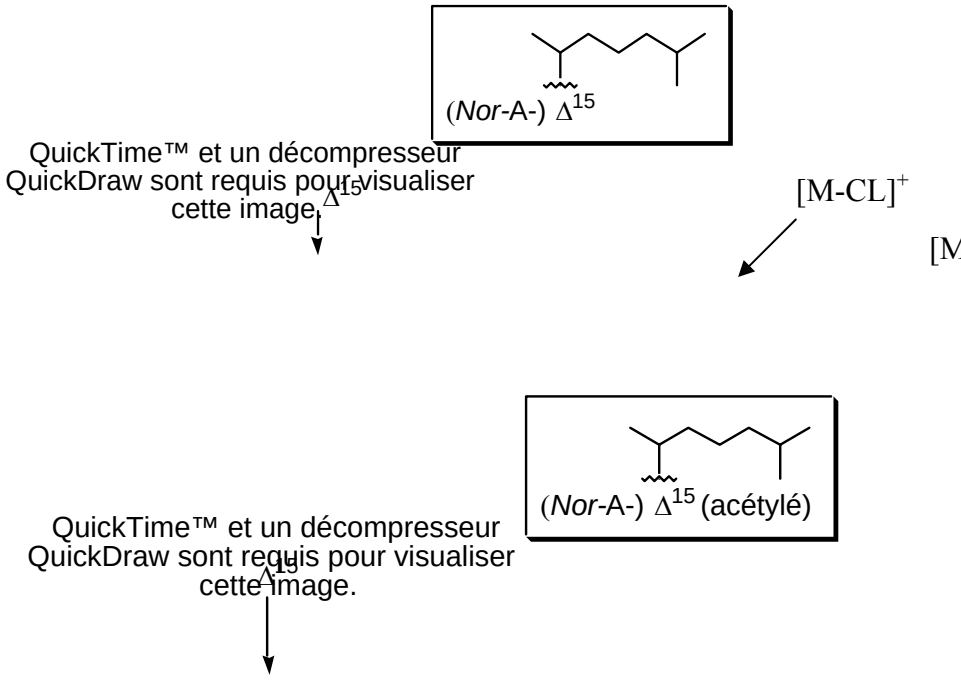
Composé S2 : 3β-hydroxyméthyl-*nor*-A-5α-cholest-22*E*-ène de *Stylissa carteri*



Composé S2 : 3β-Acétoxyméthyl-*nor*-A-5α-cholest-22*E*-ène de *Stylissa carteri*



Composé S3 : 3β-hydroxyméthyl-*nor*-A-5α-cholest-15-ène de

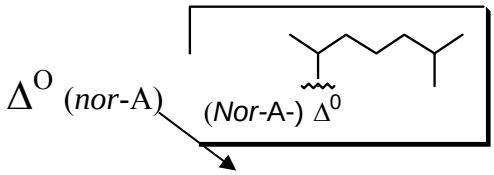


Stylissa carteri

3β-Acétoxyméthyl-*nor*-A-5α-cholest-15-ène de

Stylissa carteri

Composé S4 : 3β-Hydroxyméthyl-*nor*-A-5α–cholestane de *Stylissa*



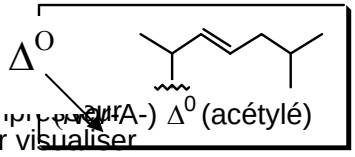
QuickTime™ et un décompresseur
QuickDraw sont requis pour visualiser
cette image.

[

carteri

3β-Acetoxyméthyl-*nor*-A-5α–cholestane de *Stylissa*

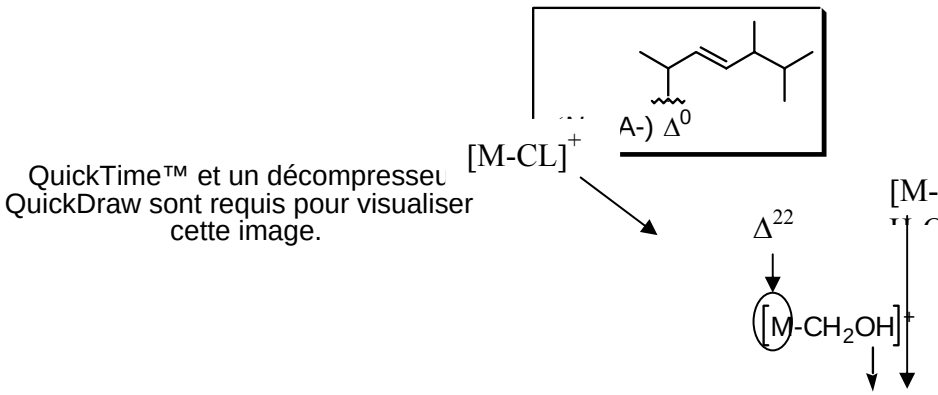
carteri



QuickTime™ et un décompresseur
QuickDraw sont requis pour visualiser
cette image.

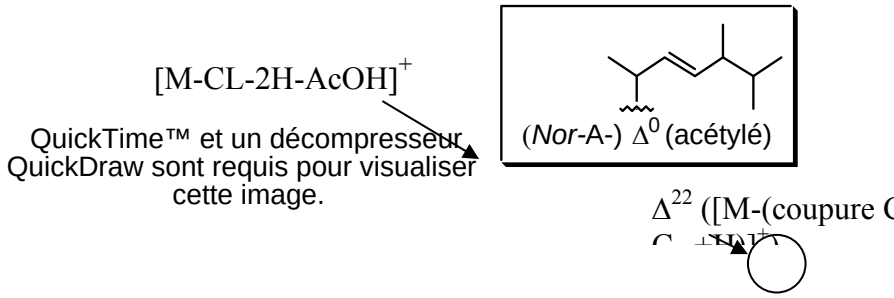
[M-Ac

Composé S5 : 3β-hydroxyméthyl-24ξ-méthyl-*nor*-A-5α-cholest-22-



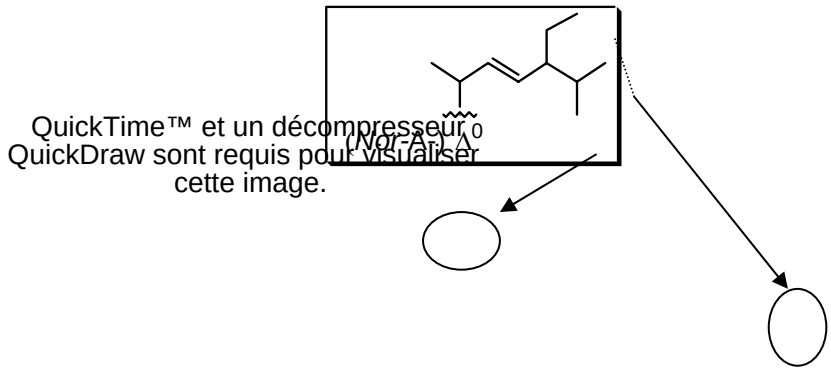
ène de *Stylissa carteri*

3β-Acétoxyméthyl-24ξ-méthyl-*nor*-A-5α-cholest-22-



ène de *Stylissa carteri*

Composé S7 : 3β-hydroxyméthyl-24ξ-éthyl-*nor*-A-5α-cholest-22-ène

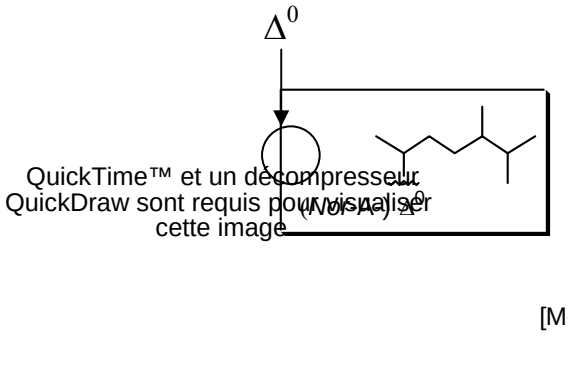


de *Stylissa carteri*

3β-Acétoxyméthyl-24ξ-éthyl-*nor*-A-5α-cholest-22-ène

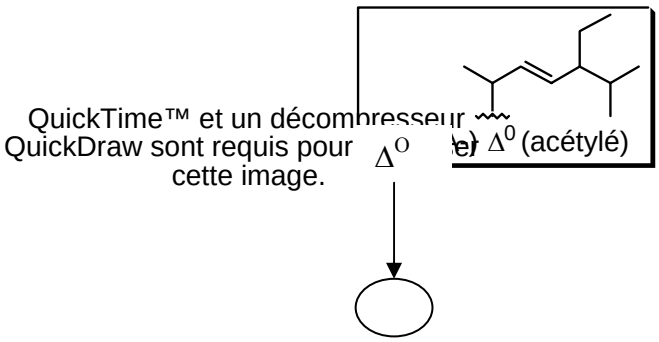
de *Stylissa carteri*

Composé S6 : 3β-hydroxyméthyl-24ξ-méthyl-*nor*-A-5α-cholestane



M^+
(C28:0)

$[M-CH_2OH]^+$



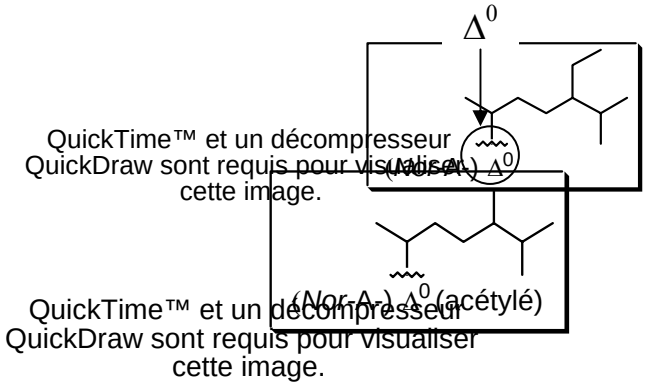
Δ^{22}

de *Stylissa carteri*

3β-Acétoxyméthyl-24ξ-méthyl-*nor*-A-5α-cholestane

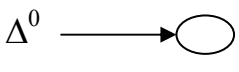
de *Stylissa carteri*

Composé S8 : 3β-hydroxyméthyl-24ξ-éthyl-*nor*-A-5α-cholestane de



$[M-CH_2OH]^+$

[M-AcOH



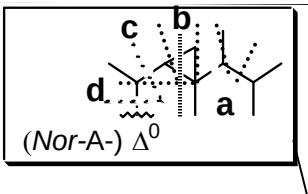
[M-AcO

Stylissa carteri

3β-Acétoxyméthyl-24ξ-éthyl-*nor*-A-5α-cholestane de

Stylissa carteri

Composé 9 : 3β-hydroxyméthyl-*nor*-A-5α–gorgostane de *Stylissa*



[M-CL-2H]$^+$

b

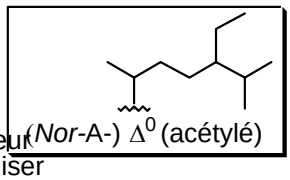
QuickTime™ et un décompresseur
Photo - JPEG sont requis pour visualiser
cette image.

d c

a

[M-CH

Δ^0



QuickTime™ et un décompresseur
QuickDraw sont requis pour visualiser
cette image.

[M-AcOH]$^+$

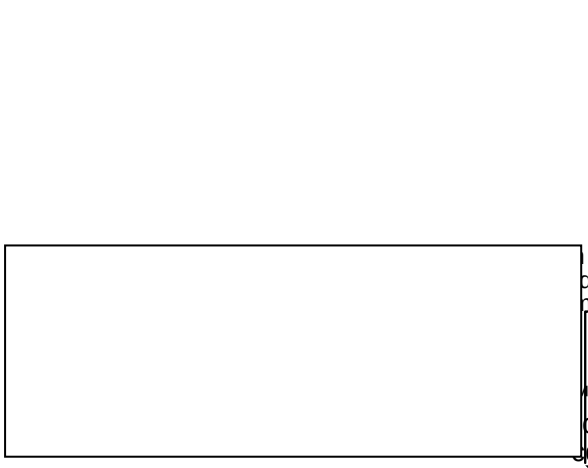
Page 112

carteri

3β-Acétoxyméthyl-*nor*-A-5α–gorgostane de *Stylissa*

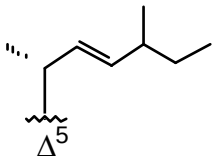
carteri

Chromatogramme des stérols conventionnels acétylés de *Stylissa carteri*

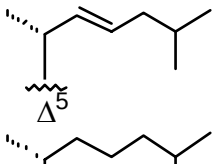


[M-CL-2H]$^+$

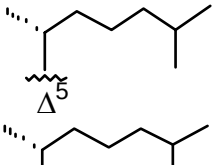
1



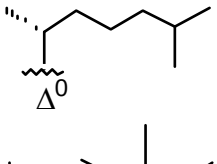
2



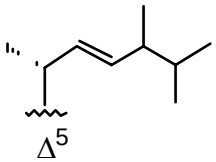
3



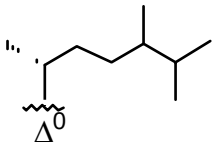
4



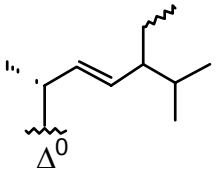
5



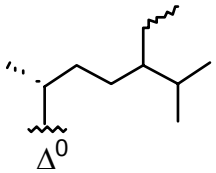
6



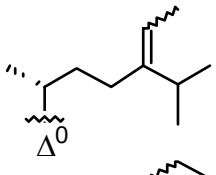
7



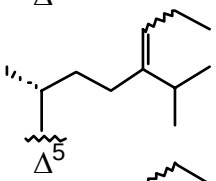
8



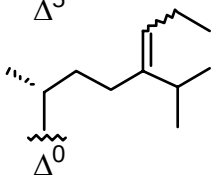
9



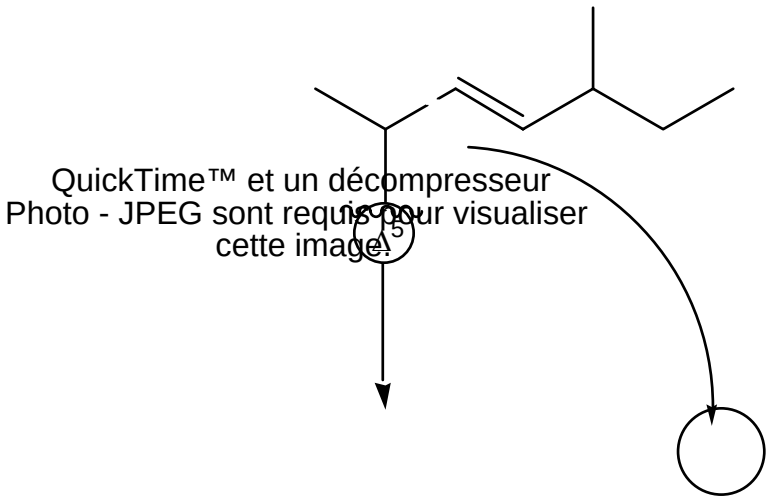
10



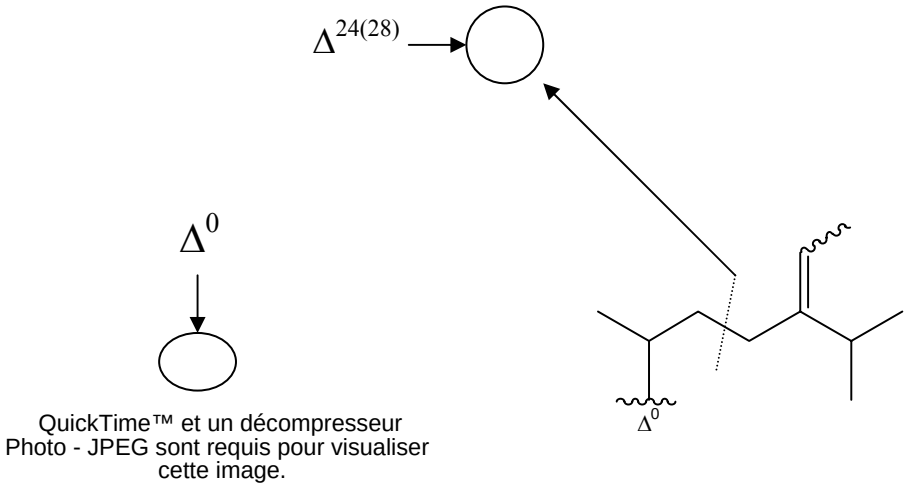
11



Spectre de masse de l’occélastérol acétylé de *Stylissa carteri*

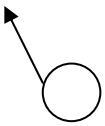


Spectre de masse du 24-Ethylènecholestanol de *Stylissa carteri*

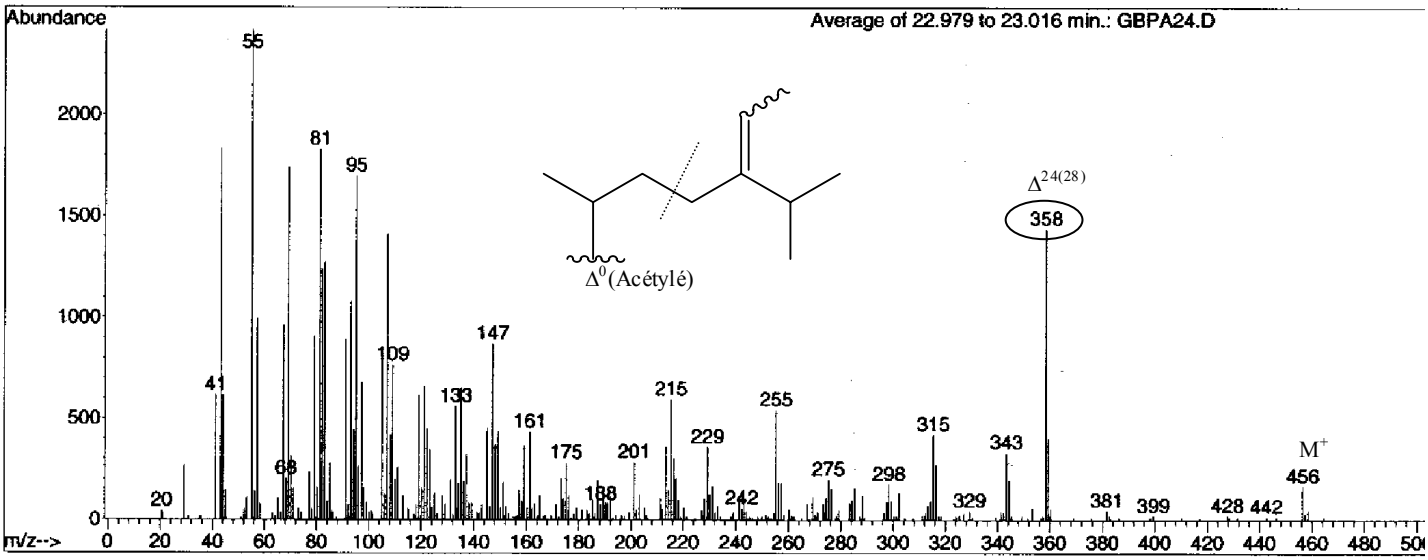


QuickTime™ et un décompresseur
Photo - JPEG sont requis pour visualiser
cette image.

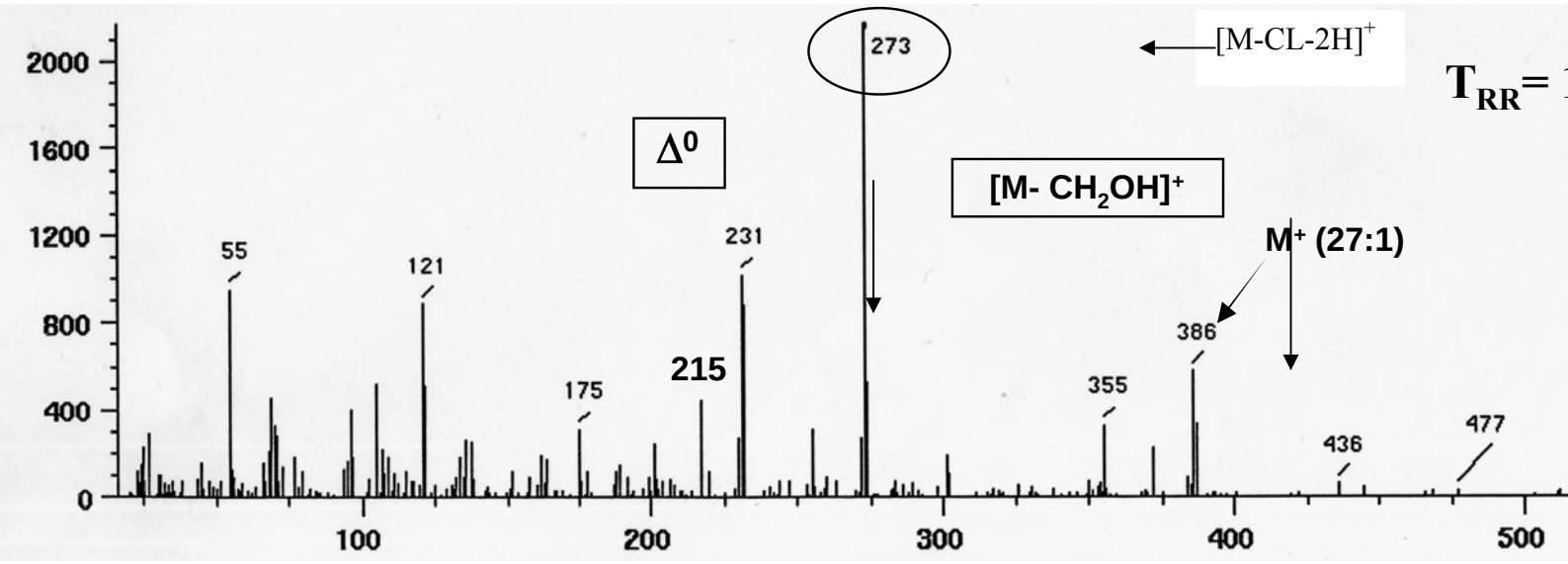
M^+(29:1)



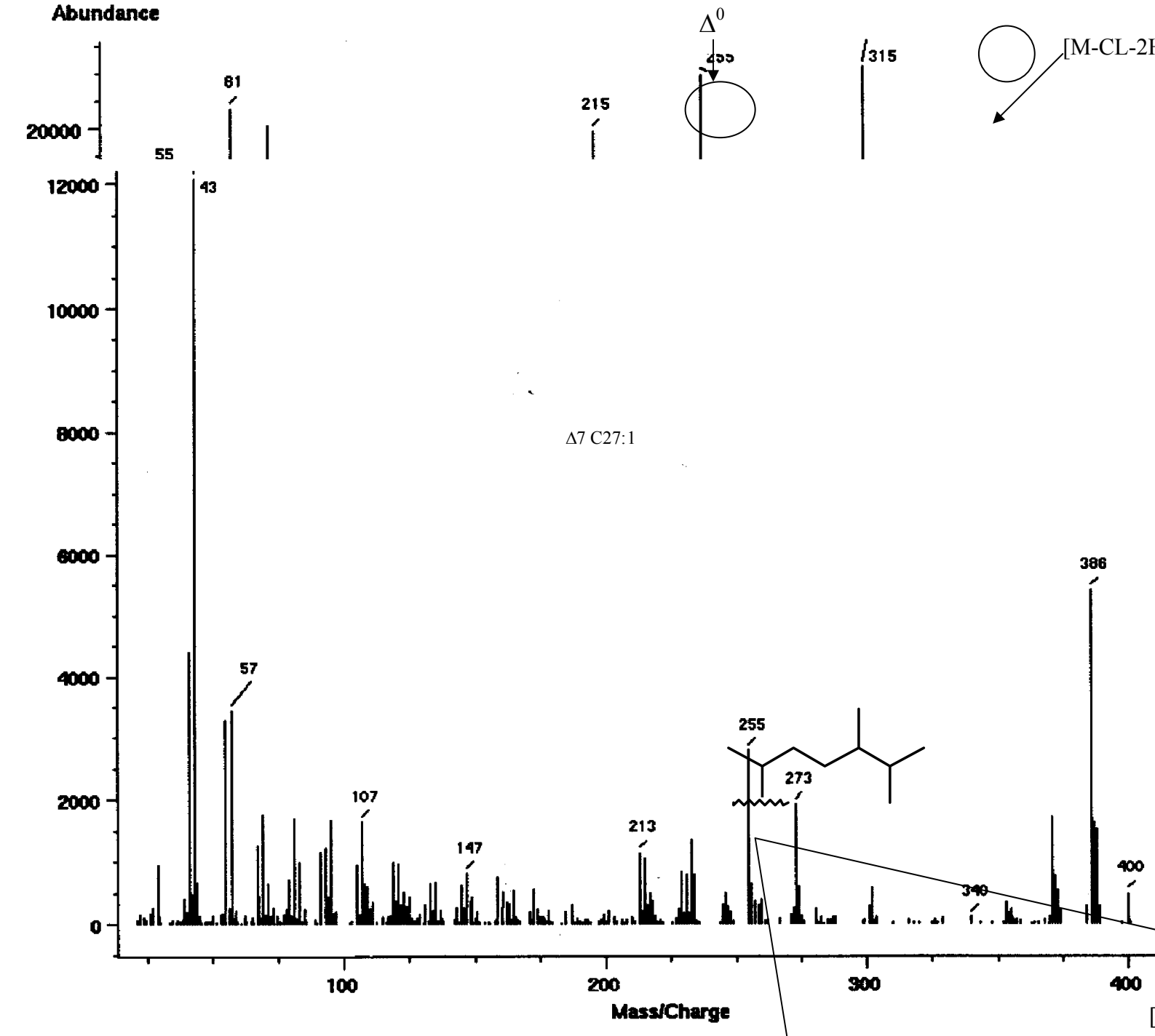
Spectre de masse du 24-Ethylènecholestanol acétylé de *Stylissa carteri*



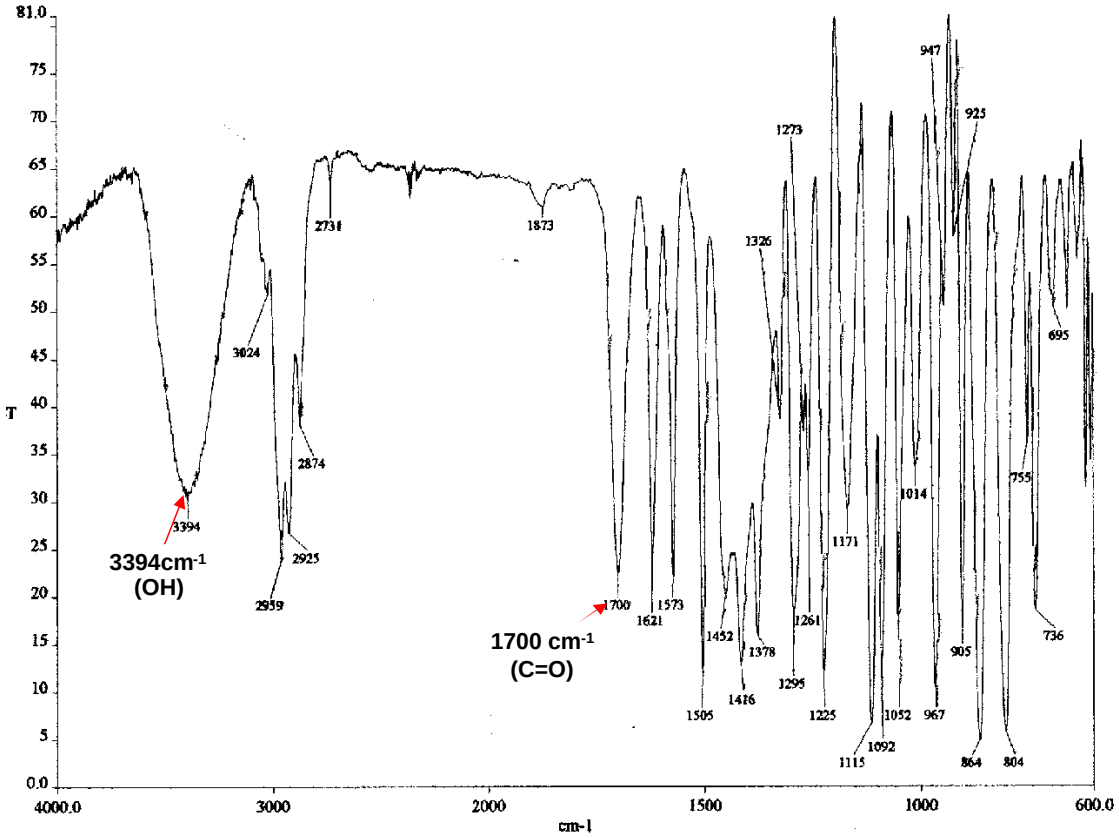
Spectre de masse du *nor*-A-stérol libre non déterminé de *Aaptos papillata*



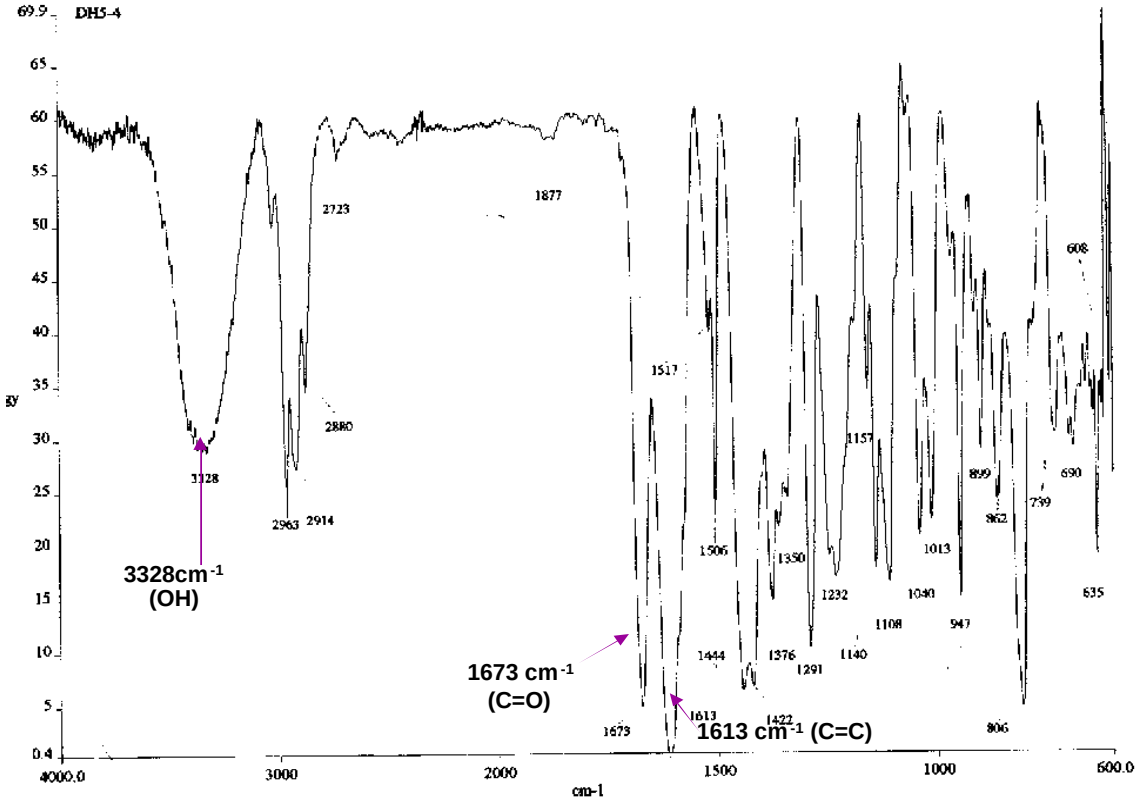
Spectre de masse du *nor*-A-stérol acétylé non déterminé de *Aaptos*



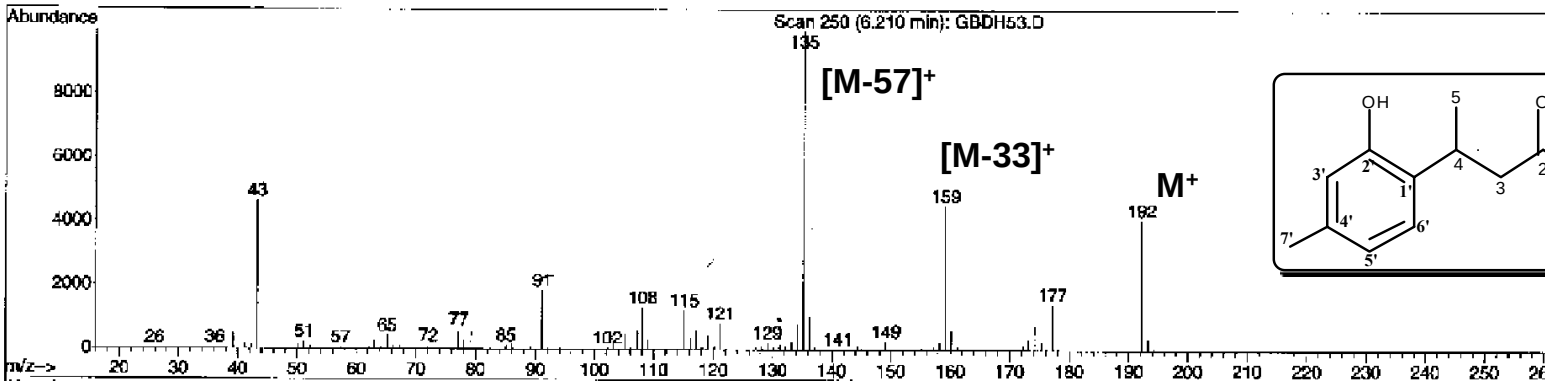
Spectre IR du composé D5-3 de *Myrmekioderma dendyi*



Spectre IR du composé D5-4 de Myrmekioderma dendyi



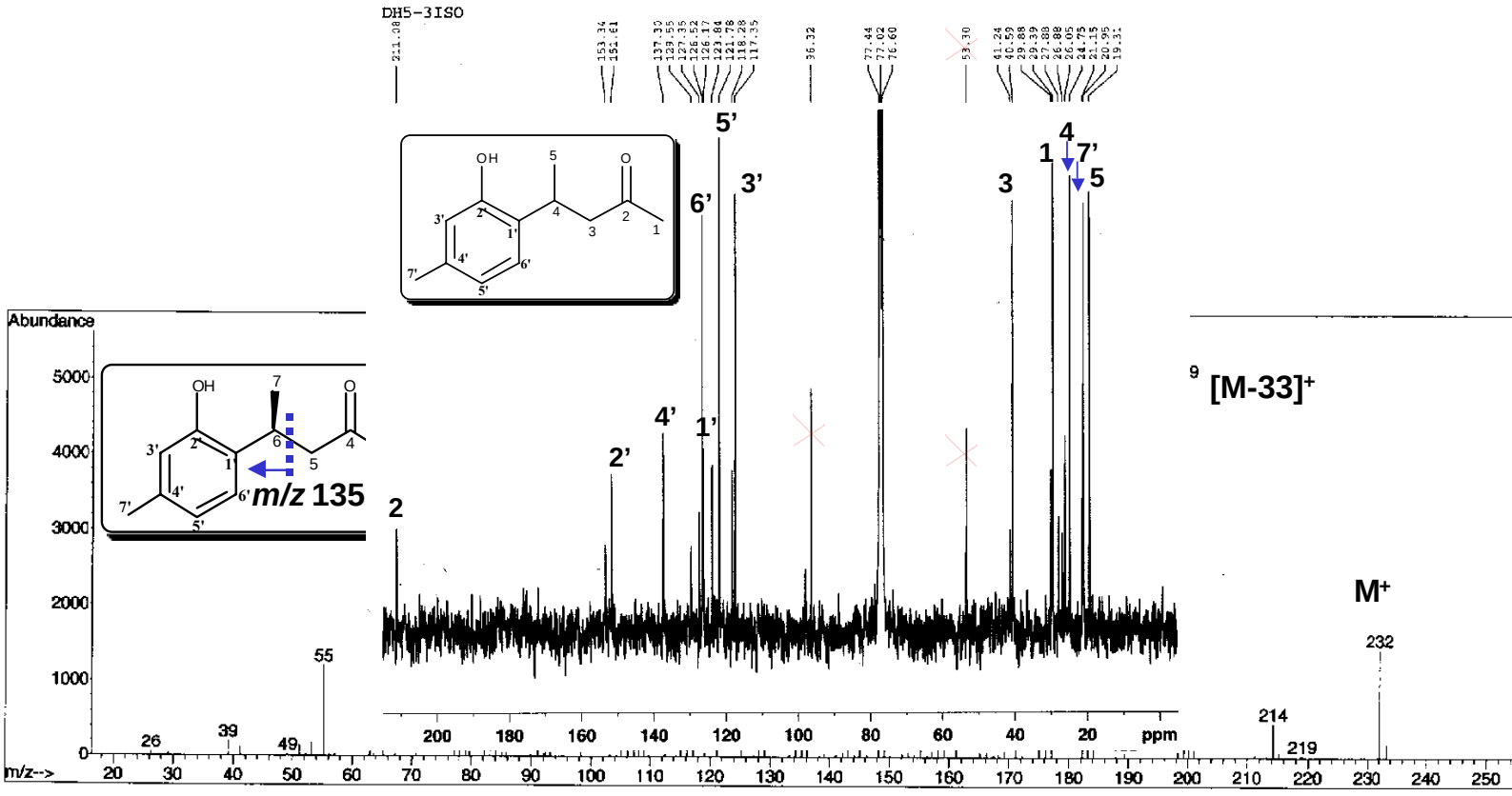
Library Searched : C:\DATABASE\nist98.L
Quality : 47
ID : 1-(2-Methyl-4-propoxy-phenyl)-ethanone



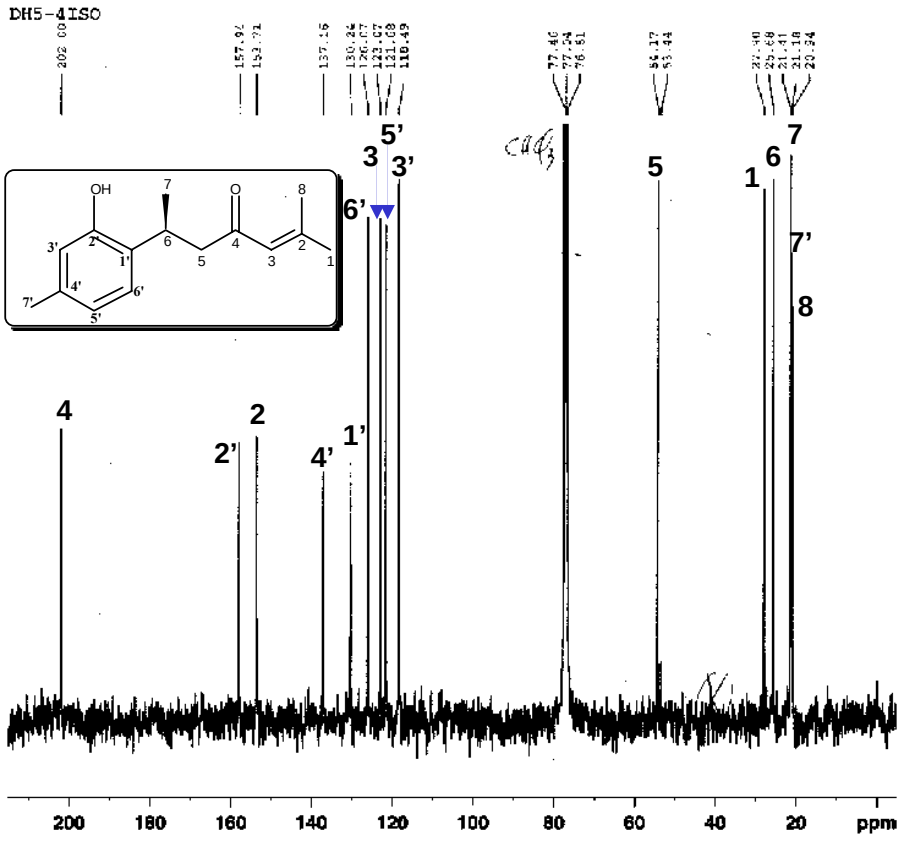
D5-3 de Myrmekioderma dendyi ***(Tome 1, p.142-144)***

D5-4 de Myrmekioderma dendyi ***(Tome 1, p.140-141 et 144)***

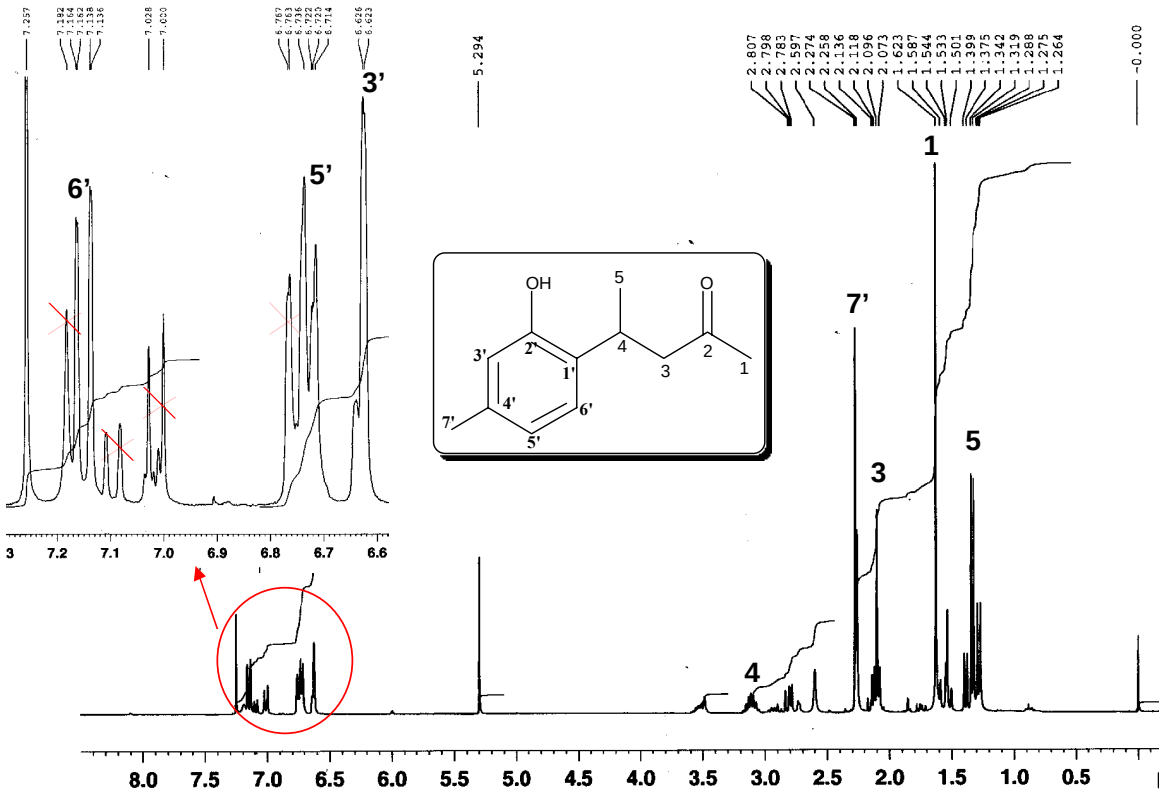
Spectre RMN ^{13}C (300 MHz) du composé D5-3 de *Myrmekioderma dendyi*



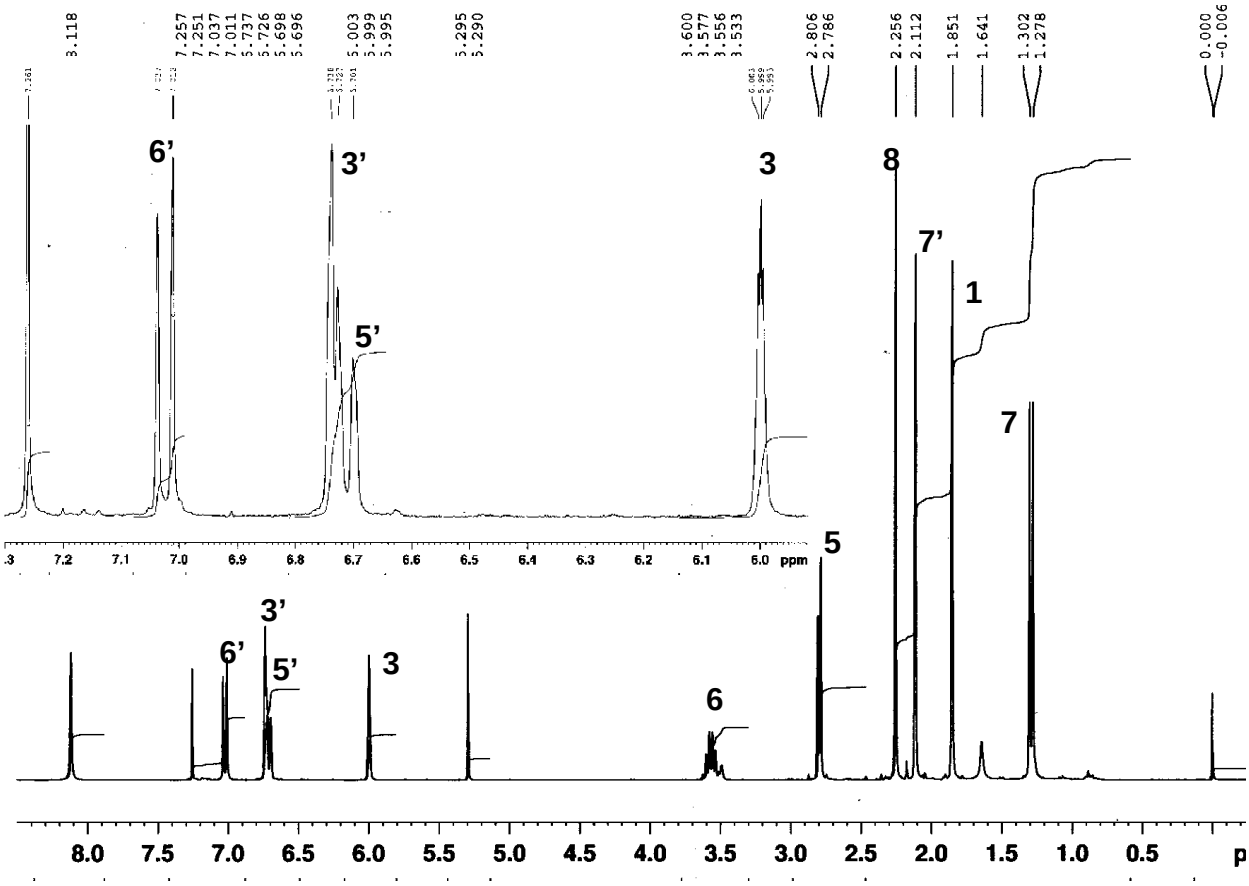
Spectre RMN ^{13}C (300 MHz) du composé D5-4 de *Myrmekioderma dendyi*



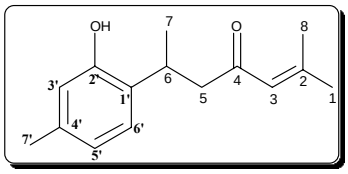
Spectre RMN ^{1}H (300 MHz) du composé D5-3 de *Myrmekioderma dendyi*



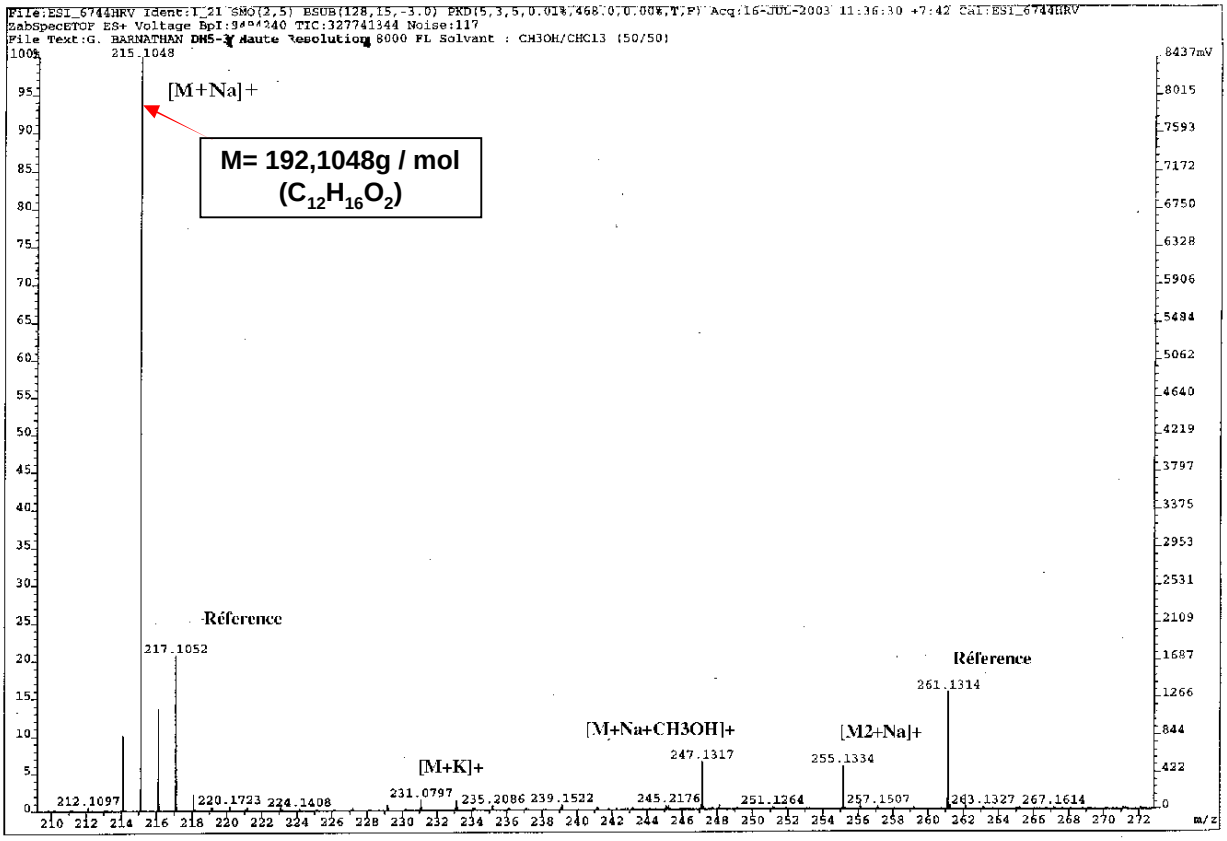
Spectre RMN ^{1}H (300 MHz) du composé



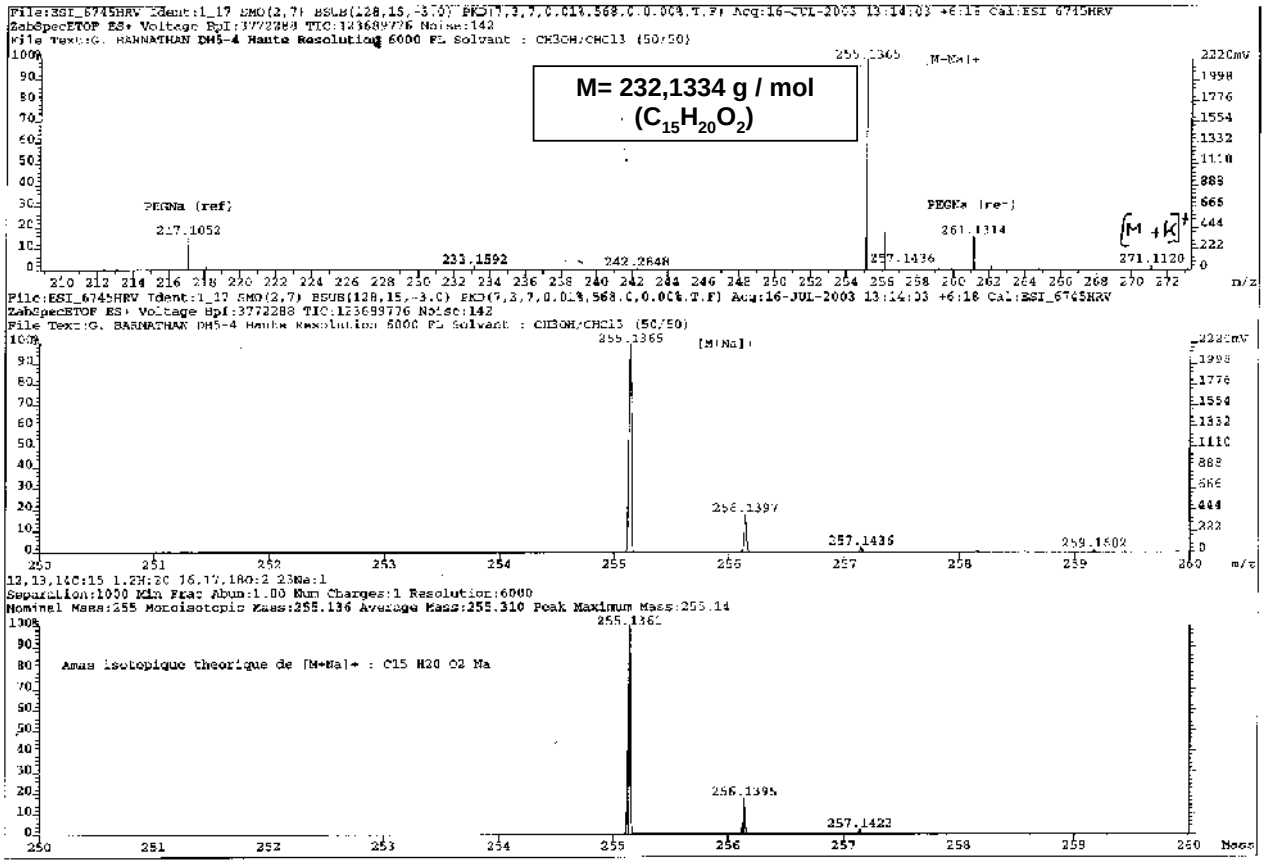
D5-4 de Myrmekioderma dendyi



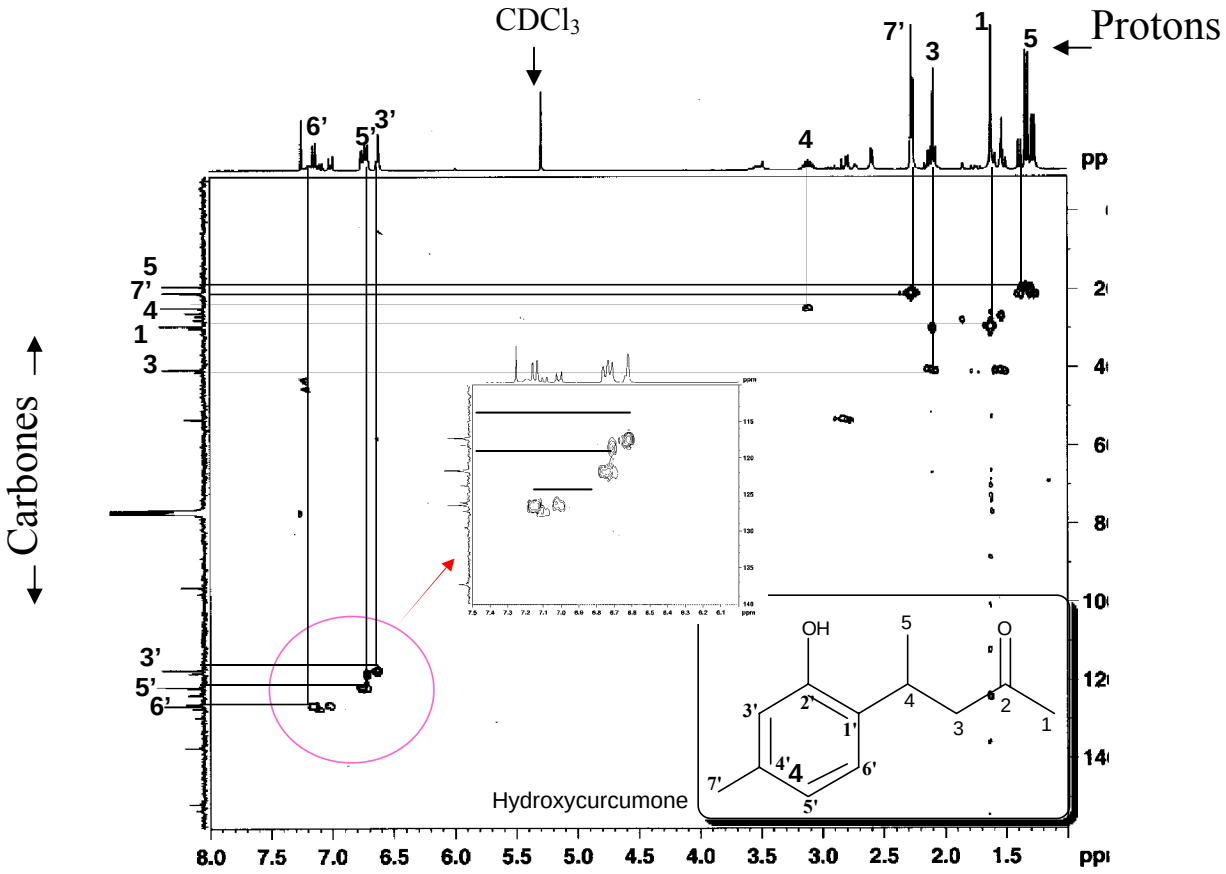
Spectre de masse haute résolution du composé D5-3 de Myrmekioderma dendyi



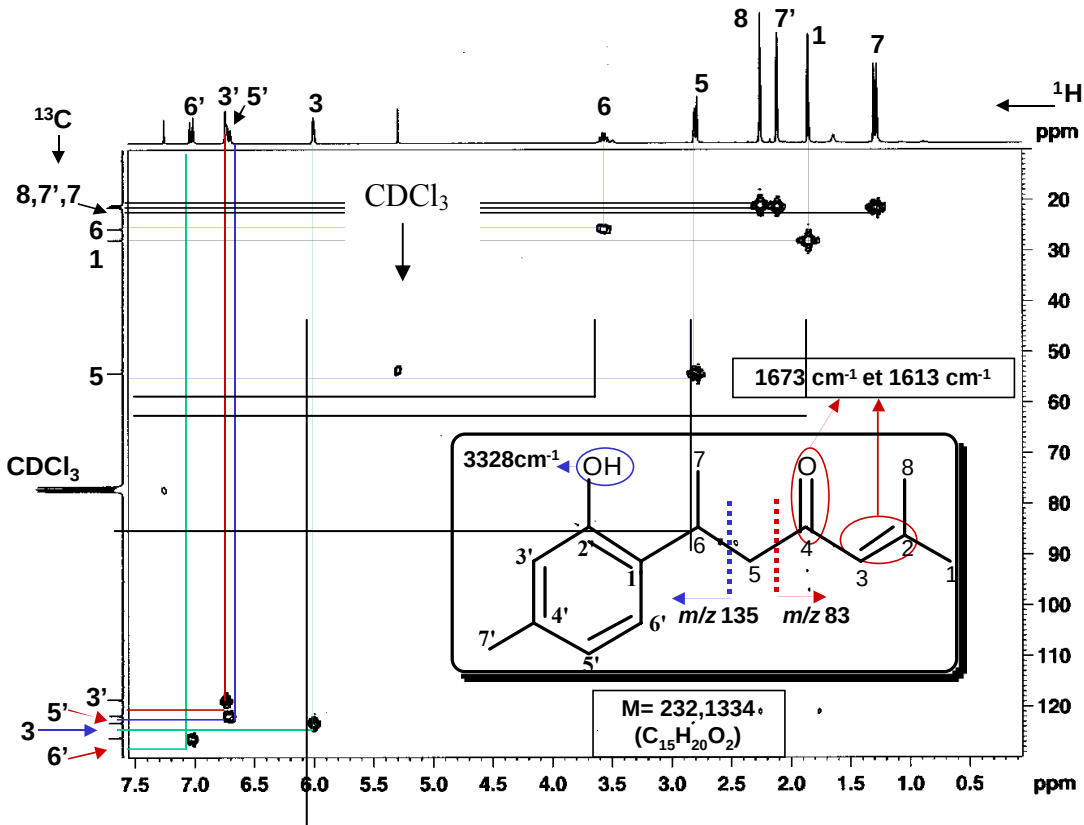
Spectre de masse haute résolution du composé D5-4 de *Myrmekioderma dendyi*



Spectre RMN bidimensionnelle du composé D5-3 de *Myrmekioderma dendyi*



nposé D5-4



ELSEVIER

Comparative Biochemistry and Physiology Part B 135 (2003) 297–308

CBP

www.elsevier.com/locate/cbpb

Phospholipid fatty acids and sterols of two *Cinachyrella* sponges from the Saudi Arabian Red Sea: comparison with *Cinachyrella* species from other origins

Gilles Barnathan[a,1], Emilie Genin[a], Nambinina E. Velosaotsy[a], Jean-Michel Kornprobst[a,*], Sultan Al-Lihaibi[b], Abdulmohsin Al-Sofyani[b], Rita Nongonierma[c]

[a]*ISOMer, SMAB group, Faculty of Pharmacy, University of Nantes, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 03, France*

[b]*Faculty of Marine Sciences, King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia*

[c]*Faculty of Pharmacy, Cheikh Anta Diop University, Dakar, Senegal*

Received 6 December 2002; received in revised form 9 March 2003; accepted 10 March 2003

Abstract

Phospholipid class compositions, fatty acids and sterols of the sponges *Cinachyrella alloclada* and *C. kükenthali* from the Saudi Arabian Red Sea were studied and compared with previous results for other *Cinachyrella* spp. collected in Senegal (East Atlantic) and New Caledonia (West Pacific). More than 50 fatty acids were identified as methyl esters and *N*-acyl pyrrolidides in each phospholipid mixture by GC/MS. Six fatty acids not hitherto found in nature were identified, namely 17-methyltetracosanoic in *C. kükenthali* and 18-methyltetracosanoic, 18-methylpentacosanoic, 18-methylhexacosanoic, 18,24-dimethyl-hexacosanoic and 6-bromo-5,9-nonacosadienoic acids in *C. alloclada*. Approximately 20 Δ5,9 unsaturated fatty acids were found, including three 6-brominated acids. The presence of bacteria was evidenced by the relatively high proportions of phosphatidylglycerol and high levels of branched short-chain fatty acids. A total of 20 free 3β-hydroxysterols were found by GC/MS, including clerosterol in relatively high amounts and gorgosterol in low amounts. The latter sterol has not been reported to date in a sponge. Comparisons with *Cinachyrella* species from other geographical areas show marked differences for both phospholipid fatty acid and sterol compositions.
© 2003 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: *Cinachyrella*; Fatty acids; New Caledonia; Phospholipids; Red Sea; Senegal; Sponges; Sterols

1. Introduction

Marine sponges are the most primitive multicellular animals and contain many bioactive and new metabolites, including lipids (Litchfield and Morales, 1976; Bergquist, 1978; Djerassi and Lam, 1991). Sponges have been able to adapt to their environments and this could be due to special structural features in their cell membranes, in particular unusual phospholipid fatty acids and sterols, since sterol–phospholipid interactions are assumed to play a major role in cell membranes (Morales and Litchfield, 1977; Djerassi and Lam, 1991). Several hypothetical intermediates have been further identified, thus providing a better understanding of already reported or novel metabolic pathways (Morales and Litchfield, 1977;

*Corresponding author. Tel: +33-2-51-12-56-88; fax: +33-2-51-12-56-79.

E-mail addresses: jean-michel.kornprobst@isomer.univ-nantes.fr (J.-M. Kornprobst), gilles.barnathan@isomer.univ-nantes.fr (G. Barnathan).

[1] Tel.: +33-2-51-12-56-89.

1096-4959/03/$ - see front matter © 2003 Elsevier Science Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/S1096-4959(03)00085-X

Carballeira et al., 1986; Djerassi and Lam, 1991; Barnathan and Kornprobst, 1992; Barnathan et al., 1996). Furthermore, particular fatty acids appear as biomarkers for symbiotic microorganisms (Gillan et al., 1988). In contrast with other living organisms, sponge phospholipid fatty acids are to a large extent as long as 23–34 carbon atoms. However, approximately 100 unprecedented sterols have been found in marine sponges with unique bioalkylations of the side chain and variations of the sterol nucleus (Bergquist, 1978; Bergquist et al., 1991; Djerassi and Lam, 1991). Sterols show great variation in quantity and composition (Walkup et al., 1981; Bergquist et al., 1991; Djerassi and Silva, 1991; Kerr and Baker, 1991; Aiello et al., 1999), although *Plakortis halichondroides* seems to be devoid of sterols (Carballeira and Shalabi, 1990).

This work aims at extending knowledge on sponge lipids, especially for the genus *Cinachyrella*, and on their distribution based on species and geographical origin. Little is known about sponge lipids from the Red Sea. The family Tetillidae, including the *Cinachyrella* genus, has been reevaluated (Rützler, 1987). We report here the phospholipid fatty acid and sterol compositions of two *Cinachyrella* species from Saudi Arabia Red Sea and compare these with previous data for sponges of the same genus originating from Senegal (tropical East Atlantic) and New Caledonia (tropical East Pacific) (Barnathan et al., 1992a,b, 1994; Barnathan, 1993; Barnathan and Kornprobst, 2000). Several new long-chain fatty acids are described.

2. Material and methods

2.1. General experimental procedures

Phospholipid analyses were performed on HPTLC silica gel (Merck) plates using a Camag densitometer and AMD apparatus (TLC scanner II, 366 nm, CATS evaluation software) with phospholipid standards purchased from Sigma. Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) coupling experiments were performed on a Hewlett Packard HP-5890 chromatograph linked to a HP-5989-A mass spectrometer (70 eV) equipped with a HP-9000-345 integrator, and using a 30-m×0.32-mm-i.d. fused silica capillary column coated with DB-1 (0.25-μm phase thickness). The carrier gas was helium. The column temperature was programmed for fatty acid methyl esters (FAMEs) and pyrrolidides from 180 to 310 °C at 3 °C min^{-1}, and for sterols and steryl acetates from 170 to 300 °C at 3 °C min^{-1}. Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer 257 spectrophotometer for liquid films between KBr plates.

2.2. Sponge material

All sponge specimens studied belong to the Tetillidae family (Demospongia, Tetractinomorpha, Spirophorida) and were collected in November 1997 in shallow waters (5–10 m deep) approximately 100 km north of Jeddah, Saudi Arabia. Both species were identified by comparison with authentic samples from Senegal. *Cinachyrella alloclada* Uliczka has several large porocalices and *C. kükenthali* Uliczka is devoid of porocalices (Barnathan et al., 1992a; Barnathan, 1993). Voucher specimens were deposited in the Faculty of Marine Science, King Abdulaziz University, Jeddah.

2.3. Extraction, isolation and analysis of phospholipids

The sponges were washed in seawater, carefully cleaned, cut in small pieces and steeped twice in chloroform/methanol (1:1 v/v) for 24 h at room temperature. The combined extracts yielded the crude total lipids. Phospholipids were separated from other lipids by column chromatography on silica gel (70–230 mesh) with hexane, dichloromethane (neutral lipids), acetone (glycolipids) and methanol (phospholipids) as successive eluents. The general methods used for isolation and analysis of lipid mixtures have been previously described (Barnathan et al., 1992a,b).

2.4. Preparation of fatty acid methyl esters and N-acyl pyrrolidides

The fatty acids obtained were converted into methyl esters by reaction (30 min under reflux) with methanolic hydrogen chloride. *N*-Acyl pyrrolidides were prepared by direct treatment of methyl esters with pyrrolidine/acetic acid (10:1 v/v) for 2 h under reflux and purified by TLC on 0.5-mm silica gel layers using hexane/diethyl ether (1:2 v/v).

Table 1
Lipid composition of the *Cinachyrella* sponges from different locations

Species	Lipid composition (%)				
	Neutral lipids		Glycolipids Acetone	Phospholipids Methanol	Sterols
	Hexane	DCM			
C. alloclada Red Sea	40.0	43.6	8.4	8.0	19.9
C. kükenthali Red Sea	37.9	36.5	16.9	8.7	26.9
C. alloclada Senegal[a]	40.8–41.6	39.8–45.0	8.9–9.6	5.1–9.6	17.3–23.4
C. kükenthali Senegal[a]	35.3–46.8	44.1–56.7	4.7–6.5	1.6–3.3	18.3–26.8
C. aff. *schulzei* New Caledonia	39.7	52.6	4.2	3.5	17.1

Free sterols were isolated as a part of neutral lipids eluted with dichloromethane.
[a] Values for three different sponge collections; see Section 2.

2.5. Isolation, purification and acetylation of sterols

Free sterol mixtures were readily isolated from all the sterol-containing chromatographic fractions (dichloromethane) obtained during the lipid class separation, by washing the dried product with methanol and purifying by column chromatography and/or preparative TLC. In some cases pure sterol samples were prepared by recrystallisation in methanol to obtain better mass spectra. The total sterols were acetylated with acetic anhydride/pyridine (1:1 v/v) for 20 h at room temperature. Sterols were analyzed in free form and as acetates by GC/MS.

GC retention times (RT) and mass spectral data (MS, 70 eV) of the new fatty acids are as follows:

17-Methyltetracosanoic acid pyrrolidide: RT, 28.95 min; MS, *m/z* (% relative intensity): 435 (M^+, 0.8), 420 (0.3), 406 (0.3), 392 (0.5), 378 (0.4), 364 (0.5), 350 (0.8), 336 (0.8), 322 (0.2), 308 (1.1), 294 (0.6), 280 (0.5), 266 (0.7), 252 (0.6), 238 (0.5), 224 (0.7), 210 (1.7), 196 (1.8), 182 (1.9), 168 (2.4), 154 (1.8), 140 (2.5), 126 (17.2), 113 (100), 98 (12.8).
18-Methyltetracosanoic acid pyrrolidide: RT, 28.52 min; MS, *m/z*: 435 (M^+, 0.8), 420 (0.3), 406 (0.3), 392 (0.5), 378 (0.4), 364 (0.8), 350 (0.7), 336 (0.2), 322 (1.1), 308 (0.5), 294 (0.5), 280 (0.6), 266 (0.5), 252 (0.8), 238 (0.7), 224 (1.0), 210 (2.0), 196 (1.1), 182 (2.0), 168 (2.3), 154 (1.8), 140 (2.6), 126 (16.4), 113 (100), 98 (11.8).
18-Methylpentacosanoic acid pyrrolidide: RT, 30.42 min; MS, *m/z*: 449 (M^+, 1.2), 434 (1.0), 420 (0.9), 406 (0.6), 392 (0.5), 378 (0.5), 364 (1.3), 350 (1.7), 336 (0.4), 322 (1.5), 308 (1.2), 294 (1.1), 280 (1.2), 266 (1.3), 252 (1.1), 238 (1.4), 224 (1.1), 210 (1.2), 196 (1.5), 182 (1.8), 168 (1.9), 154 (2.1), 140 (1.9), 126 (23.1), 113 (100), 98 (18.4).
18-Methylhexacosanoic acid pyrrolidide: RT, 32.40 min; MS, *m/z*: 463 (M^+, 2.0), 448 (0.8), 434 (1.0), 420 (1.0), 406 (0.8), 392 (0.9), 378 (1.0), 364 (2.2), 350 (2.1), 336 (0.1), 322 (2.6), 308 (0.8), 294 (1.1), 280 (1.2), 266 (1.0), 252 (1.4), 238 (1.9), 224 (1.6), 210 (1.0), 196 (2.4), 182 (2.7), 168 (2.5), 154 (2.3), 140 (2.5), 126 (15.3), 113 (100), 98 (7.8).
18,24-Dimethylhexacosanoic acid pyrrolidide: RT, 32.73 min; MS, *m/z*: 477 (M^+, 1.6), 462 (1.8), 448 (1.6), 434 (0.1), 420 (1.3), 406 (1.4), 392 (1.8), 378 (2.6), 364 (3.3), 350 (2.6), 336 (0.1), 322 (2.8), 308 (1.8), 294 (1.8), 280 (1.7), 266 (1.6), 252 (2.1), 238 (2.1), 224 (2.8), 210 (3.1), 196 (2.6), 182 (3.4), 168 (3.8), 154 (3.6), 140 (3.4), 126 (19.4), 113 (100), 98 (12.9).
6-Bromo-5,9-nonacosadienoic acid pyrrolidide: RT, 40.34 min; MS, *m/z*: 486 ($[M\text{-}Br]^+$, 8.1), 260 (9.7), 258 (9.5), 224 (2.5), 180 (12.9), 178 (12.4), 154 (3.7), 140 (2.1), 126 (16.1), 113 (100), 98 (18.9).

3. Results and discussion

3.1. Lipid and phospholipid classes

Total lipids accounted for 1.6–3.2% of dried sponge residues after extraction in all the *Cinachyrella* specimens studied, as for other specimens from various origins previously investigated (Barnathan et al., 1992a, 1994; Barnathan, 1993). Table 1 allows a comparison between several *Cinachyrella* sponges from different locations regarding the lipid composition that appears very similar.

Table 2
Phospholipid composition of the *Cinachyrella* sponges from the Red Sea

Phospholipid	Composition (wt.%)	
	C. alloclada	*C. kükenthali*
lyso-Phosphatidylcholine	2.6	–
Phosphatidylcholine	48.0	44.5
Phosphatidylethanolamine	6.7	14.9
Phosphatidylinositol	17.0	19.1
Phosphatidylglycerol	12.1	13.5
Phosphatidylserine	8.5	8.0
Diphosphatidylglycerol	5.1	–

Neutral lipids were always predominant, whereas phospholipids are the minor lipid class.

As determined by quantitative thin layer chromatography (Table 2), the major phospholipid classes were phosphatidylcholine (44–48%) and phosphatidylinositol to a lesser extent. Phosphatidylglycerol occurred at high levels, suggesting that bacteria were present, thus contributing to the chemicals further analyzed. The demospongic acids ($\geq C_{23}$) amounted to 17.8% in *C. kükenthali* and 35.2% in *C. alloclada*. As previously reported, they were generally mostly found as aminophospholipids, namely phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine, whereas the short-chain acids usually predominate in the common animal phosphatidylcholine (Djerassi and Lam, 1991).

3.2. Phospholipid fatty acid composition

More than 50 fatty acids were identified in each sponge, ranging from 10 to 30 carbon atoms (Table 3). Each fatty acid was identified, as the methyl ester or pyrrolidide, from its mass spectrum and its gas chromatography (GC) mobility (equivalent chain length, ECL values). Mass spectra of all fatty acid methyl esters analyzed showed molecular ion peaks, which allowed determination of the ECL values. *N*-Acyl pyrrolidides are known as useful derivatives for fatty acid analysis by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) since they have a more pronounced tendency to retain the positive charge under electron impact and give homologous fragments with an interval of 14 or 12 amu. A reduced or missing peak for a given fragment flanked by elevated expected peaks indicates a methyl branch at this position (Anderson, 1978). In addition, we have recently reported that ECL values determined for methyl esters and *N*-acyl pyrrolidides are found very similar for both derivatives with the exception of highly branched fatty acids (Mirallès et al., 1995). The fatty acids identified in Red Sea sponges are presented in Table 3.

3.3. Branched saturated fatty acids

As observed for species collected in other locations, both Red Sea sponges also contained a large range of iso and anteiso fatty acids typical for the occurrence of bacteria. Other branched fatty acids identified were 10-methylhexadecanoic (3.9%), 13-methylhexadecanoic (10.3%), 10-methyloctadecanoic and 12-methyleicosanoic (1.1%) acids, likely originating from bacteria (Vacelet, 1975; Bobbie and White, 1980; Walkup et al., 1981; Gillan et al., 1988; Carballeira et al., 1998). The rare 13-methylhexadecanoic acid was identified from Gorgonians (Mirallès et al., 1995). 11-Methyloctadecanoic acid was also found in some sponges (Walkup et al., 1981; Dasgupta et al., 1984). The main MS fragmentations are given in Fig. 1 for the new fatty acids described in this paper.

In the phospholipids of *C. alloclada* from the Red Sea, three new homologous 18-methyl branched long-chain acids accounted for 13.4% of the total acids. These new 18-methyl branched acids, with 25 (ECL = 24.38), 26 (ECL = 25.35) and 27 (ECL = 26.38) carbon atoms, respectively, were readily identified from the mass spectra of their pyrrolidide derivatives (see Fig. 1 and Section 2). The corresponding molecular ions were present (M^+ at m/z 435, 449 and 463, respectively). In addition, the fragment ion at m/z 336 was diminished and flanked by elevated peaks at m/z 322 and m/z 350, which clearly pointed towards the methyl group at C-18. Mass spectra for FAMEs depicted for all three acid McLafferty peaks at m/z 74 and the corresponding molecular ion peak. It is important to note that these 18-methyl fatty acids were only identified in *C. alloclada* from the Red Sea.

The new 17-methyltetracosanoic acid was identified in *C. kükenthali* (4.3%) from the mass spectrum of its pyrrolidide (ECL = 24.33) (Fig. 1) since the molecular ion was at m/z 435 and the corresponding fragmentation at m/z 322 was diminished and flanked by elevated peaks at m/z 308 and m/z 336, which pointed towards the methyl group at C-17. Some 19-methyl branched long-chain fatty acids were identified from sponge

Table 3
Phospholipid fatty acids identified from the Red Sea *Cinachyrella alloclada* and *C. kükenthali*

Fatty acid	Composition (wt.)	
	C. alloclada	*C. kükenthali*
Octanoic (8:0)	1.3	1.4
Decanoic (10:0)	1.5	2.3
Tetradecanoic (14:0)	1.4	2.1
4,8,12-Trimethyltridecanoic (br-16:0)	8.5	7.1
13-Methyltetradecanoic (i-15:0)	0.9	6.9
12-Methyltetradecanoic (a-15:0)	–	3.1
Pentadecanoic (15:0)	0.4	1.3
10,13-Dimethyltetradecanoic (br-16:0)	–	1.5
14-Methylpentadecanoic (i-16:0)	1.3	2.5
9-Hexadecenoic (16:1)	1.8	3.4
Hexadecanoic (16:0)	8.5	8.1
10-Methylhexadecanoic (br-17:0)	3.9	–
13-Methylhexadecanoic (br-17:0)	–	10.5
15-methylhexadecanoic (i-17:0)	1.7	3.7
14-Methylhexadecanoic (a-17:0)	1.8	1.2
9-Heptadecenoic (9-17:1)	–	1.0
Heptadecanoic (17:0)	0.9	1.3
9,12-Octadecadienoic (18:2)	0.2	0.6
9-Octadecenoic (18:1)	3.0	1.7
11-Octadecenoic (18:1)	3.0	2.5
Octadecanoic (18:0)	12.5	7.3
10-Methyloctadecanoic (br-19:0)	0.7	–
11-Methyloctadecanoic (br-19:0)	2.8	0.2
17-Methyloctadecanoic (i-19:0)	1.0	1.5
6-Nonadecenoic (19:1)	0.3	0.3
9-Nonadecenoic (19:1)	–	1.7
11-Nonadecenoic (19:1)	1.8	–
Nonadecanoic 19:0	1.4	0.3
14-(or 15)-Eicosenoic (20:1)[a]	0.4	0.1
12-Methyleicosanoic (br-21:0)	1.1	–
Docosanoic (22:0)	–	0.4
21-Methyldocosanoic (i-23:0)	0.7	–
17-Tetracosenoic (24:1)	0.7	0.6
Tetracosanoic (24:0)	0.2	0.3
17-Methyltetracosanoic (br-25:0)[b] #1	–	4.3
18-Methyltetracosanoic (br-25:0)[b] #2	4.5	–
Pentacosenoic (25:1)	0.3	0.5
18-Methylpentacosanoic (br-26:0)[b] #3	0.6	–
19-Hexacosenoic (26:1)	3.7	4.1
18-Methylhexacosanoic (br-27:0)[b] #4	7.4	–
25-Methyl-19 (or 20)-hexacosenoic (i-27:1)	1.3	–
18,24-Dimethylhexacosanoic (br-28:0)[b] #5	0.9	–
20-Heptacosenoic (27:1)	3.0	–
Nonacosanoic (29:0)	2.1	–
Δ5,9-Demospongic acids		
5,9-Octadecadienoic (18:2)	0.4	4.2
5,9,x-Hexacosatrienoicc	0.3	–
24-Methyl-5,9-pentacosadienoic (i-26:2)	–	0.4
23-Methyl-5,9-pentacosadienoic (a-26:2)	–	0.2
5,9-Hexacosadienoic (26:2)	0.2	0.4
25-Methyl-5,9-hexacosadienoic (i-27:2)	–	0.5
24-Methyl-5,9-hexacosadienoic (a-27:2)	–	2.0
5,9-Heptacosadienoic (27:2)	0.6	0.5
25-Methyl-5,9-heptacosadienoic (a-28:2)	–	3.0
5,9-Octacosadienoic (28:2)	4.0	0.8
Methyl-5,9-octacosadienoic (br-29:2)[a]	0.3	–

Table 3 *(Continued)*

Fatty acid	Composition (wt.)	
	C. alloclada	*C. kükenthali*
27-Methyl-5,9-octacosadienoic (i-29:2)	0.6	–
26-Methyl-5,9-octacosadienoic (a-29:2)	0.4	–
5,9-Nonacosadienoic (29:2)	1.0	Trace
6-Bromo-5,9-heptacosadienoic (Br-27:2)	0.2	Trace
5,9,23-Triacontatrienoic (30:3)	1.0	0.2
6-Bromo-5,9-octacosadienoic (Br-28:2)	1.0	Trace
6-Bromo-5,9-nonacosadienoic (Br-29:2)[b] #6	0.2	–
ΣΔ5,9	10.2	12.2
ΣLong-chain fatty acids ($\geq C_{23}$)	35.2	17.8

br, branched; i, iso; ai, anteiso; trace, <0.1%. Other minor fatty acids (< 0.2%) in *C. alloclada*: 9-17:1, i-20:0, 20:0, br-21:0, n-23:0, br-29:0, 29:1, 30:1, 31:2; and in *C. kükenthali*: n-12:0, br-14:0, 16:1, i-9-17:1, 9-17:1, 18:3, 20:0, 26:2, 30:2.

[a] The position of the methyl branch and/or double bond is still ambiguous.

[b] Unprecedented as natural compounds numbered as in Fig. 1.

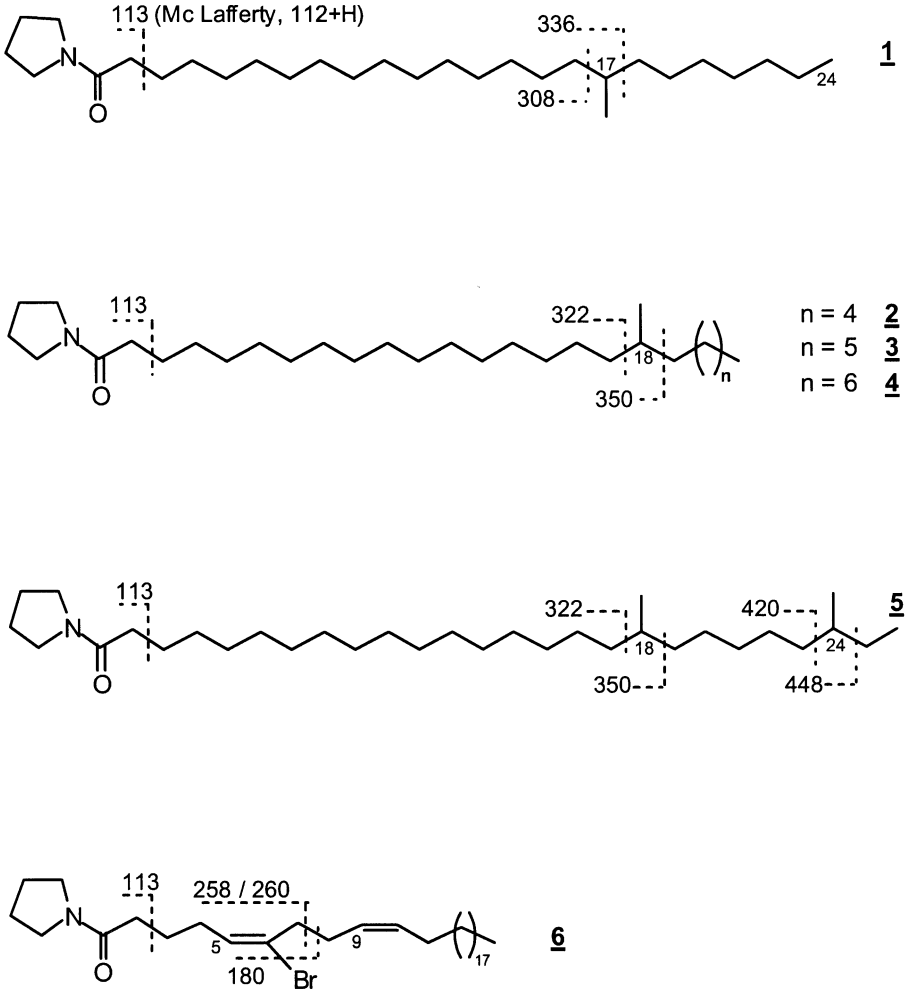
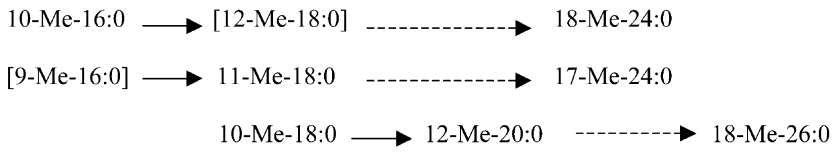


Fig. 1. Main mass spectral fragmentation (m/z) of the new fatty acids as pyrrolidide derivatives. Compounds are numbered as indicated in Table 3.



Scheme 1. Hypothetical but still unknown.

phospholipids (Dasgupta et al., 1984). The occurrence of bacteria in the sponges is supported by the huge levels of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol that are characteristic of bacterial membranes (Kates, 1964; Walkup et al., 1981; Gillan et al., 1988; Djerassi and Lam, 1991), and by the identification of several branched, short-chain acids typically of bacterial origin, such as iso- and anteiso-pentadecanoic, iso- and anteiso-heptadecanoic, 10-methylhexadecanoic, 13-methylhexadecanoic, 10-methyloctadecanoic, 16-methyl-9-hexadecenoic and 11-methyl-octadecanoic acids. Thus, the new, branched, long-chain acids probably arise from shorter precursors of exogenic origin through a homologation process, such as in Scheme 1.

10,13-Dimethyltetradecanoic acid has only been observed in a Carribean sponge (Carballeira and Maldonado, 1989). The mass spectrum of its pyrrolidide (ECL = 15.07) exhibited a molecular ion peak at m/z 309 (16:0 acid structure), and two homologous fragment ions at m/z 224 and m/z 280 were diminished (methyl branches at C-10 and C-13, respectively). A branched octacosanoic acid was identified as pyrrolidide derivative by GC/MS (ECL = 27.23) (Fig. 1). The spectrum exhibited the usual base peak at m/z 113, a molecular ion at m/z 477 (28:0 fatty acid structure) and two very weak fragment ions at m/z 336 and m/z 434 (methyl branches at C-18 and C-24, respectively). The spectrum of the corresponding methyl ester exhibited the usual base peak at m/z 74, the molecular ion peak at m/z 438 and an enhanced fragment ion at m/z 395 ($C_{25:0}$ fragment). Thus, we identified the new 18,24-dimethylhexacosanoic acid.

3.4. Isoprenoid fatty acids

Both Red Sea sponges contain 4,8,12-trimethyltridecanoic acid (4,8,12-TMTD) at significant levels (8.5 and 7.1% for *C. alloclada* and *C. kükenthali*, respectively) as shown in Table 4.

In all the other *Cinachyrella* sponges we have studied, isoprenoid acids were largely predominant. In contrast with all *Cinachyrella* previously studied, the Red Sea specimens did not contain the rare 5,9,13-trimethyltetradecanoic acid (5,9,13-TMTD) that seemed to be a specific pattern for this sponge genus (Barnathan et al., 1993; Kornprobst and Barnathan, 1998). No trace of the latter acid was detected in any *Cinachyrella* from the Red Sea, in ion monitoring GC/MS analyses of the methyl ester mixture (searching of molecular ion corresponding to a 17:0 acid structure in the area between pentadecanoic acid methyl ester and 14-methylpentadecanoic acid methyl ester). Here too, the comparison between *Cinachyrella* species collected in different locations shows interesting differences. The average content of 4,8,12-TMTD is the same for species from the Red Sea and New Caledonia, but 5,9,13-TMTD is lacking in Red

Table 4
Isoprenoid phospholipid fatty acids in the *Cinachyrella* genus

Species	Composition (%)	
	4,8,12-TM-13:0	5,9,13-TM-14:0
C. alloclada Red Sea	8.5	–
C. kükenthali Red Sea	7.1	–
C. alloclada Senegal[a]	14.5–36.7	0.4–1.5
C. kükenthali Senegal[a]	19.6–24.4	0.3–0.6
C. aff. *schulzei* New Caledonia	8.8	0.5

See Section 2; TM, trimethyl.
[a] Values for three different sponge collections. See Section 2.

Table 5
Fatty acid distribution in some *Cinachyrella* sponges from different locations

Cinachyrella species	Distribution (%)				
	Saturated		Monoenoic	Δ-5,9-dienoic	Δ-5,9,23–30:3
	Linear	Branched			
C. alloclada Red Sea	31	38	20	10	1
C. kükenthali Red Sea	26	44	18	12	Trace
C. alloclada Senegal	26–31	28–36	18–22	11–12	3–11
C. kükenthali Senegal	11–21	31–37	17–20	11–21	2–11
C. aff. *schulzei* New Caledonia	30	15	24	24	7

Trace, $<0.1\%$.

Sea sponges. On the contrary, *Cinachyrella* species from Senegal contain much more 4,8,12-TMTD than the former, but the content of 5,9,13-TMTD is the same as for the New Caledonia species. In addition, it should be noted that phytanic acid was not detected in both sponges.

3.5. Unsaturated fatty acids

It appears from Table 3 that the phospholipid fatty acid compositions of both *Cinachyrella* from the Red Sea are quite similar, even for Δ5,9 fatty acids: 13 acids (12.2%) in *C. kükenthali* and 13 acids (10.2%) in *C. alloclada*. The infrared spectrum of the phospholipid FAMEs displayed no prominent absorption at approximately 960–980 cm^{-1}, indicating the absence of (*E*)-unsaturation. It should be noted that high amounts of the short-chain 5,9-octadecadienoic acid (4.2%) were found in *C. kükenthali.* However, brominated Δ5,9 fatty acids found in *C. alloclada* only occur at trace levels in *C. kükenthali*, and this could be related to the amount of very long-chain fatty acids, which is greater in *C. alloclada* (35.2%) than in *C. kükenthali* (17.8%) (Wijekoon et al., 1984; Lam et al., 1989; Carballeira and Emiliano, 1993; Carballeira and Reyes, 1995; Barnathan et al., 1994).

The new 6-bromo-5,9-nonacosadienoic acid was characterized as the pyrrolidide derivative (Fig. 1), since the mass spectrum showed the usual base peak at m/z 113, brominated ions at m/z 258 and 260 of equal intensity due to the double allylic cleavage between C-7 and C-8 positions, an enhanced ion at m/z 180 due to the same cleavage after bromine loss, and the ion at m/z 486 after bromine loss from the molecular ion (Wijekoon et al., 1984; Barnathan et al., 1994). In addition, a plot of the retention time vs. carbon number of the already known brominated 6-bromo-Δ5,9-27:2 (ECL = 28.38) and 6-bromo-5,9-28:2 acids (ECL = 29.36) (Barnathan et al., 1994), and the new brominated Δ5,9-29:2 acid (ECL = 30.23), showed a quasi-linear relationship.

Comparison of the fatty acid distribution in *Cinachyrella* species collected in different oceanic areas shows marked differences that should be mentioned (Table 5).

First of all, the presence of the Δ5,9,23-30:3 acid was noted, which occurred in important amounts in *Cinachyrella* from Senegal (Barnathan et al., 1992a), with 11% in both species studied, but in low amounts (up to 1%) in Red Sea species. An intermediate value of 7% was observed for a species collected in New Caledonia (Barnathan et al., 1994). This implies that the total amount of Δ5,9 fatty acids mainly encountered in sponges is quite low for Red Sea sponges (10 and 12%) compared to Senegal (23 and 25%) and New Caledonia (30%). This variation is correlated with the respective content of saturated fatty acids, approximately 70% for Red Sea species, 56% for Senegalese species and 46% for the New Caledonian species.

3.6. Sterol composition

Sponge sterols are known to occur essentially in free form. Free sterols were readily isolated from the dichloromethane chromatographic fractions on crystallization from methanol. Sterols were analyzed by GC/MS in free form and as acetates. As shown in Table 6, the sterol compositions of both Red Sea sponges appear very similar, despite the fact that *C. alloclada* contains Δ7 sterols lacking in *C. kükenthali* and Δ22 sterols that occur only in low amounts in *C. kükenthali*.

The major components were brassicasterol, cho-

Table 6
Sterol compositions of *Cinachyrella* sponges from different locations

Sterol	Unsaturation pattern	M_w	Composition (%)				
			C. alloclada		*C. kükenthali*		*C.* aff. *schulzei* New Caledonia
			Red Sea	Senegal	Red Sea	Senegal	
24-Norcholestadienol	5,22	370	–	0.3/0.5	–	Trace/0.3	0.4
22(*Z*)-Dehydrocholesterol	5,22	384	2.3	0.4/0.8	1.4	0.2/0.6	1.5
22(*E*)-Dehydrocholesterol	5,22	384	5.3	8.4/7.0	4.8	3.2/4.7	7.2
22-Dehydrocholestanol	0	386	–	–/–	1.2	–/–	–
Cholesterol	5	386	14.5	22.4/22.6	11.3	19.3/19.6	18.9
Lathosterol	7	386	–	0.9/1.3	–	0.7/1.8	–
Cholestanol	0	388	3.1	2.1/3.2	5.4	3.3/10.6	0.6
Brassicasterol/crinosterol	5,22	398	24.3	15.8/13.8	18.8	14.9/8.7	18.5
24-Methylenecholesterol	5,24 (28)	398	0.3	Trace/0.3	0.4	Trace/1.5	tr.
Campesterol/dihydrobrassicasterol	5	400	11.0	8.1/9.3	14.2	6.2/6.6	4.4
Campesten-7-ol	7	400	–	–/–	2.1	–/–	–
22-Dehydrocampestanol	22	400	–	–/–	3.4	–/–	–
Campestanol	0	402	1.1	–/–	2.8	–/–	–
Poriferasterol/stigmasterol	5,22	412	0.8	4.5/4.4	1.0	5.0/2.1	7.1
23,24-Dimethylcholestadien-5,22-ol	5,22	412	–	2.2/–	–	3.1/–	–
Clerosterol	5,25	412	11.8	–/–	10.7	–/–	–
Fucosterol	5,24 (28)	412	–	1.8/2.6	–	3.2/9.5	2.0
Isofucosterol	5,24 (28)	412	–	–/–	–	0.3/0.4	2.4
Poriferasten-7-ol	7	412	–	–/–	0.7	–/–	–
Stigmasten-7-ol	7	412	–	–/–	1.0	–/–	–
Clionasterol	5	414	18.4	33.0/30.0	13.7	40.6/33.6	37.0
Sitosterol	5	414	0.7	–/–	0.9	–/–	–
22-Dehydrostigmastanol	22	414	1.6	–/–	2.0	–/–	–
Stigmastanol	0	416	4.2	–/–	3.6	–/–	–
Unidentified C_{30}[a]	5, X	426	0.3	–/–	0.5	–/–	–
Gorgosterol	5,22:23-CH_2	426	0.3	–/–	0.1	–/–	–

Data for Senegal samples show first value for shallow water sponges/second value for sponges at depth of 15–25 m.
[a] Base peak at $m/z=296$ and $(M\text{-}AcOH)^+$ at $m/z=408$.

Table 7
Comparison of sterol content according to unsaturation pattern and location

Unsaturation pattern	Sterol composition (%)				
	C. alloclada		*C. kükenthali*		*C.* aff. *schulzei* New Caledonia
	Red Sea	Senegal	Red Sea	Senegal	
Δ0	8.4	2.1/3.2	13.0	3.3/10.6	0.6
Δ5	44.4	63.6/61.9	40.1	66.1/59.8	60.4
Δ7	–	0.9/1.3	3.8	0.7/1.8	–
Δ22	1.6	–/–	5.4	–	–
Δ5,22	32.7	31.6/26.5	26.0	26.4/16.4	35.1
Δ5,24 (28)	0.3	1.8/2.9	0.3	3.5/11.4	3.9
Δ5,25	11.8	–/–	10.7	–/–	–

The unidentified C_{30} sterol and gorgosterol are not taken into account. Data for Senegal samples show first value for shallow water sponges/second value for sponges at a depth of 15–25 m.

lesterol, campesterol and clionasterol, which account for more than 10% in each sponge, but the major sterol is not the same according to the geographic sponge location. For both Senegalese species and for *C.* aff. *schulzei* from New Caledonia, the major sterol is clionasterol, at 33, 40 and 37%, respectively (Barnathan et al., 1992b). For both Saudi Red Sea species, the major sterol

is brassicasterol, at 19 and 24%, respectively. Comparison of the sterol composition according to unsaturation pattern and geographical locations gives interesting information.

It is clearly evident from Table 7 that important differences should be noted according to the geographical location. Δ22 and Δ5,25 sterols have only been identified in *Cinachyrella* species from the Red Sea. Clerosterol accounted for approximately 11% in both species. Conversely, Saudi Red Sea species are also poor in 24-methylene cholesterol. Stanols are quite lacking in the New Caledonia species, but are present in Senegal and Red Sea species, especially in the latter.

The as yet unidentified C_{30} sterol X (Table 6) is likely a sterol of 30 carbon atoms with a Δ24 (24′) unsaturated side chain, since the base peak is at m/z 296 and the ion due to the loss of acetic acid from the molecular ion at m/z 408 is less than 10% (Goad and Akihisa, 1997). Unfortunately, the low concentration of this sterol prevented further analysis. Another C_{30} sterol at low levels (0.1 and 0.3% in the species from the Red Sea) has been characterized from its mass spectrum as a Δ5 sterol with an extra double bond on the side chain. As a Δ5 sterol, its acetate exhibited intense ions at m/z 408 ($[M\text{-}AcOH]^+$) and m/z 255 (loss of the side chain from the latter ion) (Goad and Akihisa, 1997). The base peak was at m/z 296, due to the cleavage of cyclopropane, and the relative intensity of the ion at m/z 408 was 87 and 94% in two successive GC/MS experiments. Other primary cleavages were at m/z 337 (between C-23 and C-24) and m/z 213 (cleavage of the D ring). Moreover, comparison with an authentic sample isolated from a tunicate of the Indian Ocean and purified by HPLC confirmed that this sterol is gorgosterol (Viracaoundin, 2001). Thus, the most striking result of this study is the first report of gorgosterol in a marine sponge.

Gorgosterol was first isolated from gorgonians (Ciereszko et al., 1968). It has been shown that gorgosterol is associated with Zooxanthellae, the symbiotic unicellular algae (Withers et al., 1982). Diatoms and dinoflagellates are known to be important components of phytoplankton, and thus form the foundation of marine food chains. Gorgosterol is widespread in attached invertebrates such as gorgonians, but the association between marine sponges and Zooxanthellae appears to be less frequent. The partially verified biosynthesis starts from dinosterol supplied by dinoflagellates and requires successive transmethylation for side chain elaboration (Goad, 1978; Goad and Akihisa, 1997). The methyl group introduced arises from a transmethylation reaction requiring *S*-adenosylmethionine as a methyl group donor. The transfer of the electrophilic *S*-methyl group produces a cation, which is stabilized by proton loss. Of interest was the identification in Senegalese *Cinachyrella* sponges of the rare 23,24-dimethylcholesta-5,22-dien-3Δ-ol, an intermediate in the biosynthesis of gorgosterol, likely of symbiotic origin (Barnathan et al., 1992a).

To summarize, these *Cinachyrella* sponges are of particular interest since they can synthesize new methyl-branched long-chain fatty acids from short precursors, likely of bacterial origin. A new brominated Δ5,9 acid was characterized. In addition, the sterol composition of all the *Cinachyrella* species, regardless of geographic origin, appears similar, although clerosterol was found at high levels in the Red Sea sponges. Moreover, the latter sponges contain gorgosterol found for the first time in a sponge, whereas its biosynthetic intermediate, namely 23,24-dimethylcholesterol, was found in the Senegalese sponge specimens. The Central Pacific (New Caledonia), East Atlantic (Senegal) and Central Red Sea have very different ecological conditions, especially water temperature (small variations from 24 and 30 °C throughout the year for New Caledonia and Saudi Arabia, but larger variations from 14 to 28 °C along Senegalese coasts), but also for turbidity (Senegalese waters are rarely clear, whereas seawater in New Caledonia and the Central Red Sea are rarely turbid) and perhaps salinity. It is likely that at least some of these factors are implied in the differences observed in lipid compositions.

Acknowledgments

This work is part of the joint French–Saudi Research Program on Marine Natural Products from the Red Sea. We gratefully acknowledge the French Ministry of Foreign Affairs for financial and administrative support. We are also indebted to the IFREMER Research Center in Nantes (Dr J.P. Gouygou) where phospholipid analyses were carried out and to Dr Cécile Debitus, IRD Research Center in Nouméa, New Caledonia, for the gift of *Cinachyrella* aff. *schulzei* specimens.

References

Aiello, A., Fattorusso, E., Menna, M., 1999. Steroids from sponges: recent reports. Steroids 64, 687–714.

Anderson, B.A., 1978. Mass spectrometry of fatty acid pyrrolidides. Prog. Chem. Fats Other Lipids 16, 279–308.

Barnathan, G., 1993. Acides gras et stérols d'éponges marines du Sénégal et de Nouvelle-Calédonie. PhD Thesis. University of Nantes, France, pp. 191–198.

Barnathan, G., Kornprobst, J.M., 1992. Sponge fatty acids—2. Identification of three new C_{30} fatty acids in the marine sponge *Trikentrion loeve* Carter. Nat. Prod. Lett. 1, 201–207.

Barnathan, G., Kornprobst, J.M., 2000. Fatty acids from marine organisms: recent research developments. In: Baudimant, G., Guezennec, J., Roy, P., Samain, J.F. (Eds.), Marine Lipids. IFREMER Press, Brest, France, pp. 35–43.

Barnathan, G., Mirallès, J., Gaydou, E.M., Boury-Esnault, N., Kornprobst, J.M., 1992. New phospholipid fatty acids from the marine sponge *Cinachyrella alloclada*. Lipids 27, 779–784.

Barnathan, G., Mirallès, J., Njinkoué, J.M., et al., 1992. Sterol composition of three marine sponge species from the genus *Cinachyrella*. Comp. Biochem. Physiol. 103B, 1043–1047.

Barnathan, G., Mirallès, J., Kornprobst, J.M., 1993. Sponge fatty acids—4. Occurrence of two isoprenoid fatty acids (4,8,12-trimethyltridecanoic and 5,9,13-trimethyltetradecanoic) in phospholipids of marine sponges from the genus *Cinachyrella*. Nat. Prod. Lett. 3, 113–118.

Barnathan, G., Doumenq, P., Njinkoué, J.M., Debitus, C., Lévi, C., Kornprobst, J.M., 1994. Sponge fatty acids—3. Occurrence of complete series of n-7 monoenoic and iso-5,9 dienoic long-chain phospholipid fatty acids in the marine sponge *Cinachyrella* aff. *schulzei*. Lipids 29, 297–303.

Barnathan, G., Kornprobst, J.M., Doumenq, P., Mirallès, J., 1996. Sponge new unsaturated long-chain fatty acids in the phospholipids from the Axinellida sponges *Trikentrion loeve* and *Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*. Lipids 31, 193–200.

Bergquist, P., 1978. Sponges. Hutchinson University Library, London, pp. 84–98. also pp.136–180, 202–216.

Bergquist, P.R., Karuso, P., Cambie, R.C., Smith, D.J., 1991. Sterol composition and the classification of the Porifera. Biochem. System. Ecol. 19, 17–24.

Bobbie, R.J., White, D., 1980. Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. Appl. Environ. Microbiol. 39, 1212–1222.

Carballeira, N.M., Emiliano, A., 1993. Novel brominated phospholipid fatty acids from the Caribbean sponge *Agelas* sp. Lipids 28, 763–766.

Carballeira, N.M., Maldonado, M.E., 1989. New phospholipid fatty acids from the Caribbean sponge *Ectyoplasia ferox*. Lipids 24, 371–374.

Carballeira, N.M., Reyes, M., 1995. Identification of a new 6-bromo-5,9-eicosadienoic acid from the anemone *Condylactis gigantea* and *Palythoa caribaeorum*. J. Nat. Prod. 58, 1689–1694.

Carballeira, N.M., Shalabi, F., 1990. Identification of naturally occurring *trans*,*trans*-Δ-5,9 fatty acids from the sponge *Plakortis halichondroides*. Lipids 25, 825–840.

Carballeira, N.M., Thompson, J.E., Ayanoglu, E., Djerassi, C., 1986. Biosynthetic studies of marine lipids. 5. The biosynthesis of long-chain branched fatty acids in marine sponges. J. Org. Chem. 51, 2751–2755.

Carballeira, N.M., Pagan, M., Rodriguez, A.D., 1998. Identification and total synthesis of novel fatty acids from the Caribbean sponge *Calyx podatypa*. J. Nat. Prod. 61, 1049–1052.

Ciereszko, L.S., Johnson, M.A., Schmidt, R.W., Koons, C.B., 1968. Chemistry of coelenterates—VI. Occurrence of gorgosterol, a C_{30} sterol, in coelenterates and their Zooxanthellae. Comp. Biochem. Physiol. 24, 899–904.

Dasgupta, A., Ayanoglu, E., Djerassi, C., 1984. Phospholipids of marine organisms, new branched-fatty acids from *Strongylophora durissima*. Lipids 19, 768–776.

Djerassi, C., Lam, W.K., 1991. Sponge phospholipids. Acc. Chem. Res. 24, 69–75.

Djerassi, C., Silva, C.J., 1991. Sponge sterols: origin and biosynthesis. Acc. Chem. Res. 24, 371–378.

Gillan, F.T., Stoilov, I.L., Thompson, J.E., Hogg, R.W., Wilkinson, C.R., Djerassi, C., 1988. Fatty acids as biological markers for bacterial symbionts in sponges. Lipids 23, 139–145.

Goad, L.J., 1978. The sterols of marine invertebrates: composition, biosynthesis, and metabolites. In: Scheuer, P.J. (Ed.), Marine Natural Products, vol. 2. Academic Press, New York, pp. 75–172.

Goad, L.J., Akihisa, T., 1997. Mass spectrometry of sterols. Analysis of Sterols. Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, London, pp. 152–193.

Kates, M., 1964. Bacterial lipids. Adv. Lipid Res. 2, 17–90.

Kerr, R.G., Baker, J.T. 1991. Marine sterols. Nat. Prod. Rep., 465–497.

Kornprobst, J.M., Barnathan, G., 1998. Methoxy fatty acids in nature. Recent Res. Dev. Lipids Res. 2, 235–248.

Lam, W.K., Hahn, S., Ayanoglu, E., Djerassi, C., 1989. Phospholipid studies of marine organisms. 22. Structure and biosynthesis of a novel brominated fatty acid from a Hymeniacidon sponge. J. Org. Chem. 54, 3428–3432.

Litchfield, C., Morales, R.W., 1976. Are Demospongiae membranes unique among the living organisms? In: Harrison, F.W., Cowden, R.R. (Eds.), Aspects of Sponge Biology. Academic Press, New York, pp. 183–200.

Mirallès, J., Barnathan, G., Galonnier, R., et al., 1995. New branched-chain fatty acids from the Senegalese Gorgonian *Leptogorgia piccola* (white and yellow morphs). Lipids 30, 456–459.

Morales, R.W., Litchfield, C., 1977. Incorporation of 1-^{14}C-acetate into C_{26} fatty acids of the marine sponge *Microciona prolifera*. Lipids 12, 570–576.

Rützler, K., 1988. In: Vacelet, J., Boury-Esnault, N. (Eds.), Taxonomy of Porifera from the NE Atlantic and Mediterranean Sea, NATO-ASI Series G13. Springer Berlin, pp. 187–203.

Vacelet, J., 1975. Etude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). J. Microsc. Biol. Cell 3, 271–288.

Viracaoundin, I., 2001. Etude chimique et pharmacologique de deux ascidies de Mayotte (Océan Indien). Isolement d'alcaloïdes à noyau pyridoacridine. Analyse de la fraction lipidique. PhD Thesis. University of La Réunion, France.

Walkup, R.D., Jamieson, G.C., Ratcliff, M.R., Djerassi, C.,

1981. Phospholipid studies of marine organisms: 2. Phospholipid-bound fatty acids and free sterols of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas) *forma fulva* (=*Verongia thiona*). Isolation and structure elucidation of unprecedented branched fatty acids. Lipids 16, 631–646.

Wijekoon, W.M.D., Ayanoglu, E., Djerassi, C., 1984. Phospholipid studies of marine organisms: 9. New brominated demospongic acids from the phospholipids of two *Petrosia* species. Tetrahedron Lett. 31, 3285–3288.

Withers, N.W., Kokke, W.C.M.C., Fenical, W., Djerassi, C., 1982. Sterol patterns of cultured Zooxanthellae isolated from marine invertebrates: synthesis of gorgosterol and 23-desmethylgorgosterol by aposymbiotic algae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 24, 3764–3768.

PHOSPHOLIPID DISTRIBUTION AND PHOSPHOLIPID FATTY ACIDS IN FOUR SAUDI RED SEA SPONGES

NAMBININA VELOSAOTSY*, EMILIE GENIN*, RITA NONGONIERMA*, SULTAN AL-LIHAIBI**, JEAN-MICHEL KORNPROBST*, JEAN VACELET*** & GILLES BARNATHAN*

*Laboratoire de Chimie Marine, Groupe SMAB, Institut ISOMer, Faculté de Pharmacie, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 3, France
**Faculty of Marine Sciences, University of Jeddah, Saudi Arabia
***Centre d'Océanologie de Marseille, Station d'Endoume, Université de la Méditerranée-CNRS UMR 6540, France
E-Mail: Gilles.Barnathan@isomer.univ-nantes.fr, Jean-Michel.Kornprobst@isomer.univ-nantes.fr

ABSTRACT

Sponge phospholipids and phospholipid fatty acids were investigated in sponges collected in Saudi Red Sea, namely *Cinachyrella* sp_1, *Cinachyrella* sp_2, *Chalinula saudiensis* and *Stylissa carteri*. More than fifty fatty acids have been identified as methyl esters and *N*-acyl pyrrolidides in each fatty acid mixture by GC/MS. The presence of bacteria was evidenced from the relatively high proportions of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol, and the high levels of the branched short-chain fatty acids. *Cinachyrella* sponges contained eighteen typical Δ5,9 fatty acids, and new compounds, namely 17-methyltetracosanoic, 18-methyl tetracosanoic, 18-methylpentacosanoic, 18-methylhexacosanoic, 18,24-dimethylheptacosanoic and 6-bromo-Δ5,9-nonacosadienoic acids. Phospholipid fatty acids from *Stylissa carteri* were characterised by a high content of Δ5,9 fatty acids (55.5 %) and phytanic acid (20 %). *Chalinula saudiensis* contained several Δ5,9 fatty acids, including the rare 6-bromo-Δ5,9-octacosadienoic acid. Unexpected polyunsaturated fatty acids occurred in the two latter sponges, such as arachidonic and docosahexaenoic acids.

KEY WORDS

Sponge phospholipids, Red Sea, polyunsaturated fatty acids, branched-chain fatty acids, Δ5,9-diunsaturated fatty acids, Porifera.

INTRODUCTION

Marine sponges, have proved to be a rich source of many unusual phospholipid fatty acids. These acids are quite unusual and possess long chain (23-34 carbon atoms) and unique unsaturation pattern (Δ5,9) (DJERASSI & LAM, 1991). Thus, they contrast sharply with their common counterparts where the methylene-interrupted unsaturation pattern is found in numerous other organisms. The common polyunsaturated fatty acids (n-3) et (n-6) are quite rare in sponges. Phospholipid fatty acids were reported from *Cinachyrella* sponges originating from Senegal and New-Caledonia (BARNATHAN *et al.,* 1992, 1994). As part of our ongoing investigations (BARNATHAN *et al.,* 1996; BARNATHAN & KORNPROBST, 2000), phospholipids were analysed in sponges collected by scuba diving in Saudi Red Sea: *Chalinula saudiensis*,

Stylissa carteri, *Cinachyrella* sp1 and *Cinachyrella* sp2 (RÜTZLER, 1987). *Chalinula saudiensis* is a new sponge recently described (VACELET *et al.,* 2001). The sponge species are assigned according to the Systema Porifera (HOOPER & VAN SOEST, 2002; VAN SOEST *et al.,* 2002).

MATERIAL AND METHODS

Cinachyrella sp1 (Uliczca, 1929) and *Cinachyrella* sp2 (Uliczca, 1929) (Tetillidae)**,** *Stylissa carteri* (Dendy, 1989) (Dictyonellidae) and *Chalinula saudiensis* Vacelet *et al.,* 2001 (Haplosclerida, Chalinidae) were collected by hand (Scuba) in the Red Sea off Jeddah, at depth of 10 - 20 m. Sponges were steeped in CH_2Cl_2/MeOH (1:1, v/v) and the combined extracts yielded the crude total lipids. Phospholipids were separated from other lipids by column chromatography on silica gel with hexane, dichloromethane (neutral lipids), acetone (glycolipids), methanol (phospholipids). Phospholipids were subjected to acidic methanolysis. Fatty acid methyl esters were then treated by pyrrolidine/acetic acid. High performance thin layer chromatography (HPTLC) phospholipid analysis: plates precoated with silica gel 60F 254 (Merck), Linomat IV (Camag) for standards and sample application, primulin and molybdene blue for revelation, and TLC IL scanner, automated multiple development apparatus system consisting of CH_2Cl_2/MeOH (decreasing polarity). Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was performed on a HP 5890II chromatograph, DB-1 column (30 m x 0.25 mm, 0.33 µm phase thickness) linked to a HP 5989A spectrometer and a HP 98785A integrator.

RESULTS

In sponges, phosphatidylethanolamine was usually found as major class (DJERASSI & LAM, 1991). As shown in Tab. I, phosphatidylcholine was the major class in *Cinachyrella* sponges. High levels of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol revealed the important presence of bacteria in these sponges. This observation was confirmed by the detection of a lot of typical bacterial short-chain and branched fatty acids such as *iso*- and *anteiso*-pentadecanoic, *iso*- and *anteiso*-heptadecanoic.

Tab. I. Phospholipid composition of *Cinachyrella* sponges

Phospholipids	*Cinachyrella* sp1	*Cinachyrella* sp2
Lyso phosphatidylcholine	2.6	--
Phosphatidylcholine	48.0	44.5
Phosphatidylethanolamine	6.7	14.9
Phosphatidylinositol	17.0	19.1
Phosphatidylglycerol	12.1	13.5
Phosphatidylserine	8.5	8.0
Diphosphatidylglycerol	5.1	- -

Fatty acid derivative mixtures were analysed by GC/MS. Mass spectra of fatty acid methyl esters and *N*-acyl pyrrolidides (ANDERSSON, 1978; WALKUP *et al.,* 1981; BARNATHAN *et al.,* 1992; CARBALLEIRA & EMILIANO, 1993) showed a major fragment ion due to Mac Lafferty rearrangement at m/z 74 and 113, respectively, as well as a molecular fragment ion, and allowed detection and location of methyl branching and unsaturation in fatty acids (*N*-acyl pyrrolidides An ion at m/z 81 (methyl esters) and m/z 180 (pyrrolidides) was characteristic for Δ5,9 unsaturation. Each fatty acid derivative was identified by its GC mobility (Equivalent chain length, ECL) and its mass spectrum.

Tab. II. Phospholipid saturated and monounsaturated fatty acids from *Cinachyrella* sp_1, **A**, and *Cinachyrella* sp_2, **B** (minor fatty acids unreported).

Fatty acids	**A**[a]	**B**[a]
octanoic (8:0)	1.3	1.4
decanoic (10:0)	1.5	2.3
tetradecanoic (14:0)	1.4	2.1
4,8,12-trimethyltridecanoic (br-16:0)	8.5	7.1
13-methyltetradecanoic (i-15:0)	0.9	6.9
12-methyltetradecanoic (a-15:0)	-	3.1
pentadecanoic (15:0)	0.4	1.3
10,13-dimethyltetradecanoic (br-16 :0)	-	1.5
14-methylpentadecanoic (i-16:0)	1.3	2.5
9-hexadecenoic (16:1)	1.8	3.4
hexadecanoic (16:0)	8.5	8.1
10-methylhexadecanoic (br-17:0)	3.9	-
13-methylhexadecanoic (br-17:0)	-	10.5
15-methylhexadecanoic (i-17:0)	1.7	3.7
14-methylhexadecanoic (a-17:0)	1.8	1.2
11-heptadecenoic (17:1)	-	1.0
heptadecanoic (17:0)	0.9	1.3
9-octadecenoic (18:1)	3.0	1.7
11-octadecenoic (18:1)	3.0	2.5
octadecanoic (18:0)	12.5	7.3
11-methyloctadecanoic (br-19:0)	2.8	0.2
17-methyloctadecanoic (i-19:0)	1.0	1.5
9-nonadecenoic (19:1)	-	1.7
11-nonadecenoic (19:1)	1.8	-
nonadecanoic 19:0	1.4	0.3
17-tetracosenoic (24:1)	0.7	0.6
17-methyltetracosanoic (br-25:0)[b]	-	4.3
18-methyltetracosanoic (br-25:0)[b]	4.5	-
18-methylpentacosanoic (br-26:0)[b]	0.6	-
19-hexacosenoic (26:1)	3.7	4.1
18-methylhexacosanoic (br-27:0)[b]	7.4	-
25-methyl-19(or 20)-hexacosenoic (i-27:1)	1.3	-
18,24-dimethylhexacosanoic (br-28:0)[b]	0.9	-
20-heptacosenoic (27:1)	3.0	-
nonacosanoic (29:0)	2.1	-

Δ5,9 fatty acids

Fatty acids	**A**	**B**
5,9-octadecadienoic (18:2)	0.4	4.2
24-methyl-5,9-pentacosadienoic (i-26:2)	-	0.4
5,9-hexacosadienoic (26:2)	0.2	0.4
25-methyl-5,9-hexacosadienoic (i-27:2)	-	0.5
24-methyl-5,9-hexacosadienoic (a-27:2)	-	2.0
5,9-heptacosadienoic (27:2)	0.6	0.5
25-methyl-5,9-heptacosadienoic (a-28:2)	-	3.0
5,9-octacosadienoic (28:2)	4.0	0.8
27-methyl-5,9-octacosadienoic (i-29:2)	0.6	-
5,9-nonacosadienoic (29:2)	1.0	tr.
6-bromo-5,9-heptacosadienoic (Br-27:2)	0.2	tr.
5,9,23-triacontatrienoic (30:3)	1.0	0.2
6-bromo-5,9-octacosadienoic (Br-28:2)	1.0	tr.
6-bromo-5,9-nonacosadienoic (Br-29:2)[b]	0.2	-

br: branched; i: *iso*; ai: *anteiso*; tr.: traces (< 0.1 %). [a]Abundance in weight. [b]Unprecedented as natural compounds.

Cinachyrella sponges

Tab. II shows almost all phospholipid fatty acids. The demospongic acids (≥ 23 C) accounted for 17.8 % in *Cinachyrella* sp_2 and 35.2 % in *Cinachyrella* sp_1. It appears from Tab. II that the phospholipid fatty acid compositions of both *Cinachyrella* are quite similar, including thirteen Δ5,9 fatty acids accounting for about 11 % in both sponges. As observed, both sponges contained a large range of *iso* and *anteiso* fatty acids typical of bacteria. Other identified branched short-chain fatty acids were the 10-methylhexadecanoic, 13-methylhexadecanoic, 10-methyloctadecanoic and 12-methyleicosanoic acids, likely originating from bacteria (VACELET, 1975; BOBBIE & WHITE, 1980; WALKUP *et al.,* 1981; GILLAN *et al.,* 1988).

In *Cinachyrella* sp_1, three new homologous 18-methyl branched acids accounted for 13.4 % of the total acids with 25 (ECL = 24.38), 26 (ECL = 25.35) and 27 (ECL = 26.38) carbon atoms, respectively, were readily identified from the mass spectra of their pyrrolidides (Fig. 1). The new 18,24-dimethylhexacosanoic acid was identified as shown in Fig. 1.

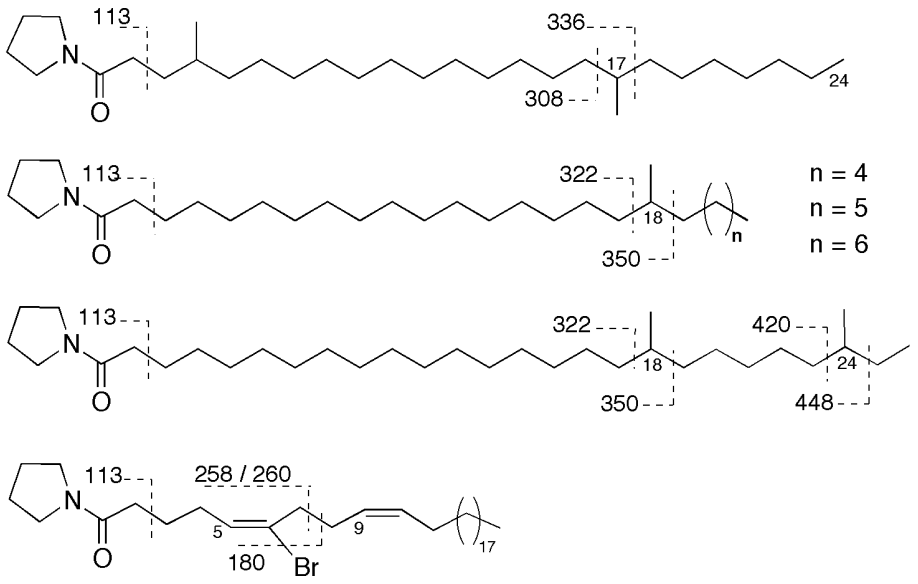


Fig. 1. Main MS fragmentation (*m/z*) of the new fatty acids (pyrrolidides).

The corresponding molecular ions were present and the corresponding fragment ion at *m/z* 336 was diminished and flanked by elevated peaks at *m/z* 322 and *m/z* 350, clearly pointed towards the methyl group at C-18. The new 17-methyltetracosanoic acid was identified in *Cinachyrella* sp_2 (4.3 %) from the mass spectrum of its pyrrolidide (ECL = 24.33) (Fig. 1) since the molecular ion was at *m/z* 435 and the corresponding fragmentation at *m/z* 322 was diminished and flanked by elevated peaks at *m/z* 308 and *m/z* 336 pointed towards the methyl group at C-17. The infrared spectrum of the fatty acid methyl esters indicated the absence of (*E*)-unsaturation. The new 6-bromo-5,9-nonacosadienoic acid was characterized as the

pyrrolidide derivative (Fig. 1) since the mass spectrum showed the usual base peak at *m/z* 113, the brominated ions at *m/z* 258 and 260 of equal intensity due to the double allylic cleavage between C-7 and C-8 positions, and an enhanced ion at *m/z* 180 due to the same cleavage after bromine loss, and the ion at *m/z* 486 after bromine loss from the molecular ion (WIJEKOON *et al.,* 1984; CARBALLEIRA & EMILIANO, 1993; BARNATHAN *et al.,* 1994).

Stylissa carteri

An unusual phospholipid fatty acid composition was observed as shown in Tab. III. Among fifty identified acids, only two of them represented 68 % of the total: 5,9-hexacosadienoic acid and phytanic acid (3,7,11,15-tetramethyl-16:0) accounting for 41 % and 20 % respectively. Polyunsaturated fatty acids quite unsual in sponges have been identified, namely Δ4,7,10,13,16-22:5, Δ9,12,15,18-22:4, Δ5,8,11,14-20:4 (arachidonic). Furthermore, we found a series of 2-hydroxylated saturated fatty acids with 23 to 26 carbon atoms.

Tab. III. Phospholipid fatty acids composition of *Stylissa carteri*

Fatty acids	ECL	%
i-16:0	15.60	1.0
9-16:1	15.77	1.3
16:0	16.00	4.1
9-17:1	16.80	0.7
17:0	17.00	0.5
3,7,11,15-TM-16:0	17.22	0.1
9,12-18:2	17.50	0.5
9-18:1	17.60	0.9
11-18:1	17.70	0.9
18:0	18.00	2.7
Δ5,8,11,14-20:4	18.93	2.5
11,15-20:2	19.70	0.8
11-20:1	19.87	0.5
Δ4,7,10,13,16-22:5	20.80	1.9
Δ9,12,15,18-22:4	20.99	0.5
17-23:1	23.06	tr
2-OH-22:0	23.17	tr
5,9-24:2	23.56	0.3
24:0	24.00	1.3
5,9-25:2	24.47	6.0
2-OH-24:0	25.27	1.8
5,9-26:2	25.52	41.5
9-26:1	25.80	8.6
2-OH-25:0	26.28	1.4
5,9-27:2	26.50	0.6
2-OH-26:0	27.28	tr
5,9-28:2	27.33	0.6

ECL = Equivalent chain length

Chalinula saudiensis

The major fatty acids were hexadecanoic, 9,12-octadecadienoic, octadecanoic, nonadecanoic, eicosanoic, docosanoic, tricosanoic and tetracosanoic acids. Several typical Δ5,9 fatty acids have been identified, including 5,9-octacosadienoic acid as major component of the series, and the unusual 6-bromo-5,9-octacosadienoic acid. These acids were identified as already explained. Polyunsaturated fatty acids such as

arachidonic acid and the acid Δ4,7,10,13,16,19-22:6 (DHA) accounting for 4.5 and 3.2 % respectively, have been identifed as N-acyl pyrrolidides.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Typical Δ5,9 demospongic acids were detected in all sponges. The *Cinachyrella* sponges were associated with a number of bacteria. As demonstrated by electron microscopy, symbiotic bacteria were remarkably few in number in *Chalinula saudiensis*. They are extracellular and localised in a few areas of the mesohyl where collagen fibrils accumulate (VACELET *et al.,* 2001). Furthermore, the occurrence of Cyanobacteria was occasionally observed in this study. Thus, the unexpected occurrence of arachidonic acid and docosahexaenoic acid (DHA) may be attributed to the associated Cyanobacteria. Although electron microscopy studies on *Stylissa carteri* are still to perform, one can suggest that polyunsaturated fatty acids likely originate from Cyanobacteria. This work increases knowledge on biochemistry of the Red Sea sponges, including a new one.

ACKNOWLEDGMENTS

The French Ministry of Foreign Affairs and the University of Jeddah are carefully aknowledged for financial and technical assistance. We warmly thank Dr. J.P. Gouygou, IFREMER, Nantes, for phospholipid class analysis, and G. Nourrisson, CNRS-University, Nantes for GC/MS experiments.

REFERENCES

ANDERSSON B.A., 1978 - Mass spectrometry of fatty acid pyrrolidides. *Progr. Chem. Fats other Lipids,* **16**: 279-308.

BARNATHAN G., DOUMENQ P., NJINKOUE J.M., DEBITUS C., LEVI C., KORNPROBST J.M., 1994 - Sponge fatty acids-3. Occurrence of complete series of n-7 monoenoic and *iso*-5,9 dienoic long-chain phospholipid fatty acids in the marine sponge *Cinachyrella* aff. *schulzei*. *Lipids,* **29**: 297-303.

BARNATHAN G., KORNPROBST J.M., 2000 - Fatty acids from marine organisms: recent research developments. In G. Baudimant, J. Guezennec, P. Roy, J.F. Samain (eds), *Marine Lipids.* International Symposium on Marine Lipids, IFREMER Press, Brest, France: 35-43.

BARNATHAN G., KORNPROBST J.M., DOUMENQ P., MIRALLES J., 1996 - Sponge new unsaturated long-chain fatty acids in the phospholipids from the Axinellida sponges *Trikentrion loeve* and *Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*. *Lipids,* **31**: 193-200.

BARNATHAN G., MIRALLES J., GAYDOU E.M., BOURY-ESNAULT N., KORNPROBST J.M., 1992 - New Phospholipid fatty acids from the marine sponge *Cinachyrella alloclada* Uliczca. *Lipids,* **27**: 779-784.

BOBBIE R.J., WHITE D., 1980 - Characterization of benthic microbial community structure by high-resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Appl. Environ. Microbiol.,* **39**: 1212-1222.

CARBALLEIRA N.M., EMILIANO A., 1993 - Novel brominated phospholipid fatty acids from the Caribbean sponge *Agelas* sp. *Lipids,* **28**: 763-766.

DJERASSI C., LAM W., 1991 - Sponge phospholipids. *Accounts Chem. Res.,* **24**: 69-75.

GILLAN F.T., STOILOV I.L., THOMPSON J.E., HOGG R.W., WILKINSON C.R., DJERASSI C., 1988 - Fatty acids as biological markers for bacterial symbionts in sponges. *Lipids,* **23**: 139-145.

HOOPER J.N.A., SOEST R.W.M. VAN, 2002 - Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, (2 vols) 1708 pp.

RÜTZLER K., 1987 - Tetillidae (Spirophorida, Porifera): a taxonomic re-evaluation. In J. Vacelet, N. Boury-Esnault (eds), *Taxonomy of Porifera From the N.E. Atlantic and Mediterranea Sea.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, *NATO ASI Ser.,* **G 13**: 187-203.

SOEST R.W.M. VAN, ERPENBECK D., ALVAREZ B., 2002 - Family Dictyonellidae van Soest, Diaz, Pomponi, 1990. In J.N.A. Hooper, R.W.M. van Soest (eds), *Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges.* Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, Vol. **1**: 773-786.

VACELET J., 1975 - Etude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *J. Microsc. Biol. Cell.,* **3**: 271-288.

VACELET J., AL-SOFYANI A., AL-LIHAIBI S., KORNPROBST J.M., 2001 - A new Haploslerid sponge species from the Red Sea. *J. Marine Biol. Assoc. UK,* **81**: 943-948.

WALKUP R.D., JAMIESON G.C., RATCLIFF M.R., DJERASSI C., 1981 - Phospholipid studies of marine organisms. 2. Phospholipid-bound fatty acids and free sterols of the sponge *Aplysina fistularis*. Isolation and structure elucidation of unprecedented branched fatty acids. *Lipids,* **16**: 631-646.

WIJEKOON W.M.D., AYANOGLU E., DJERASSI C., 1984 - Phospholipid studies of marine organisms: 9. New brominated demospongic acids from the phospholipids of two *Petrosia* species. *Tetrahedron Lett.,* **31**: 3285-3288.

UNUSUAL STEROL COMPOSITION AND CLASSIFICATION OF THREE MARINE SPONGE FAMILIES

GILLES BARNATHAN*, NAMBININA VELOSAOTSY*, SULTAN AL-LIHAIBI**, JEAN-MICHEL NJINKOUE*, JEAN-MICHEL KORNPROBST*, JEAN VACELET*** & NICOLE BOURY-ESNAULT***

*Laboratoire de Chimie Marine, Groupe SMAB, Institut ISOMer, Faculté de Pharmacie, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 3, France
**Faculty of Marine Sciences, University of Jeddah, Saudi Arabia
***Centre d'Océanologie de Marseille, Station marine d'Endoume, CNRS-Université de la Méditerranée, UMR 6540, France
E-Mail: Gilles.Barnathan@isomer.univ-nantes.fr, Jean-Michel.Kornprobst@isomer.univ-nantes.fr

ABSTRACT

Five sponge species belonging to the family Suberitidae are shown to contain 80-95 % of 5α-stanols, mainly cholestanol (51 - 74 %), confirming the data already known for this family. Three *Ciocalypta* species (Halichondriidae) contained four quite unusual 24-isopropyl and 24-isopropenyl Δ5 sterols, accounting for 70 - 80 % of the total sterol mixture, mainly 24-isopropylcholesterol (41 - 59 %). Fourteen A-*nor*-sterols were found as major sterols (66 - 72 % of the total sterol fraction) in *Stylissa carteri* (family Dictyonellidae). These results confirm that sterols can provide useful chemotaxonomic data for the classification of these sponge families.

KEY WORDS

Sterols, Suberitidae, Halichondriidae, Dictyonellidae, Axinellidae, *Ciocalypta, Acanthella, Stylissa,* chemotaxonomy.

INTRODUCTION

Sponges, which occupy a low position in the evolutionary scale, are difficult to classify due to their few available useful morphological characteristics (BERGQUIST, 1978). Thus, sponges often pose a difficult identification task for systematists. Among the various sponge metabolites, sterols have been well-documented since the pioneer studies (BERGMANN *et al.,* 1950). In contrast to the terrestrial sterols, sponge sterols show complex variations in both the tetracyclic nucleus and the side chain. Over 100 unprecedented sterols have been found to date from marine sponges.

Taxonomy is essential to the development of marine natural products. The use of taxonomic knowledge makes it possible to focus investigation on sponge genera which offer the greatest potential for biologically active compounds. Sterols were the first group of sponge metabolites to be used in biochemical taxonomic studies. Sterols are present in almost all species and show great variation in composition. Certain sponges possess very low sterol content or may be devoid of sterols. Several extensive studies have been achieved (BERGQUIST*,* 1978; BERGQUIST *et al.,* 1980,

1986, 1991), and helpful data have been obtained by comparing the complete sterol composition of different sponge species. The genus *Acanthella,* is well-known to contain a lot of nitrogen-containing terpenes but little is known about the membrane constituents of sponge species belonging to the family Dictyonellidae.

As part of our investigations on sponge sterols (SJOSTRAND *et al.,* 1981; BARNATHAN *et al.,* 1992, 2000; BARNATHAN, 1993), we conducted a comparative chemical study of sterols. A sufficient number of different sponge specimens was needed to allow group characteristics of families to be appraised. This work deals with sterol composition from sponge species belonging to the families Suberitidae (*Pseudosuberite*s, *Suberites, Rhizaxinella*), Halichondriidae (*Ciocalypta*) and Dictyonellidae (*Stylissa*).

MATERIAL AND METHODS

Sponges were collected along the Senegalese coast by hand at low tide (*Pseudosuberites* sp., **A**, and *Suberites massa,* **B**) or by Scuba diving at depths of 15 - 35 m (*Suberites* sp_1, **C**, *Suberites* sp_2, **D**, and *Rhizaxinella elongata*, **E**) (1987-1997). The three *Ciocalypta* species, namely sp_1, sp_2 and sp_3, were collected off Dakar, at depth of 20 - 30 m. *Stylissa carteri,* **L,** was collected by Scuba diving in the Red Sea off Jeddah, Saudi Arabia, at depth of 10 - 20 m. For all specimens, vouchers have been deposited at the Centre d'Océanologie de Marseille, Station marine d'Endoume.

Sterols were isolated during lipid class separation from fractions eluted by dichloromethane. Sterol mixtures were analysed by GC (OV-17) and by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) in free form, or as acetates. GC/MS experiments: HP-1 column (12 m, 0.2 mm i.d., 0.33 μm phase thickness). Temperature programmed at 7° C x min^{-1}, 150 - 300° C. A 30 m x 0.32 mm ID fused silica capillary column coated with DB-1 (0.25 μm phase thickness) was used to analyse sterol fractions from sponges **D**, **E** and **L**. The carrier gas was helium. Column temperature was programmed for steryl acetates from 170 to 300° C at 3° C x min^{-1}. Unusual 24-alkyl sterols were isolated and purified by high performance liquid chromatography HPLC (RP-18 column, MeOH) and studied by ^{1}H-nuclear magnetic resonance ^{1}H-NMR (Bruker AMX-500).

RESULTS

For some sponge species, several samples have been studied at different times of year. As shown below, a number of genera have not yet been investigated in the families Suberitidae, Halichondriidae and Dictyonellidae. The families Suberitidae, Halichondriidae and Dictyonellidae have been recently revised (respectively: VAN SOEST, 2002; ERPENBECK & VAN SOEST, 2002; VAN SOEST *et al.,* 1990, 2002).

Tab. I shows sponge families for which sterol composition has been reported. Among genera belonging to the family Axinellidae, Tab. I indicates those containing A-*nor*-sterols. The genus *Homaxinella* formerly classified as an axinellid sponge, is now assigned to Suberitidae and one species contains A-*nor*-sterols.

Tab. I. Classification of genera of four sponge families indicating those for which sterol composition is available. (Classification: HOOPER & VAN SOEST, 2002).

Tetractinomorpha	**Hadromerida**	**Suberitidae**
Aaptos[a] *Caulospongia Homaxinella*[c] *Plicatellopsis Prosuberites Protosuberites Pseudospongorites Pseudosuberites*[b] *Rhizaxinella*[b] *Suberites*[b] *Terpios*[a]		
Ceractinomorpha	**Halichondrida**	**Halichondriidae**
Amorphinopsis Axinyssa Ciocalapata Ciocalypta[b] *Epipolasis Halichondria Hymeniacidon*[a] *Laminospongia Spongosorites Topsentia Vosmaeria*		
Ceractinomorpha	**Halichondrida**	**Axinellidae**
Auletta Axinella[c] *Cymbastela Dragmacidon Dragmaxia Pararhaphoxia Reniochalina Phakellia*[c] *Phycopsis Ptilocaulis*		
Ceractinomorpha	**Halichondrida**	**Dictyonellidae**
Acanthella Dictyonella Liosina Lipastrotethya Phakettia Rhaphoxya Scopalina Stylissa[b] *Svenzea Tethyspira*		

[a] Data available on sterol composition. [b] This study. [c] Sponge containing A-*nor*-sterols

Suberitidae sterols

Tab. II gives data available on sterols from suberitid sponges (VAN SOEST, 2002). Major stanol content was formerly found in *Aaptos* sp., *Suberites compacta*, *S. domuncula*, *S. suberea*, *Terpios fugax* and *T. zeteki* (= *Suberites aurantiaca*) (BERGMANN *et al.,* 1950).

Tab. II. Reported 5α-stanol content (%) in Suberitidae.

Aaptos sp.	New Zealand	90.0	BERGQUIST *et al.,* 1980
Aaptos aaptos	Mediterranean	99.5	DINI *et al.,* 1984
Suberites carnosus	Mediterranean	86.0	DE SIMONE *et al.,* 1980
Suberites domuncula	Mediterranean	98.0	BERGQUIST *et al.,*1980
Suberites domuncula	Mediterranean	95.1	DINI *et al.,* 1984
Terpios zeteki (= *S. aurantiaca)*	Hawaii	90.8	DELSETH *et al.,* 1979

Tab. III shows the simplified sterol composition of our suberitid sponges. Sterol components were readily identified by GC-MS as recently reported (BARNATHAN *et al.,* 2000). Mass spectra of stanol acetates exhibited molecular ion peak M^+, and some diagnostic fragment ions, mainly m/z 215 as base peak (GOAD & AKIHISA, 1997). The level of only the major component of each sterol class is given. The complete composition has been given (BARNATHAN *et al.,* 2000). Four stanols occurred in each sponge accounting for 80 - 90 % of the total sterol mixture, including cholestanol as major component (51 - 74 %). Five usual Δ5-sterols accounted for 50 - 60 %, including sitosterol as major component. In addition, six Δ7-sterols were present at low levels except for lathosterol.

Tab. III. Sterol composition in suberitid sponges (for the meaning of **A** to **E**, see Materials and methods). All data are expressed as % of total sterol mixture.

Sterols	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
5α-Stanols	84.5	85.1	86.3	83,6	96.0
cholestanol	65.6	72.2	71.7	12,6	51.2
Δ5-Stenols	10.8	10.1	5.2	2.7	4.0
sitosterol	9.3	6.3	3.0	0.8	4.0
Δ7-Stenols	3.6	4.8	9.2	13.2	--
lathosterol	2.4	2.1	9.2	12.6	--

Halichondriidae sterols (*Ciocalypta*)

Tab. IV shows that the three species of brush-shaped *Ciocalypta* possessed similar sterol composition. 24-Isopropyl and 24-isopropenyl Δ5-sterols accounted for 75 - 89 % of the total sterol mixture. Mass spectra of the acetates displayed the $(M\text{-}AcOH)^+$ and $(M\text{-}AcOH\text{-}iPr)^+$ ions as expected for Δ5 sterols. These four unusual sterols were isolated by HPLC and identified by NMR.

Table 4. Sterol composition of three unidentified *Ciocalypta* species.

Sterols	*Ciocalypta*		
	sp_1	sp_2	sp_3
24-isopropenyl-22*E*-dehydrocholesterol	2.8	--	--
24-isopropenylcholesterol	9.7	--	--
24-isopropyl-22*E*-dehydrocholesterol	21.2	33.1	30.0
24-isopropylcholesterol	41.5	47.7	58.8
Other Δ5 sterols (5 to 9 compounds)	24.8	19.2	11.2

24-Isopropylcholesterol and 24-isopropyl-22*E*-dehydrocholesterol were initially identified as the only sterols in the Australian sponge *Pseudaxynissa* sp. (HOFHEINZ & OESTERHELT, 1979). 24-Isopropenyl sterols were identified in *Verongia* (= *Aplysina*) *cauliformis* and in further specimens of *Pseudaxynissa* sp. (TAM HA *et al.,* 1985). Structure of the side chain and of the nucleus (Fig. 2) of the major compounds are given below on Fig. 1 and Fig. 2.

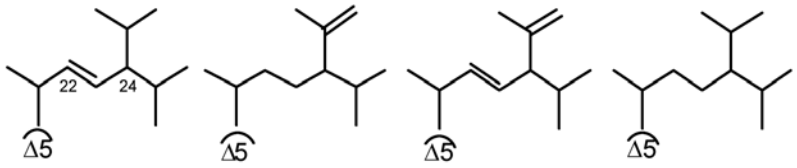


Fig. 1. Side chains of major 24-alkyl-sterols from *Ciocalypta* sponges.

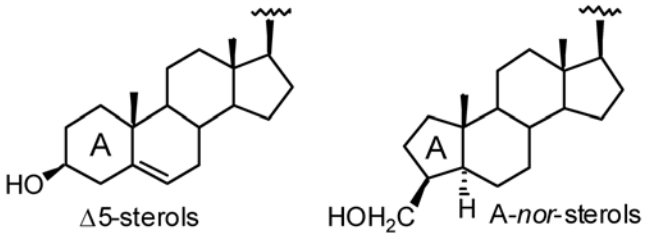


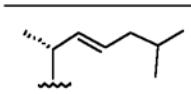
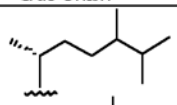
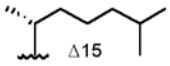
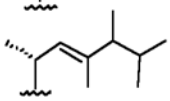
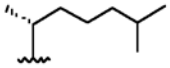
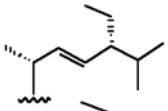
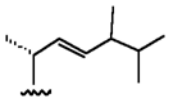
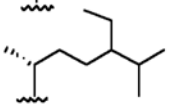
Fig. 2. Tetracyclic nucleus of usual Δ5 sterols and A-*nor*-sterols.

Dictyonellidae sterols (*Acanthella, Stylissa*)

The Saudi Red Sea sponge *Stylissa carteri* (**L**) contained mostly very uncommon A-*nor*-sterols associated with common sterols at low level (26 - 33 %). All sterol components were identified by GC-MS. Spectra of free A-*nor*-sterols display the molecular ion peak M^+ and the peak $(M\text{-}OCH_3)^+$. The base peak $(M\text{-}155)^+$ corresponds to the opening of cycle D and loss of $C_{11}H_{22}$ fragment. A rare Δ15 A-

nor-sterol was identified from diagnostic ions, mainly *m/z* 206 (GOAD & AKIHISA, 1997). Tab. V gives the composition of A-*nor*-sterols for *Stylissa carteri* (this study), *Acanthella aurantiaca (=Stylissa carteri)* collected in the Red Sea (BÖHLIN *et al.,* 1982), and *Acanthella cristagalli (=Stylissa carteri)* collected in Okinawa (TESHIMA *et al.,* 1984).

Tab. V. Major A-nor-sterols from *Stylissa carteri*[a], **L**; *Acanthella aurantiaca*[b], **M**; *Acanthella cristagalli*[c], **N***.

Side Chain	L	M	N	Side Chain	L	M	N
	1.7	5	4.2		13.5	9.0	20.7
 Δ15	7.5	6	5.7		2.1	-	-
	29.2	20	32.4		9.7	5.0	6.3
	24.2	28	18.1		10.5	15.0	10.7

[a] This study; [b] BÖHLIN *et al.,* 1982; [c] TESHIMA *et al.,* 1984. *Probably the same species *Stylissa carteri.*

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Only species of Suberitidae possess very high levels of 5α-stanols. All other sponge families investigated by us to date (Tetillidae, Axinellidae, Desmoxyidae, Euryponidae, Tedaniidae, Myxillidae) in the same collection sites along the Senegalese coast had usual sterol compositions, with 15 - 20 usual Δ5 3β-hydroxysterols including cholesterol, brassicasterol, campesterol, poriferasterol as major components (SJOSTRAND *et al.,* 1981; BARNATHAN *et al.,* 1992; BARNATHAN, 1993; BARNATHAN *et al.,* unpubl. data). It should be noted that a species *Homaxinella balfourensis* (genus now assigned to the Suberitidae) mainly contained 5α-stanols confirming our results (SELDES *et al.,* 1986). In the contrary, *Homaxinella trachys* that contains almost only A-*nor*-sterols does not seem to be a suberitid sponge but rather an axinellid sponge (EGGERSDORF *et al.,* 1982).

However stanols are present as major sterol components in some sponge species not belonging to Suberitidae. Thus, *Polymastia fusca*, also from the order Hadromerida but belonging to the family Polymastiidae (BOURY-ESNAULT *et al.,* 1990, BOURY-ESNAULT, 2002a), contained 96 % of stanols (DELSETH *et al.,* 1979). *Chondrilla nucula* (order Chondrosida, family Chondrillidae) (BOURY-ESNAULT & LOPES, 1985; BOURY-ESNAULT, 2002b) had 80 % of stanols (DELSETH *et al.,* 1979). *Axinella damicornis* belonging to the family Axinellidae (order Halichondrida) was reported to contain 99 % of stanols (DINI *et al.,* 1984). *Hymeniacidon perlevis*, belonging to the

family Halichondriidae, does not possess these 24-branched sterols, but appears to be close to the Suberitidae since it contains 73 % of stanols (ERDMAN & THOMSON, 1972).

About thirty years ago, A-*nor*-sterols were first isolated from *Axinella verrucosa* (MINALE & SODANO, 1974). A series of five 3β-hydroxymethyl-A-nor-steranes were identified in *Acanthella aurantiaca* (= *Stylissa carteri*) (BÖHLIN *et al.,* 1982) and four new A-nor-sterols were found in *Acanthella cristagalli* (= *Stylissa carteri*) (TESHIMA *et al.,* 1984). A-*Nor*-sterols were also identified in *Axinella proliferans* (AKNIN *et al.,* 1996) and in *Pseudaxynissa cantharella* (= *Cymbastela cantharella*), (DE NANTEUIL *et al.,* 1985). A-*Nor*-sterols have been found in sponges mainly from the family Axinellidae. Surprisingly, they have been found also in a Halichondriidae species *Hymeniacidon perlevis* (TESHIMA *et al.,* 1980). Thus, more work is required on other Halichondriidae using different chemotaxonomic markers or sequencing studies.

Furthermore, it should be noted that some Senegalese sponges, namely *Ptilocaulis* sp., *Axinella* sp., *Pseudaxinella lunaecharta* and *P.* cf. *lunaecharta* had usual sterols and no A-*nor*-sterols (SJOSTRAND *et al.,* 1981; BARNATHAN *et al.,* 1992; BARNATHAN, 1993; BARNATHAN *et al.,* unpubl. data). *Ciocalypta* sponges contained high amounts of 24-isopropyl Δ5 sterols and 24-isopropenyl Δ5 sterols. This feature was only found in *Pseudaxynissa* sp. (HOFHEINZ & OSTERHELT, 1979).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Profs. E. Fattorusso and A. Mangoni, Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali, Napoli, Italia, for NMR experiments; Prof. A. Samb for the assistance of the Laboratoire des Produits Naturels, Faculté des Sciences, Dakar, Senegal; H. El Ali, Océanium de Dakar, for organizing the dives and the collection of several sponges. Several students were associated with this work: R. Ganachaud, S. Markai and H. Miche.

REFERENCES

AKNIN M., GAYDOU E.M., BOURY-ESNAULT N., COSTANTINO V., FATTORUSSO E., MANGONI A., 1996 - *Nor*-sterols in *Axinella proliferans*, sponge from the Indian Ocean. *Comp. Biochem. Physiol.,* **113B**: 845-848.

BARNATHAN G., 1993 - Acides gras et stérols d'éponges marines du Sénégal et de Nouvelle-Calédonie. Ph. D. Thesis, University of Nantes, France.

BARNATHAN G., MIRALLES J., KORNPROBST J.M., MANGONI A., FATTORUSSO E., BOURY-ESNAULT N., 2000 - Unusual sterol composition and classification of two marine sponge families. In G. Baudimant, J. Guezennec, P. Roy, J.F. Samain (eds), *Marine Lipids*, International Symposium on Marine Lipids, IFREMER Press, Brest, France: 87-94.

BARNATHAN G., MIRALLES J., NJINKOUE J.M., MANGONI A., FATTORUSSO E., DEBITUS C., BOURY-ESNAULT N., KORNPROBST J.M., 1992 - Sterol composition of three marine sponge species from the genus *Cinachyrella*. *Comp. Biochem. Physiol.,* **103B**: 1043-1047.

BERGMANN W., MC TIGUE F.H., LOW E.M., STOCKES W.M., FEENEY R.J., 1950 - Sterols from sponges of the family Suberitidae. *J. Org. Chem.,* **15**: 96-105.

BERGQUIST P.R., 1978 - Sponges. Hutchinson of London, 268 pp.

BERGQUIST P.R., HOFHEINZ W., OSTERHELT G., 1980 - Sterol composition and the classification of the Demospongiae. *Biochem. Syst. Ecol.,* **8**: 423-435.

BERGQUIST P.R., KARUSO P., CAMBIE R.C., SMITH D.J., 1991 - Sterolcomposition and the classification of the Porifera. *Biochem. Syst. Ecol.,* **19**: 17-24.

BERGQUIST P.R., LAVIS A., CAMBIE R.C., 1986 - Sterol composition and the classification of the Porifera. *Biochem. Syst. Ecol.,* **14**: 105-112.

BÖHLIN L., SJÖSTRAND U., SODANO G., DJERASSI C., 1982 - Sterols. 33. Five new 3β-(hydroxymethyl)-A-*nor*-steranes from the Red Sea sponge *Acanthella aurantiaca*. Indirect evidence for transfer of dietary precursors, *J. Org. Chem.,* **47**: 5309-5314.

BOURY-ESNAULT N., 2002a - Family Polymastiidae Gray, 1867. In J.N.A. Hooper, R.W.M. van Soest (eds), *Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, Vol. **1**: 201-219.

BOURY-ESNAULT N., 2002b. Order Chondrosida Boury-Esnault & Lopès, 1985. Family Chondrillidae Gray, 1872. In J.N.A. Hooper, R.W.M. van Soest (eds), *Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, Vol. **1**: 291-297.

BOURY-ESNAULT N., DE VOS L., DONADEY C., VACELET J., 1990 - Ultrastructure of choanosome and sponge classification. In K. Rützler (ed), *New Perspectives in Sponge Biology*. Third International Conference on Biology of Sponges, Smithsonian Inst. Press, Washington, D.C.: 237-244.

BOURY-ESNAULT N., LOPES M.T., 1985 - Les Démosponges littorales de l'Archipel des Açores. *Ann. Inst. Océanogr.,* **61** (2): 149-225.

DE NANTEUIL G., AHOND A., POUPAT C., POTIER P., PUSSET M., PUSSET J., 1985 - Isolement et identification de onze hydroxymethyl-3β-*nor*-A cholestane du spongiaire *Pseudaxinella cantharella*. *Tetrahedron,* **41**: 6035-6039.

DE SIMONE F., SENATORE F., ZOLLO F., SICA D., 1980 - Synthesis of two stanols identified in the sponge *Suberites carnosus*. *Gazz. Chim. Ital.,* **110**: 147-150.

DELSETH C., TOTELA L., SCHEUER P.J., WELLS R.J., DJERASSI C., 1979 - 5α-24-Norcholestan-3β-ol and (24*Z*)-stigmasta-5,24(28)-trien-3β-ol, two new marine sterols from the Pacific sponges *Terpios zeteki* and *Dysidea herbacea*. *Helv. Chim. Acta,* **62**: 101-109.

DINI A., FALCO B., FERRIGNI M., MARINO A., SICA D., 1984. The sterols of two Hadromerida sponges. *Experientia,* **40**: 170-171.

EGGERSDORFER M.L., KOKKE W.C.M., CRANDELL C.W., HOCHLOWSKI J.E., DJERASSI C., 1982 - Sterols in marine invertebrates. 32. Isolation of 3β-(hydroxymethyl)-A-*nor*-5α-cholest-15-ene, the first natural occurring sterol with a 15-16 double bond. *J. Org. Chem.,* **47**: 5304-5309.

ERDMAN T.R., THOMSON R.H., 1972 - Sterols from the sponges *Cliona celata* and *Hymeniacidon perleve*. *Tetrahedron,* **28**: 5163-5173.

ERPENBECK D., SOEST R.W.M. VAN, 2002 - Family Halichondriidae Gray, 1867. In J.N.A. Hooper, R.W.M. van Soest (eds), *Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, Vol. **1**: 787-815.

GOAD L.J., AKIHISA T., 1997 - Mass spectrometry of sterols. In L.J. Goad, T. Akihisa (eds), *Analysis of Sterols*. Blackie Academic and Professionnal, Chapman & Hall, London, UK: 152-195.

HOFHEINZ W., OSTERHELT G., 1979 - 24-Isopropyl and 22-dehydro-24-isopropylcholesterol, novel sterols from a sponge *Pseudaxinissa* sp. *Helv. Chim. Acta,* **62**: 1307-1309.

HOOPER J.N.A., SOEST R.W.M. VAN, 2002 - Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, (2 vols) 1708 pp.

MINALE L., SODANO G., 1974 - Marine sterols: unique 3β-hydroxymethyl-A-*nor*-5α-steranes from the sponge *Axinella verrucosa*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*: 2380-2384.

SELDES A.M., ROVIROSA J., SAN MARTIN A., GROS E.G., 1986 - Steroids from aquatic organisms. XII. Sterols from the antartic sponge *Homaxinella balfourensis* (Ridley and Dendy). *Comp. Biochem. Physiol.,* **83**: 841-842.

SJOSTRAND U., KORNPROBST J.M., DJERASSI C., 1981 - Two new marine sterols from the sponge *Pseudaxinella lunaecharta*. *Steroids,* **38**: 355-364.

SOEST R.W.M. VAN, 2002 - Family Suberitidae Schmidt, 1870. In J.N.A. Hooper, R.W.M. van Soest (eds), *Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, Vol. **1**: 227-244.

SOEST R.W.M. VAN, DIAZ M.C., POMPONI S.A., 1990 - Phylogenetic classification of the halichondrids (Porifera, Demospongia). *Beaufortia,* **40** (2): 15-62.

SOEST R.W.M. VAN, ERPENBECK D., ALVAREZ B., 2002 - Family Dictyonellidae Van Soest, Diaz, Pomponi, 1990. In J.N.A. Hooper, R.W.M. van Soest (eds), *Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, Vol. **1**: 773-786.

TAM HA T.B., KOKKE W.C.M.C., PROUDFOOT J.R., DJERASSI C., THOMPSON J., 1985 - Minor and trace sterols in marine invertebrates 53 (1): further novel marine sterols resulting from triple and quadruple biomethylation of the cholesterol side-chain. *Steroids,* **45**: 263-276.

TESHIMA S., KANAZAWA A., HYODO S., 1980 - 3β-Hydroxymethyl 24-methylene-A-*nor*-cholestane from the sponge *Hymeniacidon*. *Bull. Jpn. Soc. Fish. Oceanogr.,* **46**: 1517-1520.

TESHIMA S., KANAZAWA A., YAMADA I., 1984. Occurrence of 3β-hydroxymethyl-A-*nor*-sterols in the sponge *Acanthella cristagalli*. *Nippon Suisan Gakkaishi,* **50**: 707-712.

ETUDE DE LIPIDES D'EPONGES MARINES : PHOSPHOLIPIDES, ACIDES GRAS, STEROLS - IDENTIFICATION ET EVALUATION PHARMACOLOGIQUE DE METABOLITES SECONDAIRES

RESUME

La composition en classes de lipides, phospholipides, acides gras, stérols a été déterminée chez neuf éponges marines : *Chalinula saudiensis*, *Cinachyrella alloclada*, *C. kükenthali*, *Stylissa carteri* (mer Rouge), *Axinyssa djiferi*, *Trikentrion laeve*, *Geodia* sp. (Atlantique), *Myrmekioderma dendyi* (Pacifique), *Aaptos papillata* (Méditerranée). Le couplage CPG/SM a permis d'identifier les lipides à l'état d'esters méthyliques, *N*-acylpyrrolidides, et d'acétates. Plusieurs nouveaux acides ont été caractérisés. Les acides polyinsaturés conventionnels ne sont significativement présents que chez *C. saudiensis*. Une vingtaine d'acides Δ5,9 sont identifiés y compris des acides bromés. Des acides gras 2-hydroxylés et de nombreux acides ramifiés, nouveaux ou rares sont caractérisés. Les stérols sont de type conventionnel pour la plupart des éponges, sauf pour *Stylissa carteri* qui contient majoritairement des *nor*-A-stérols. Un deux métabolites secondaires identifiés a des propriétés neurostatiques.

Mots clés: éponges, phospholipides, acides gras, stérols, terpènes, couplage CPG-SM

STUDY OF LIPIDS FROM MARINE SPONGES : PHOSPHOLIPIDS, FATTY ACIDS, STEROLS - IDENTIFICATION AND PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF SECONDARY METABOLITES

ABSTRACT

The lipid composition : phospholipid fatty acids and sterol composition were studied in nine sponges from the Red Sea (*Chalinula saudiensis*, *Cinachyrella alloclada*, *C. kükenthali*, *Stylissa carteri*), the Atlantic Ocean (*Axinyssa djiferi*, *Geodia* sp., *Trikentrion laeve*), the Pacific Ocean (*Myrmekioderma dendyi*), and from the Mediterranean Sea (*Aaptos papillata*). GC-MS was the principal technique to identify the lipidic structures as methyl esters, *N*-acyl pyrrolidides, and steryl acetates. About twenty □5,9 fatty acids were observed in this study, including brominated ones. In some sponges, several 2-hydroxy fatty acids, and branched saturated and unsaturated fatty acids were identified. Sterols were found common in these sponges, with 26 to 31 carbon atoms, apart from the sponges *Stylissa* that contained mainly a series of A-*nor*-sterols. One of the two secondary metabolites One of the two identified secondary metabolites showed a neurostatic activity (tested against diptera larves).

Key words : marine sponges, phospholipids, fatty acids, sterols, terpenes, GC-MS