

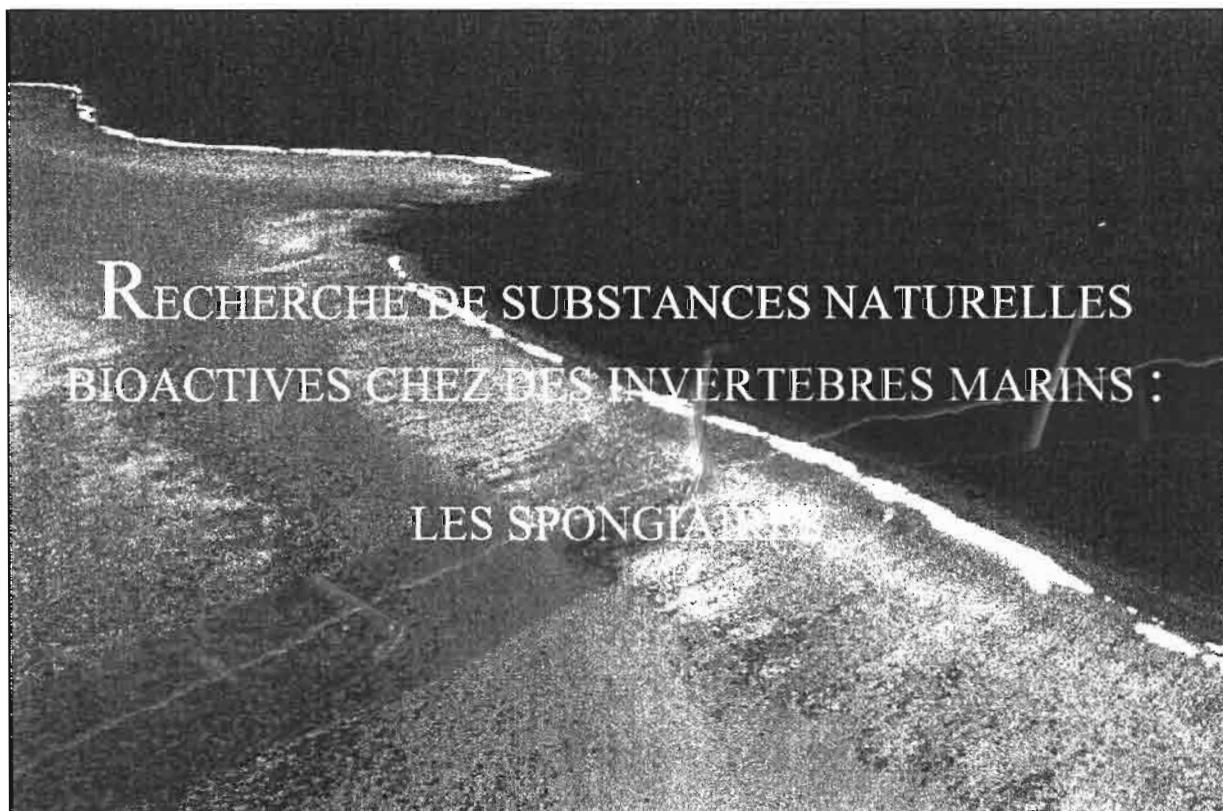


*Institut de Recherche  
pour le Développement*

## Rapport de stage



*Université  
de la Nouvelle-Calédonie*



**COCHARD Cédric**  
DEUG de sciences de la matière

Sous la direction de :  
Maryvonne FROSTIN  
Isabelle DESVIGNES  
Jacques PUSSET

16 octobre 2001 au 14 décembre 2001  
7 janvier 2002 au 1<sup>er</sup> février 2002

Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles  
IRD/UNC de NOUMEA

En relation avec les études que je poursuis à l'Université de Nouvelle Calédonie (DEUG de Sciences mention Sciences de la Matière), j'ai pu suivre un stage au sein du Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles I.R.D./U.N.C. Ce stage s'est déroulé du 16 octobre au 14 décembre 2001 et du 7 janvier au 1<sup>er</sup> février 2002 sous la direction de Madame FROSTIN et de Madame DESVIGNES, toutes deux Maîtres de Conférences de Chimie à l'Université de la Nouvelle Calédonie et de Monsieur PUSSET, chercheur au CNRS.

## REMERCIEMENT

Je remercie le directeur du Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles I.R.D./U.N.C. (L.P.S.N.), Monsieur Dominique LAURENT pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et permis de collaborer à une mission océanographique sur le navire de l'I.R.D., L'Alis.

Je remercie tout particulièrement, Madame FROSTIN, Madame DESVIGNES et Monsieur PUSSET ainsi que Monsieur HNAWIA pour m'avoir guidé et suivi dans mon travail.

Une pensée toute particulière à Mademoiselle Raphaële BOYDRON pour m'avoir prodigué conseils et encouragements.

Un grand merci à Madame Véronique GAUDICHON et Antoine HOLUE pour leur bonne humeur et leur sympathique accueil.

Enfin je remercie le commandant PRONER et tout l'équipage de l'Alis ainsi que l'équipe des plongeurs de L'I.R.D. et particulièrement Monsieur Pierre LABOUTE pour m'avoir fait partager leur passion du monde marin.

# SOMMAIRE

1. INTRODUCTION .....	3
2. LA COLLABORATION ENTRE L'I.R.D. ET L'U.N.C. ....	4
3. DÉMARCHE GÉNÉRALE POUR LA RECHERCHE DE SUBSTANCES NATURELLES D'INTÉRÊT BIOLOGIQUE .....	6
3.1 Sélection des organismes .....	6
3.2 Prospection et récolte .....	6
3.3 L'identification .....	7
3.4 L'extraction .....	7
3.5 Screening biologique .....	9
3.5.1 Tests de cytotoxicité sur les cellules Kb .....	9
3.5.2 Tests antibiotiques et antifongiques.....	9
3.5.3. Tests antiviraux (virus de la dengue).....	9
3.6 Séparation et fractionnement chimique .....	10
3.7 Analyse structurale .....	11
3.8 Analyses pharmacologiques .....	12
3.9 Phase industrielle - Synthèse chimique du produit .....	12
4. LA BIODIVERSITÉ MARINE DE NOUVELLE-CALÉDONIE.....	13
4.1 Généralités sur les éponges .....	13
4.2 Caractéristiques générales.....	13
4.3 Morphologie et anatomie .....	14
4.4 Reproduction.....	14
4.5 Des éponges très particulières.....	15
5. PRÉSENTATION DE L'ÉPONGE <i>SPONGIA AUSTRALIS</i> BERGQUIST TRAITÉE SOUS LA RÉFÉRENCE R 1561.....	17
6. LA DENGUE .....	18
6.1 Epidémiologie.....	18
6.2 Symptômes.....	19
6.3 Moyens de lutte et résultats déjà obtenus .....	19
7. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	20

<u>8. MISSION DE PROSPECTION ET DE RÉCOLTE</u> .....	22
<u>9. ETUDE SUR SPONGIA AUSTRALIS BERGQUIST</u> .....	23
<u>9.1 Etude sur les fractions MF66-423 et MF66-424</u> .....	23
9.1.1 Préparation du fractionnement chimique sur MF66-423 et MF66-424 .....	23
9.1.2 Fractionnement chimique de MF66-424.....	24
9.1.3 Fractionnement chimique sur MF66-423.....	26
9.1.4 Conclusion .....	27
<u>9.2. Etude sur l'extrait C de l'éponge 1561</u> .....	28
9.2.1. Premier fractionnement chimique.....	28
9.2.2. Deuxième fractionnement sur CC1-3 .....	29
9.2.3. Analyse et séparation sur HPLC.....	30
<u>9.3. Discussion</u> .....	33
<u>10. CONCLUSION</u> .....	34
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....	35
<u>LISTE DES ABRÉVIATIONS</u> .....	36
<u>ANNEXE</u>	
<u>LISTING DES QUANTITÉS DE PRODUITS RESTANTS</u>	

## 1. INTRODUCTION

Le lagon calédonien, considéré comme un des plus grands lagons du monde, abrite une biodiversité d'une extrême richesse. Des espèces de tout ordre se sont adaptées aux conditions parfois particulières qu'impose ce milieu marin. Au cours de leur évolution, certaines ont même développé la production de métabolites qui peuvent se révéler des molécules bioactives très intéressantes pour la recherche pharmaceutique.

Le Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles, issu de la collaboration entre l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Nouméa et l'Université de Nouvelle-Calédonie (UNC), s'implique dans la mise en évidence d'activités antibiotiques, antifongiques, cytotoxiques ou antivirales chez les invertébrés marins. La recherche s'oriente plus particulièrement vers les spongiaires et les ascidies dont le potentiel pharmacologique est très important compte tenu de leur forte contenance en molécules azotées (peptides, alcaloïdes, etc.).

Récemment l'activité antivirale sur le virus de la dengue de l'éponge *Spongia australis* Bergquist, a éveillé l'intérêt des chercheurs. Il n'existe pour le moment aucun traitement contre ce virus en pleine explosion dans les régions équatoriales. La découverte d'une telle molécule se révèle donc du plus grand intérêt.

## 2. LA COLLABORATION ENTRE L'I.R.D. ET L'U.N.C.

### ➤ L'Institut de Recherche pour le Développement (I.R.D) <sup>1</sup>

L'IRD est un établissement public à caractère scientifique et technologique, placé sous la tutelle des ministres chargés de la Recherche et de la Coopération.

Depuis cinquante ans, l'Institut conduit des recherches sur les milieux intertropicaux qui sont devenues des références internationales. L'IRD mène des recherches en Afrique, dans l'Océan Indien, en Amérique latine et dans le Pacifique. Il dispose d'implantations dans 26 pays de la zone intertropicale. Il compte également cinq implantations en métropole et cinq dans les DOM-TOM-POM.

L'I.R.D. remplit trois missions fondamentales, la recherche, l'expertise et la formation dans le but d'étudier les relations de l'homme avec son environnement et de contribuer à un développement durable.

Les activités de l'I.R.D. s'organisent donc en cinq départements :

- Milieu et environnement : recherche sur les climats tropicaux, les interactions océan-atmosphérique, les milieux littoraux et terrestres, les ressources en eau, les risques naturels, les ressources minérales et les impacts des activités humaines sur l'environnement.
- Ressources vivantes : études de la biodiversité, des écosystèmes aquatiques et des agrosystèmes tropicaux afin d'adapter la gestion des exploitations.
- Société et santé : programme de recherche sur la santé, les problèmes économiques, culturels et sociaux du développement du continent africain.
- Expertise et valorisation : expertises collégiales et mise en valeur du savoir-faire de l'I.R.D. auprès des organismes publics et privés internationaux.
- Soutien et formation des communautés scientifiques du sud : renforcement des capacités de recherche, meilleure insertion à l'échelle internationale.

---

<sup>1</sup> Cf. Bibliographie n°1 et n°2

➤ **L'Université de Nouvelle-Calédonie (U.N.C.)**<sup>2</sup>

L'Université de la Nouvelle-Calédonie (UNC) a été créée le 31 mai 1999. Autrefois, simple composante de l'Université Française du Pacifique, elle est maintenant un établissement public à caractère scientifique, culturel et professionnel.

L'UNC comptait en 2001 environ 1 900 étudiants, 60 enseignants-chercheurs et enseignants et 40 agents administratifs.

Au cours de ces dernières années, le rapprochement du département de Chimie de l'UNC et du laboratoire de Pharmacologie de l'O.R.S.T.O.M. devenu aujourd'hui I.R.D., a donné lieu à la création d'un laboratoire commun. Cette collaboration, officialisée par une convention signée dans l'année 2001, donne naissance au Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles I.R.D. / U.N.C. (L.P.S.N.).

➤ **Le Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles (IRD/UNC)**

Basée dans les locaux du centre I.R.D. de Nouméa, le Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles (IRD/UNC), regroupe des chercheurs de l'I.R.D. et de l'U.N.C.. Il a pour objectif principal d'isoler et d'identifier des molécules naturelles extraites de la biodiversité, de structures chimiques originales, actives contre les processus prolifératifs notamment dans le cas des parasites et des virus.

Dans cette optique, le Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles IRD/UNC cherche dans les invertébrés marins, en collaboration avec les laboratoires pharmaceutiques Pierre Fabre, des composés bioactifs, agissant plus particulièrement contre le paludisme mais aussi contre le cancer, des maladies du système nerveux, les antibiotiques et les antiviraux.

---

<sup>2</sup> Cf Bibliographie n°3

### **3. DEMARCHE GENERALE POUR LA RECHERCHE DE SUBSTANCES NATURELLES D'INTERET BIOLOGIQUE**

La recherche des substances naturelles s'effectue toujours suivant la même démarche scientifique :

- Prospection et récolte
- Identification
- Extraction de substances par solvants
- Screening biologique
- Séparation et purification du principe actif
- Analyse structurale
- Analyses pharmacologiques
- Phase industrielle - Synthèse chimique du produit

#### **3.1 Sélection des organismes**

Les critères de sélection varient en fonction de la nature des organismes étudiés. Ainsi suivant qu'il soit d'origine végétale ou animale (plantes, invertébrés marins, champignons, ou autres micro-organismes), l'approche se fera selon :

- L'éthnopharmacologie : c'est dans ce cas la médecine traditionnelle qui oriente les recherches vers les organismes ayant des potentialités pharmacologiques. Ce critère de sélection s'applique surtout pour les organismes terrestres et très peu pour les organismes marins.
- La chimiotaxonomie : cette méthode se base sur la comparaison des principes actifs qui restent très proches dans une même famille taxonomique. Les récoltes sont ainsi guidées vers les espèces proches. Cette méthode est très utilisée par la prospection végétale et des organismes marins.
- L'écologie chimique : c'est l'observation des interactions chimiques entre les êtres vivants et leur milieu qui permet de faire le choix de l'organisme.
- Le criblage systématique : il se pratique lors d'une étude de la faune et de la flore d'une région.

#### **3.2 Prospection et récolte<sup>3</sup>**

Les organismes sont récoltés et répertoriés avec un relevé précis du lieu géographique de la récolte. Pour les organismes marins, une partie des échantillons est placée dans un solvant approprié à son espèce pour l'identification, et l'autre est congelée, broyée, lyophilisée, puis stockée en chambre froide pour une extraction ultérieure.

---

<sup>3</sup> Cf. ANNEXE n°4

### **3.3 L'identification**

Dans le cas des éponges, le LPSN envoie ses échantillons dans un laboratoire spécialisé en Australie ou en Nouvelle Zélande pour l'identification des spécimens. La diversité chez les invertébrés marins, en particulier chez les éponges, rend l'identification très difficile. Il existe de moins en moins de spécialistes européens capables d'identifier parfaitement les organismes.

### **3.4 L'extraction**<sup>4</sup>

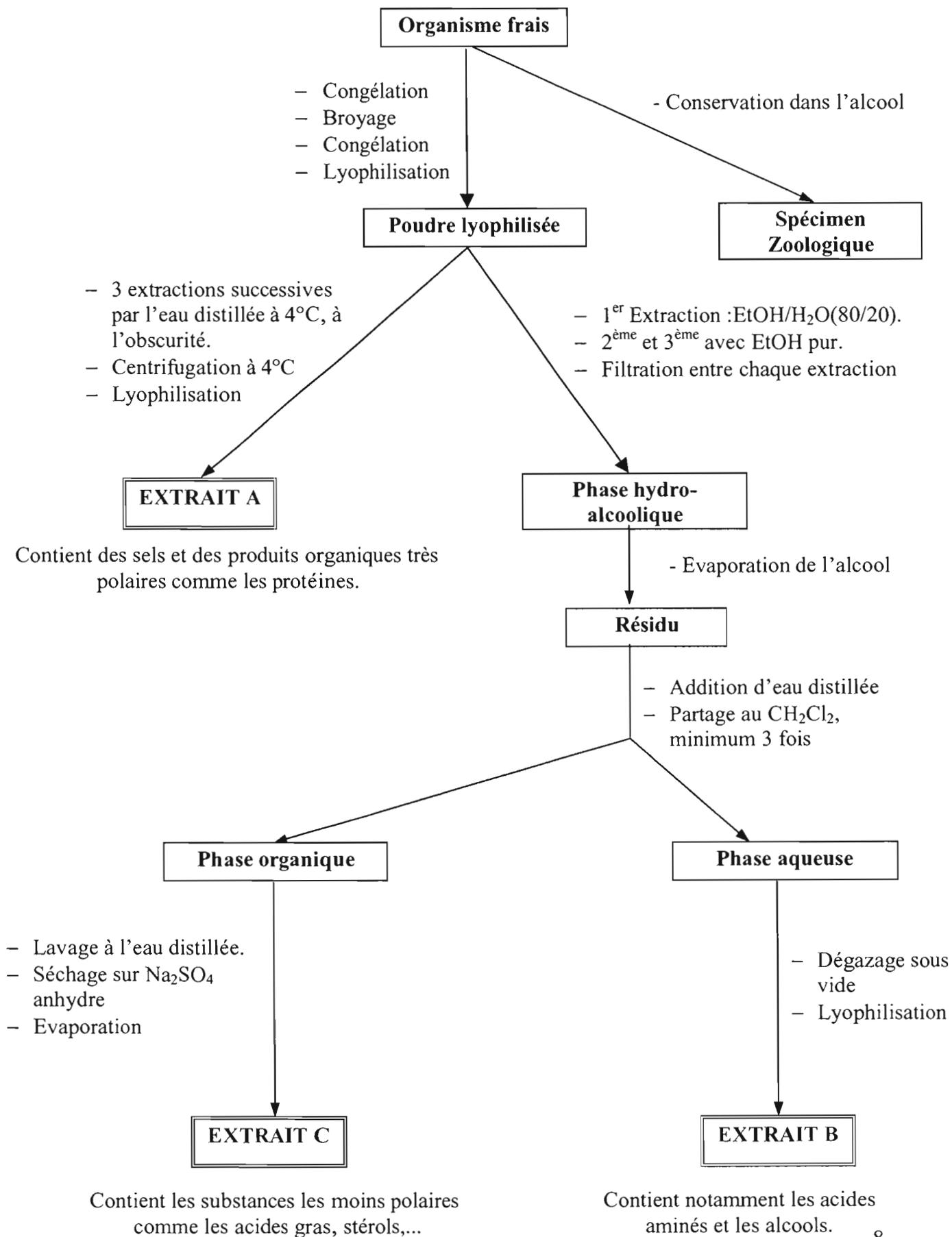
Dans le cas des organismes marins, les principes actifs sont récupérés le plus souvent par une extraction en utilisant des solvants de polarité croissante (chlorure de méthylène, éthanol, eau).

Cette technique permet ainsi d'obtenir trois extraits.

- Extrait A : issu de l'extraction à l'eau, il regroupe les produits les plus polaires, comme les sels, les protéines, les peptides.
- Extrait B : issu de l'extraction hydroalcoolique. Cet extrait contient les produits de polarité intermédiaire comme les acides aminés, les alcools, les phénols, les amines.
- Extrait C : issu de l'extraction au chlorure de méthylène. On y retrouve les produits peu polaires comme les acides gras et les stérols.

---

<sup>4</sup> Cf. ANNEXE n°1



**Schéma 1 : principe de l'extraction**

### 3.5 Screening biologique

le screening biologique ou criblage biologique permet de détecter une éventuelle activité de l'organisme.

Au LPSN sont pratiqués les tests suivants :

- Tests de cytotoxicité sur les cellules cancéreuses de type Kb.
- Tests antibiotiques et antifongiques.
- Tests antiviraux réalisés en collaboration avec l'institut Pasteur de Nouméa, sur le virus de la dengue.

#### 3.5.1 Tests de cytotoxicité sur les cellules Kb

Les tests de cytotoxicité sont réalisés sur des cellules cancéreuses Kb issues du carcinome du larynx, cultivées très facilement en lignées continues dans des boîtes de culture (du fait de leur adhérence et croissance rapide) contenant un milieu nutritif enrichi avec du sérum de veau fœtal (SVF).

#### 3.5.2 Tests antibiotiques et antifongiques

Les tests sont effectués sur trois souches :

- Ca : *Candida albicans*, levure impliquée dans les infections généralisées chez les immunodéficients, responsable de mycoses.
- Ec : *Escherichia coli*, bactérie impliquée dans un grand nombre d'infection chez l'homme.
- Sa : *Staphylococcus aureus*, bactérie qui a un pouvoir pathogène. Elle provoque une manifestation cutanée, systémique (méningite, septicémie) et digestive. Elle est aussi impliquée dans un grand nombre d'infection à la suite d'opérations chirurgicales.

Une pastille de cellulose, imprégnée par l'extrait, est placée dans une boîte de pétriensemencée par l'une des souches. Après 24 heures, une zone d'inhibition peut apparaître autour de la pastille, témoignant de l'activité de l'extrait sur la souche bactérienne. Cette activité est quantifiée par comparaison entre le diamètre de l'inhibition de l'extrait et celui d'un antibiotique témoin (la gentamycine).

#### 3.5.3. Tests antiviraux (virus de la dengue)

Les souches du virus de la dengue (du sérotype 1, 2 et 4) sont implantées dans des cellules porcines (pork spleen) et cultivées à 37°C en milieu Leibovitz L15 glutamine enrichi avec 3% de SVF. Après 5 jours d'incubation à l'obscurité, les plages de lyse sont visualisées par coloration au violet de gentiane. L'activité antidengue est alors déterminée en comparant le nombre de plages de lyse des essais avec celui des témoins.

### 3.6 Séparation et fractionnement chimique<sup>5</sup>

Lorsque l'extrait étudié montre une activité antibiotique ou antivirale, on procède à la purification du principe actif grâce aux méthodes de chromatographie bioguidées. Pour cela, on choisit au préalable le principe de purification, la phase et le matériel à utiliser pour obtenir une séparation optimale.

#### ➤ Le choix du principe de purification

Il existe selon les phénomènes mis en jeu plusieurs types de purification. Au LPSN, les principes d'adsorption polaire et d'exclusion stérique sont le plus souvent utilisés selon leur capacité à mieux séparer les produits.

- La chromatographie d'exclusion stérique (filtration sur gel): la séparation est fondée sur les différentes capacités des molécules à pénétrer dans les pores de la phase stationnaire. Les molécules de grosses tailles ne pénètrent pas dans le gel et sont éluées en premières alors que les plus petites entrent dans le gel et se déplacent plus lentement. Les produits sortent du support chromatographique par ordre décroissant de masse moléculaire. Au LPSN, cette méthode est utilisée pour filtrer les sels dans les extraits A et B.
- La chromatographie d'adsorption: la séparation est fondée sur la différence d'adsorption des produits du mélange avec la phase stationnaire. Ce principe est utilisé pour purifier les principes actifs.

#### ➤ Le choix de la phase

Le principe de purification utilisé étant l'adsorption polaire, il est important de choisir la phase dans laquelle on travaillera en fonction de la polarité des produits à séparer.

- La phase normale: Pour opérer en phase normale, on utilise une phase stationnaire qui possède un fort pouvoir d'adsorption vis-à-vis des produits polaires et une phase mobile (l'éluant) au gradient polaire croissant. De ce fait, les produits élués sont recueillis du moins polaire au plus polaire.
- La phase inverse: Contrairement à la phase normale, on utilise une phase stationnaire qui possède un pouvoir d'adsorption de plus en plus fort vis-à-vis des produits apolaires et une phase mobile au gradient polaire décroissant. On recueille par conséquent les produits du plus polaire au moins polaire.

---

<sup>5</sup> Cf. Bibliographie n°4

➤ Matériel utilisé :

Pour séparer les principes actifs, la première étape est de choisir l'éluant le mieux adapté pour une séparation optimale des substances présentes dans l'extrait. Cette étape se fait en utilisant la chromatographie sur couche mince, méthode analytique de séparation des produits qui permet de tester différents éluants. Sont ensuite utilisées les techniques de chromatographies sur colonne, méthodes de séparation semi-préparatives ou préparatives. La dernière technique utilisée, L'HPLC offre un moyen de détection ultra sensible et utilisé dans tous les types de séparation.

- La chromatographie sur couche mince (CCM)<sup>6</sup> : Cette méthode utilise une plaque de verre ou d'aluminium enduite d'un adsorbant composé soit de silice soit d'alumine. L'extrait à analyser est dilué dans un minimum de solvant approprié, et déposé sur la plaque. La plaque est alors mise dans une cuve contenant un éluant déterminé et saturée par ce solvant. La base de la plaque est plongée dans le solvant, celui-ci monte par capillarité et les substances sont entraînées à des vitesses différentes selon leur affinité pour l'adsorbant. En fin de chromatographie, les différents produits séparés sont révélés soit aux U.V. (254nm et 366nm), soit par pulvérisation à la vaniline sulfurique à chaud, au réactif de Dragendrof, ou d'autres réactifs spécifiques.
- La chromatographie sur colonne<sup>7</sup> : elle utilise une colonne (généralement en verre) dans laquelle est introduit l'adsorbant en suspension dans le solvant. Le produit dissout dans un minimum de solvant est déposé sur le sommet de la colonne. Les différents composés sont alors entraînés par l'éluant et les produits se séparent en fonction de leur polarité. On recueille alors les produits soit en les différenciant par leur couleur, soit par fraction de volume constant. Une fois recueillies, on analyse la composition des fractions en chromatographie sur couche mince.
- High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) : C'est La méthode de chromatographie la plus sensible et la plus précise. C'est une chromatographie sous haute pression qui permet de déceler grâce à ses détecteurs ultrasensibles (UV - visible, en particulier), tous les composants d'un mélange, même ceux qui sont à l'état de trace.

### **3.7 Analyse structurale :**

Une fois qu'un produit est suffisamment purifié, il faut déterminer sa structure. Les méthodes spectroscopiques (Spectrométrie de masse, rayons X, Résonance magnétique Nucléaire (RMN), UV – visible, Infra – Rouge) permettent de recueillir des informations qui vont permettre de déterminer la structure moléculaire du principe actif. Cette étape est primordiale puisqu'elle permet de savoir si le principe actif isolé est nouveau.

---

<sup>6</sup> Cf. ANNEXE n°2

<sup>7</sup> Cf. ANNEXE n°3

### **3.8 Analyses pharmacologiques :**

Cette phase permet de déterminer le mécanisme d'action du principe actif, de confirmer son activité et de mesurer sa toxicité *in vivo*. C'est à ce stade que de nombreuses molécules sont stoppées dans leur développement, soit parce que leur toxicité est trop élevée, soit parce que l'activité devient trop faible et ne stoppe pas l'évolution de la maladie.

### **3.9 Phase industrielle - Synthèse chimique du produit :**

Le produit qui a passé avec succès les différents stades des études pharmacologiques, sans occasionner d'effets secondaires néfastes sur les individus, est alors proposé aux industriels pour une éventuelle commercialisation. Si un groupe pharmaceutique décide la mise en production du médicament et si la source naturelle est insuffisante pour une exploitation industrielle, le médicament sera alors produit par synthèse chimique.

Cette dernière aura été mise au point pendant la phase de l'étude pharmacologique qui prend toujours plusieurs années. Il faut donc compter au moins dix ans entre la détection d'une activité biologique et la mise sur le marché d'un nouveau médicament.

## **4. LA BIODIVERSITE MARINE DE NOUVELLE-CALEDONIE**

La Nouvelle-Calédonie, par son vaste lagon et les monts sous-marins de sa zone économique, présente une grande biodiversité parmi les organismes marins. Le milieu marin a en effet obligé les êtres vivants à s'adapter au cours du temps à des conditions parfois particulières de pression, luminosité ou salinité. Les organismes ont ainsi acquis des caractères spécifiques, morphologiques ou chimiques, tels que la production de métabolites originaux. Ceux-ci constituent donc un réservoir de molécules susceptibles de présenter un intérêt pharmaceutique.

Parmi cette biodiversité, les invertébrés marins, tels les spongiaires, échinodermes, alcyonnaires, font partie d'un groupe où les potentialités pharmaceutiques sont les plus grandes. En effet, ces animaux dépourvus de système immunitaire, ont dû développer de nouveaux moyens de défense ou d'attaque, en particulier des métabolites secondaires, toxiques pour leurs prédateurs et leurs proies. C'est particulièrement le cas des éponges qui, fixées, ont souvent dû synthétiser des substances chimiques élaborées, d'où la présence de toxines parfois très actives dans ces organismes.

### **4.1 Généralités sur les éponges**<sup>8</sup>

Les éponges, appelées aussi spongiaires ou porifères, comptent près de 10 000 espèces, dont la taille varie entre 1 cm et 2 m. Elles vivent fixées sur le fond, de sorte qu'on les a longtemps prises pour des végétaux. La majorité des espèces vit dans l'eau de mer, toutefois une centaine d'espèces vit en eau douce.

### **4.2 Caractéristiques générales**

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

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

---

<sup>8</sup> Cf. Bibliographie n°5, n°6 et n°7

### **4.3 Morphologie et anatomie**

Le corps des éponges ne présente aucune symétrie. Sa forme est très variable : il peut, suivant l'espèce, évoquer une outre, un arbuscule, une coupe (figure 1) ou encore se présenter comme une masse informe plus ou moins encroûtante.

Les éponges sont des animaux pluricellulaires, mais leurs cellules, dont chacune jouit d'une assez large autonomie fonctionnelle, ne forment jamais à proprement parler de tissus spécialisés, et donc jamais d'organes. Il n'y a pas véritablement de bouche, ni d'appareil digestif, de muscles, ou de système nerveux bien organisés. Le corps des éponges résulte simplement de l'agrégation de cellules disposées autour d'un système de canaux (figure 2) ; le corps peut éventuellement se désagréger et se reformer.

A quelques exceptions près, les éponges se nourrissent en filtrant l'eau. Celle-ci pénètre dans l'animal par les trous microscopiques dont sont criblées certaines cellules de la paroi extérieure, ou par des pores existant entre ces cellules. L'intérieur de l'animal est tapissé de cellules caractéristiques, les choanocytes, dotées d'un long flagelle qu'enveloppe une collerette de cils modifiés. Ce sont les mouvements de ces flagelles qui permettent la circulation continue de l'eau à travers l'éponge. La collerette des choanocytes, quant à elle, piège les particules organiques très fines (débris, bactéries) véhiculées par l'eau, les entoure et les ingère. L'eau ressort par une ou plusieurs ouvertures plus larges (les oscules), situées à la partie supérieure de l'outre.

L'espace compris entre la couche externe et la couche interne des éponges est rempli d'une substance gélatineuse, la mésogée, dans laquelle des cellules, dites amiboïdes, se déplacent à la manière des amibes, en se déformant. Ces cellules ont de multiples fonctions : certaines assurent le transfert des nutriments, d'autres semblent jouer un rôle dans la digestion, d'autres encore sécrètent les spicules ou les fibres de spongine (une protéine), qui formeront le squelette de l'éponge ; il en est enfin qui se modifient pour former les cellules reproductrices, spermatozoïdes ou ovules.

La paroi des éponges peut former des replis plus ou moins complexes. Les choanocytes sont alors réunis par petits groupes, au sein de l'éponge, dans des chambres, dites "chambres vibratiles", où l'eau parvient par l'intermédiaire d'un réseau complexe de petits canaux développés à partir des pores extérieurs, et d'où elle est expulsée par un autre réseau qui aboutit à de gros oscules (figure 1-C).

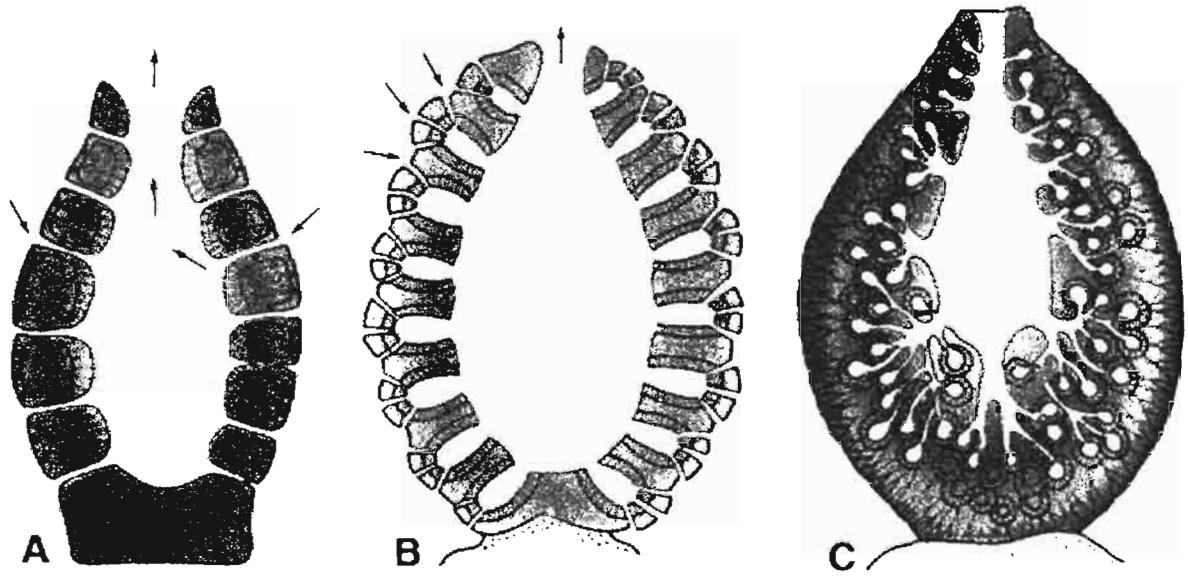
### **4.4 Reproduction**

Leurs cellules ayant gardé une grande autonomie physiologique et étant peu différenciées, les éponges se multiplient facilement de façon asexuée (par bourgeonnement, par exemple). Leur pouvoir de régénération à partir de fragments est d'ailleurs mis à profit dans l'exploitation industrielle des éponges de toilette. Il existe cependant un mode de reproduction sexuée ; les espèces sont alors le plus souvent hermaphrodites (produisant à la fois des spermatozoïdes et des ovules). L'autofécondation (fécondation d'un ovule par un spermatozoïde du même individu) est cependant exclue car les cellules sexuelles ne sont pas matures en même temps, et c'est par fécondation croisée qu'est assurée la reproduction. Le spermatozoïde d'un individu, émis dans l'eau, est capté par les choanocytes d'un autre individu

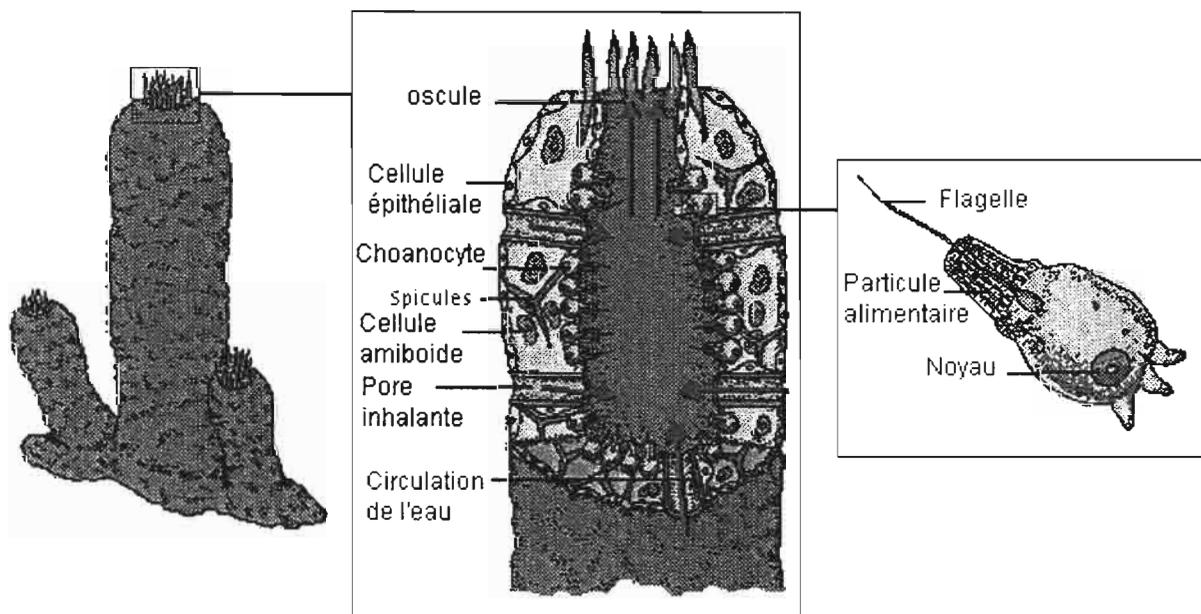
et acheminé jusqu'à l'ovule. La fécondation a lieu dans la mésoglée, ainsi que les premières phases du développement ; le nouvel individu ainsi formé est libéré sous forme d'une larve ciliée nageuse, qui par la suite se fixera sur un support.

#### **4.5 Des éponges très particulières**

Les espèces de la famille des cladorhizidés, qui fréquentent les grands fonds marins, jusqu'à près de 9 000 m de profondeur, ne possèdent pas le système filtreur caractéristique des autres espèces (ensemble de pores, de canaux et de choanocytes). On a découvert récemment que ce sont des éponges carnivores, qui se nourrissent de petits animaux. Elles capturent leurs proies à l'aide de leurs longs filaments hérissés de spicules.



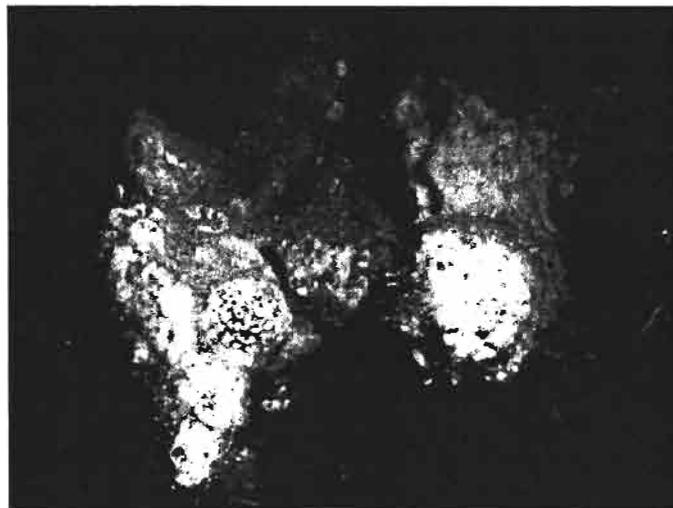
**Figure 1 :** Schéma des trois types d'organisation fondamentaux des animaux appartenant à l'embranchement des spongiaires ou porifères, respectivement les types ascon (A), sycon (B) et leucon (C). Les flèches indiquent dans quel sens l'eau circule dans la cavité interne.



**Figure 2 :** schéma général de la paroi d'un Spongiare

## 5. PRESENTATION DE L'EPONGE SPONGIA AUSTRALIS BERGQUIST TRAITEE SOUS LA REFERENCE R 1561

Cette éponge a été récoltée le 28 juillet 1992 sur le pente externe du récif de Kaune (côté Est). L'éponge est de couleur gris blanc à la consistance molle et charnue, se présentant comme une main, à la base demi sphérique et aux excroissances coniques poussant dans les grottes peu éclairées. Lors de cette mission 4 Kg en ont été récoltées par trois plongeurs à une profondeur de 25 m.



*Spongia australis* Bergquist (éponge 1561)

### ➤ Résultats des tests antibiotiques, antifongiques, antiviraux et sur cellules cancéreuses<sup>9</sup>

Après l'extraction préliminaire, divers tests ont été effectués pour détecter une éventuelle activité biologique.

	Activité antibiotique (mm)			Activité sur cellules cancéreuses	Activité antivirale
	Sa	Ec	Ca		(Dengue)
Extrait A	0	0	Légère activité	0	0
Extrait B	0	0	0	0	0
Extrait C	0	0	Légère activité	Légère cytotoxicité	70%

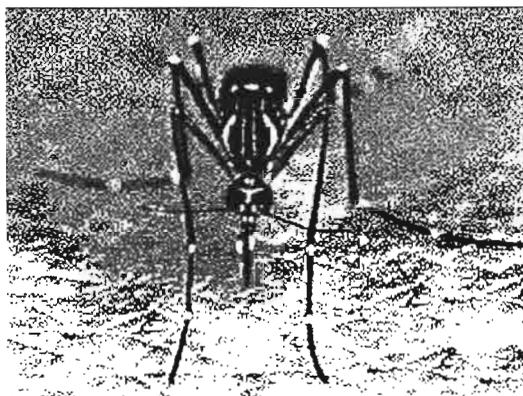
**Tableau 1: résultats des tests préliminaires sur les extraits A,B et C.**

Les résultats de ces tests montrent que l'extrait C est actif sur le virus de la dengue. Cette activité antivirale pourrait se révéler d'un grand intérêt.

<sup>9</sup> Cf. Bibliographie n°8

## **6. LA DENGUE** <sup>10</sup>

La dengue est une sorte de "grippe tropicale", décrite dès 1779. Les virus responsables de cette maladie sont transmis à l'homme par le moustique *Aedes aegypti*. Soixante à 100 millions de personnes sont infectées chaque année dans le monde, et la forme grave de la maladie, la dengue hémorragique, en recrudescence dans plusieurs régions intertropicales, est responsable de plus de 20 000 morts annuelles.



**Moustique *Aedes aegypti***

### **6.1 Epidémiologie**

La dengue, qui peut être provoquée par quatre types de virus (1,2,3,4), a été à l'origine d'importantes épidémies : en 1897 en Australie, en 1926 aux Seychelles, en 1927 à Tunis, en 1928 à Athènes (1250 morts), en 1931 à Formose... Elle sévit principalement aujourd'hui dans la zone intertropicale (c.f. figure 1).

Autrefois limitée à l'Asie du Sud-est (440 000 cas en Chine en 1980, 200 000 cas en Thaïlande en 1987), la dengue hémorragique ne cesse de s'étendre, à l'Océan Indien, au Pacifique Sud (45 000 cas à Tahiti et Mooréa, Polynésie Française, en 1988-89) et surtout à l'Amérique Latine où les cas annuels rapportés ont été multipliés par 60 entre 1989 et 1993 comparativement à la période précédente (1984-1988). La dengue hémorragique a réapparu en 1996 à Cuba après quinze années d'interruption, malgré une tentative d'éradication du moustique *Aedes aegypti*. Cette inquiétante résurgence de la dengue en Amérique Latine et dans les Caraïbes semble largement due à la diminution des programmes d'éradication du moustique vecteur dans cette région du globe. L'évolution démographique, l'urbanisation non contrôlée, les catastrophes naturelles et la paupérisation sont également en cause.

---

<sup>10</sup> Cf. Bibliographie n°9

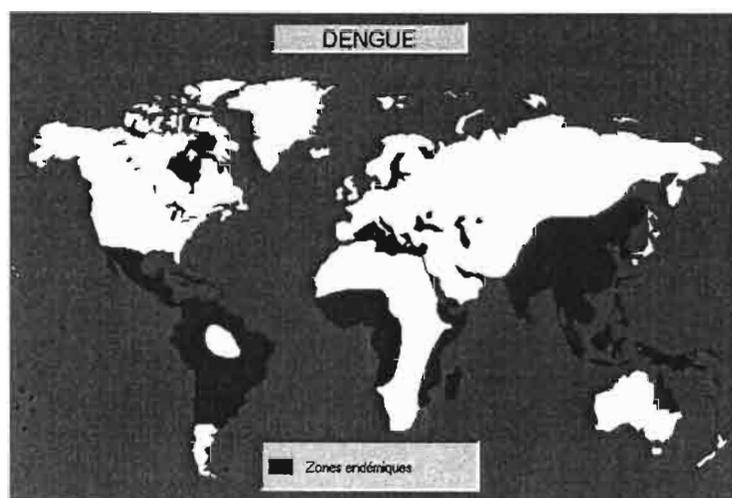
## **6.2 Symptômes**

La dengue "classique" se manifeste brutalement après 2 à 7 jours d'incubation par l'apparition d'une forte fièvre souvent accompagnée de maux de tête, de nausées, de vomissements, de douleurs articulaires et musculaires et d'une éruption cutanée ressemblant à celle de la rougeole. Au bout de 3 à 4 jours, une brève rémission est observée, puis les symptômes s'intensifient - des hémorragies conjonctivales, des saignements de nez ou des ecchymoses pouvant survenir - avant de régresser rapidement au bout d'une semaine. La guérison s'accompagne d'une convalescence d'une quinzaine de jours. Sous cette forme, la dengue, bien que fort invalidante, n'est pas dangereuse. Sa forme hémorragique, qui représente environ 1% des cas de dengue dans le monde, est par contre extrêmement sévère : la fièvre persiste et des hémorragies multiples, notamment gastro-intestinales, cutanées et cérébrales, surviennent souvent. La guérison peut être rapide, totale et sans séquelles. Mais, chez les enfants de moins de quinze ans notamment, un état de choc hypovolémique peut s'installer, refroidissement, moiteur de la peau et pouls imperceptible signalant une défaillance circulatoire. L'enfant est agité et se plaint de douleurs abdominales. Il risque la mort en quelques heures s'il n'est pas perfusé.

## **6.3 Moyens de lutte et résultats déjà obtenus**

Il n'existe aujourd'hui ni traitement spécifique ni vaccin pour combattre cette maladie si on excepte, celui dit de première génération, récemment mis au point à partir de souches atténuées, par une équipe thaïlandaise. Le seul moyen de lutte existant est le contrôle des moustiques vecteurs dans les zones concernées. La recherche des molécules bioactives sur les quatre stéréotypes représente l'un des espoirs de guérison contre le virus de la dengue.

Quelques résultats positifs ont été obtenus au laboratoire. Ainsi des crinoïdes (*Gymnocrinus richeri*) ont été isolés des gymnochromes, dont certains présentent une activité antivirale remarquable. D'autres organismes, dont les extraits se sont révélés actifs sont en cours d'études<sup>11</sup>.



**Figure 1 : carte de la zone d'épidémie de dengue**

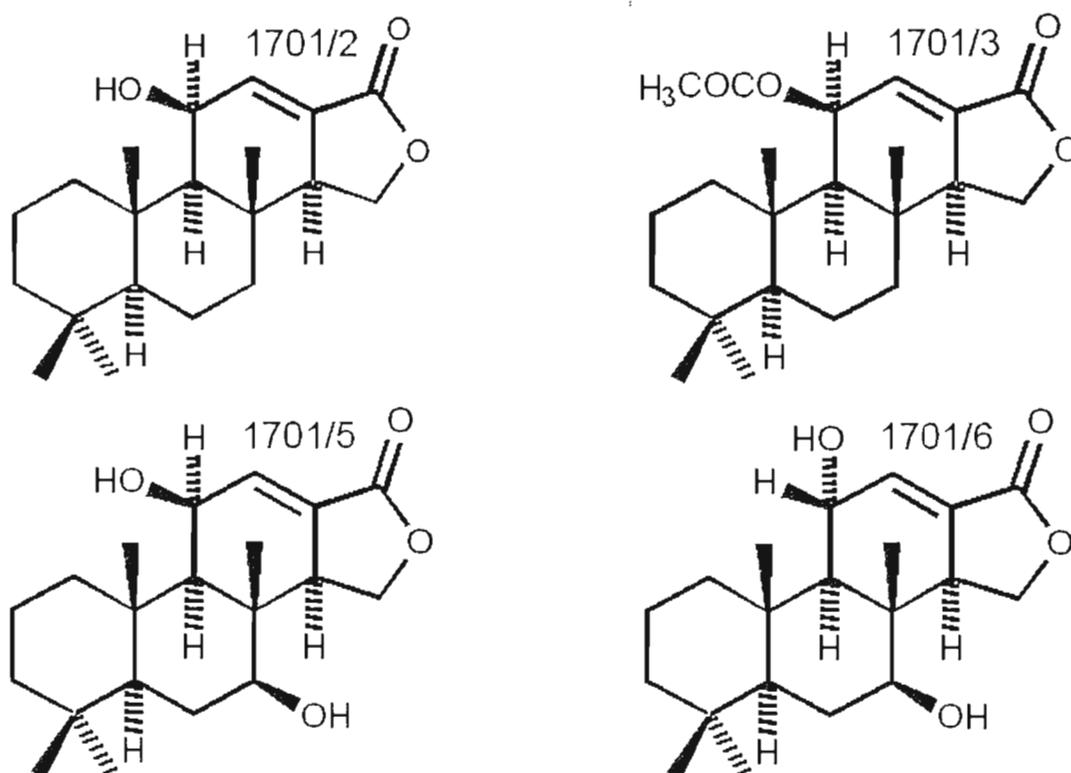
<sup>11</sup> Cf. Bibliographie n°10, n°11 et n°12

## 7. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE :

L'éponge R 1561 a été identifiée depuis peu sous le nom de *Spongia australis* Berquist. Aucune publication traitant de cette éponge n'a paru jusqu'à ce jour. Néanmoins le genre *Spongia* compte de nombreuses autres espèces mentionnées à plusieurs reprises dans des articles scientifiques.

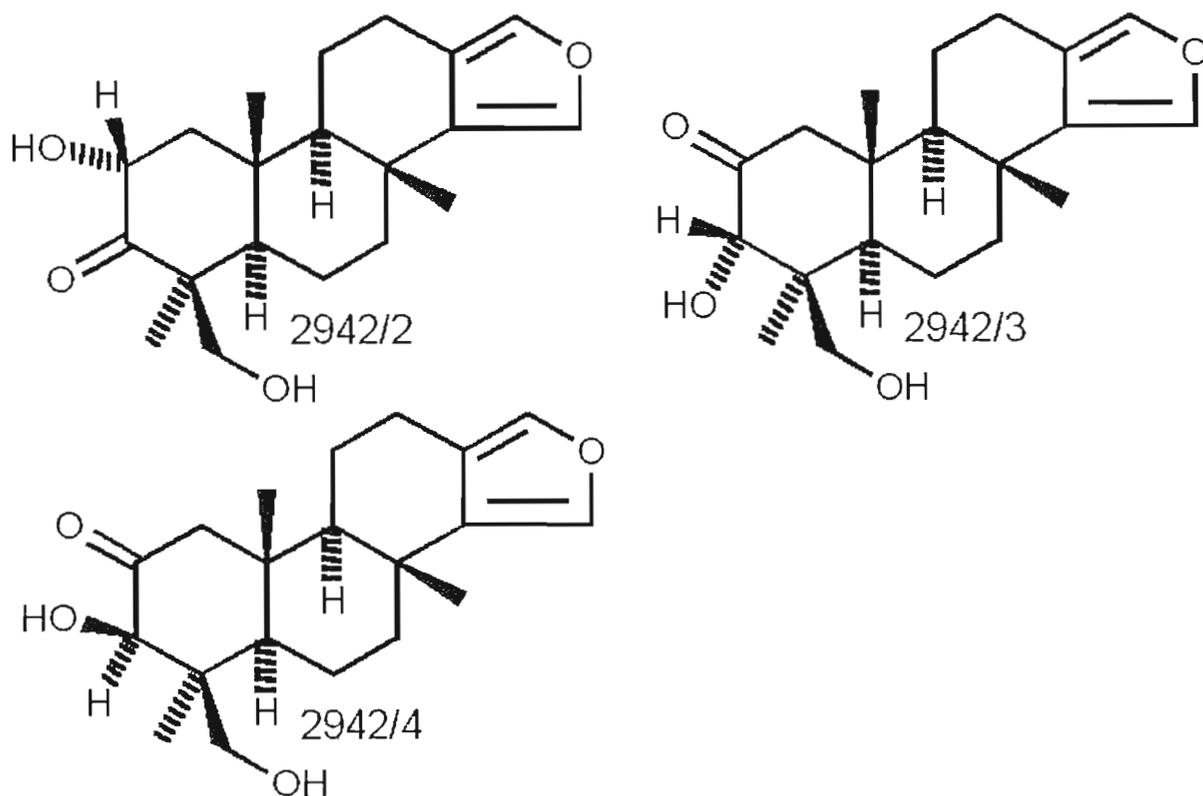
C'est le cas de *Spongia officinalis*, dont les diverses bioactivités sont mentionnées dans de nombreuses publications. Les quatre molécules qui suivent possèdent une activité antimicrobienne, découverte en 1984<sup>12</sup>.

La structure diterpénoïde des quatre molécules est la suivante :



<sup>12</sup> Cf. Bibliographie n°13

De même parmi les éponges dont le nom d'espèce n'est pas encore identifié, quelques articles font mention de molécules bioactives. C'est le cas d'une *Spongia sp.* dans laquelle trois molécules bioactives ont été découvertes en 1988. Ces trois principes actifs ont une structure de furanoditerpénoïde et agissent sur les cellules cancéreuses et les virus <sup>13</sup>.



La recherche chimiotaxonomique permet par rapprochement entre deux éponges de même genre d'identifier les types de molécules bioactives susceptibles d'être trouvées. On peut ainsi supposer que les molécules bioactives extraites de *Spongia australis*, sont très proches de celles dont les structures sont représentées ci-dessus.

<sup>13</sup> Cf. Bibliographie n°14

## **8. MISSION DE PROSPECTION ET DE RECOLTE** <sup>14</sup>

Les récoltes d'organismes constituent la première étape indispensable pour la recherche des substances naturelles. Dans le cadre du LPSN, où la recherche est principalement axée sur les invertébrés marins, des campagnes à bord de navires océanographiques permettent de récolter des spécimens marins susceptibles de contenir des molécules intéressantes.

Ce fut donc le cas de la mission de prospection et de récoltes 2001 qui amena à bord de l'Alis une équipe de six scientifiques dans l'extrême nord de la Nouvelle Calédonie. Cette équipe était constituée, d'une part de quatre plongeurs biologistes dirigés par Pierre LABOUTE et comprenant Christophe PEIGNON, John BUTSCHER, Géraud BRETIGNIERE, et d'autre part d'un chimiste chef de mission Jacques PUSSET, et de moi-même au titre de stagiaire.

Le travail à bord comporte deux étapes. D'abord la récolte qui consiste à collecter des organismes soit par dragage ou chalutage pour les grandes profondeurs soit par plongée autonome pour les faibles profondeurs nécessitant le savoir faire et les connaissances des plongeurs biologistes. Ensuite vient le travail de conditionnement qui consiste à référencer, identifier sommairement les spécimens en les photographiant, à préparer des échantillons dans un solvant approprié pour leur identification ultérieure et à stocker en chambre froide le plus gros de la récolte pour les futures extractions. Cette seconde partie est le travail des chimistes qui, en plus du conditionnement, notent précisément les positions de chaque récolte pour situer la zone de peuplement de tous les organismes.

Au cours de cette mission, une cinquantaine d'éponges a pu être collectée ainsi que plusieurs ascidies, gorgones et alcyonaires. Mais pour seulement un tiers des organismes récoltés, la quantité était supérieure au kilogramme.

Cette mission initialement prévue sur 10 jours a dut être écourtée suite à une avarie moteur importante, obligeant le navire à rentrer d'urgence à son port d'attache. De retour à Nouméa, les organismes ont été transférés directement à l'I.R.D, stockés en chambres froides en attendant d'être broyés et lyophilisés pour pouvoir être testés. Quant aux échantillons zoologiques, une partie de chaque spécimen a été prélevée puis placée dans des poches en plastique ; ils seront envoyés avec leur photo en Australie pour identification.

---

<sup>14</sup> Cf. ANNEXE n°4

## **9. ETUDE SUR SPONGIA AUSTRALIS BERGQUISTS**

Depuis deux ans, plusieurs chimistes du LPSN se sont intéressés à l'activité antivirale de l'extrait C de l'éponge 1561. M<sup>elle</sup> GENTOU Jessica sous la responsabilité de Mme FROSTIN a commencé dès 1999 à purifier le produit, puis M. BOIVIN S. et Mme. GAUDICHON V. ont continué l'étude en l'an 2000. Tous trois ont permis d'obtenir une purification très avancée du produit.

J'ai repris cette étude sous la direction de Mme Frostin afin de purifier le principe actif et de contrôler son activité antivirale.

### **9.1 Etude sur les fractions MF66-423 et MF66-424**

#### **9.1.1 Préparation du fractionnement chimique sur MF66-423 et MF66-424**

Avant chaque fractionnement par chromatographie sur colonne, des CCM préliminaires sont réalisées afin de visualiser les différents composés de l'extrait et de déterminer la séquence de solvant qui pourrait nous amener à une séparation optimale.

Dans le cas qui suit, on s'intéressera plus particulièrement à l'étude des fractions MF66-423 et MF66-424, issues d'une précédente purification.

#### ➤ Première CCM<sup>15</sup>

Solvant de dilution : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Supports : plaque de silice en phase normale de référence Si 60 F 254, activée.

Eluant : trois mélanges de solvants sont utilisés :

- Hexane / Acétate d'éthyle (20/80).
- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / Acétate d'éthyle (50/50).
- CHCl<sub>3</sub> / MeOH / H<sub>2</sub>O (65/25/4).

Révéléateur : Ultra-Violet (254 nm et 366 nm)

Vanilline sulfurique

Observations et remarques :

Les tests montrent que le mélange CHCl<sub>3</sub> / MeOH / H<sub>2</sub>O (65/25/4) est beaucoup trop polaire et que celui Hexane / Acétate d'éthyle (20/80) ne l'est pas assez. Seul le mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / Acétate d'éthyle (50/50) bien que pas assez polaire, pourrait permettre dans d'autres proportions une meilleure séparation.

---

<sup>15</sup> Cf. ANNEXE n°5

➤ Deuxième CCM <sup>16</sup>

Etant donné que seul le mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / Acétate d'éthyle semble adéquat, trois nouveaux mélanges de ces deux solvants sont essayés dans les mêmes conditions que précédemment.

- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / Acétate d'éthyle (20/80).
- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / Acétate d'éthyle (5/95).
- Acétate d'éthyle pur.

Observations et remarques :

Les CCM montrent que même dans le meilleur des cas (acétate d'éthyle pur), les tâches se séparent très peu du spot de départ. Il apparaît par conséquent que les mélanges testés ne sont pas adaptés pour la séparation des fractions MF66-423 et MF66-424. Des mélanges plus adaptés seront testés.

➤ Troisième CCM <sup>17</sup>.

Supports : plaque de silice en phase normale de référence Si 60 F 254, activée.

Solvant de dilution : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Eluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH (80/20)

Observations et remarques :

La CCM montre que ce mélange semble mieux adapté pour la séparation des produits et que les deux fractions sont très proches chimiquement.

### 9.1.2 Fractionnement chimique de MF66-424

On effectue cette fois-ci une chromatographie sur colonne dans le but de récupérer les produits séparés. Pour cela différents mélanges d'éluants de polarité croissante seront introduits sur la colonne, ce qui aura pour effet de fractionner le produit initial. Etant donné la faible quantité de produit disponible, on utilisera une colonne de chromatographie dite Sep-Pak de petite taille mieux adaptée dans notre situation.

➤ Chromatographie sur MF66-424

Caractéristique de la colonne : Sep-pak (phase normale) Hauteur : 2,5cm ; Diamètre : 1 cm

Masse de MF66-424 :

- Quantité totale : 15,4 mg
- Quantité injectée sur la colonne : 5,4 mg

---

<sup>16</sup> Cf. ANNEXE n°6

<sup>17</sup> Cf. ANNEXE n°7

5,4 mg de produit préalablement solubilisé dans un minimum de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont injectés à l'aide d'une seringue.

On obtient 7 fractions :

Fraction	Couleur	Eluant	Masse (mg)
MF66-4241	Incolore	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100%	0,1
MF66-4242	Incolore	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (95/5)	0,8
MF66-4243	Jaune très pâle	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90/10)	0,1
MF66-4244	Jaune pâle	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (80/20)	0,1
MF66-4245	Jaune pâle	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (50/50)	0,6
MF66-4246	Jaune		0,7
MF66-4247	Incolore	MeOH 100%	2,5

Ta

**bleau 2 :résultats du fractionnement sur colonne de MF66-424.**

Rendement de la colonne :

- Quantité de départ : 5.4mg
- Quantité finale : 4.9mg
- Rendement : 91%

➤ Analyse CCM de chaque fraction de MF66-424<sup>18</sup>

Support : Plaque de silice Si 60 F 254, activée

Solvant de dilution : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Solvant de migration : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH (80/20)

Révéléateur : Ultra-Violet (254 nm et 366 nm), vanilline sulfurique

Observations et remarques :

Le produit qui nous intéresse, de couleur jaune pâle lors de l'élution, apparaît en mauve après pulvérisation et chauffage à la vanilline sulfurique. C'est donc la quatrième fraction qui contient le produit. Cependant lors de la migration, celle-ci a tendance à s'étaler au lieu de migrer uniformément. Cette observation pourrait traduire une dégradation du principe actif.

<sup>18</sup> Cf. ANNEXE n°8

### 9.1.3 Fractionnement chimique sur MF66-423

#### ➤ Chromatographie sur MF66-423

Caractéristique de la colonne : Set-pak (en phase normal) Hauteur : 2,5cm ; Diamètre : 1 cm  
Solvant de dilution : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH (80/20)

Masse de MF66-423.

- Quantité injectée : 6,9 mg

On obtient 5 fractions :

Fraction	Couleur	Solvant	Masse (mg)
MF66-4231	Incolore	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (95/5)	1,4
MF66-4232	Jaune	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90/10)	4,1
MF66-4233	Jaune	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (80/20)	5,2
MF66-4234	Incolore	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (50/50)	0,1
MF66-4235	Incolore	MeOH 100%	0,4

Tableau 3 : résultat du fractionnement sur colonne de MF66-423

Rendement de la colonne :

- Quantité de départ : 6.9mg
- Quantité finale : 11.2mg

Le rendement ne peut être calculé car une masse importante de silice entraînée par le méthanol vient fausser les résultats.

#### ➤ Analyse CCM de chaque fraction de MF66-423<sup>19</sup>

Support : Plaque de silice Si 60 F 254 activée

Solvant de dilution : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Eluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH (80/20)

Révéléateur : Ultra-Violet (254 nm et 366 nm), vanilline sulfurique

Observations et remarques :

Les observations que l'on a pu faire sur la CCM comparative des fractions de MF66-424, sont les mêmes que pour MF66-423. Les produits que contiennent ces deux fractions sont identiques et ont la même tendance à se dégrader avec le temps.

---

<sup>19</sup> Cf. ANNEXE n°9

#### 9.1.4 Conclusion

L'étude entreprise sur les fractions MF66-423 et MF66-424 montre que le principe actif peut se dégrader rapidement dans le temps. En raison de l'instabilité du produit et des faibles quantités restantes, une nouvelle étude sur l'extrait de départ permettra d'obtenir en plus grande quantité une molécule non dégradée.

## 9.2. Etude sur l'extrait C de l'éponge 1561

En raison de la dégradation du principe actif, il est préférable de repartir avec l'extrait C initial que l'on possède en plus grande quantité.

### 9.2.1. Premier fractionnement chimique

#### ➤ Flash chromatographie

Les résultats des CCM précédentes suggèrent d'opérer en phase normale et avec des gradients de solvants similaires. Cette première chromatographie permettra de faire une séparation grossière.

Caractéristique de la colonne : Hauteur 60 cm ; Diamètre 2.5 cm

Phase stationnaire utilisée : Silice Si 60 (phase normale)

Quantité de silice : 50g

Quantité injectée sur la colonne : 899 mg

Après une première séparation, on obtient 7 fractions :

Fraction	Couleur	Solvant	Masse (mg)
CC1-1	Jaune très clair	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100%	69,3
CC1-2	Jaune	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (95/5)	45,3
CC1-3	Marron clair	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90/10)	614,8
CC1-4	Jaune clair	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (80/20)	136,4
CC1-5	Jaune clair	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (50/50)	26,3
CC1-6	Jaune clair	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (30/70)	37
CC1-7	Jaune clair	MeOH 100%	25,8

Tableau 4 : résultat du fractionnement sur colonne de l'extrait C

Rendement de la colonne :

Quantité déposée : 899mg

Quantité recueillie : 955.1mg

#### ➤ CCM comparative entre l'extrait C et ses fractions<sup>20</sup>

Support : plaque de silice Si 60 F 254, activée.

Eluant et solvant de dilution : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (80/20).

<sup>20</sup> Cf. ANNEXE n°10

Révélateur : Ultra-Violet (254 nm et 366 nm), vanilline sulfurique

Observations et remarques :

Les quantités recueillies sont suffisamment importantes pour poursuivre le fractionnement chimique. Les fractions CC1-3 et CC1-4 contiennent le produit recherché reconnaissable par sa couleur violet mauve après révélation à la vanilline sulfurique. En comparant les deux fractions, on remarque que la zone qui nous intéresse contient deux ou plusieurs produits. En effet la tâche supérieure qui apparaît sur la fraction de CC1-3 ne ressort pas sur celle de CC1-4.

Il est donc intéressant de fractionner de nouveau notre fraction CC1-3 pour essayer de séparer les différents produits. Quant à la fraction CC1-4 qui semble mieux purifiée, elle pourra être analysée directement en HPLC.

### 9.2.2. Deuxième fractionnement sur CC1-3

Cette nouvelle chromatographie est destinée à séparer les différents produits qui sont contenus dans la fraction CC1-3.

Caractéristique de la colonne : Hauteur 60 cm ; Diamètre 2.5 cm

Phase stationnaire utilisée : Silice 60 (phase normale)

Quantité de silice : 50g

Quantité injectée sur la colonne : 350,4 mg

Cette deuxième séparation nous permet d'obtenir 12 nouvelles fractions :

Fractions	Couleur	Solvant	Masse (mg)
CC1-31	Incolore	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90/10)	0,6
CC1-32	Anneau marron orange	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (90/10)	0,3
CC1-33	Anneau jaune clair		3,9
CC1-34	Orange		8,2
CC1-35	Marron orange		51,9
CC1-36	Jaune clair		11,4
CC1-37	Anneau marron		107,1
CC1-38	Jaune clair		65,6
CC1-39	Jaune clair		51,1
CC1-3-10	Jaune clair		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH (50/50)
CC1-3-11	Anneau marron	7,1	
CC1-3-12	Jaune clair	3	

Tableau 5 : résultat du fractionnement sur colonne de CC1-3.

Rendement de la colonne :

Quantité déposée : 350,4 mg

Quantité recueillie : 312.6 mg

Rendement : 89.2%

➤ CCM comparative entre CC1-3 et ses fractions<sup>21</sup>

Support : plaque de silice Si 60 F 254, activée.

Eluant et solvant de dilution : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (80/20).

Révélateur : Ultra-Violet (254 nm et 366 nm), vanilline sulfurique

Observations et remarques :

Cette CCM permet de constater que les produits actifs se retrouvent dans les fractions CC1-35 à CC1-39. Une autre CCM focalisée sur ces cinq fractions permettra de mieux séparer les produits.

➤ Deuxième CCM comparative entre CC1-3 et les fractions CC1-35 à CC1-39<sup>22</sup>

Support : plaque de silice 60 F 254, activée.

Eluant et solvant de dilution : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (80/20).

Révélateur : Ultra-Violet (254 nm et 366 nm), vanilline sulfurique

Observations et remarques :

Cette plaque montre que le principe actif qui nous intéresse est présent dans l'un des deux ensembles de produits. Une purification en HPLC permettra de vérifier la pureté des fractions et de séparer nos produits des impuretés.

### 9.2.3. Analyse et séparation sur HPLC

Le détecteur d'absorption en U.V./visible lié au dispositif d'HPLC permet de visualiser les molécules grâce à leur spectre et ainsi de les séparer du reste de la fraction.

Un ensemble de fractions, comprenant CC1-4, CC1-3 et une partie de ses sous fractions, sera analysé afin de connaître l'éluant le mieux adapté pour séparer les produits. Une fois les conditions de fractionnement trouvées, on collectera séparément nos molécules.

➤ Analyse de CC1-3 et CC1-4<sup>23</sup>.

Colonne : μ Bondapack C<sub>18</sub>, analytique.

Débit : 1 ml/min.

Eluant : Eau / acétonitrile.

Quantité injecté : 40 μl

---

<sup>21</sup> Cf. ANNEXE n°11

<sup>22</sup> Cf. ANNEXE n°12

<sup>23</sup> Cf. ANNEXE n°13 et n°14

Résultats :

Premier pic de CC1-3 :

- Temps de rétention : 13,972 mn
- Maxima U.V. : 227 et 285,6 nm

Premier pic de CC1-4 :

- Temps de rétention : 14,016 mn
- Maxima U.V. : 230 et 286,7 nm

Interprétation des résultats :

L'utilisation du gradient Eau / Acétonitrile donne des résultats moyens, mais permet de constater que les deux fractions contiennent un produit commun. Ce produit qui sort à la quatorzième minute, possède un spectre U.V. reconnaissable à ces deux pics d'absorption aux longueurs d'ondes 286 et 227nm. Le pic est dans le cas de CC1-4 pratiquement pur alors que dans la fraction CC1-3 il est entouré par de nombreuses impuretés. Une analyse sur les produits obtenus par fractionnement de CC1-3, permettra d'isoler plus facilement les produits à purifier. Quant à la fraction CC1-4 on pourra collecter directement le produit.

➤ Analyse des fractions CC1-36 à CC1-38

Le choix de ces fractions se fait par l'observation des résultats des précédentes CCM (Annexe 10, 11 et 12).

Colonne :  $\mu$  Bondapack C<sub>18</sub>, analytique.

Débit : 1 ml/min.

Eluant : Eau / acétonitrile.

Quantité injectée : 40  $\mu$ l

Résultats :

Premier pic de CC1-36<sup>24</sup> :

- Temps de rétention : 7,301 mn
- Maximum U.V. : 232,4 nm

Premier pic de CC1-37<sup>25</sup> :

- Temps de rétention : 14,203 mn
- Maxima U.V. : 227,7 et 285,6 nm

Premier pic de CC1-38<sup>26</sup> :

- Temps de rétention : 15,059 mn
- Maxima U.V. : 233,6 nm

---

<sup>24</sup> Cf. ANNEXE n°15

<sup>25</sup> Cf. ANNEXE n°16

<sup>26</sup> Cf. ANNEXE n°17

Interprétations des résultats :

Les trois produits ne semblent posséder aucun pic en commun. Les impuretés environnantes empêchent peut-être de bien comparer les spectres U.V. Pour la suite de l'étude on se référera donc aux résultats des précédentes CCM. En analysant la CCM comparative de CC1-3, on peut supposer que la tâche de la fraction CC1-38 se rapproche de celle de la fraction CC1-4. Par conséquent en purifiant cet extrait par l'H.P.L.C., on peut espérer isoler la molécule.

➤ Fractionnement de la fraction CC1-38

Colonne :  $\mu$  Bondapack C<sub>18</sub>, semi-préparative.

Débit : 3 ml/min.

Eluant : Eau / acétonitrile.

Quantité injectée : 80  $\mu$ l

Résultats :

fraction	CC1-38/1	CC1-38/2	CC1-38/3
Masse (mg)	17,2	38,2	6

Tableau 6 : Fractionnement semi-préparatif de CC1-38

On récolte notre produit dans la fraction CC1-38/2.

➤ Fractionnement de la fraction CC1-4

Colonne :  $\mu$  Bondapack C<sub>18</sub>, semi-préparative.

Débit : 3 ml/min.

Eluant : Eau / acétonitrile.

Quantité injectée : 80  $\mu$ l

Résultats :

fraction	CC1-4/1	CC1-4/2	CC1-4/3
Masse (mg)	8,1	12,5	10,1

Tableau 7 : Fractionnement Semi-preparatif de CC1-4

Notre produit est récolté dans la fraction CC1-4/2.

➤ Analyse des fractions CC1-38/2<sup>27</sup> et CC1-4/2<sup>28</sup>

Colonne :  $\mu$  Bondapack C<sub>18</sub>, analytique.

Débit : 1 ml/min.

Eluant : Eau / acétonitrile.

Quantité injectée : 40  $\mu$ l

Interprétations des résultats :

Alors que l'on s'attendait à ne voir qu'un seul pic, signe que le produit recueilli est pur, on observe pour les fractions CC1-38/2 et CC1-4/2 un ensemble de pics qui n'apparaissent même pas sur les analyses précédentes.

Les raisons de ce mauvais fractionnement peuvent venir de différentes origines. Néanmoins, on peut se demander si notre produit ne se révèle pas instable

Seule la suite de l'étude, grâce aux méthodes d'analyses spectrales et aux tests sur le virus de la dengue, permettra de confirmer l'hypothèse de l'instabilité du produit ou d'une analyse défectueuse.

### **9.3. Discussion**

Une faible quantité de chaque fraction susceptible de contenir la molécule active (CC1-4, CC1-35 à CC1-39, CC1-38/2 et CC1-4/2) a été prélevée et confiée à l'institut Pasteur où elles seront testées sur le virus de la dengue. L'analyse est en cours et les résultats seront disponibles très prochainement.

Si l'activité antivirale des deux fractions est confirmée, elles seront alors envoyées aux collaborateurs de l'unité de recherche de Toulouse pour l'identification structurale. Cela permettra de connaître la ou les molécules responsables de l'activité et de savoir s'il s'agit d'une substance nouvelle.

---

<sup>27</sup> Cf. ANNEXE n°18

<sup>28</sup> Cf. ANNEXE n°19

## **10. CONCLUSION**

Après l'identification, si la ou les molécules actives sur le virus de la dengue se révèlent innovantes, les études pharmacologiques permettront de déterminer son degré de toxicité sur le corps humain. Enfin, si le principe actif obtient l'approbation de commercialisation, on peut espérer voir apparaître une nouvelle thérapie contre le virus de la dengue.

Ce stage m'a énormément appris sur le métier de chercheur. J'ai ainsi pu apprécier les joies et difficultés que l'on peut rencontrer dans la recherche. Il m'a permis de me familiariser avec les techniques de laboratoire et notamment certaines méthodes de chromatographies essentielles dans la chimie des substances naturelles.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1) [www.ird.fr](http://www.ird.fr)
- 2) [www.ird.nc](http://www.ird.nc)
- 3) [www.univ-nc.nc](http://www.univ-nc.nc)
- 4) ROOSET R., CAUDE M., JARDY A., Manuelle pratique de la chromatographie en phase liquide, (deuxième édition), Edition MASSON, Paris, 1982.
- 5) LEVI C., LABOUTE P., BARGIBANT G., MENU J.L. – Sponge of the New Caledonian Lagoon, Edition de l'ORSTOM, collection Faune tropicale N°XXX, 1991, Paris.
- 6) HOOPER J. N. A., WIEDENMAYER F. – Zoological catalogue of Australia : Porifera, 12, Edition CSIRO Australia, 1994, 187-190 225-247.
- 7) [www.webencyclo.com](http://www.webencyclo.com) , Edition Atlas 2001 (Article :éponge) .
- 8) GENTOU J., RECHERCHE DE SUBSTANCES NATURELLES D'INTERET BIOLOGIQUE CHEZ DES INVERTEBRES MARINS: LES SPONGIAIRES, Rapport de stage à l'I.R.D. , 1999.
- 9) [www.pasteur.fr](http://www.pasteur.fr) (Article : la dengue)
- 10) DEBITUS C., GERALD F. LAILLE M., In vitro antiviral activity on dengue of marine natural products CMLS Cellular and Molecular Life Sciences, n°54, 1998, 167-170
- 11) DEBITUS C., GERALD F. LAILLE M., LAURENT D., FROSTIN M., GERALD F. In vitro antiviral activity on dengue of marine natural products Communication Affichée au 9<sup>ème</sup> Symposium International sur les Produits Naturels Marins, Townsville, 1998.
- 12) LAURENT D. (IRD), LAILLE M. (IPNC), Recherche de produit antiviraux contre la dengue dans la biodiversité marine de Nouvelle-Calédonie Décembre 1999.
- 13) GONZALEZ A.G., ESTRADA D.M., MARTIN J.D., MARTIN V.S., PEREZ C., PEREZ R., New antimicrobial diterpenes from sponge *Spongia officinalis*, Tetrahedron, 1984, 40, 4109-4113.
- 14) KOMOTO S., Mc CONNELL O.J., CROSS S.S., Antitumor and antiviral furanoditerpenoids from a marine sponge, Eur. Pat., Appl., 1988, 1-13.

## **LISTE DES ABREVIATIONS.**

IRD : Institut de Recherche pour le Développement

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

UNC : Université de la Nouvelle-Calédonie

LPSN : Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles I.R.D./U.N.C.

CCM :Chromatographie sur Couche Mince

UV :Ultra-Violet

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

HPLC (ou CLHP) : Chromatographie Liquide Haute Pression (ou en anglais :High Performance/Pressure Liquid Chromatography)

## TABLE DES ANNEXES.

ANNEXE 1 Extraction : mode opératoire.....	pII
ANNEXE 2 : CCM :mode opératoire.....	pIII
ANNEXE 3 : Chromatographie sur colonne : mode opératoire.....	pIV
ANNEXE 4 : Mission de prospection et de récolte.....	pV
ANNEXE 5 : CCM 1.....	pVII
ANNEXE 6 : CCM 2.....	pVII
ANNEXE 7 : CCM 3.....	pVIII
ANNEXE 8 : CCM 4.....	pIX
ANNEXE 9 : CCM 5.....	pX
ANNEXE 10 : CCM 6.....	pXI
ANNEXE 11 : CCM 7.....	pXII
ANNEXE 12 : CCM 8.....	pXIII
ANNEXE 13 : HPLC 1.....	pXIV
ANNEXE 14 : HPLC 2.....	pXV
ANNEXE 15 : HPLC 3.....	pXVI
ANNEXE 16 : HPLC 4.....	pXVII
ANNEXE 17 : HPLC 5.....	pXVIII
ANNEXE 18 : HPLC 6.....	pXIX
ANNEXE 19 : HPLC 7.....	pXX

## Annexe 1 Extraction : mode opératoire

### ➤ EXTRAIT A

Peser 10g d'éponge et verser dans un erlenmeyer.

Prendre une cuvette remplie de glace.

Mettre 100ml d'eau déminéralisée ( ou plus) dans l'erlenmeyer, le déposer dans la cuvette de glace à l'abri de la lumière.

Agiter pendant environ ½ heure (agitateur magnétique).

Laisser décanter en arrêtant l'agitation.

Prendre le surnageant.

Remettre au moins 100ml d'eau et agiter ½ heure, laisser décanter, prendre le surnageant.

Refaire une troisième fois.

Centrifuger à 6°C, 2500 tours/min pendant 15 minutes (ne pas oublier d'équilibrer).

Récupérer le filtrat. Filtrer sur papier filtre.

Mettre dans un sac au congélateur, lyophiliser ⇒ Extrait A

### ➤ EXTRAITS B ET C

Peser 50g d'éponge dans un grand bécher de 1L.

Ajouter 200ml EtOH (ou plus) et 50 ml d'eau déminéralisée.

Agiter ¼ d'heure environ avec une tige.

Filtrer sur buchner avec la trompe à vide et filtrer de nouveau avec papier filtre.

Reprendre l'éponge avec 250ml d'EtOH.

Agiter ¼ d'heure et filtrer.

Refaire une troisième fois ou plus si nécessaire.

Evaporer l'EtOH.

Ajouter 250ml d'eau au résidu aqueux.

Faire un partage avec au moins 3\*100ml de CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>.

Séparer la phase aqueuse de la phase organique.

Sécher la phase organique ( avec du sulfate de sodium anhydre), filtrer et évaporer à sec.

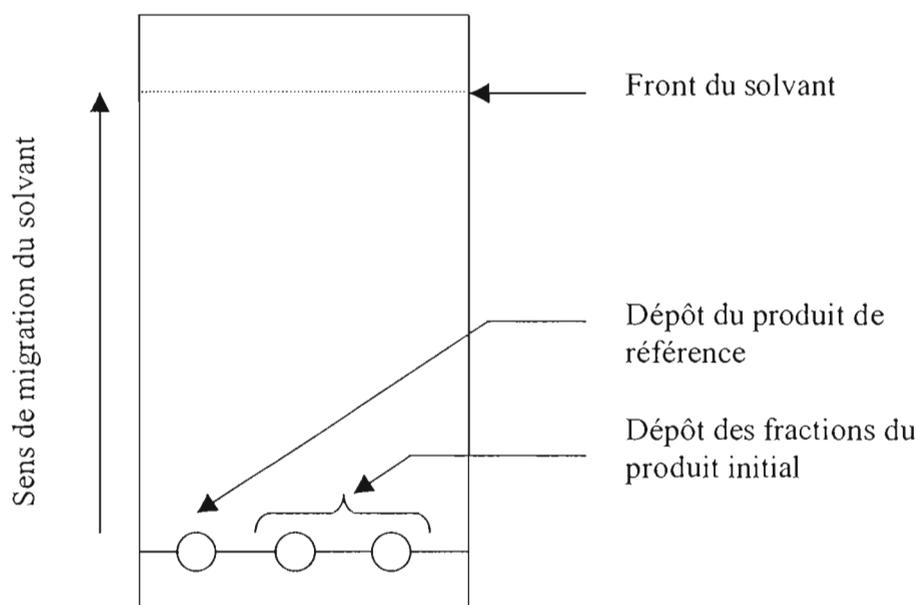
Mettre dans un pilulier ⇒ EXTRAIT C

Evaporation de la phase aqueuse pour enlever tout autre solvant restant et mettre dans un sac au congélateur.

Lyophiliser (s'il reste du solvant la lyophilisation ne se fera pas) ⇒ EXTRAIT B

## ANNEXE 2 : CCM :mode opératoire.

1. Diluer une faible quantité de produit dans le solvant correspondant à l'extraction.
2. A l'aide d'un capillaire, déposer sur une plaque de silice, à 1cm de la base, sur une ligne tracée au crayon, une goutte d'extrait (de façon à avoir un spot).
3. Remplir la cuve d'environ 0.5 cm du solvant de migration choisi.
4. Déposer la plaque dans la cuve contenant le solvant.
5. Laisser le solvant migrer jusqu'en haut de la plaque.
6. Retirer la plaque et la laisser sécher sur la hotte ( ou au sèche-cheveux).
7. 3 méthodes sont possibles pour révéler les tâches :
  - Les U.V. à deux longueurs d'ondes différentes : 254 et 366 nm
  - La pulvérisation à la vanilline sulfurique : on pulvérise la vanilline sur la plaque de silice et les tâches apparaissent après chauffage. C'est un test universel permettant de visualiser la plupart des composés organiques.
  - La pulvérisation au réactif de DRAGENDORFF pour déceler les alcaloïdes (composés contenant de l'azote).



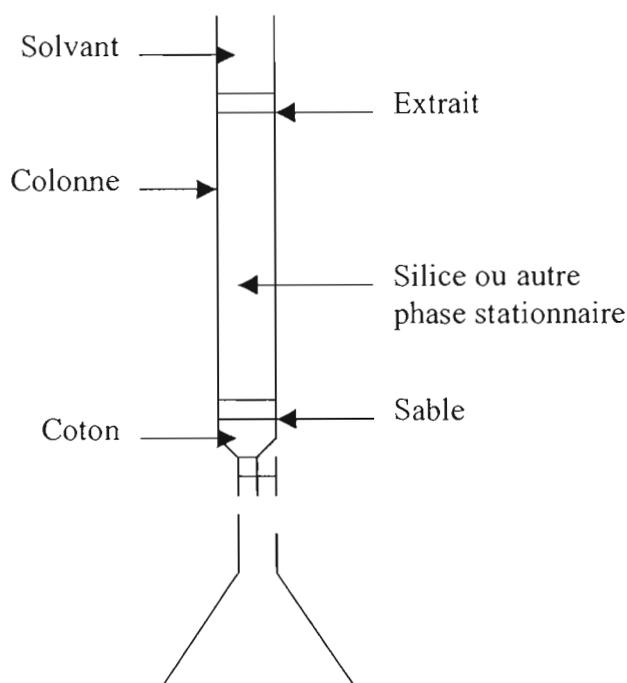
Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

### ANNEXE 3 : Chromatographie sur colonne : mode opératoire

But :Le fractionnement chimique par chromatographie permet de purifier le principe actif de l'extrait initial. Cette méthode permet la séparation des composants d'un mélange à analyser grâce à leur migration différentielle le long du dispositif séparateur. Le principe consiste à fixer les produits d'un mélange sur la phase stationnaire puis à les faire migrer à des vitesses différentes suivant leur nature en utilisant des phases mobiles (l'éluant). il existe différentes sortes de résines jouant le rôle de phase stationnaire.

1. La résine est mise à tremper dans le premier solvant qui passera dans la colonne.
2. Disposer au fond de la colonne un morceau de coton et 1cm de sable de façon à ce que la séparation des produits soit bien nette
3. Verser la préparation de la résine dans la colonne.
4. Bien passer la résine en tapotant sur la colonne.
5. Déposer avec précaution l'extrait préalablement dilué dans un minimum de solvant.
6. Le sommet de la colonne ne doit pas être percé et en aucun cas la colonne ne doit s'assécher.
7. La résine adsorbe l'extrait, puis nous pouvons débiter la séparation en introduisant successivement les différents éluants choisis.

Quand l'éluant passe dans la colonne, il emporte avec lui tous les composés de même affinité.



Chromatographie sur colonne

## Annexe 4 : Mission de prospection et de récolte

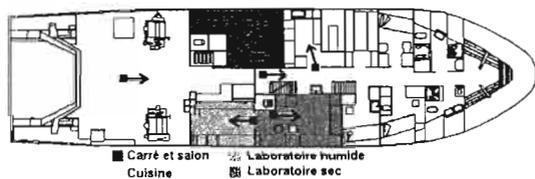
Moyen navigant : N/O Alis



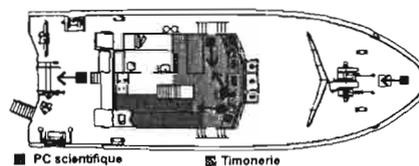
N/O Alis de Concarneau.

L'Alis, le navire océanographique de l'IRD, est le plus lourd des outils scientifiques disponibles sur le territoire pour des missions de prospections et de récoltes. L'Alis a été conçu sur les plans originaux d'un chalutier, puis modifié pour les besoins spécifiques de la recherche. Il fut mis en service en 1987 pour succéder au VAUBAN lui même mis en service 40 ans plus tôt.

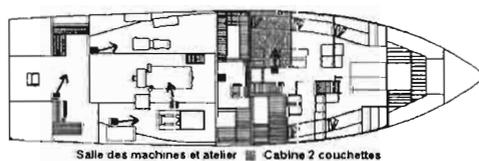
Navire océanographique de 28,6m avec une autonomie de 15 jours de mer, il peut embarquer 18 personnes, dont 12 membres d'équipage et 6 personnels scientifiques. Il effectue 228 jours de mission sur 365.



Pont principal



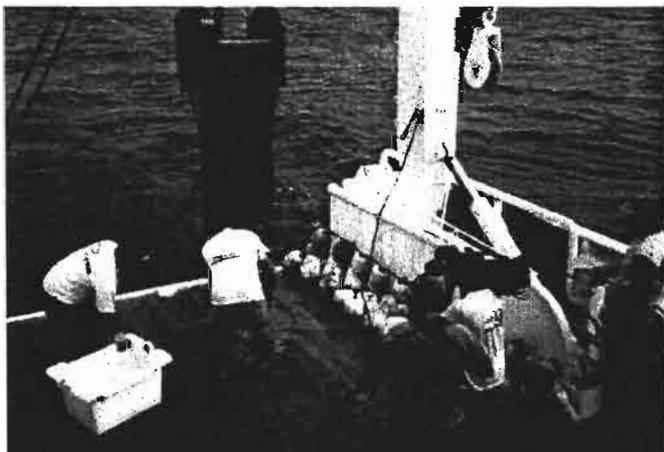
Pont supérieur



Sous pont principal

Moyen de récolte :

- Le dragage :



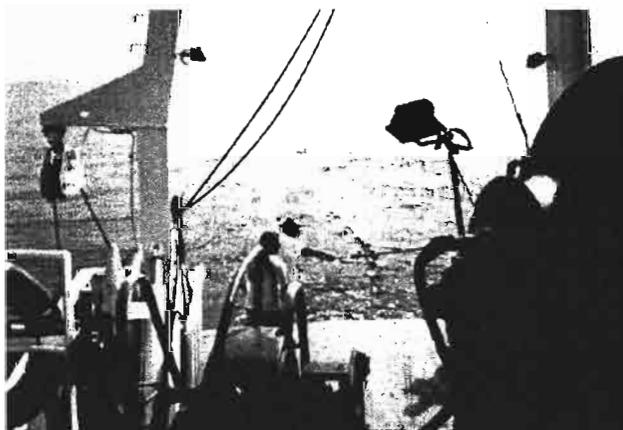
La relève de la drague  
WARREN

La drague WARREN est un outil spécifiquement étudié pour le raclage de tous types de fond (sablonneux, rocheux, etc.). Toutefois, du fait de sa conception, il se remplit vite de matières inertes et ne peut donc rester longtemps immergé

- Le chalutage

Mise à l'eau d'un chalut de pêche

Le chalut est un instrument de pêche très efficace. Grâce à sa grande taille, il peut récolter de grandes quantités d'organismes. Toutefois, sa conception le rend très fragile, et il ne peut racler les fonds sablonneux.



- Prospection et récolte en plongée autonome :



Observation d'algues du genre *Caulerpa*.

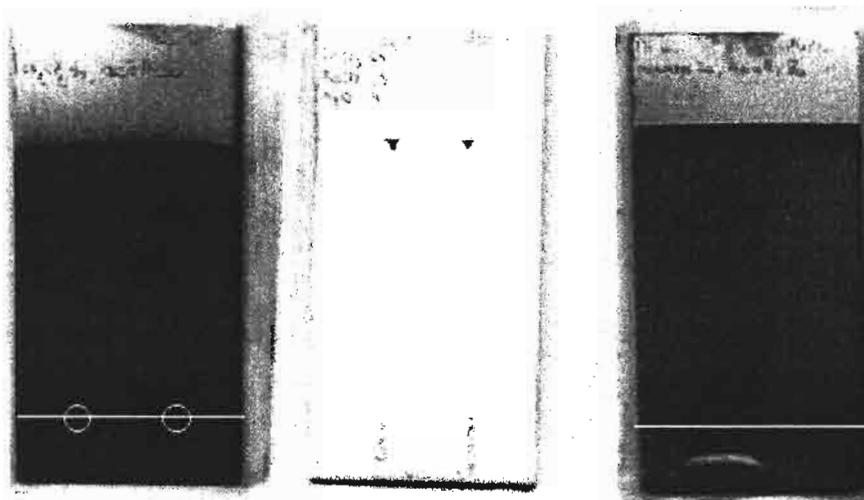


Récolte d'octocoralliaires en plongée autonome.

Les récoltes en plongées autonomes permettent de rapporter en plusieurs immersions une quantité moyenne d'organismes, et de photographier *In situ* les spécimens.

## Annexe 5 : Première CCM préliminaire

Solvant de migration :  
 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$   
(72/26,6/4,4)

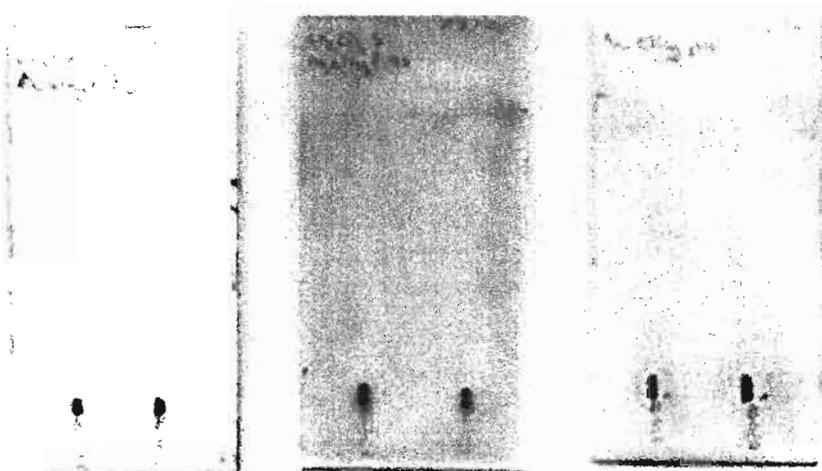


Solvant de migration :  
 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / Ac éthyl (50/50)

Solvant de migration :  
Hexane / Ac éthyl (20/80)

## Annexe 6 : Deuxième CMM préliminaire

Solvant de migration :  
 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / Ac éthyl (5/95)



Solvant de migration :  
 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / Ac éthyl (20/80)

Solvant de migration :  
Ac éthyl pur

**Annexe 7 :Troisième CMM préliminaire**

Solvant de migration :  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH (80/20)

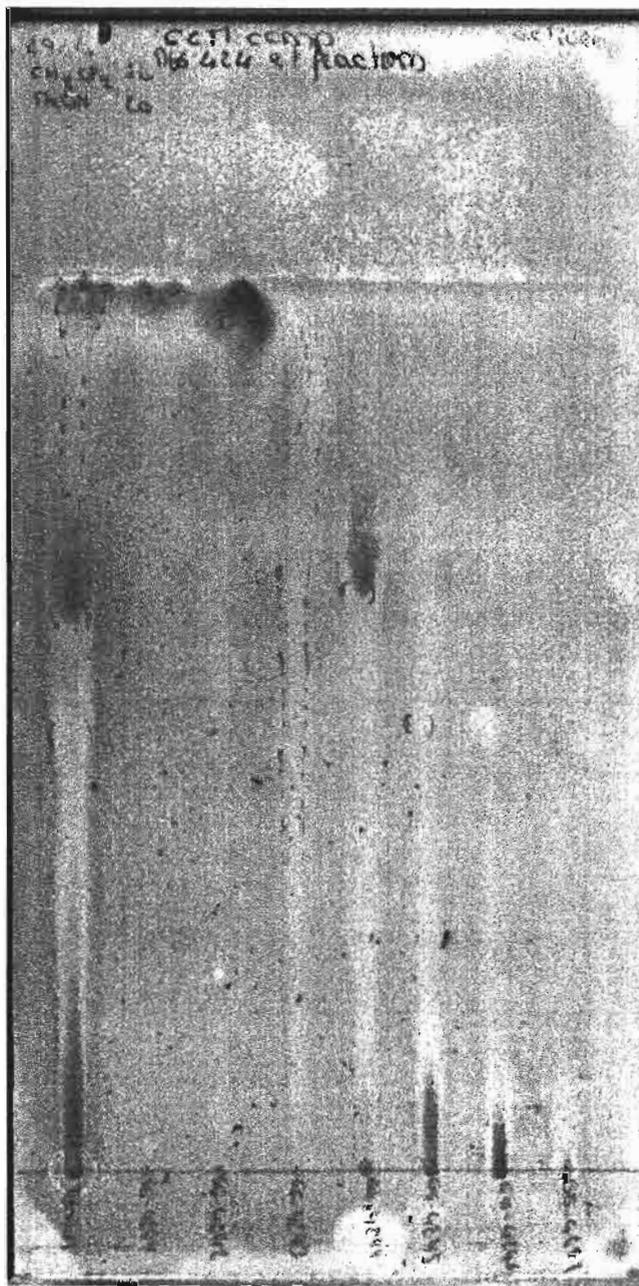


MF 66-423

MF 66-424

**Annexe 8 : CCM comparative entre MF66-424 et ses fractions**

Solvant de migration :  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH (80/20)



MF 66-4247  
MF 66-4246  
MF 66-4245  
MF 66-4244  
MF 66-4243  
MF 66-4242  
MF 66-4241  
MF 66-424

**Annexe 9 : CCM comparative entre MF66-423 et de ses fractions.**

Solvant de migration :  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH (80/20)



**Annexe 10 : CCM comparative entre R 1561 et ses fractions**

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20  
 MeOH 80  
 2/15  
 2/15  
 2/15

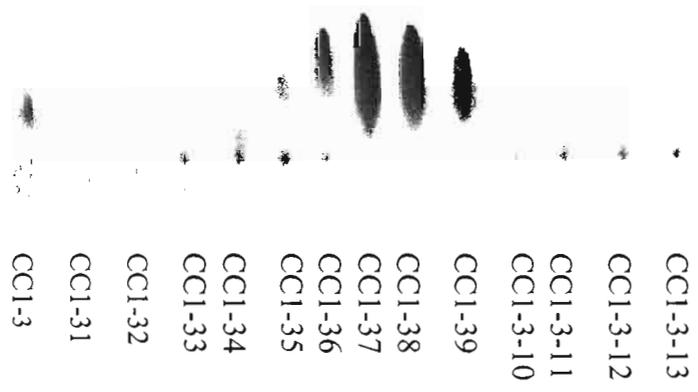
Solvant de migration :  
 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH (80/20)



Annexe 11 : première CCM comparative entre CC1-3 et ses fractions

CC1-3  
CC1-3-10  
CC1-3-11  
CC1-3-12  
CC1-3-13

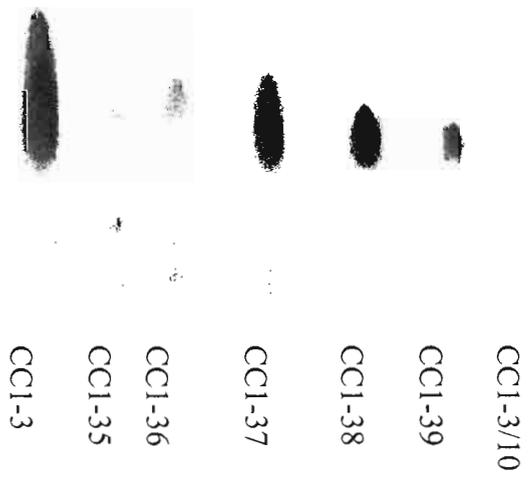
Solvant de migration :  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH (90/10)



**Annexe 12 : Deuxième CCM comparative entre CC1-3 et ses fractions**

Résultat de la CCM comparative  
de CC1-3 et ses fractions  
dans le solvant de migration  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH (90/10)

Solvant de migration :  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH (90/10)

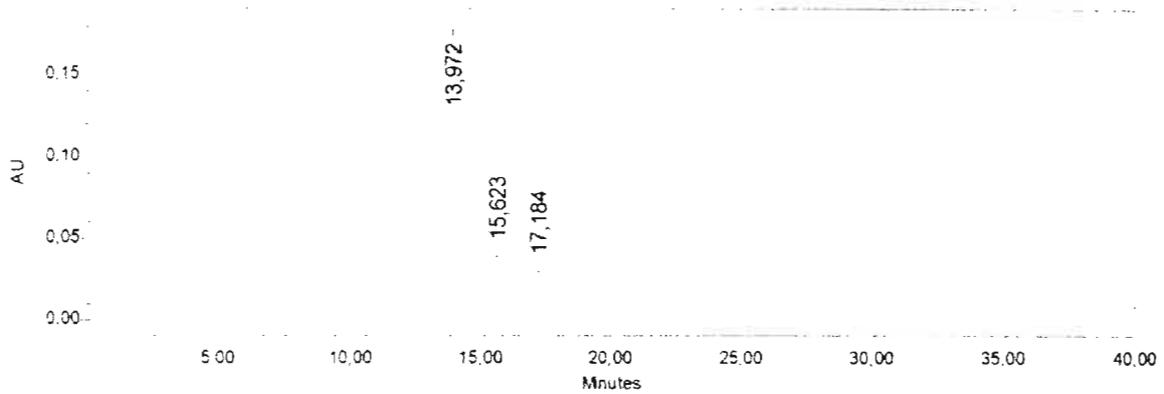


# Annexe 13 : Analyse en HPLC de CC1-3

Current Date 25/01/2002

1

## 1561 C cc 1-3 (acétonitrile)



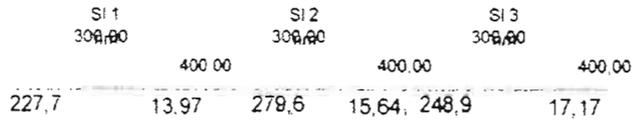
SampleName 1561 C cc 1-3 (acétonitrile) Date Acquired 08/11/2001 10:29:47 Processed Channel Descr. PDA 257,2 nm

### Spectrum Index Plot

Annexe

Solvant A: Eau  
Solvant B: Acétonitrile

Colonne: U Bondapack C18 Analytique



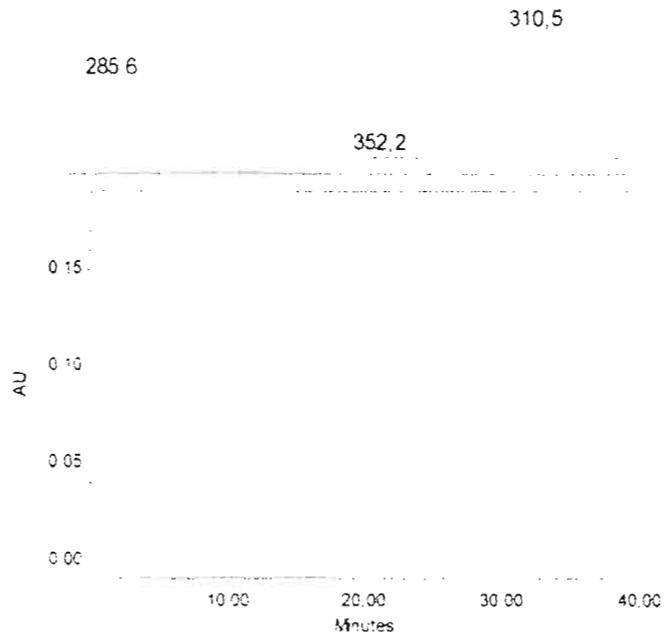
Instrument Method: SB  
Stored 08/11/2001 10:28:18

Comments

Modified User System  
Locked No  
Method Id 4109  
Method Version 49  
Edit User

### PCM Gradient Table

Time	Flow	%A	%B	%C	Curve
1	1,00	60,0	40,0	0,0	
2	30,00	1,00	20,0	80,0	0,0
3	35,00	1,00	20,0	80,0	0,0
4	40,00	1,00	60,0	40,0	0,0
5	41,00	0,20	60,0	40,0	0,0

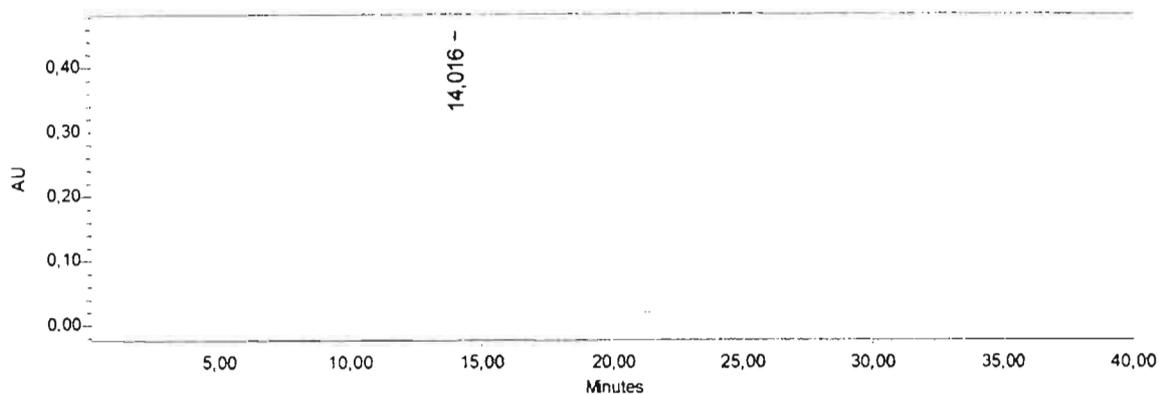


# Annexe 14 : Analyse en HPLC de CC1-4

Current Date 25/01/2002

1

## 1561 C cc 1-4 (acétonitrile)



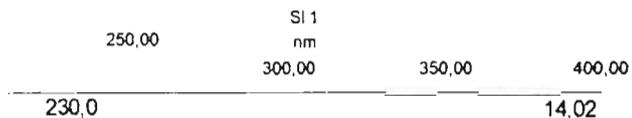
SampleName 1561 C cc 1-4 (acétonitrile) Date Acquired 08/11/2001 13:43:24 Processed Channel Descr. PDA 247,9 nm

### Spectrum Index Plot

Annexe

Solvant A: Eau  
Solvant B: Acétonitrile

Colonne: U Bondapack C18 Analytique



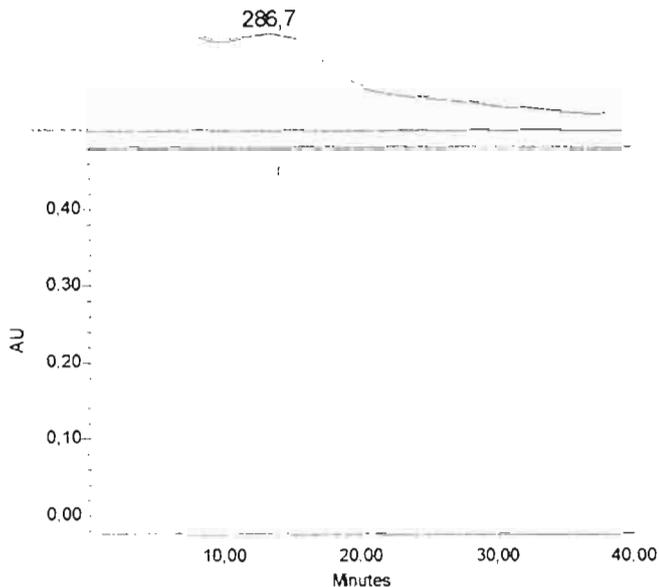
Instrument Method: SB  
Stored: 08/11/2001 10:28:18

#### Comments

Modified User System  
Locked No  
Method Id 4109  
Method Version 49  
Edit User

#### PCM Gradient Table

Time	Flow	%A	%B	%C	Curve
1	1,00	60,0	40,0	0,0	
2	30,00	1,00	20,0	80,0	6
3	35,00	1,00	20,0	80,0	6
4	40,00	1,00	60,0	40,0	6
5	41,00	0,20	60,0	40,0	6

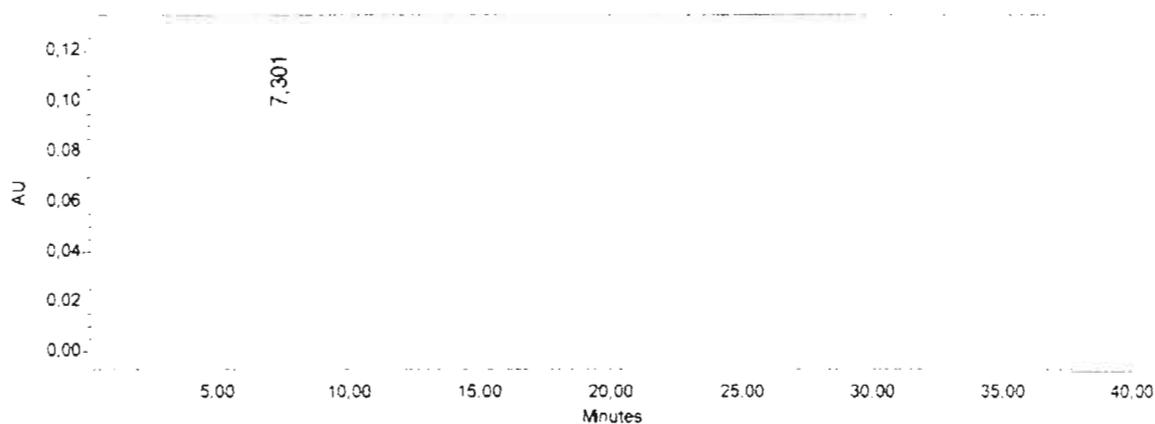


# Annexe 15 : Analyse en HPLC de CC1-36

Current Date 25/01/2002

1

1561 C cc 1-3/6



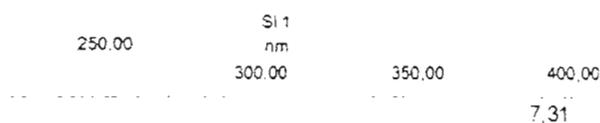
SampleName 1561 C cc 1-3/6 Date Acquired 09/11/2001 09:00:35 Processed Channel Descr. PDA 252.7 nm

### Spectrum Index Plot

Annexe

Solvant A: Eau  
Solvant B: Acétonitrile

Colonne: U Bondapack C18 Analytique



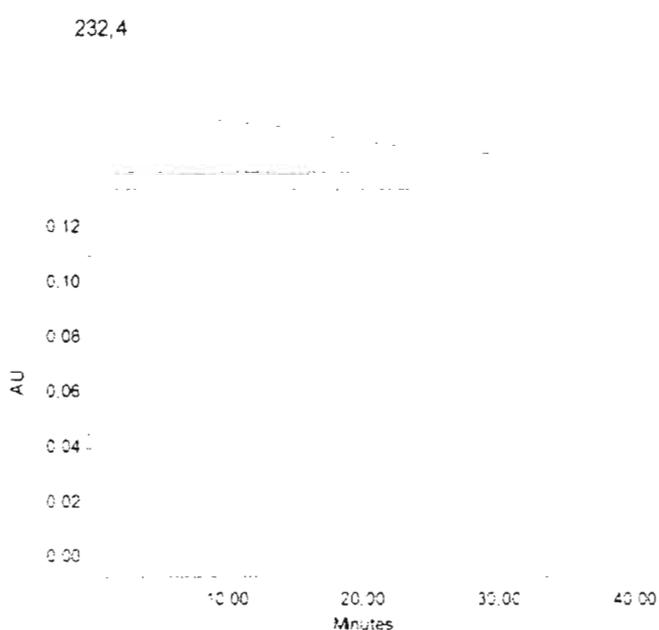
Instrument Method: SB  
Stored 08/11/2001 10:28 18

### Comments

Modified User System  
Locked No  
Method Id 4109  
Method Version 49  
Edit User

### PCM Gradient Table

Time	Flow	%A	%B	%C	Curve
1	1.00	60.0	40.0	0.0	
2	30.00	1.00	20.0	80.0	6
3	35.00	1.00	20.0	80.0	6
4	40.00	1.00	60.0	40.0	6
5	41.00	0.20	60.0	40.0	6

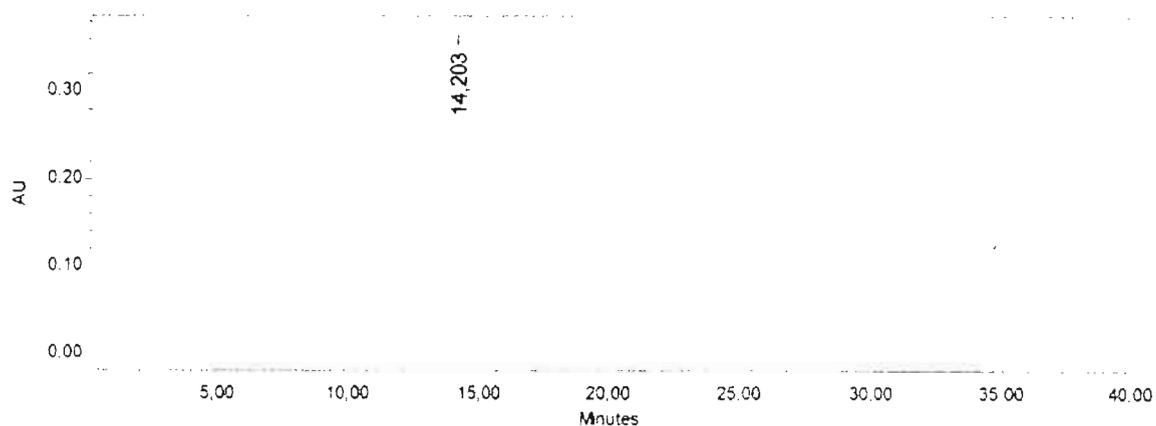


# Annexe 16 : Analyse en HPLC de CC1-37

Current Date 25/01/2002

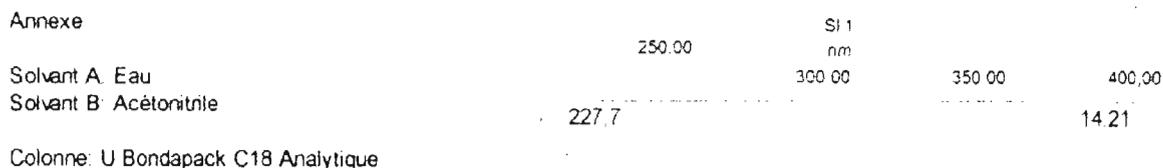
1

1561 C cc 1-3/7



SampleName 1561 C cc 1-3/7 Date Acquired 09/11/2001 15:59:58 Processed Channel Descr. PDA 236,6 nm

### Spectrum Index Plot



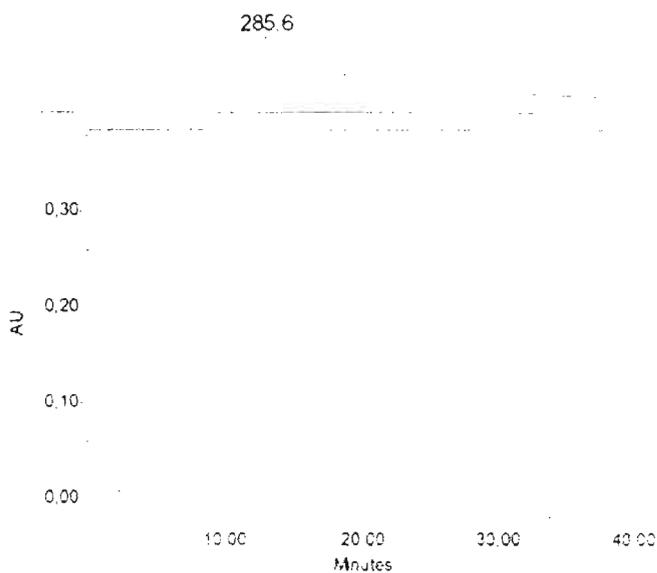
Colonne: U Bondapack C18 Analytique

Instrument Method: SB  
Stored: 08/11/2001 10:28:18

Comments  
Modified User System  
Locked No  
Method Id 4109  
Method Version 49  
Edit User

### PCM Gradient Table

Time	Flow	%A	%B	%C	Curve
1	1.00	60.0	40.0	0.0	
2	30.00	1.00	20.0	80.0	6
3	35.00	1.00	20.0	80.0	6
4	40.00	1.00	60.0	40.0	6
5	41.00	0.20	60.0	40.0	6

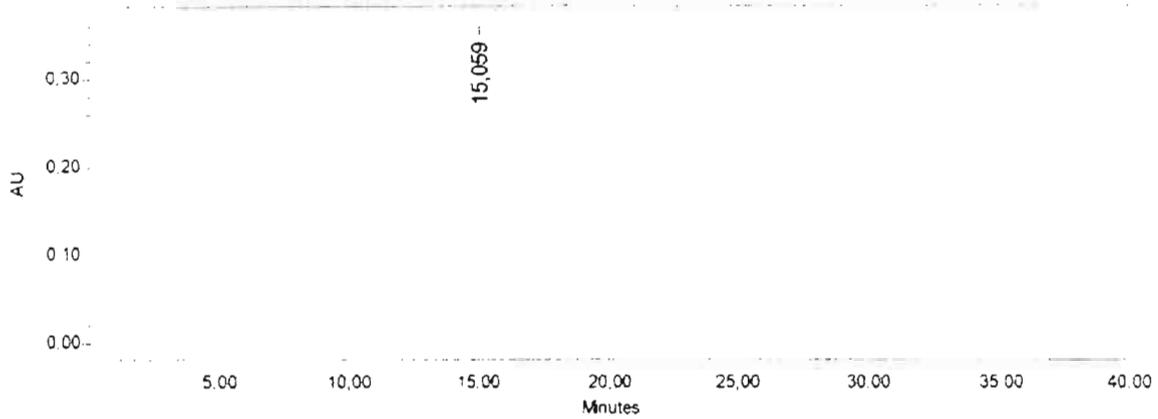


# Annexe 17 : Analyse en HPLC de CC1-38

Current Date 25/01/2002

1

1561 C cc 1-3/8



SampleName 1561 C cc 1-3/8 Date Acquired 09/11/2001 14:42:48 Processed Channel Descr. PDA 244.0 nm

### Spectrum Index Plot

Annexe

Solvant A: Eau  
Solvant B: Acétonitrile

Colonne: U Bondapack C18 Analytique



233.6

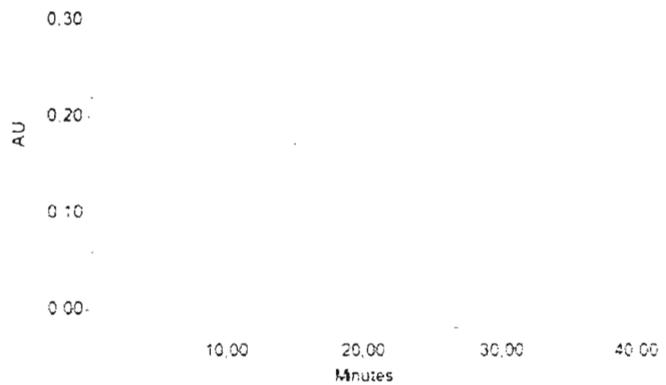
Instrument Method: SB  
Stored 08/11/2001 10:28:18

### Comments

Modified User System  
Locked No  
Method Id 4109  
Method Version 49  
Edit User

### PCM Gradient Table

Time	Flow	%A	%B	%C	Curve
1	1.00	60.0	40.0	0.0	
2	30.00	1.00	20.0	80.0	6
3	35.00	1.00	20.0	80.0	6
4	40.00	1.00	60.0	40.0	6
5	41.00	0.20	60.0	40.0	6

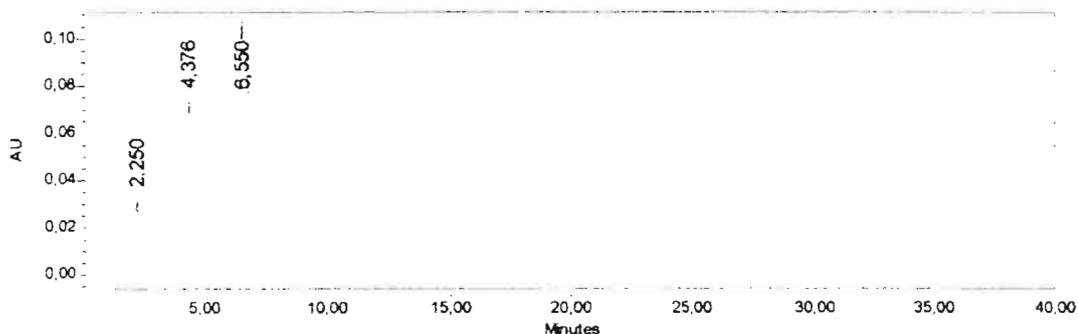


# Annexe 19 : Analyse en HPLC de CC1-38/2

Current Date 12/04/2002

1 of 1

R 1561C cc 1-38/2



SampleName R 1561C cc 1-38/2 Date Acquired 16/11/2001 16:07:47 Processed Channel Descr: PDA 243,7 nm

### Spectrum Index Plot

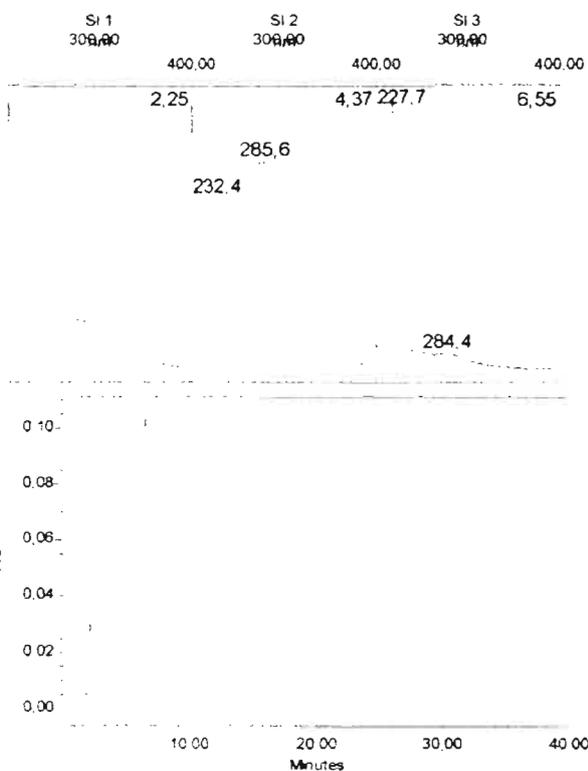
Annexe

Solvent A: Eau  
Solvent B: Acétonitrile

Colonne: U Bondapack C18 Analytique

Instrument Method: SB  
Stored 16/11/2001 16:00:06

Comments  
Modified User System  
Locked No  
Method Id 4617  
Method Version 51  
Edit User



### PCM Gradient Table

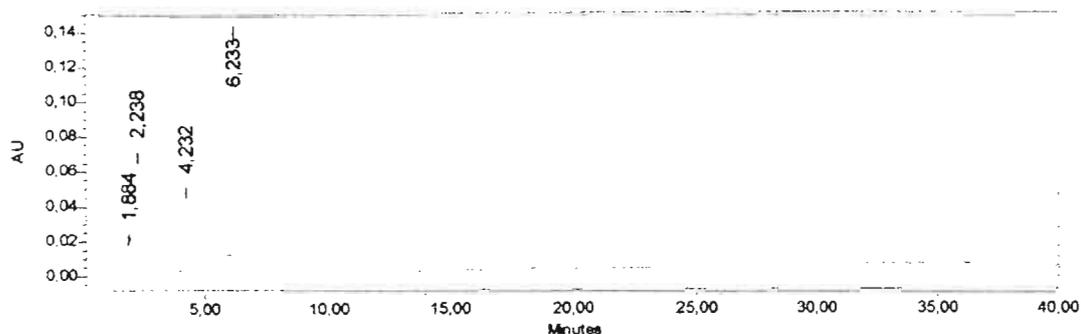
	Time	Flow	%A	%B	%C	Curve
1		1.00	60.0	40.0	0.0	
2	30.00	1.00	20.0	80.0	0.0	6
3	35.00	1.00	20.0	80.0	0.0	6
4	40.00	1.00	60.0	40.0	0.0	6
5	41.00	0.20	60.0	40.0	0.0	6

# Annexe 20 : Analyse en HPLC de CC1-4/2

Current Date 12/04/2002

1 of 1

R 1561C cc 1-4/2 (2ième inj.)



SampleName R 1561C cc 1-4/2 (2ième inj.) Date Acquired 16/11/2001 15.06.42 Processed Channel Descr. PDA 243,5 nm

### Spectrum Index Plot

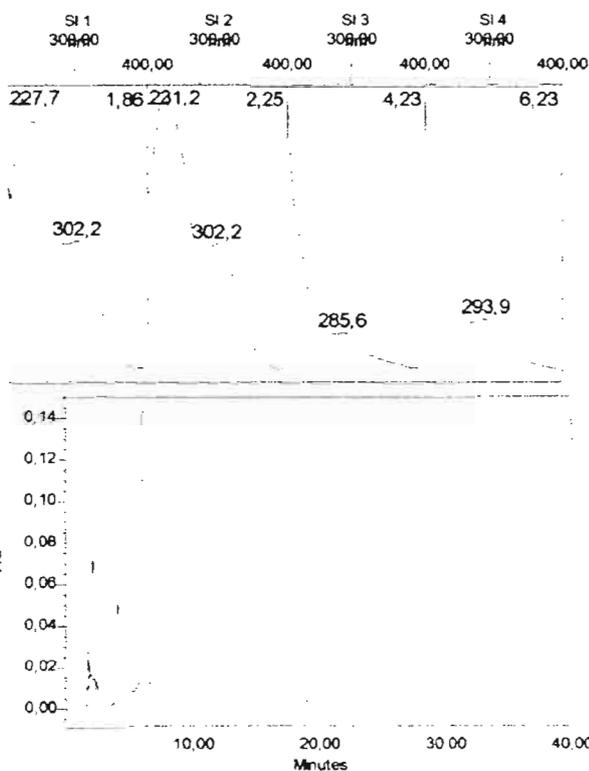
Annexe

Solvant A: Eau  
Solvant B: Acétonitrile

Colonne: U Bondapack C18 Analytique

Instrument Method: SB  
Stored: 16/11/2001 11:20:21

Comments  
Modified User System  
Locked No  
Method Id 4551  
Method Version 50  
Edit User



### PCM Gradient Table

Time	Flow	%A	%B	%C	Curve
1	1,00	60,0	40,0	0,0	
2	30,00	1,00	20,0	80,0	6
3	35,00	1,00	20,0	80,0	6
4	40,00	1,00	60,0	40,0	6
5	41,00	0,20	60,0	40,0	6

# Listing des quantités de produits restants

Extrait 1561 C

chromatographie en phase normale

	CC1-1	CC1-2	CC1-3	CC1-4	CC1-5	CC1-6	CC1-7
Quantité 1 (mg)	38	23,1	264,4	32,3	14	23,6	19,8
Quantité 2 (mg)	31,3	22,2	X	58,1	12,3	13,5	-

Chromatographie en phase normal

HPLC

	CC1-4/1	CC1-4/2	CC1-4/3
Quantité1(mg)	2,4	12,5	3,2
Quantité2 (mg)	3,2	X	3,2
Quantité3 (mg)	2,5	X	3,7

	CC1-31	CC1-32	CC1-33	CC1-34	CC1-35	CC1-36
Quantité 1(mg)	0,6	0,3	3,9	8,2	8,4	11,3
Quantité 2(mg)	-	-	-	-	43,5	2,9

	CC1-37	CC1-38	CC1-39	CC1-3/10	CC1-3/11	CC1-3/12
Quantité 1(mg)	110,2	4,5	44,3	2,3	7,1	3
Quantité 2(mg)	3	X	3	-	-	-

HPLC

	CC1-38/1	CC1-38/2	CC1-38/3
Quantité1 (mg)	8,5	35,1	2,8
Quantité2 (mg)	8,7	X	3,2

Test antiviral  
(sur la dengue)

Tests antiviraux  
(sur la dengue)

**Legende**

- CC1/...:Fraction contenant le principe actif et envoyée pour test dengue (sauf CC1-3)
- X: fraction utilisée
- "-": quantité épuisée