HAL
open science

Recherche de molécules non-toxiques actives en antifouling à partir d'organismes marins de Méditerranée

Yannick Viano

▶ **To cite this version:**

Yannick Viano. Recherche de molécules non-toxiques actives en antifouling à partir d'organismes marins de Méditerranée. Chimie. Université du Sud Toulon Var, 2010. Français. NNT : . tel-00595753

HAL Id: tel-00595753

https://theses.hal.science/tel-00595753v1

Submitted on 25 May 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université du Sud Toulon-Var

Ecole doctorale des Sciences Chimiques (ED 250)

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université du Sud Toulon-Var

Discipline : Chimie

Recherche de molécules non-toxiques actives en antifouling à partir d'organismes marins de Méditerranée

Soutenue le 16 juin 2010 par

Yannick VIANO

Directeur de thèse : Pr Louis PIOVETTI

Co-directeur de thèse : Dr Gérald CULIOLI

JURY

M. Eric DESLANDES	Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
M. Ali AL MOURABIT	DR CNRS, ICSN Gif-sur-Yvette	Rapporteur
M. Olivier THOMAS	MC, Université de Nice Sophia-Antipolis	Examinateur
M. Louis PIOVETTI	Professeur émérite, Université du Sud Toulon-Var	Examinateur
M. Gérald CULIOLI	MC, Université du Sud Toulon-Var	Examinateur
M. Yves BLACHE	Professeur, Université du Sud Toulon-Var	Examinateur
M. Alain BARCELO	Responsable scientifique du Parc national de Port-Cros	Invité

Liste des figures 1
Liste des tableaux 5
Abréviations 7
Glossaire 8

Introduction générale 11

Partie A : Analyse des données bibliographiques 15

I. Le parc national de Port-Cros 16

II. Etude bibliographique des organismes étudiés 18
II.1. Algue verte : *Caulerpa taxifolia* 19
II.1.1. Description biologique et distribution de l'espèce *Caulerpa taxifolia* 20
a/ Position systématique 20
b/ Description morphologique 20
c/ Répartition géographique et caractère invasif 21
II.1.2. Etude chimique du genre *Caulerpa* 22
a/ Métabolites isolés de *Caulerpa taxifolia* 22
La caulerpényne et ses dérivés 23
La caulerpine 24
La composition en stérols 24
Autres composés 25
b/ Composés issus d'autres espèces du genre *Caulerpa* 25
Caulerpa prolifera 25
Caulerpa racemosa 26
Composés issus d'espèces tropicales du genre *Caulerpa* 27
II.1.2. Etudes en écologie chimique portant sur *Caulerpa taxifolia* 28
II.2. Algues brunes : *Dictyota* sp. et *Dictyota dichotoma* 28
II.2.1 Description biologique du genre *Dictyota* 29
a/ Position systématique du genre *Dictyota* 29
b/ Répartition géographique 30
c/ Description morphologique 30
Dictyota dichotoma 30
Dictyota sp. 31
II.2.2. Etude chimique du genre Dictyota 31
a/ Diterpènes cycliques 31
Voies biosynthétiques des différentes familles de diterpènes cycliques 31
Diterpènes du groupe I 32
Diterpènes du groupe II 34

Diterpènes du groupe III 36
b/ Autres types de composés 37
c/ Composés issus de *D. linearis* 38
d/ Composés issus de *D. dichotoma* de Méditerranée 39
Diterpènes du groupe I 39
Diterpènes du groupe II 40
Diterpènes du groupe III 41
Sesquiterpènes 41
e/ Diterpènes aux squelettes atypiques isolés de *D. dichotoma* 42
II.3. Algue brune : *Cystoseira foeniculacea* 43
II.3.1 Description biologique du genre *Cystoseira* 43
II.3.2. Etude chimique du genre *Cystoseira* 43
II.4. Bryozoaires 45
II.4.1. Description biologique 45
II.4.2. Métabolites secondaires isolés de bryozoaires 45

III. Biofouling et antifouling 47
III.1. Le fouling en milieu marin 48
III.1.1. Mécanisme d'action (biofilm) 48
III.1.2. Impact du biofouling en milieu naturel 49
III.2. Conséquences sur les activités humaines 49
III.2.1. Impact économique 49
III.2.2. Impact écologique 49
III.2.3. La prévention contre le fouling 50
a/ Historique 50
De l'antiquité à la moitié du XXème siècle 50
Depuis la moitié du XXème siècle 51
b/ La lutte antifouling aujourd'hui 51
Les peintures à base de métaux 52
L'approche répulsive 52
L'approche biomimétique 52
III.3. Substances naturelles d'origine marine présentant des propriétés antifouling 53
III.3.1. Molécules actives en antifouling 53
III.3.2. Molécules actives en antibiofilm 57

Partie B : Isolement et caractérisation structurale de métabolites issus d'organismes marins 61

I. A partir de Caulerpa taxifolia 62
I.1. Obtention des métabolites secondaires 62
I.1.1. Récolte et extraction 62
I.1.2. Fractionnement et purification 62

I.2. Caractérisation structurale des composés 63
I.2.1. Analyse structurale du composé **Ct1** 64
I.2.2. Analyse structurale du composé **Ct2** 66
I.2.3. Analyse structurale du composé **Ct3** 67
I.2.4. Analyse structurale du composé **Ct4** 68
a/ Identification 68
b/ Discussion avec les données bibliographiques 71
I.2.5. Analyse structurale du composé **Ct5** 72

II. A partir de Dictyota sp. 73
II.1. Obtention des métabolites secondaires 73
II.1.1. Récolte et extraction 73
II.1.2. Fractionnement et purification 73
II.2. Caractérisation structurale des composés 76
II.2.1. Analyse structurale du composé **Ds1** 76
a/ Détermination de la structure plane 76
b/ Détermination de la stéréochimie en C-2, C-3, C-4 et $\Delta^{9,1}$ 79
Résultats expérimentaux obtenus par RMN et modélisation moléculaire 79
Comparaison avec la littérature 82
c/ Détermination de la stéréochimie en C-19 82
Dégradation (épimérisation) 83
Correlation NOESY ^{1}H-^{1}H /modélisation moléculaire 84
II.2.2. Analyse structurale du composé **Ds2** 85
II.2.3. Analyse structurale du composé **Ds3** 88
II.2.4. Analyse structurale du composé **Ds4** 92
II.2.5. Analyse structurale du composé **Ds5** 93
a/ Identification des deux parties diterpéniques de **Ds5** 95
b/ Liaison entre les deux parties diterpéniques de **Ds5** 98
c/ Détermination de la stéréochimie relative de **Ds5** 101
II.2.6. Autres composés non nouveaux 104
a/ Analyse structurale du composé **Ds6** 104
b/ Analyse structurale du composé **Ds7** 104
c/ Analyse structurale du composé **Ds8** 105
d/ Analyse structurale du composé **Ds9** 106
e/ Analyse structurale du composé **Ds10** 107
f/ Analyse structurale du composé **Ds11** 108
g/ Analyse structurale du composé **Ds12** 111

III. A partir de Dictyota dichotoma 112
III.1. Obtention des métabolites secondaires 112

III.1.1. Récolte et extraction 112
III.1.2. Fractionnement et purification 112
III.2. Elucidation structurale des différents composés isolés 114
III.2.1. Analyse structurale du composé **Dd1** 114
III.2.2 Analyse structurale du composé **Dd2** 117
III.2.3. Autres composés non nouveaux 119
a/ Analyse structurale du composé **Dd3** 119
b/ Analyse structurale du composé **Dd4** 120
c/ Autres composés 120

IV. A partir de Cystoseira foeniculacea 121
IV.1. Obtention des métabolites secondaires 121
IV.1.1. Récolte et extraction 121
IV.1.2. Fractionnement et purification 121
IV.2. Elucidation structurale des différents composés isolés 122
IV.2.1. Analyse structurale du composé **Cf1** 122
IV.2.2. Analyse structurale du composé **Cf2** 123
IV.2.2. Analyse structurale du composé **Cf3** 125

Partie C : Fluctuation de l'expression métabolique – Chimiotaxonomie – Activités biologiques 129

I. Caulerpa taxifolia 130
I.1. Optimisation du protocole 131
I.1.1. Protocole d'extraction de *C. taxifolia* et optimisation du gradient HPLC 131
I.1.2. Conservation de l'extrait de *C. taxifolia* 133
I.2 Variation saisonnière de l'extrait 133

II. Les bryozoaires 134
II.1. Chimiotaxonomie 136
II.1.1. Détection de l'homarine 136
II.1.2. Présence de métabolites bromés 137
a/ *Celleporina caminata* 137
b/ *Smittina cervicornis* 138
c/ *Myriapora truncata* 139
II.2. Variations géographiques 140
II.2.1 *Myriapora truncat*a 140
II.2.2 *Turbicellepora avicularis* 141
II.2.3 *Smittina cervicornis* 142
II.2.4 *Reteporella* sp. 143
II.2.5 *Adeonella calveti* 143
II.2.6 *Pentapora fascialis* et *Pentapora* sp. 144

III. Activité antifouling 146

III.1. Présentation du test antifouling (anti-adhésion) 146

III.2. Résultats obtenus avec des métabolites purs 147

III.2.1. Métabolites isolés à partir d'algues du genre *Dictyota* 147

III.2.2. Métabolites isolés de *Caulerpa taxifolia* 148

III.3. Résultats obtenus avec des extraits bruts (*Caulerpa taxifolia*) 148

IV. Autres activités 150

Matériels et méthodes 152

I. Appareillage 153

I.1. Analyses chromatographiques 153

I.2. Analyses spectrales 154

I.3. Analyses biologiques 154

II. Modélisation moléculaire 154

III. Tests antifouling anti-adhésion 155

Conclusion 157

Bibliographie 163

Annexes 178

Annexe A : Caulerpa taxifolia 180

1. Composé **Ct1** : acide Z,Z,Z-octadéca-9,12,15-triénoïque 181
2. Composé **Ct2** : acide Z,Z,Z,Z,Z-eicosa-5,8,11,14,17-pentaénoïque 182
3. Composé **Ct3** : caulerpényne 183
4. Composé **Ct4** : 14,15-dihydroxy-α-tocophérol 185

Annexe B : Dictyota sp. 190

1. Composé **Ds1** 191
2. Composé **Ds2** : 18-hydroxydolabella-3,7-dièn-2-one 197
3. Composé **Ds3** : 3,4-epoxy-2,18-dihydroxydolabell-7-ène 202
4. Composé **Ds4** : 3,4-epoxy-18-hydroxydolabell-7-ène 206
5. Composé **Ds5** : dictyotadimer A 210
6. Composé **Ds6** : dictyol E 218
7. Composé **Ds7** : 10-acetoxy-18-hydroxydolabella-2,7-diène 220
8. Composé **Ds8** : hydroxyacetyldictyolal 222
9. Composé **Ds9** : hydroxycrénulide 224
10. Composé **Ds10** : dictyol C 226
11. Composé **Ds11** : 3-hydroxydilophol 228

12. Composé **Ds12** : fucoxanthine 230

Annexe C : Dictyota dichotoma 232

1. Composé **Dd1** 233
2. Composé **Dd2** 237
3. Composé **Dd3** : 10,18-dihydroxydolabella-2,7-diène 242
4. Composé **Dd4** 244

Annexe D : Cystoseira foeniculacea 245

1. Composé **Cf1** 245
2. Composé **Cf2** : saringostérol 247
3. Composé **Cf3** : fucostérol 250

Annexe E : les bryozoaires 252

Liste des figures

Figure 1 : *Carte du parc national de Port-Cros (© http://www.parcsnationaux.fr/)* 17

Figure 2 : *Répartition des produits naturels marins au sein des différents phyla [6]* 19

Figure 3 : *Thalle de* Caulerpa taxifolia *(Vahl) C. Agardh (© http://www.algaebase.org/)* 21

Figure 4 : *Part des métabolites issus des différentes espèces d'algues appartenant au genre* Caulerpa 22

Figure 5 : *Caulerpényne (**C1**)* 23

Figure 6 : *Dérivés de la caulerpényne isolés de* C. taxifolia 23

Figure 7 : *Oxytoxin 2 (**C11**)* 24

Figure 8 : *Caulerpine (**C12**)* 24

Figure 9 : *Clionastérol (**C13**)* 25

Figure 10 : *Métabolites isolés de* C. taxifolia *provenant de Chine (**C14**, **C15**) et de Méditerranée (**C16-C19**)* ... 25

Figure 11 : *Composés issus de* Caulerpa prolifera *(**C20-C27**)* 26

Figure 12 : *Caulerpicine (**C28**)* 26

Figure 13 : *Dérivés aromatiques identifiés dans* Caulerpa racemosa *(**C29-C33**)* 27

Figure 14 : *Squelettes-types des dérivés terpéniques isolés à partir d'espèces tropicales de* Caulerpa *(**C34-C37**)* 27

Figure 15 : *Composé isolé de* Caulerpa trifaria *(**C38**)* 28

Figure 16 : *Thalle de* Dictyota dichotoma (© *http://www.algaebase.org/)* 30

Figure 17 : *Répartition des métabolites décrits à partir des algues de la tribu des Dictyoteae* 32

Figure 18 : *Exemples de xénicanes isolés d'un cnidaire (**D1**, [52]) et d'une algue brune du genre* Dictyota *(**D2**, [53])* 33

Figure 19 : *Exemple de crénulide isolé à partir de* Dictyota crenulata 34

Figure 20 : *Répartition des diterpènes du groupe II* 35

Figure 21 : *Dilophol (**D4**) et pachydictyol A (**D5**)* 35

Figure 22 : *Exemples de spatane (**D6**) et de secospatane (**D7**) isolés de* Rugulopteryx okamurae *[66]* 35

Figure 23 : *Répartition des diterpènes du groupe III* 36

Figure 24 : *Dolabellanes isolés du mollusque* Dolabella californica 36

Figure 25 : *Exemples de dolastanes (**D10**, **D11**) et de sécodolastane (**D12**)* 37

Figure 26 : *Phéromone de* D. dichotoma *(**D13**)* 37

Figure 27 : *Dolastanes (**D14-D18**, **D19-D24**) et sécodolastane (**D12**) isolés à partir d'échantillons de* D. linearis *récoltés au Honduras et au Japon* 38

Figure 28 : *Diterpènes isolés de* D. linearis *de Méditerranée* 39

Figure 29 : *Diterpènes du groupe I isolés de* D. dichotoma *de Méditerranée (**D2**, **D3**, **D37-D39**)* 40

Figure 30 : *Diterpènes du groupe II isolés de* D. dichotoma *de Méditerranée (**D40-D45**)* 40

Figure 31 : *Dolabellanes (groupe III) isolés de* D. dichotoma *de Méditerranée (**D34**, **D36**, **D46-D50**)* 41

Figure 32 : *Sesquiterpènes isolés de* D. dichotoma *de Méditerranée (**D51-D54**)* 41

Figure 33 : *Composés possédant un squelette atypique isolés à partir de* D. dichotoma ***(D55-D60)*** 42

Figure 34 : *Exemples des différents types de squelettes de méroditerpènes isolés à partir d'algues du genre* Cystoseira 44

Figure 35 : *Méroditerpènes isolés à partir de* Cystoseira foeniculacea *[96]* 44

Figure 36 : *Bryostatine 1(**B1**) isolée à partir de* Bugula neritina *[98]* 46

Figure 37 : *Pentaporines A (**B2**), B (**B3**) et C (**B4**) isolées à partir de* Pentapora fascialis 46

Figure 38 : *Myriaporones 3 (**B5**) et 4 (**B6**) isolées à partir de* Myriapora truncata 47

Figure 39 : *Chromatogramme UV (210 nm) de la fraction 6 de* C. taxifolia *(colonne RP18e)* 63

Figure 40 : *Spectre RMN ^{1}H du composé **Ct1*** 65

Figure 41 : *Structure du composé **Ct1*** 66

Figure 42 : *Structure du composé **Ct2*** 66

Figure 43 : *Structure du composé **Ct3*** 67

Figure 44 : *Spectre HMBC du composé **Ct3*** 68

Figure 45 : *Détail du spectre HMBC du composé **Ct4*** 69

Figure 46 : *Structure du composé **Ct4*** 71

Figure 47 : *Structure du clionastérol* 72

Figure 48 : *Chromatogramme de la fraction 5 de* Dictyota *sp.* 73

Figure 49 : *Chromatogramme de la fraction 6 de* Dictyota *sp.* 74

Figure 50 : *Chromatogramme de la fraction 7 de* Dictyota *sp.* 74

Figure 51 : *Chromatogramme de la fraction 9 de* Dictyota *sp.* 75

Figure 52 : *Chromatogramme de la fraction 10 de* Dictyota *sp.* 75

Figure 53 : *Chromatogramme de la fraction 12 de* Dictyota *sp.* 75

Figure 54 : *Spectre RMN du ^{13}C du composé **Ds1*** 76

Figure 55 : *Spectre RMN du ^{1}H du composé **Ds1*** 77

Figure 56 : *Représentation des principaux couplages en COSY ^{1}H-^{1}H (▬) et HMBC (↷ de C à H) du composé **Ds1*** 78

Figure 57 : *Détail du spectre NOESY ^{1}H-^{1}H du composé **Ds1*** 80

Figure 58 : *Hydroxyacetyldictyolal* 82

Figure 59 : *Différence des déplacements chimiques (en RMN ^{1}H) entre **Ds1'** et **Ds1*** 83

Figure 60 : *Détail du spectre RMN ^{1}H du mélange **Ds1/Ds1'*** 84

Figure 61 : *Détail du spectre NOESY ^{1}H-^{1}H du mélange **Ds1/Ds1'*** 84

Figure 62 : *Modélisation moléculaire des 2 épimères* 85

Figure 63 : *Structure du composé **Ds1*** 85

Figure 64 : *Structure du composé **Ds2*** 87

Figure 65 : *Détail du spectre NOESY ^{1}H-^{1}H du composé **Ds2*** 88

Figure 66 : *Spectre RMN ^{13}C du composé* ***Ds3*** 89

Figure 67 : *Structure du composé* ***Ds3*** 90

Figure 68 : *Détail du spectre NOESY ^{1}H-^{1}H du composé* ***Ds3*** *indiquant les corrélations importantes pour la déterminations des configurations de $\Delta^{7,8}$ (en rouge) et de C-2, C-3 et C-4 (en bleu)* 91

Figure 69 : *Structure du composé* ***Ds4*** 93

Figure 70 : *Spectre RMN ^{1}H du composé* ***Ds5*** 93

Figure 71 : *Détail du spectre HMBC du composé* ***Ds5*** 94

Figure 72 : *DEPT 135 du composé* ***Ds5*** 95

Figure 73 : *Comparaison entre les données RMN ^{13}C du composé* ***Ds5*** *et celles de l'isoacétylcrénulatine (A) [155] et de l'hydroxyacétyldictyolal (B) [53]* 97

Figure 74 : *Représentation de la jonction entre les deux parties diterpéniques de* ***Ds5*** 98

Figure 75 : *Spectre COSY ^{1}H-^{1}H du composé* ***Ds5*** 99

Figure 76 : *Représentation des principaux couplages en COSY ^{1}H-^{1}H (▬) et HMBC (↷ de C à H) du composé* ***Ds5*** 101

Figure 77 : *Spectre NOESY ^{1}H-^{1}H du composé* ***Ds5*** 102

Figure 78 : *Structure du composé* ***Ds5*** 103

Figure 79 : *Structure du composé* ***Ds6*** 104

Figure 80 : *Structure du composé* ***Ds7*** 105

Figure 81 : *Structure du composé* ***Ds8*** 105

Figure 82 : *Structure du composé* ***Ds9*** 107

Figure 83 : *Structure du composé* ***Ds10*** 108

Figure 84 : *Spectre RMN ^{13}C du mélange des composés* ***Ds11*** *et* ***Ds3*** 109

Figure 85 : *Structure du composé* ***Ds11*** 109

Figure 86 : *Détail du spectre HSQC du mélange de* ***Ds11*** *et* ***Ds3*** 111

Figure 87 : *Structure du composé* ***Ds12*** 112

Figure 88 : *Chromatogramme de la fraction 9 de* Dictyota dichotoma 113

Figure 89 : *Chromatogramme de la fraction 10 de* Dictyota dichotoma 113

Figure 90 : *Chromatogramme de la fraction 17 de* Dictyota dichotoma 114

Figure 91 : *Structure de la dictyolactone* 115

Figure 92 : *Structure du composé* ***Dd1*** 116

Figure 93 : *Structure du composé* ***Dd2*** 119

Figure 94 : *Structure du composé* ***Dd3*** 119

Figure 95 : *Structure du composé* ***Dd4*** 120

Figure 96 : *Chromatogramme UV (205 nm) de la fraction stérolique avec une colonne ayant une phase stationnaire RP8e* 122

Figure 97 : *Structure du composé* ***Cf1*** 122

Figure 98 : *Structure du composé* ***Cf2*** 123

Figure 99 : *Détails des spectres RMN* ^{1}H *de* ***Cf2*** *(saringostérol),* ***Cf3*** *(fucostérol) et du mélange des deux (b)* 125

Figure 100 : *Spectre COSY* ^{1}H-^{1}H *du composé* ***Cf3*** 127

Figure 101 : *Chromatogramme UV (205 nm) de l'extrait brut de* C. taxifolia *obtenu avec la méthode 1* 132

Figure 102 : *Chromatogramme UV (205 nm) de l'extrait brut de* C. taxifolia *obtenu avec la méthode 2* 132

Figure 103 : *Détail du chromatogramme UV (205 nm) de l'extrait brut de* C. taxifolia *après deux mois de conservation à 30°C (bleu), 4°C (rouge) et -20°C (noir)*..... 133

Figure 104 : *Variation saisonnière relative des composés Ct1, Ct2 et Ct3 au sein de l'extrait brut de* C. taxifolia 134

Figure 105 : *Homarine*..... 136

Figure 106 : *Chromatogramme DEDL d'un échantillon de* Myriapora truncata *avec le spectre de masse de l'homarine* 137

Figure 107 : *Chromatogramme DEDL de* C. caminata *(avec le spectre de masse du pic à* t_R *= 28,7 min)* 138

Figure 108 : *Chromatogramme DEDL de* S. cervicornis *(avec les spectres de masse des composés bromés)*... 139

Figure 109 : *Profil +MS d'un échantillon de* M. truncata *(avec les spectres de masse des composés bromés)*.. 139

Figure 110 : *Détails des chromatogrammes UV (205 nm) des trois échantillons de* M. truncata *prélevés en Corse* 140

Figure 111 : *Détails des chromatogrammes UV (205 nm) de trois échantillons de* M. truncata *prélevés en Corse (rouge), en Crète (rose) et à Marseille (or)* 141

Figure 112 : *Détails des chromatogrammes UV (205 nm) des quatre échantillons de* T. avicularis *prélevés à Marseille en 2007 et en 2008 (vert)* 141

Figure 113 : *Détails des chromatogrammes UV (205 nm) de quatre échantillons de* S. cervicornis *prélevés en Corse (rouge) et à Marseille* 142

Figure 114 : *Détails des chromatogrammes UV (254 nm) des échantillons de* S. cervicornis *prélevés en Corse (rouge) et à Marseille* 142

Figure 115 : *Détails des chromatogrammes DEDL de quatre échantillons d'*A. calveti *prélevés en Corse (rouge), en Crète (vert) et à Marseille en 2008 (bleu et noir)* 143

Figure 116 : *Détails des chromatogrammes DEDL de deux échantillons de* S. cervicornis *(noir) et d'*A. calveti *(rouge) prélevés en Corse* 144

Figure 117 : *Détails des chromatogrammes UV (205 nm) des quatre échantillons de* P. fascialis *prélevés à Marseille en 2008*..... 144

Figure 118 : *Détails des chromatogrammes UV (205 nm) des trois échantillons de* P. fascialis *prélevés en Corse en 2008*..... 145

Figure 119 : *Détails des chromatogrammes UV (205 nm) des deux échantillons de* Pentapora *sp. prélevés à Ceuta en 2007* 145

Figure 120 : *Détails des chromatogrammes UV (254 nm) de deux échantillons de* Pentapora *sp. et* P. fascialis *prélevés en Corse en 2008 sur le même site*..... 146

Figure 121 : *Inhibition de l'adhésion du biofilm de* Pseudoalteromonas *sp. par les extraits bruts de* C. taxifolia 149

Liste des schémas

Schéma 1 : *Représentation des voies biosynthétiques des trois groupes de diterpènes isolés des espèces de Dictyoteae* 32

Schéma 2 : *Voie biosynthétique et répartition des diterpènes du groupe I* 33

Schéma 3 : *Voie biosynthétique des différentes familles de diterpènes du groupe II* 34

Schéma 4 : *Voie biosynthétique des différentes familles de diterpènes du groupe III* 36

Schéma 5 : *Voie biosynthétique du squelette dichotomane à partir du squelette xénicane* 42

Schéma 6 : *Schéma de formation du biofouling en milieu marin [104]* 48

Schéma 7 : *Hypothèse de l'origine biosynthétique du composé* ***Ct4*** 72

Schéma 8 : *Hypothèse de l'origine biosynthétique du composé* ***Ds5*** 99

Liste des tableaux

Tableau 1 : *Composés issus de macroalgues brunes présentant des propriétés antifouling* 55

Tableau 2 : *Composés issus de macroalgues, vertes et rouges, et de bryozoaires présentant des propriétés antifouling* 56

Tableau 3 : *Composés (et analogues synthétiques) issus d'organismes marins testés pour leur activité anti-biofilm* 57

Tableau 4 : *Données RMN (1D et 2D) du composé* ***Ct4*** 70

Tableau 5 : *Données RMN (1D et 2D) du composé* ***Ds1*** 78

Tableau 6 : *Paramètres théoriques mesurés sur le conformère le plus stable (optimisé par modélisation moléculaire) de chaque diastéréoisomère de* ***Ds1*** 81

Tableau 7 : *Etude de l'influence de la configuration du C-19* 82

Tableau 8 : *Données RMN (1D et 2D) du composé* ***Ds2*** 86

Tableau 9 : *Données RMN (1D et 2D) du composé* ***Ds3*** 90

Tableau 10 : *Comparaison entre les déplacements chimiques de RMN* ^{13}C *de* ***Ds3*** *et* ***Ds4*** 92

Tableau 11 : *Données RMN (1D et 2D) du composé* ***Ds5*** 100

Tableau 12 : *Paramètres théoriques calculés pour le conformère le plus stable (optimisé par modélisation moléculaire) de plusieurs diastéréoisomères de* ***Ds5*** 103

Tableau 13 : *Comparaison des données RMN* ^{13}C *du composé* ***Ds9*** *avec celles de l'hydroxycrénulide* 106

Tableau 14 : *Comparaison des données RMN* ^{13}C *du composé* ***Ds10*** *avec celles de* ***Ds6*** *(dictyol E)* 107

Tableau 15 : *Comparaison des données RMN* ^{13}C *et* ^{1}H *du composé* ***Ds11*** *avec celles du 3-hydroxydilophol [163]* 110

Tableau 16 : *Comparaison des données RMN du* ^{13}C *du composé* ***Dd1*** *avec celles de l'isodictyohémiacétal* ... 115

Tableau 17 : *Données RMN (1D et 2D) du composé* ***Dd1*** 116

Tableau 18 : *Comparaison des données RMN* ^{13}C *du composé* ***Dd2*** *avec celles du dictyotatriol A* 117

Tableau 19 : *Données RMN (1D et 2D) du composé* ***Dd2*** 118

Tableau 20 : *Comparaison des données RMN* ^{13}C *du composé* ***Cf2*** *avec celles de la littérature* 124

Tableau 21 : *Comparaison des données RMN* ^{13}C *du composé* ***Cf3*** *avec celles de la littérature* 126

Tableau 22 : *Nombre et origine des différents échantillons de bryozoaires analysés* 135

Tableau 23 : *Inhibition de l'adhésion du biofilm de* Pseudoalteromonas *sp. par des biocides standards et plusieurs composés isolés à partir de* Dictyota *sp.* 147

Tableau 24 : *Inhibition de l'adhésion du biofilm de* Pseudoalteromonas *sp. par des biocides standards et plusieurs composés isolés à partir de* Caulerpa taxifolia. 148

Tableau 25 : *Activités biologiques de différents extraits de bryozoaires* 150

Abréviations

AcOEt :	Acétate d'éthyle
CC :	Chromatographie sur colonne
$CDCl_3$:	Chloroforme deutéré
CE_{50} :	Concentration effective correspondant à une inhibition de 50% de l'adhésion bactérienne
$CHCl_3$:	Chloroforme
CH_2Cl_2 :	Dichlorométhane
DAD :	Diode array detector (en français : détecteur UV à barrette de diode)
ESI/MS :	Spectromètre de masse avec ionisation par électrospray
HR-ESI/MS :	Spectromètre de masse haute résolution avec ionisation par électrospray
HPLC :	Chromatographie liquide haute performance
IR :	Infra-rouge
MeCN :	Acétonitrile
MeOH :	Méthanol
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
TBT :	TriButylTin (en français : tributylétain)
TBTO :	TriButylTinOxyde (en français : oxyde de tributylétain)
UV :	Ultra-violet

Glossaire

Caroténoïdes : Classe de pigments de couleur jaune à orange de la famille des terpènes formés par 8 unités isopréniques

Coenocytique : Qualifie le thalle unicellulaire de certaines algues, comprenant de nombreux noyaux mais pas de paroi

Espèce type : Espèce qui sert de modèle à la définition d'un genre

Méroterpène : Molécule à biogénèse mixte composée d'un cycle aromatique et d'une partie terpénique

Métabolites secondaires : molécules spécifiques produites par chaque organisme qui n'interviennent pas dans des mécanismes vitaux, s'opposent aux métabolites primaires communs à une grande variété d'organismes et qui sont indispensables à la vie de l'organisme (constituants des parois cellulaires par exemple)

Procaryote : Se dit d'un organisme dont les cellules ne comportent pas de noyau, le matériel génétique étant libre dans le cytoplasme

Quorum sensing : Capacité d'une bactérie à communiquer et à coordonner son comportement avec les autres bactéries d'une même colonie en utilisant des molécules de signalisation

Sessile : Se dit d'un organisme qui vit définitivement fixé à un substrat, qu'il soit vivant ou inerte, fixe ou mobile

Terpène : Hydrocarbure constitué d'un assemblage d'unités isopréniques

Thalle : Appareil végétatif de certains végétaux "inférieurs" (algues, champignons, lichens, mousses) ne comportant ni racines, ni tige, ni feuilles véritables

Xanthophylles : Famille de pigments de couleur jaune, orange ou rouge, dérivés des caroténoïdes par l'ajout de fonctions oxygénées

Introduction générale

Les océans et les mers représentent près des trois-quarts de la surface du globe. La vie sur Terre est apparue dans le milieu marin il y a environ 3,8 milliards d'années alors que les premières espèces terrestres remontent, quant à elles, à 400 millions d'années. Cette différence se traduit aujourd'hui par une plus grande diversité des phyla et des genres dans le milieu marin. Par exemple, parmi les principaux phyla qui composent le règne animal, une grande majorité comporte des espèces marines et nombre d'entre eux sont exclusivement marins. De la même manière, on peut constater que le règne végétal terrestre se limite au seul monde « vert », alors que le milieu marin en comporte trois : les mondes « vert », « rouge » et « brun ». En effet, au cours de l'évolution, les algues vertes se sont adaptées aux eaux douces puis ont colonisé les sols, conduisant à l'ensemble des végétaux terrestres que l'on connait actuellement. A l'inverse, les algues brunes et rouges sont restées essentiellement marines en colonisant peu les eaux douces et pas du tout le domaine terrestre [1]. En plus de ce temps d'évolution plus long, un autre paramètre pourrait expliquer la richesse du milieu marin par rapport au milieu terrestre : l'espace. En effet, la vie sur terre se développe principalement en trois dimensions, une temporelle et deux spatiales ; dans le milieu marin, une quatrième dimension, celle de la verticalité, permet une diversification des milieux le long de la colonne d'eau (lumière, pression, nourriture, etc) et donc des espèces vivantes.

Cette biodiversité que l'on retrouve dans les mers et les océans se traduit naturellement par une chimiodiversité tout aussi importante. Celle-ci est d'ailleurs très spécifique en raison des particularités physico-chimiques du milieu marin. Néanmoins, sur près de 220 000 substances naturelles répertoriées, seules 10% sont d'origine marine. Ceci peut s'expliquer par le fait que les organismes marins ont été beaucoup moins étudiés que leurs analogues terrestres ; et ce principalement à cause du manque de connaissance de ce milieu et des difficultés liées à la récolte des échantillons. Ainsi, les premières recherches sur les produits naturels marins datent seulement de la fin des années 60 alors que les substances d'origine terrestre sont étudiées intensivement depuis déjà plus d'un siècle. Dès lors, de nombreux organismes marins n'ont pas encore fait l'objet d'études chimiques et beaucoup de métabolites restent à découvrir dans ce domaine. Notamment, une grande variété de végétaux et d'animaux sessiles utilisant la défense chimique comme mode de protection contre les prédateurs constitue un immense réservoir de structures chimiques originales et potentiellement valorisables pour leur bioactivité.

Par ailleurs, les hommes sont amenés à lutter contre une certaine diversité marine, appelée biofouling, qui sous forme de salissures marines colonise toutes sortes d'ouvrages immergés. Des peintures anti-salissures (antifouling) ont ainsi été développées pour contrôler la prolifération de ces espèces colonisatrices sur les navires et certaines surfaces artificielles. Or, les revêtements très efficaces à base d'oxydes de tributylétain, couramment utilisés à partir des années 70, ont été totalement interdits par l'IMO (International Maritime Organization) en 2008 du fait de leur importante toxicité vis-à-vis d'espèces non-ciblées, principalement des mollusques. Pour cette raison, de nombreux travaux sont actuellement dévolus à la recherche de substances actives en antifouling et non-toxiques pour l'environnement marin. Les organismes marins produisant eux-mêmes des molécules afin de se protéger des organismes colonisateurs entrant en compétition avec eux, ils peuvent être considérés comme des sources potentielles de molécules actives en antifouling.

Dans ce contexte, le premier objectif de ce projet de recherche consiste à évaluer le potentiel dans le domaine de la lutte antifouling de substances naturelles issues d'organismes marins méditerranéens communément rencontrés le long des côtes varoises. De précédents travaux réalisés au laboratoire MAPIEM avaient ainsi permis de mettre en évidence une importante activité anti-colonisatrice envers des larves de balanes d'un extrait organique de l'algue verte invasive *Caulerpa taxifolia* [2]. De fait, un partenariat avec le parc national de Port-Cros a été établi afin notamment de pouvoir disposer d'échantillons de *C. taxifolia* provenant des campagnes d'éradication organisées au sein du parc. D'autres types d'organismes tels que des algues brunes appartenant aux genres *Dictyota* et *Cystoseira*, ou encore des bryozoaires (étudiés dans le cadre du programme ECIMAR[1]) ont été également analysés pour la même finalité. Néanmoins, d'autres gageures scientifiques liées à l'analyse structurale, notamment les études stéréochimiques, des substances isolées ou à des domaines tels que l'écologie chimique et la chimiotaxonomie ont été également relevées.

Ce mémoire s'articule en trois parties principales : la première partie constitue une revue des données bibliographiques concernant principalement les organismes étudiés et la lutte contre le biofouling ; l'ensemble des travaux portant sur la purification et la caractérisation structurale de substances naturelles à partir d'organismes marins récoltés en mer Méditerranée sont regroupés dans la seconde partie ; enfin la troisième partie rassemble non seulement les résultats obtenus lors de l'évaluation des propriétés antifouling des composés isolés, mais porte également sur l'étude de l'expression métabolique de plusieurs espèces ainsi que sur la recherche de marqueurs chimiques utilisables à des fins chimiotaxonomiques.

[1] Programme d'une durée de 4 ans (2006-10) financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) et l'Institut Français de la Biodiversité (IFB).

Partie A : Analyse des données bibliographiques

Cette première partie relative à l'analyse des données bibliographiques est divisée en trois axes. Dans un premier temps, une présentation générale du parc national de Port-Cros, avec en particulier une description de ses activités et de ses objectifs, est proposée. Puis, une revue des données biologiques et chimiques des différents organismes marins étudiés (l'algue verte *Caulerpa taxifolia*, des algues brunes appartenant aux genres *Dictyota* et *Cystoseira*, ainsi que plusieurs espèces de bryozoaires) a été réalisée. Celle-ci traite aussi bien de la position systématique, des caractéristiques morphologiques ou de la répartition géographique de ces organismes que du type de métabolites secondaires* qu'ils biosynthétisent. Enfin, la dernière partie porte sur une description générale du phénomène de biofouling : les aspects biologiques (formation et impact du biofouling), économiques (lutte antifouling) et chimiques (molécules actives en antifouling) seront ainsi abordés.

I. Le parc national de Port-Cros

En attendant l'ouverture officielle du parc national des calanques en 2010, le parc national de Port-Cros, créé en 1963, fut le premier parc national marin d'Europe et le seul en France métropolitaine. Il se situe dans le département du Var et s'étend au niveau des îles d'Hyères (cf Figure 1). Il englobe la totalité de l'île de Port-Cros avec ses îlots (île de Bagaud, rochers du Rascas et de la Gabinière) et son domaine maritime est constitué d'une bande de 600 m de large tout autour de l'île. Avec près de 2000 hectares, dont 1300 maritimes, il s'agit du plus petit parc national français. Le parc gère également l'île de Porquerolles ainsi que deux zones côtières continentales : le cap Lardier, la presqu'île de Giens. Il est également assistant scientifique et technique sur le territoire des salins d'Hyères. L'île du Levant est, pour sa part, réservée en majeure partie aux activités militaires (80% du territoire de l'île).

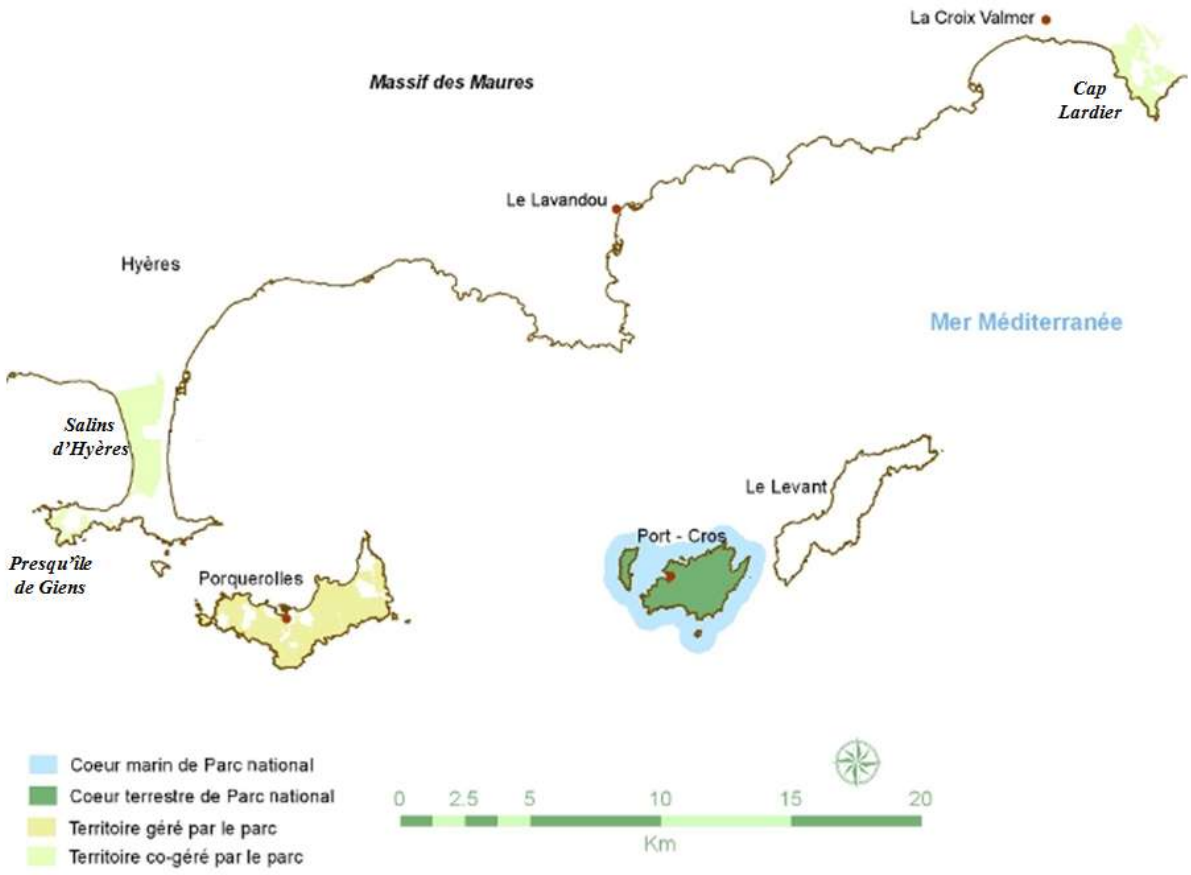


Figure 1 : *Carte du parc national de Port-Cros (© http://www.parcsnationaux.fr/)*

Avec 600 espèces végétales terrestres et 500 espèces d'algues, l'île de Port-Cros constitue un habitat privilégié pour des centaines d'espèces animales dont quelques-unes sont endémiques. La préservation de ces milieux aussi riches que fragiles est l'une des missions principales du parc national. Les actions entreprises passent entre autres par une sensibilisation du public à la protection de l'environnement et par une gestion de ces espaces naturels. Dans ce contexte, les gardes du parc national de Port-Cros organisent chaque année depuis 1994 une campagne d'éradication de l'algue invasive *Caulerpa taxifolia* autour de l'île de Port-Cros [3-4]. Celle-ci s'effectue soit par prélèvement manuel, pour les petites colonies isolées, soit à l'aide de couvertures traitées au cuivre, pour les colonies plus étendues [3-4]. Cette action est localisée uniquement dans la zone centrale du parc, l'île de Porquerolles étant touchée à une trop grande échelle, notamment sur la côte nord, par cette invasion pour envisager toute élimination. Le matériel végétal prélevé lors de ces campagnes était détruit : une des idées à l'initiative de ce travail doctoral fut de valoriser scientifiquement ces échantillons afin notamment de les étudier d'un point de vue chimique.

II. Etude bibliographique des organismes étudiés

Près de 20 000 substances naturelles marines ont été isolées à ce jour. Ce chiffre reste néanmoins relativement modeste comparativement aux plus de 200 000 composés décrits à partir d'organismes terrestres. Pourtant, les molécules d'origine marine sont particulièrement originales car, du fait de l'environnement dans lequel elles sont produites, elles témoignent de particularités structurales inédites par rapport aux substances terrestres. Par exemple, certains éléments comme le chlore, le brome et, dans une moindre mesure, le bore, le silicium, le phosphore, l'iode et l'arsenic, sont incorporés dans les métabolites marins alors qu'ils ne le sont pas, ou peu, dans les composés terrestres. Certaines fonctions chimiques, isonitrile, thiocyanate ou formamide, sont majoritairement rencontrées dans des métabolites produits par des invertébrés marins [5]. Par ailleurs, dans les écosystèmes terrestres, les molécules sont essentiellement vectorisées par voie aérienne, les composés volatils constituent donc une classe majeure au sein des produits naturels terrestres. A l'inverse, les métabolites secondaires marins sont en général plus lourds et plus complexes que leurs homologues terrestres ; ceci est dû notamment à la vectorisation et à l'utilisation de ces composés qui s'effectue cette fois en milieu liquide.

Près de 80% des produits naturels marins ont été décrits à partir d'éponges (Porifera), d'algues (Chlorophycota, Rhodophycota, Chromophycota et Cyanophycota) et de cnidaires (coraux, gorgones, méduses, etc) (cf Figure 2). Ces organismes étant majoritairement sessiles*, leur stratégie de défense s'est donc plus particulièrement orientée vers la défense chimique. Ceci peut permettre d'expliquer l'abondance des métabolites isolés à partir de ces organismes par rapport à ceux appartenant au monde pélagique. Actuellement, une attention toute particulière est portée sur les microorganismes qui, seuls ou en symbiose, seraient responsables de la production d'un grand nombre de métabolites secondaires marins.

Les métabolites isolés à partir d'algues représentent près de 22% des produits naturels marins décrits à ce jour. L'appellation "algue" est couramment utilisée pour désigner un végétal aquatique, par opposition aux végétaux terrestres ; or, la réalité biologique de ces organismes est beaucoup plus complexe.

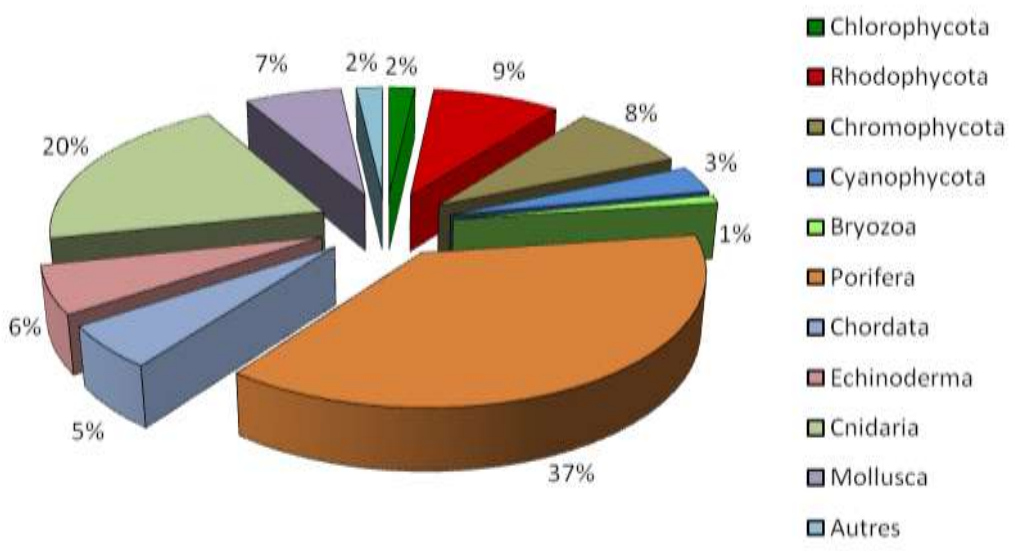


Figure 2 : *Répartition des produits naturels marins au sein des différents phyla [6]*

On définit en tant qu'«algue» un végétal chlorophyllien dont l'appareil végétatif, appelé thalle*, ne possède aucun organe spécifique (racine, tige, feuille), contrairement aux végétaux supérieurs. Ce terme (algue) rassemble des organismes provenant d'origines évolutives très différentes : les algues forment un groupe polyphylétique, c'est-à-dire que les espèces qui le composent n'ont pas d'ancêtre commun. Ce groupe peut être divisé en trois classes principales : les chlorophycées (algues vertes), les rhodophycées (algues rouges) et les chromophycées (comprenant entre autres les algues brunes), auxquelles s'ajoute une classe d'organismes procaryotes* unicellulaires (à laquelle appartiennent les cyanobactéries). D'un point de vue chimique, ces trois mondes diffèrent par leur composition en pigments (chlorophylles et caroténoïdes) et en polysaccharides de réserve ou pariétaux. De ce point de vue, une algue verte présente plus de similitudes avec un végétal supérieur terrestre – qui descend directement des algues vertes – qu'avec une algue brune ou une algue rouge. Les Chlorophycées se caractérisent par la présence de chlorophylles *a* et *b* ainsi que de β carotène. L'appellation "algue verte" englobe aussi bien des organismes microscopiques que macroscopiques, pouvant vivre en eau douce ou salée.

II.1. Algue verte : *Caulerpa taxifolia*

L'espèce *Caulerpa taxifolia* appartient aux Chlorophycées. Dans un premier temps une description biologique (morphologie, répartition) de cette algue est proposée. Puis, une étude des phytoconstituants de *C. taxifolia* et plus généralement des algues, méditerranéennes ou tropicales, du

genre a été réalisée. Enfin, un bilan des travaux d'écologie chimique portant sur *C. taxifolia* est présenté.

II.1.1. Description biologique et distribution de l'espèce Caulerpa taxifolia

a/ Position systématique

Phylum Chlorophyta

Classe Bryopsidophyceae

Ordre Bryopsidales

Famille Caulerpaceae

Actuellement, l'ordre des Bryopsidales comprend six familles principales : Derbesiaceae, Halimedaceae, Bryopsidaceae, Caulerpaceae, Codiaceae et Udoteaceae. Au sein de la famille des Caulerpaceae, la grande majorité des espèces (86 sur 87) appartient au genre *Caulerpa*. Elles sont très majoritairement réparties dans l'hémisphère sud. En effet, seules sept espèces sont présentes en Méditerranée dont quatre dans le bassin occidental : *C. taxifolia*, *C. racemosa*, *C. prolifera* et enfin *C. olliveri* (qui ne serait qu'une forme de *C. prolifera*) [7].

b/ Description morphologique

C. taxifolia, comme les autres espèces de caulerpe, est une algue coenocytique* : son thalle est composé d'une cellule unique géante contenant des milliers de noyaux. Le thalle est constitué d'un stolon qui est un axe rampant à la surface du substrat auquel il est accroché à l'aide de bouquets de rhizoïdes. Depuis le stolon se dressent des frondes, composées de pinnules, qui peuvent être ramifiées (cf Figure 3).

L'algue récemment introduite en Méditerranée nord-occidentale présente des caractéristiques morphologiques différentes de celles de son homologue subtropicale : les frondes, dont la taille est inférieure à 25 cm sous les tropiques, peuvent dépasser 60 cm sur les côtes françaises [8]. En Méditerranée, la reproduction de *C. taxifolia* se fait uniquement par bouturage. En effet, aucune reproduction sexuée de cette espèce n'a été observée à ce jour. N'importe quel fragment du thalle peut alors donner naissance à une nouvelle colonie. L'hydrodynamisme ainsi que les activités humaines (vectorisation par le biais des ancres de bateaux, par exemple) permettent une dissémination rapide des fragments à plus ou moins grande échelle.

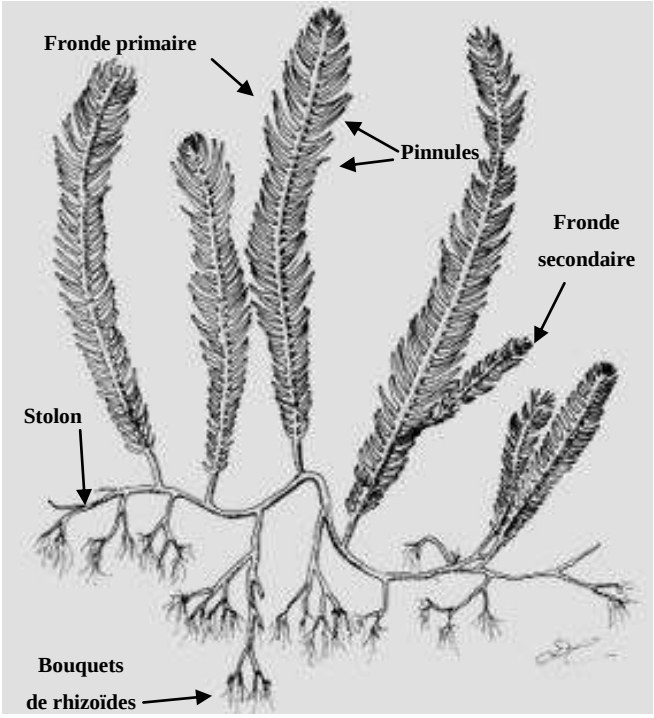


Figure 3 : *Thalle de* Caulerpa taxifolia *(Vahl) C. Agardh (© http://www.algaebase.org/)*

A partir d'études de variation saisonnière de biomasse, une division du cycle annuel de *C. taxifolia* en quatre phases a été proposée pour la souche méditerranéenne : la quiescence (janvier-mars), la croissance (avril-juillet), l'équilibre (août-octobre) et la dégénérescence (novembre-décembre) [9].

c/ Répartition géographique et caractère invasif

A l'origine, *C. taxifolia* est une espèce subtropicale présente aussi bien en Amérique latine, en Afrique, en Asie du Sud qu'en Océanie. Sa présence en Méditerranée est beaucoup plus récente. Elle y a été observée pour la première fois au pied du musée océanographique de Monaco en 1984. Son origine invasive, *via* un rejet de l'aquarium de Monaco, a rapidement été mise en évidence par des comparaisons morphologiques [8]. Néanmoins, il a fallu attendre des études génétiques [10] pour écarter définitivement l'hypothèse d'une métamorphose de *C. mexicana* en *C. taxifolia*. Depuis cette introduction accidentelle, *C. taxifolia* s'est rapidement adaptée aux faibles températures hivernales de la mer Méditerranée [11] (elle peut résister à une température de 10 °C, contre 20 °C pour la variété subtropicale, pendant trois mois), au point de connaitre une expansion rapide et étendue à toute la Méditerranée occidentale [12]. En 2005, plus d'une centaine de zones indépendantes colonisées ont été recensées dans les eaux territoriales de six pays (Monaco, France, Espagne, Italie, Croatie et Tunisie) [13].

Au sein du parc national de Port-Cros, l'arrivée de cette algue a fait l'objet d'une surveillance particulière (organisation de campagnes d'éradication annuelles au niveau de l'île de Port-Cros). Ainsi,

C. taxifolia se fait de plus en plus rare dans cette zone restreinte. Néanmoins, à une plus grande échelle le contrôle de la population s'avère impossible et l'algue continue son expansion dans les rades d'Hyères et de Toulon [13-14].

II.1.2. Etudes chimiques du genre Caulerpa

Les métabolites isolés à partir d'algues de l'ordre des Bryopsidales représentent 60% de l'ensemble des molécules décrites à partir des Chlorophycées. Les espèces appartenant au genre *Caulerpa* sont particulièrement prolifiques puisque, avec une centaine de métabolites décrits, elles biosynthétisent près de la moitié des molécules isolées à partir des Bryopsidales. En particulier, les métabolites de *Caulerpa taxifolia* ont été largement étudiés depuis son introduction en mer Méditerranée.

Cette partie correspond à un recensement de la totalité des molécules extraites à partir des espèces de caulerpes présentes en mer Méditerranée (*C. taxifolia*, *C. racemosa* et *C. prolifera*), qui sont riches en métabolites secondaires (cf Figure 4), ainsi qu'à un résumé des métabolites les plus représentatifs décrits à partir des espèces tropicales appartenant au même genre.

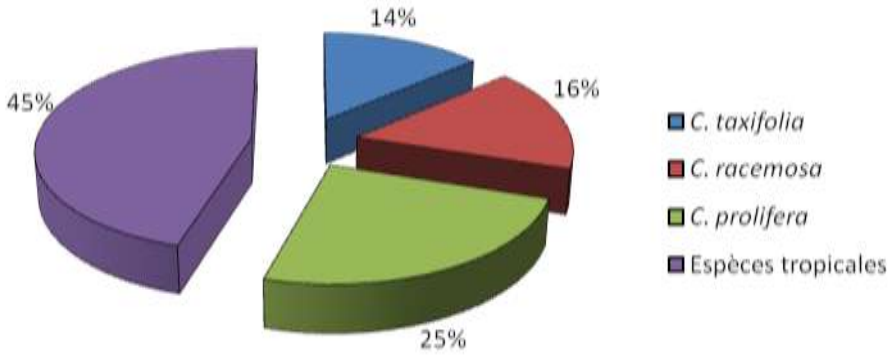


Figure 4 : *Part des métabolites issus des différentes espèces d'algues appartenant au genre* Caulerpa

a/ Métabolites isolés de *Caulerpa taxifolia*

Contrairement à d'autres espèces de *Caulerpa* qui ont fait l'objet d'études phytochimiques dès le début des années 60, les travaux traitant de *C. taxifolia* ont débuté seulement à la fin des années 80 et ont porté majoritairement sur des échantillons méditerranéens.

La caulerpényne et ses dérivés

La caulerpényne (cf Figure 5) est une molécule présente dans la majorité des espèces de *Caulerpa*. Sa structure a été décrite pour la première fois en 1978 par Amico *et al.* à partir d'un échantillon de *C. prolifera* récolté en Méditerranée [15]. Ce composé représente le métabolite secondaire majoritaire dans les extraits de *C. taxifolia* [16-17]. D'un point de vue structural, la caulerpényne est un sesquiterpène triacétylé présentant un groupement diacétoxybutadiène caractéristique des molécules isolées à partir d'algues de l'ordre des Bryopsidales.

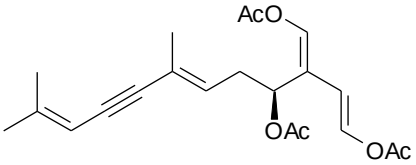
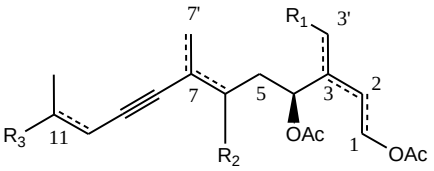


Figure 5 : *Caulerpényne (**C1**)*

Par ailleurs, de nombreux dérivés d'oxydation de la caulerpényne ont été décrits [18-20] (cf Figure 6).

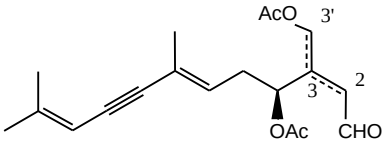


C2 : R_1=OAc; $\Delta^{1,2}$ (*E*); $\Delta^{3,3'}$ (*Z*); $\Delta^{6,7}$ (*E*); R_2=H; C_{10}-C_{11}=epoxy; R_3=Me

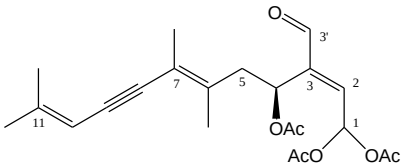
C3 : R_1=OAc; $\Delta^{1,2}$ (*E*); $\Delta^{3,3'}$ (*Z*); C_6-C_7=epoxy; R_2=H; $\Delta^{10,11}$; R_3=Me

C4 : R_1=OAc; $\Delta^{1,2}$ (*E*); $\Delta^{3,3'}$ (*Z*); $\Delta^{7,7'}$; R_2=OH; $\Delta^{10,11}$; R_3=Me

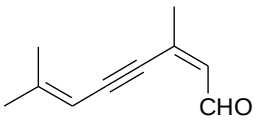
C7 : R_1=OAc; $\Delta^{1,2}$ (*E*); $\Delta^{3,3'}$ (*Z*); $\Delta^{6,7}$ (*E*); R_2=H; $\Delta^{10,11}$; R_3=CHO



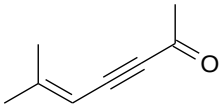
C5 : $\Delta^{3,3'}$ (*Z*) **C6** : $\Delta^{2,3}$ (*Z*)



C8



C9



C10

Figure 6 : *Dérivés de la caulerpényne isolés de* C. taxifolia

Ceux-ci peuvent par exemple provenir de l'oxydation d'une double liaison (**C2-C4**) ou d'une coupure oxydante en $\Delta^{4,5}$ (**C9**) ou en $\Delta^{6,7}$ (**C10**). L'oxytoxin 1 (**C5**) et les taxifolials A-C (**C6-C8**) sont probablement des métabolites dérivés de la caulerpényne. En effet, des études portant sur la défense chimique de *C. taxifolia* ont montré que lorsque l'algue est sectionnée, elle réagit en transformant la

caulerpényne, probablement *via* un processus enzymatique, en divers composés déacétylés tels que l'oxytoxin 2 [21] (cf Figure 7).

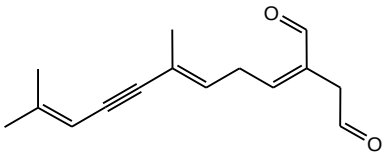


Figure 7 : *Oxytoxin 2 (**C11**)*

La caulerpine

La caulerpine (**C12**, cf Figure 8) est un pigment rouge orangé présent dans plusieurs espèces de caulerpes dont *C. taxifolia* [22]. Isolée pour la première fois en 1970 à partir de *C. racemosa* [23], sa structure chimique exacte a finalement été publiée en 1978 [24]. Ce type de squelette *bis*-indolique constitue un cas unique dans le genre *Caulerpa*.

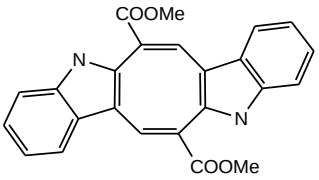


Figure 8 : *Caulerpine (**C12**)*

La composition en stérols

Contrairement aux deux autres phyla que sont les Rhodophycées et les Phéophycées, la composition stérolique des Chlorophycées est très variée [1]. En effet, le cholestérol est considéré comme étant le stérol le plus commun au sein des algues rouges, tandis que le fucostérol se retrouve dans la majorité des algues brunes. Néanmoins, ces deux composés sont souvent associés à quelques autres stérols minoritaires. Chez les algues vertes, une dizaine de stérols différents peuvent être majoritaires suivant les espèces étudiées. L'étude de la fraction stérolique de *C. taxifolia* (prélevée en Méditerranée) a montré la présence de clionastérol (**C13**, cf Figure 9) en tant que métabolite majeur [25], confirmant ainsi des précédents travaux qui indiquent que le clionastérol est le principal stérol chez les algues du genre *Caulerpa* [26-27].

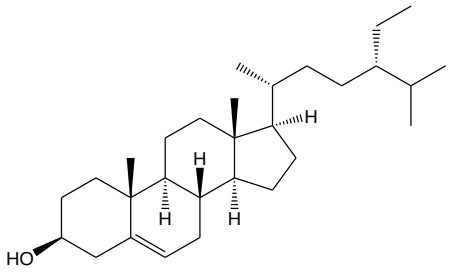
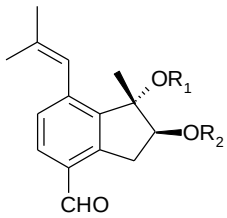


Figure 9 : *Clionastérol (**C13**)*

Autres composés

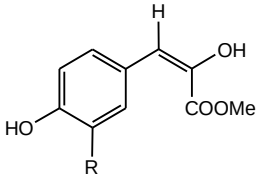
D'autres types de composés ont été ponctuellement isolés à partir d'échantillons de *C. taxifolia* provenant de diverses régions du globe.

Récemment, deux nouveaux métabolites (**C14**, **C15**) présentant un squelette sesquiterpénique atypique chez les caulerpes (cf Figure 10) ont été isolés à partir d'échantillons de *C. taxifolia* récoltés en mer de Chine [28].



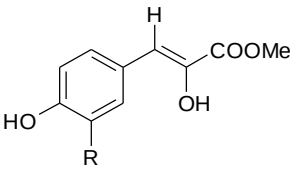
C14 : R_1=H; R_2=Ac

C15 : R_1=Me; R_2=H



C16 : R=H

C17 : R=OH



C18 : R=H

C19 : R=OH

Figure 10 : *Métabolites isolés de* C. taxifolia *provenant de Chine (**C14**, **C15**) et de Méditerranée (**C16-C19**)*

L'étude de la fraction polaire d'un extrait de *C. taxifolia* récoltée en mer Méditerranée a conduit à l'isolement de quatre énols (**C16-C19**) comportant une partie arylpropane (cf Figure 10), ainsi que de plusieurs glycoglycérolipides [29]. Enfin des polysaccharides sulfatés ont été isolés à partir d'un échantillon provenant de la côte Est de l'Inde [30].

b/ Composés issus d'autres espèces du genre *Caulerpa*

Caulerpa prolifera

C. prolifera est l'espèce-type* du genre *Caulerpa*. Il s'agit également d'une espèce indigène qui était la plus répandue en Méditerranée avant l'arrivée récente de *C. taxifolia* et *C. racemosa*. C'est pour cette raison que les premières études chimiques portant sur les caulerpes méditerranéennes ont été effectuées sur cette espèce [15, 31-33]. Outre la caulerpényne, de nombreuses molécules spécifiques à *C. prolifera* ont été décrites (cf Figure 11). La furocaulerpine (**C20**) provient probablement de la

dégradation, chimique ou enzymatique, de la caulerpényne comme nous l'avons vu pour les composés précédemment cités. De plus, une vingtaine d'esters de caulerpényne ont été identifiés à partir d'échantillons récoltés en Grèce [34] et en Italie [33]. Ils ne diffèrent que par la position d'une double liaison ($\Delta^{3,3'}$ pour **C21** ou $\Delta^{2,3}$ pour **C22**) et par la nature de la chaîne carbonée (R= différents types de chaînes allant de C14:0 à C20:5). Enfin cinq triterpènes linéaires, le squalène (**C23**) et quatre dérivés d'oxydation (**C24-C27**), ont également été isolés à partir de *C. prolifera* [32].

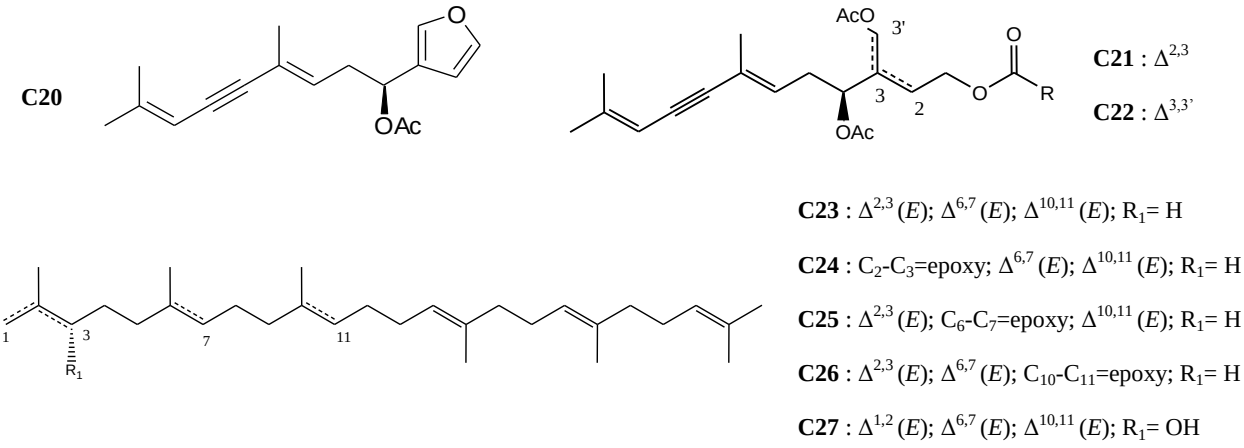


Figure 11 : *Composés issus de* Caulerpa prolifera *(**C20-C27**)*

Caulerpa racemosa

La caulerpicine (**C28**, cf Figure 12) fut la première toxine isolée à partir d'une algue du genre *Caulerpa*, en 1966 [35]. Néanmoins, sa structure exacte n'a été publiée qu'en 1982 [36]. Elle se présente sous forme d'un mélange de plusieurs molécules qui ne diffèrent que par la longueur de la chaîne aliphatique.

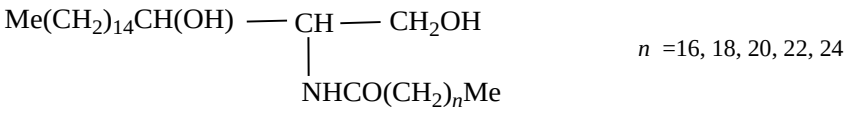


Figure 12 : *Caulerpicine (**C28**)*

Cette toxine a été identifiée dans de nombreuses espèces de *C aulerpa* mais jamais dans *C. taxifolia*.

Par ailleurs, cinq dérivés aromatiques (**C29-C33**) ont été décrits à partir d'un échantillon de *C. racemosa* récolté en Inde [37] (cf Figure 13). Ce type de composés (dimères de phénylpropane) est rare chez les algues mais beaucoup plus courant chez les plantes terrestres. On peut constater que l'on retrouve le même squelette arylpropane précédemment reporté dans certaines molécules isolées de *C. taxifolia* (cf Figure 10).

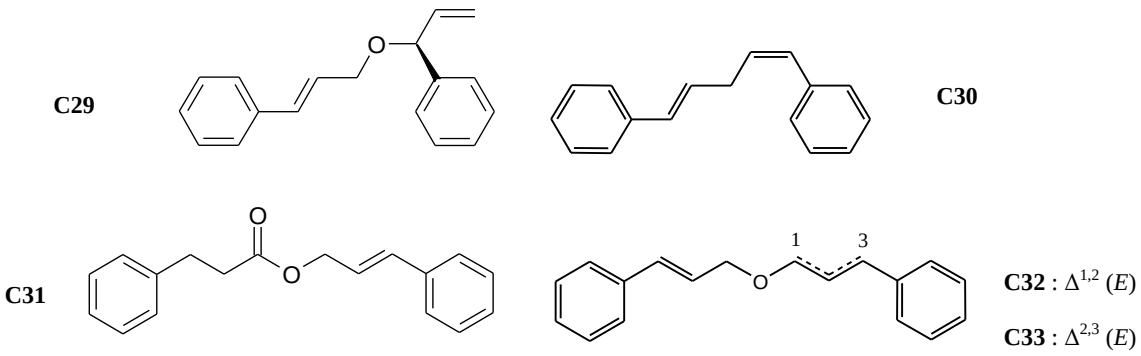
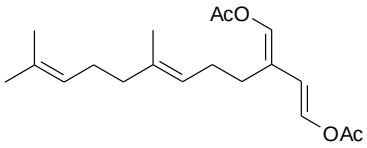


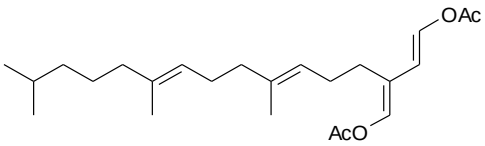
Figure 13 : *Dérivés aromatiques identifiés dans* Caulerpa racemosa ***(C29-C33)***

Composés issus d'espèces tropicales du genre *Caulerpa*

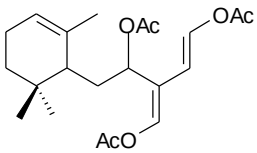
La majorité des espèces appartenant au genre *Caulerpa* sont subtropicales. Les terpènes représentent la plus grande partie des métabolites issus de ces algues, comme cela a pu être décrit pour *C. ashmeadii*, *C. brownii*, *C. flexilis* et *C. bikinensis*. Une trentaine de molécules – sesquiterpènes ou diterpènes, linéaires ou cyclisés – ont ainsi été isolées à partir de caulerpes tropicales [38-45]. Ces dérivés terpéniques peuvent être répartis en quatre squelettes types représentés respectivement par les composés **C34**-**C37** (cf Figure 14). Ces molécules portent toutes un groupement diacétoxybutadiène (ou un de ses dérivés) déjà présent dans la caulerpényne. Cette caractéristique structurale, uniquement observée dans les molécules isolées à partir de Bryopsidales, peut être considérée comme une marque chimiotaxonomique de cet ordre.



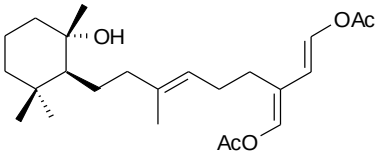
C34 Sesquiterpène linéaire (1 métabolite)



C35 Diterpène linéaire (5 dérivés)



C36 Sesquiterpène cyclique (11 dérivés)



C37 Diterpène cyclique (16 dérivés)

Figure 14 : *Squelettes-types des dérivés terpéniques isolés à partir d'espèces tropicales de* Caulerpa ***(C34-C37)***

De façon surprenante, un diterpène cyclique présentant un squelette de type labdène unique pour le genre *Caulerpa* (cf Figure 15) a été isolé de *C. trifaria* [43].

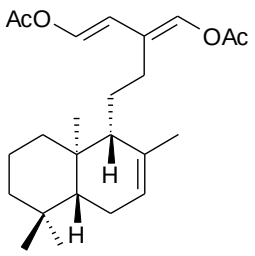


Figure 15 : *Composé isolé de* Caulerpa trifaria ***(C38)***

II.1.3. Etudes en écologie chimique portant sur Caulerpa taxifolia

Les études en écologie chimique menées sur *C. taxifolia* ont essentiellement porté sur la détermination du taux de caulerpényne. Celui-ci s'avère plus important dans les échantillons méditerranéens que dans ceux ayant une origine tropicale [16]. L'hypothèse d'une différence génétique entre les souches subtropicales et méditerranéennes de *C. taxifolia* a été avancée : elle pourrait également expliquer les autres différences (taille, mode de reproduction, etc) observées [46].

Par ailleurs, plusieurs travaux visant à quantifier les fluctuations temporelles des taux de caulerpényne dans différentes conditions ont été entrepris. Ils indiquent que la concentration de caulerpényne est minimale de janvier à mai et atteint son seuil maximal de juillet à octobre [16-17]. Cette période où les taux mesurés sont les plus forts correspond au moment où la compétition inter-spécifique dans l'écosystème est la plus forte.

D'autre part, il a été démontré que la concentration en caulerpényne était plus importante dans les frondes que dans les stolons [16] : ceci pourrait s'expliquer par le fait que les frondes sont soumises à une plus forte pression de la part des herbivores et des organismes épiphytes que les stolons [16].

Enfin, *C. taxifolia* entre souvent en compétition avec la posidonie (*Posidonia oceania*) au point de diminuer la taille des herbiers et donc de menacer potentiellement la totalité de l'écosystème formé par cette espèce. Une étude a ainsi mis en évidence un changement du métabolisme de l'algue en fonction de la compétition : lorsque la compétition augmente, le taux de caulerpényne diminue tandis que la taille des frondes s'allonge significativement [17].

II.2. Algues brunes : *Dictyota* sp. et *Dictyota dichotoma*

Les algues brunes représentent, devant les algues rouges et vertes, une importante part de la biomasse marine, en particulier dans les eaux froides et tempérées. Certaines de ces algues sont

traditionnellement utilisées pour l'alimentation (les laminaires au Japon), ou comme engrais (le goémon en Bretagne). D'un point de vue économique, des hydrocolloïdes, tels que les alginates produits par certaines algues brunes, sont largement utilisés dans le domaine agroalimentaire ainsi que dans l'industrie cosmétique.

Toujours visibles à l'œil nu, les Phéophycées sont des algues pluricellulaires qui se développent à une faible profondeur (généralement entre 0 et 20 m) dans des eaux agitées. Leur coloration brune est due à la prédominance de pigments orangés, tels que les carotènes* et les xanthophylles* par rapport aux chlorophylles *a* et *c*.

Deux échantillons d'algues brunes appartenant au genre *Dictyota* ont été étudiés dans le cadre de ce travail doctoral : le premier, récolté dans la lagune du Brusc (Six-Fours, Var, France), a été simplement caractérisé au niveau générique[2] tandis que le second provenant des côtes algériennes a été identifié comme étant *Dictyota dichotoma*[3]. Dans un premier temps, une description biologique (morphologie, répartition) des algues récoltées est proposée, puis une étude détaillée des métabolites secondaires, notamment des diterpènes cycliques, isolés à partir des algues du genre *Dictyota* est présentée.

II.2.1 Description biologique du genre Dictyota

a/ Position systématique du genre *Dictyota*

Classe Phaeophyceae

Ordre Dictyotales

Famille Dictyotaceae

Tribu Dictyoteae

Au sein des algues brunes, l'ordre des Dictyotales est constitué de 208 espèces, dont 207 appartiennent à la famille des Dictyotaceae. Celle-ci est divisée en deux tribus : les Zonarieae et les Dictyoteae. Cette dernière, qui comprend les genres *Canistrocarpus* et *Rugulopteryx*, est principalement composée du genre *Dictyota* (71 espèces sur 78) qui regroupe maintenant les genres appelés précédemment

[2] Identifié par Dr F. Rousseau (Département Systématique et Evolution, UMR 7138, MNHN, Paris, France)

[3] Identifié par Dr H. Seridi (Laboratoire de biologie et écologie marine, Université des sciences et technologies Houari-Boumedienne, BP 32, El Alia, 16111 Bab Ezzouar, Alger, Algerie)

Pachydictyon, *Glossophora*, *Glossophorella* et une grande partie des espèces de *Dilophus* [7] qui ont été renommées.

b/ Répartition géographique

Les différentes espèces de *Dictyota* sont réparties sur les cinq continents, principalement dans les eaux chaudes et tempérées. *Dictyota dichotoma* est l'espèce-type du genre *Dictyota*. Elle est très commune en Europe, que ce soit en mer Méditerranée (du détroit de Gibraltar jusqu'en Turquie) ou le long de la façade Atlantique (des Açores à la Norvège). Elle est également présente en mer Rouge, en mer Noire, au Japon et dans l'océan Indien.

Parmi les algues appartenant au genre *Dictyota*, six espèces ont été identifiées en mer Méditerranée : *D. dichotoma*, *D. fasciola*, *D. linearis*, *D. ciliolata*, *D. mediterranea* et *D. spiralis*. Le long des côtes françaises, *D. dichotoma* est, sous ses différentes formes et variétés, l'espèce la plus courante. *D. fasciola*, *D. spiralis* et *D. linearis* ont également déjà été référencées sur le littoral français à l'inverse de *D. ciliolata* et *D. mediterranea*. *D. ciliolata* a été répertoriée uniquement en Espagne tandis que la présence de *D. mediterranea* a été relevée sur les côtes espagnoles, italiennes et grecques.

c/ Description morphologique

Dictyota dichotoma

D. dichotoma présente un thalle aplati en lanières avec une ramification dichotome et des rameaux de même longueur à l'extrémité arrondie qui mesurent entre 5 et 10 mm de large (cf Figure 16). Elle se fixe au substrat par des rhizoïdes qui se terminent par des disques adhésifs. Elle mesure généralement entre 10 et 25 cm de long, mais elle peut parfois atteindre 50 cm en été. Elle épiphyte souvent d'autres organismes tels que les algues ou les gorgones [47].

Figure 16 : *Thalle de* Dictyota dichotoma (© *http://www.algaebase.org/)*

Dictyota sp.

L'échantillon récolté dans la lagune du Brusc présente des caractéristiques morphologiques proches de celles de *D. dichotoma*. Il apparait néanmoins que la principale différence entre ces deux espèces est la largeur des rameaux : ceux-ci sont en effet beaucoup plus étroits sur l'échantillon de *Dictyota* sp. que sur celui de *D. dichotoma*. Cette caractéristique le rapprocherait plus alors de *D. linearis* ou *D. dichotoma* var *implexa* pour lesquels des largeurs de rameaux de 1 à 2 mm ont été observées.

II.2.2. Etude chimique du genre Dictyota

Parmi les Phéophycées, les algues de l'ordre des Dictyotales représentent une source prolifique de métabolites secondaires, et notamment de diterpènes cycliques. Près du tiers des 1500 métabolites isolés des Phéophycées l'ont été à partir d'algues appartenant à cet ordre [6]. Plus précisément, les algues de la tribu des Zonarieae renferment une grande variété de composés appartenant à différentes classes chimiques tels que des sesquiterpènes (genres *Dictyopteris* et *Taonia*), des diterpènes (genre *Spatoglossum*), des méroterpènes* (genre *Taonia*) ou des dérivés phénoliques (genre *Zonaria*). A l'inverse, les algues de la tribu des Dictyoteae sont particulièrement riches en diterpènes cycliques qui constituent la grande majorité des composés qu'elles biosynthétisent.

a/ Diterpènes cycliques

La principale voie de biosynthèse des unités isopréniques, qui constituent les unités de base des terpènes, est celle dans laquelle le précurseur est l'acide mévalonique. Une autre voie biosynthétique, partant de l'acide pyruvique et de glucides, a été également mise en évidence chez certaines bactéries. A partir de ces précurseurs, deux unités isopréniques de base, l'isopenténylpyrophosphate (IPP) et le diméthylallylpyrophosphate (DMAPP) sont obtenues. L'assemblage de ces fragments par des jonctions de type « tête – queue » donne naissance aux différents précurseurs des terpènes : le géraniolpyrophosphate (GPP) pour les monoterpènes, le farnésolpyrophosphate (FPP) pour les sesquiterpènes, le géranylgéraniolpyrophosphate (GGPP) pour les diterpènes, etc.

Les voies biosynthétiques

Les diterpènes cycliques isolés à partir d'algues du genre *Dictyota* sont généralement classés en trois grands groupes (I, II et III ; cf Schéma 1) en fonction de leur voie biosynthétique à partir du GGPP [48].

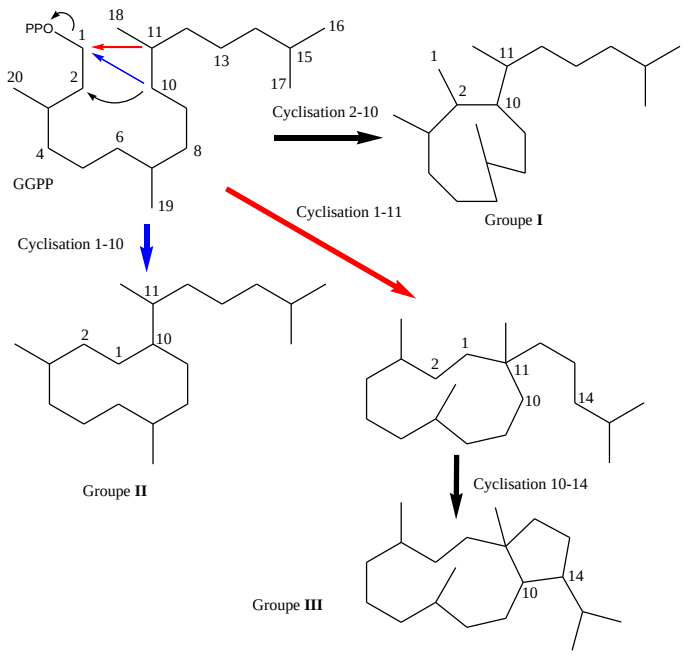


Schéma 1 : *Représentation des voies biosynthétiques des trois groupes de diterpènes isolés des espèces de Dictyoteae*

Près de 350 molécules ont déjà été décrites à partir d'algues du genre *Dictyota*. Les diterpènes cycliques, qui constituent plus de 90% de l'ensemble de ces métabolites (cf Figure 17), présentent plus d'une vingtaine de squelettes différents, dont beaucoup sont propres à ces seuls organismes.

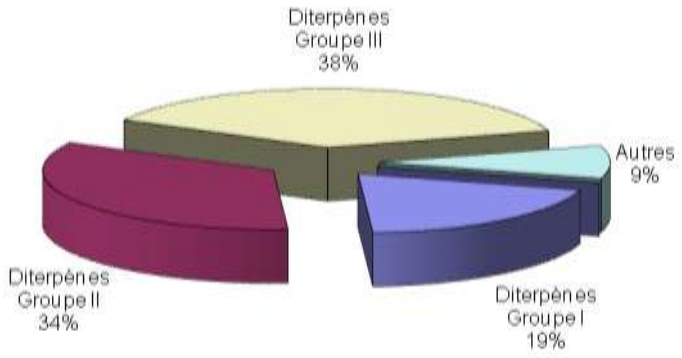


Figure 17 : *Répartition des métabolites décrits à partir des algues de la tribu des Dictyoteae*

Diterpènes du groupe I

Les diterpènes du groupe I sont issus d'une première cyclisation en C-2/C-10 à partir du GGPP (cf Schéma 1). La majorité d'entre eux présentent soit un squelette xénicane soit un squelette crénulide (cf Schéma 2).

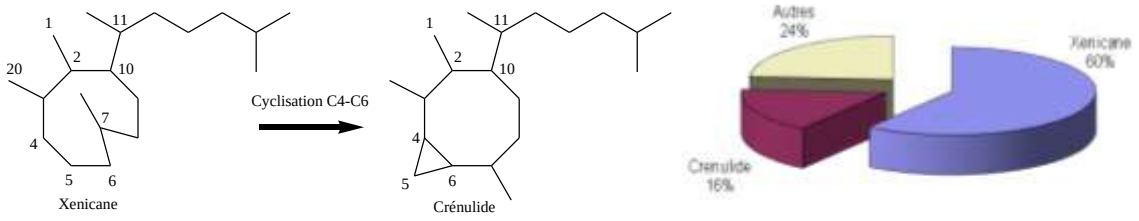
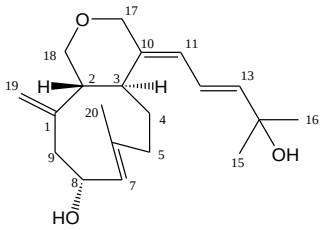
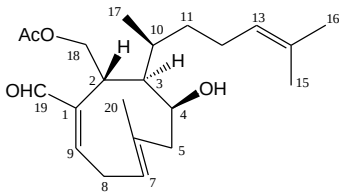


Schéma 2 : *Voie biosynthétique et répartition des diterpènes du groupe I*

Le squelette xénicane est typique des diterpènes issus d'algues de la famille des Dictyotaceae ou de différentes espèces de cnidaires, principalement des coraux mous appartenant au genre *Xenia* [49-52]. Néanmoins, des différences structurales significatives peuvent être relevées entre ces deux groupes de xénicanes (cf Figure 18).

D1





D2

Figure 18 : *Exemples de xénicanes isolés d'un cnidaire (**D1**, [52]) et d'une algue brune du genre* Dictyota *(**D2**, [53])*

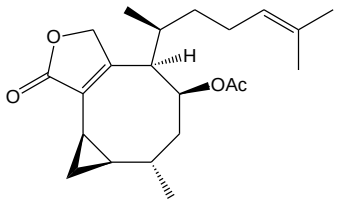
Les xénicanes isolés à partir de coraux présentent systématiquement un hétérocycle de type pyrane au sein duquel l'atome d'oxygène est situé entre C-17 et C-18[4]. D'autre part, le macrocycle carboné de ces composés peut être oxygéné en C-7, C-8 ou C-9 alors que les positions C-4, C-5 et C-19 ne le sont jamais. A l'inverse, seuls 20% des xénicanes issus d'espèces de *Dictyota* présentent une fonction oxygénée en C-17 (seulement 10 composés isolés des espèces australiennes *D. prolificans* et *D. divaricata* [54-55] et deux composés récemment décrits à partir de *D. ciliolata* [56] montrent une telle fonctionnalisation) alors que celles-ci sont plus courantes en C-18 et C-19. Dans ce dernier cas de figure, des cycles de type furane avec l'atome d'oxygène situé entre C-18 et C-19 peuvent alors se former. Enfin, ces diterpènes présentent fréquemment une fonction oxygénée en C-4.

D'un point de vue stéréochimique, la configuration des atomes de carbone asymétriques du macrocycle a été étudiée à l'aide de diverses méthodes sur des xénicanes issus de *Dictyota*. Les configurations relatives 2*R**, 3*R** et 4*S** ont été proposées sur la base d'études RMN et par comparaison avec des molécules de stéréochimie connue [53]. Des études sur plusieurs autres

[4] Chaque famille de diterpènes possède une numérotation qui lui est propre et qui est différente de la numérotation du géranylgéraniol ; cette dernière sera donc utilisée uniquement pour décrire les voies biosynthétiques conduisant aux différents squelettes diterpéniques

xénicanes d'origine algale ont ensuite été réalisées par diffraction de rayons X [57] et par RMN, en utilisant la méthode de Mosher modifiée [58-59] : dans chaque cas, les configurations absolues du macrocycle ont été déterminées comme étant 2*S*, 3*S* et 4*R*.

Cinq autres squelettes, dont certains rares comme les 2,6-cyloxénicanes [60] ou comme celui du crenulal [61], découlent de réarrangements successifs à partir du squelette xénicane initialement formé. En particulier, la famille des crénulides est issue d'une cyclisation en C-4/C-6 à partir du squelette xénicane (cf Schéma 2). Les premiers crénulides ont simultanément été identifiés à partir de l'algue brune *Dictyota crenulata* [62] (cf Figure 19) et du lièvre de mer *Aplysia vaccaria* [63].



D3

Figure 19 : *Exemple de crénulide isolé à partir de* Dictyota crenulata

Diterpènes du groupe II

Les diterpènes du groupe II sont obtenus biosynthétiquement *via* une première cyclisation en C-1/C-10 à partir du GGPP (cf Schéma 1). Ils constituent les pendants prénylés[5] de squelettes sesquiterpéniques communément isolés à partir de sources terrestres. De nombreux squelettes différents, parmi lesquels les dilophanes, les dictyanes, les spatanes et les sécospatanes sont les plus répandus (cf Figure 20), découlent de cette première cyclisation (cf Schéma 3).

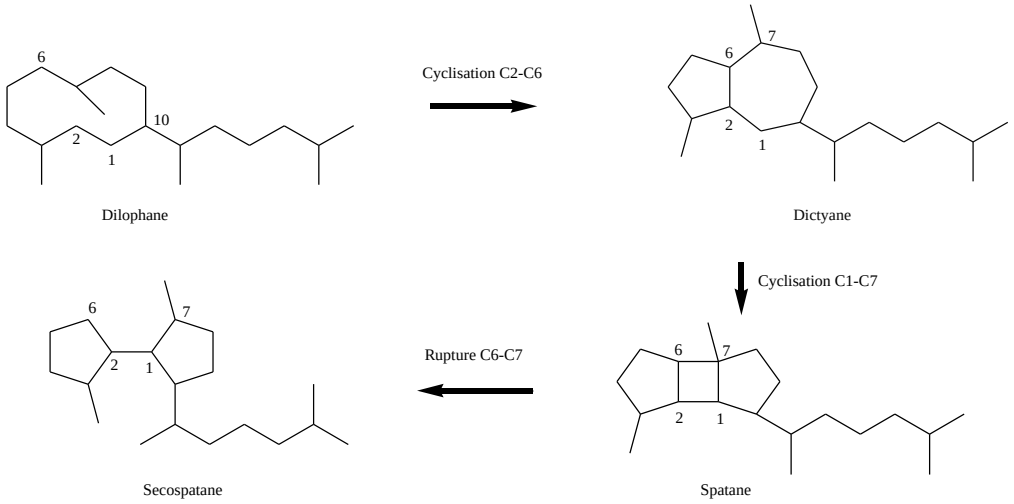


Schéma 3 : *Voie biosynthétique des différentes familles de diterpènes du groupe II*

[5] Prénylés : rallongés d'une unité isoprénique

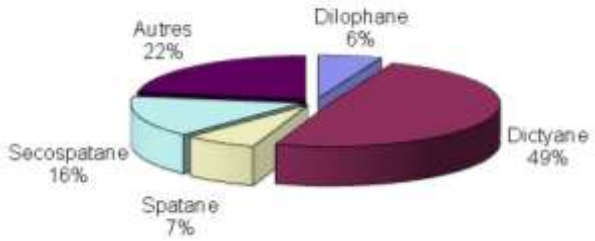
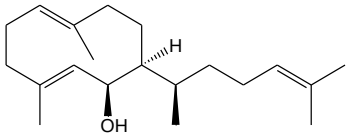
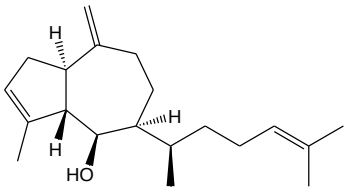


Figure 20 : *Répartition des diterpènes du groupe II*

Le squelette dilophane, qui correspond à un squelette germacrane prénylé, est assez peu répandu (cf Figure 20) ; le dilophol (**D4**, cf Figure 21), purifié à partir d'un extrait de *Dilophus ligatus* (appelé aujourd'hui *Dictyota spiralis*), est le premier représentant de cette famille [64]. Ce squelette constitue un intermédiaire biosynthétique clé qui conduit à la famille des dictyanes, ou guaïanes prénylés (cf Schéma 3). Depuis la découverte du pachydictyol A (**D5**, cf Figure 21), décrit à partir de *Dictyota coriacea* [65] (anciennement appelée *Pachydictyon coriaceum*), environ soixante diterpènes de type dictyane ont été isolés à partir des Dictyoteae.

D4



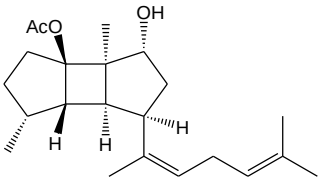


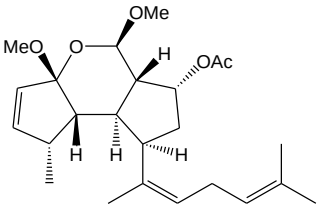
D5

Figure 21 : *Dilophol (**D4**) et pachydictyol A (**D5**)*

Au sein du groupe II, les spatanes et les secospatanes représentent les squelettes diterpéniques les plus évolués biosynthétiquement (cf Figure 22). Ils sont spécifiques à certaines espèces de Dictyoteae (*Rugulopteryx marginata* et *R. okamurae)* qui appartenaient précédemment au genre *Dilophus*, ce genre n'étant actuellement plus reconnu.

D6





D7

Figure 22 : *Exemples de spatane (**D6**) et de secospatane (**D7**) isolés de* Rugulopteryx okamurae *[66]*

Diterpènes du groupe III

Les diterpènes du groupe III sont issus de deux cyclisations successives en C-1/C-11 et en C-10/ C-14 à partir du GGPP (cf Schéma 1). Le squelette dolabellane ainsi formé est constitué d'un cycle à onze atomes de carbone accolé à un cyclopentane (cf Schéma 4). Cette famille constitue, avec les dolastanes et les sécodolastanes qui en découlent, la quasi-totalité des molécules de ce groupe (cf Figure 23).

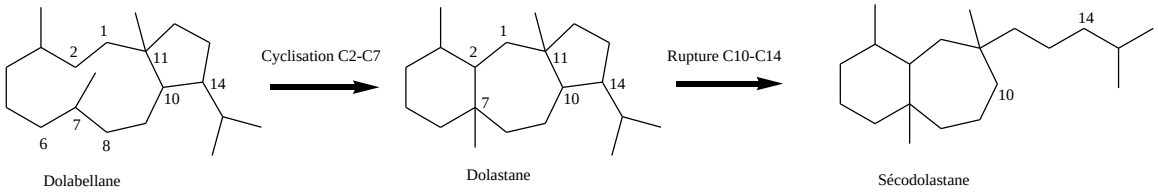


Schéma 4 : *Voie biosynthétique des différentes familles de diterpènes du groupe III*

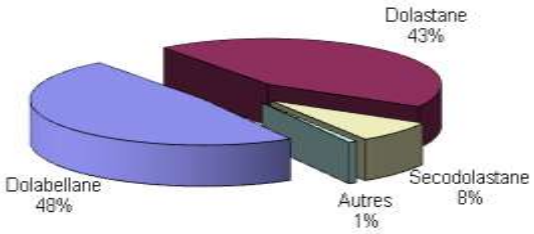


Figure 23 : *Répartition des diterpènes du groupe III*

Les dolabellanes sont largement répandus chez les *Dictyota* (cf Figure 23), néanmoins les premières molécules appartenant à cette famille (**D8** et **D9**, cf Figure 24) ont été isolées à partir des glandes digestives d'un lièvre de mer, *Dolabella californica* [67], se nourrissant effectivement d'algues de ce genre.

D8 : R=H

D9 : R=OAc

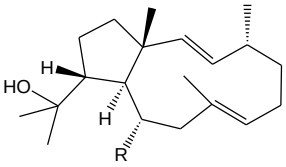
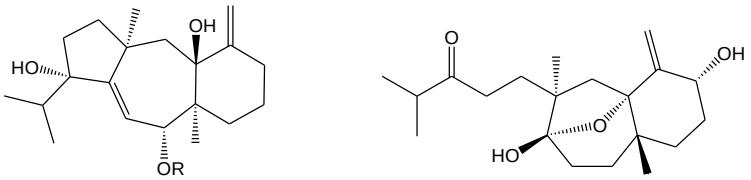


Figure 24 : *Dolabellanes isolés du mollusque* Dolabella californica

A partir du squelette dolabellane, une cyclisation supplémentaire entre C-2 et C-7 conduit aux dolastanes (cf Schéma 4) : cette famille de diterpènes est également très représentée dans les extraits d'algues du genre *Dictyota*. Comme vu précédemment dans le cas des dolabellanes, les premiers dolastanes (**D10, D11**, cf Figure 25) ont également été décrits initialement à partir d'une espèce de lièvre de mer, *Dolabella auricularia* [68].

D10 : R=H

D11 : R=Ac



D12

Figure 25 : *Exemples de dolastanes (**D10**, **D11**) et de sécodolastane (**D12**)*

La famille des sécodolastanes est probablement issue d'un schéma biosynthétique impliquant la rupture de la liaison C-10/C-14 (cf Schéma 4) au niveau du squelette dolastane. Le premier sécodolastane décrit, le linéarol (**D12**), a été isolé a partir de l'algue brune *Dictyota linearis* [69] (cf Figure 25).

b/ Autres types de composés

Même si les diterpènes constituent la majeure partie des extraits organiques des *Dictyota*, d'autres types de molécules y ont été également décrits. Parmi ces composés, peuvent être cités :

- le fucostérol [70], connu pour être le stérol majoritaire chez les algues brunes.
- le β-carotène et la fucoxanthine, des caroténoïdes qui constituent généralement les deux principaux pigments chez les Phéophycées. Présents en plus grande quantité que les chlorophylles *a*, *c1* et *c2*, ils sont responsables de la couleur brune caractéristique de ces algues [71].
- un hydrocarbure à 11 atomes de carbone (**D13**, cf Figure 26) isolé à partir d'un échantillon de *D. dichotoma* lors de l'étude de ses gamètes femelles [72]. Les composés de ce type sont courants chez les algues brunes : ce sont des phéromones qui jouent, en tant qu'attracteurs des gamètes mâles, un rôle primordial au niveau de la reproduction et qui peuvent également intervenir dans la défense chimique [1].

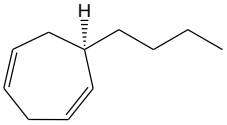


Figure 26 : *Phéromone de* D. dichotoma *(**D13**)*

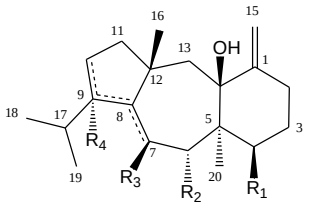
- des sesquiterpènes cycliques, isolés notamment à partir de *D. dichotoma* (cf Figure 32).

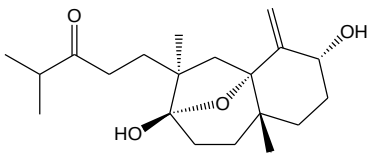
Deux échantillons d'algues brunes appartenant au genre *Dictyota* ont été étudiés au cours de ce travail. L'un d'entre eux, prélevé le long des côtes algériennes, appartient à l'espèce *D. dichotoma*. En

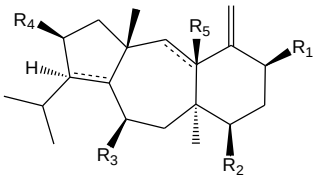
revanche, le second échantillon, récolté dans la lagune du Brusc, a simplement été identifié au niveau générique. Les caractéristiques morphologiques des algues de cet échantillon, comme la faible largeur des rameaux, tendent à les rapprocher des espèces *D. linearis* ou *D. dichotoma* var *implexa* qui possèdent également des caractéristiques de ce type. Ces deux espèces sont d'ailleurs très répandues en mer Méditerranée et notamment le long des côtes françaises [7]. Au vu de l'identification des échantillons d'algues étudiés, une revue détaillée des composés décrits à partir de *D. linearis* et d'échantillons méditerranéens de *D. dichotoma* est proposée.

c/ Composés issus de *D. linearis*

D. linearis est une espèce courante en Méditerranée, mais elle est également présente en Amérique Centrale, dans le Sud de l'Afrique et en Asie [7]. Jusqu'à une période récente, les seules études chimiques menées à partir de *D. linearis* avaient porté sur des échantillons non méditerranéens [69, 73-76]. Les métabolites isolés de spécimens récoltés au Honduras (**D14-D18**) et au Japon (**D12**, **D19-D24**) appartiennent tous à la sous-famille des dolastanes, à l'exception du linéarol (**D12**) qui est un sécodolastane (cf Figure 27).







D14: R_1=OAc; R_2=H; $\Delta^{7,8}$; R_3=H ; R_4=OH

D15: R_1=R_2=H; $\Delta^{7,8}$; $\Delta^{9,10}$; R_3=H

D16: R_1=OH; R_2=H; $\Delta^{7,8}$; R_3=H; R_4=OH

D17: R_1=OH; R_2=H; $\Delta^{8,9}$; R_3=OH

D18: R_1=R_2=OAc; $\Delta^{8,9}$; R_3=H

D12

D19: R_1=H; R_2=OH; $\Delta^{8,9}$; R_3=R_4=OAc; R_5=OH

D20: R_1=H; R_2=OH; $\Delta^{13,14}$; R_3=R_4=H; R_5=OH

D21: R_1=OH; R_2=H; $\Delta^{8,9}$; R_3=R_4=R_5=H

D22: R_1=H; R_2=OH; $\Delta^{8,9}$; R_3=R_4=H; R_5=OH

D23: R_1=OH; R_2=H; $\Delta^{8,9}$; R_3=R_4=H; R_5=OH

D24: R_1=H; R_2=OH; $\Delta^{8,9}$; R_3=R_4=R_5=H

Figure 27 : *Dolastanes (**D14-D18**, **D19-D24**) et sécodolastane (**D12**) isolés à partir d'échantillons de* D. linearis *récoltés au Honduras et au Japon*

Plus récemment, l'étude d'un échantillon de *D. linearis* provenant des côtes grecques a montré que la composition chimique en diterpènes cycliques de cette algue ne se limitait pas simplement aux squelettes dolastane et sécodolastane [77]. En effet, quatorze métabolites secondaires appartenant aux trois groupes de diterpènes cycliques précédemment décrits et présentant quatre squelettes carbonés différents ont été isolés (cf Figure 28) :

- les quatre xénicanes (**D25-D28**) et l'acétylsanadaol (**D29**) appartiennent au groupe I.

- les cinq métabolites (**D5**, **D30-D33**) présentent un squelette carboné de type dictyane (groupe II). Les dictyols C (**D30**) et E (**D31**) ont été décrits pour la première fois à partir du mollusque *Aplysia delipans* [78] tandis que le pachydictyol A (**D5**), l'isopachydictyol A (**D32**) et le dictyoxyde (**D33**) ont été initialement isolés à partir de diverses espèces de *Dictyota* [65, 79-80].

- les trois dolabellanes (**D34-D36**) sont des membres du groupe III. Ils ont été précédemment décrits à partir du lièvre de mer *Dolabella californica* [81].

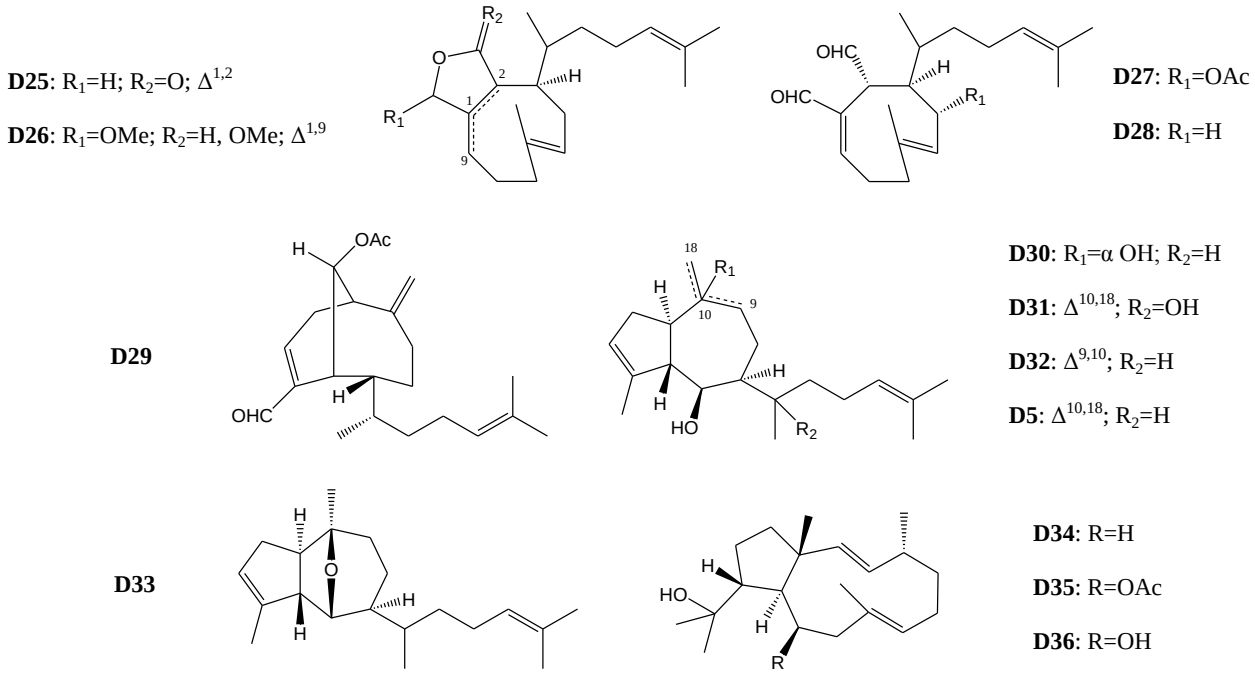


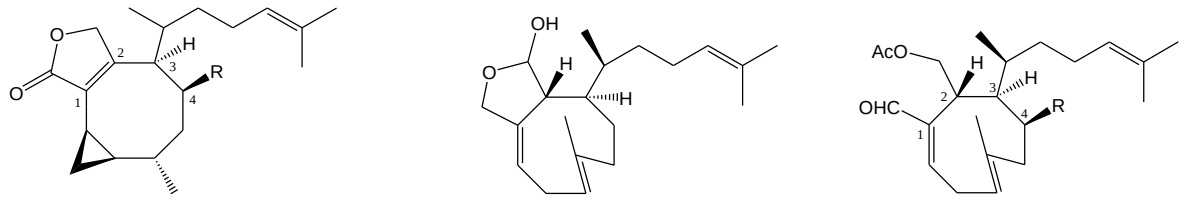
Figure 28 : *Diterpènes isolés de* D. linearis *de Méditerranée*

d/ Composés issus de *D. dichotoma* de Méditerranée

L'espèce *D. dichotoma* a fait l'objet de nombreuses études et témoigne d'une grande richesse en métabolites secondaires : en effet, près d'une centaine de diterpènes cycliques ont été identifiés à partir de cette seule espèce [6] récoltée en différents points du monde. Cette partie se limitera à la description des métabolites décrits à partir d'échantillons méditerranéens de *D. dichotoma*.

Diterpènes du groupe I

Faisant partie de ce groupe, deux crénulides (**D3**, **D37**) et trois xénicanes (**D2**, **D38**, **D39**) ont été décrits à partir de cette espèce [53, 77] (cf Figure 29). En terme de stéréochimie, les configurations relatives relevées en C-3 et C-4, respectivement *R** et *S**, sont identiques quel que soit le type de squelette carboné. En outre, une des caractéristiques de ces diterpènes du groupe I réside dans le fait que, dans tous les cas, la seule fonction oxygénée portée par le macrocycle est localisée en C-4.



D3: R=OAc

D37: R=OH

D38

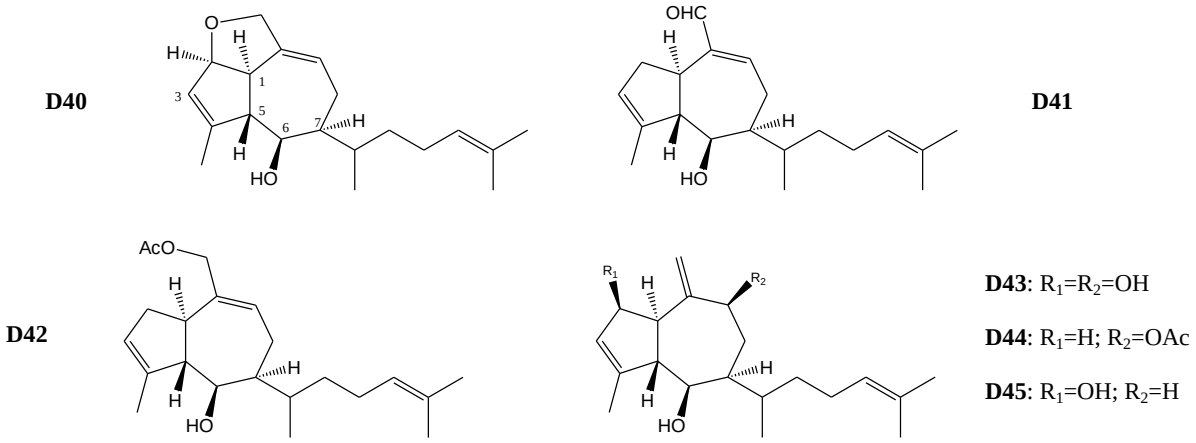
D2: R=OH

D39: R=H

Figure 29 : *Diterpènes du groupe I isolés de* D. dichotoma *de Méditerranée (**D2**, **D3**, **D37-D39**)*

Diterpènes du groupe II

Les extraits de *D. dichotoma* renferment de nombreux composés présentant un squelette hydroazulénique de type dictyane (cf Figure 30). Les dictyols A (**D40**), B (**D43**) et D (**D45**) ont été décrits à partir de différents échantillons récoltés sur les côtes italiennes [78, 82]. L'isopachydictyolal (**D41**) et l'acétate de dictyol B (**D44**) ont été identifiés dans des spécimens collectés en Grèce [77, 83], tandis que l'acétate de dictyol I (**D42**) a été isolé à partir de *D. dichotoma* récoltée en mer Adriatique [84]. Enfin, cinq autres composés, le dictyoxide (**D33**), les dictyols C (**D30**) et E (**D31**), le pachydictyol A (**D5**) et l'isopachydictyol A (**D32**) décrits précédemment à partir de *D. linearis*, ont été purifiés à partir d'un extrait de *D. dichotoma* prélevée en Grèce [77].



D43: R_1=R_2=OH

D44: R_1=H; R_2=OAc

D45: R_1=OH; R_2=H

Figure 30 : *Diterpènes du groupe II isolés de* D. dichotoma *de Méditerranée (**D40-D45**)*

Tous ces métabolites présentent une fonction oxygénée, généralement un alcool, en position 4. La stéréochimie relative de ces composés est toujours la même, à savoir une jonction *trans* entre les deux cycles (et donc entre H-1 et H-5), une relation *trans* entre H-5 et H-6 et enfin une relation *cis* entre H-6 et H-7.

Diterpènes du groupe III

En ce qui concerne les diterpènes appartenant à ce groupe, huit dolabellanes ont été purifiés à partir de différents extraits de *D. dichotoma* récoltés en Italie [81, 85-86] (cf Figure 31). En termes de stéréochimie, les configurations relatives de C-1, C-11 et C-12 sont identiques pour tous ces composés : l'étude des corrélations NOE indique une jonction *trans* entre les deux cycles ainsi qu'une orientation *trans* des deux protons H-11 et H-12. Les composés **D48**, **D49** et **D50** présentent, en outre, un groupement *cis*-époxyde localisé en C-3/C-4.

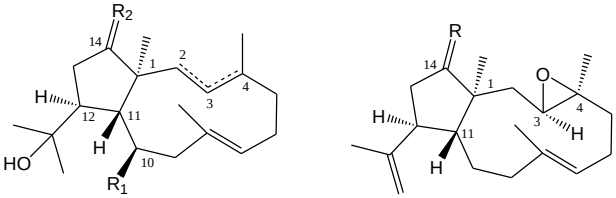
D34 : $\Delta^{2,3}$; R_1=H; R_2=H, H

D35 : $\Delta^{2,3}$; R_1=OAc; R_2= H, H

D36 : $\Delta^{2,3}$; R_1=OH; R_2= H, H

D46 : $\Delta^{3,4}$; R_1=H; R_2= H, H

D47 : $\Delta^{3,4}$; R_1=H; R_2=O



D48 : R=O

D49 : R=H, α OH

D50 : R=H, H

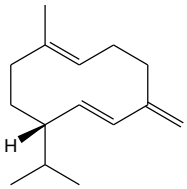
Figure 31 : *Dolabellanes (groupe III) isolés de* D. dichotoma *de Méditerranée (**D34**, **D36**, **D46-D50**)*

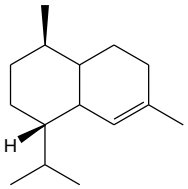
En définitive, des composés issus de toutes les grandes familles de diterpènes cycliques ont été identifiés à partir d'échantillons de *D. dichotoma* de Méditerranée. Les principaux squelettes, hormis celui des dolastanes, sont représentés. Il faut néanmoins préciser que certains auteurs considèrent *D. dichotoma* et ses nombreuses variétés comme un ensemble regroupant plusieurs espèces différentes et non comme une espèce unique [87].

Sesquiterpènes

Outre les diterpènes cycliques, plusieurs sesquiterpènes cycliques (cf Figure 32) ont également été isolés de *D. dichotoma* [77, 88].

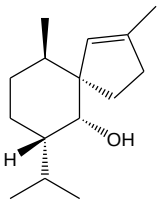
D51

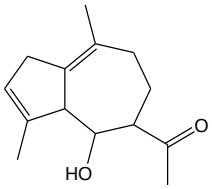




D52

D53





D54

Figure 32 : *Sesquiterpènes isolés de* D. dichotoma *de Méditerranée (**D51-D54**)*

Le composé **D51** possède une structure cyclique correspondant au squelette dilophane non prénylé. Le composé **D52** montre un squelette bicyclique qui découle directement du squelette précédent *via* une cyclisation. L'axénol (**D53**) possède un atome de carbone spiranique, cette caractéristique structurale constitue un cas unique chez les algues du genre *Dictyota*. Ces trois composés (**D51-D53**) ont été préalablement isolés à partir de l'algue brune *Taonia atomaria*, qui appartient à la famille des

Dictyotaceae [89]. Enfin, le composé **D54** est un norsesquiterpène qui présente un squelette azulénique que l'on retrouve chez les dictyanes (groupe II). Ces hydrocarbures volatils ont en général des odeurs fortes qui contribuent à «l'odeur de plage».

e/ Diterpènes aux squelettes atypiques isolés de *D. dichotoma*

Plusieurs diterpènes cycliques ayant été décrits à partir d'échantillons de *D. dichotoma* récoltés à travers le monde présentent des squelettes diterpéniques peu courants dans ce type d'organisme. Des dichotomanes, parmi lesquels **D55** (cf Figure 33), issus du xénicane *via* une transposition de la liaison en C-5/C-6 vers celle en C-5/C-7 suivie d'une cyclisation en C-2/C-19 (cf Schéma 5), ont été caractérisés à partir d'échantillons de *D. dichotoma* récoltés en Australie [60].

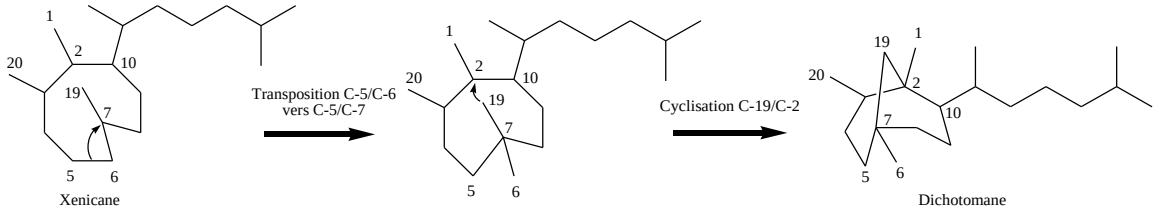


Schéma 5 : *Voie biosynthétique du squelette dichotomane à partir du squelette xénicane*

Trois composés, les tricyclodictyofuranes A (**D56**), B et C appartenant au groupe I ont été isolés à partir d'algues récoltées au Japon [90]. Ce type de diterpènes proviendrait du squelette xénicane suite à deux cyclisations en C-2/C-7 et C-20/C-4 (cf Schéma 2). Plusieurs composés du groupe II, dont la dictyotine A (**D57**), ont été purifiés à partir d'extraits de *D. dichotoma* récoltée au Japon [91] : ils dérivent des dilophanes par cyclisation en C-1/C-6 (cf Schéma 3).

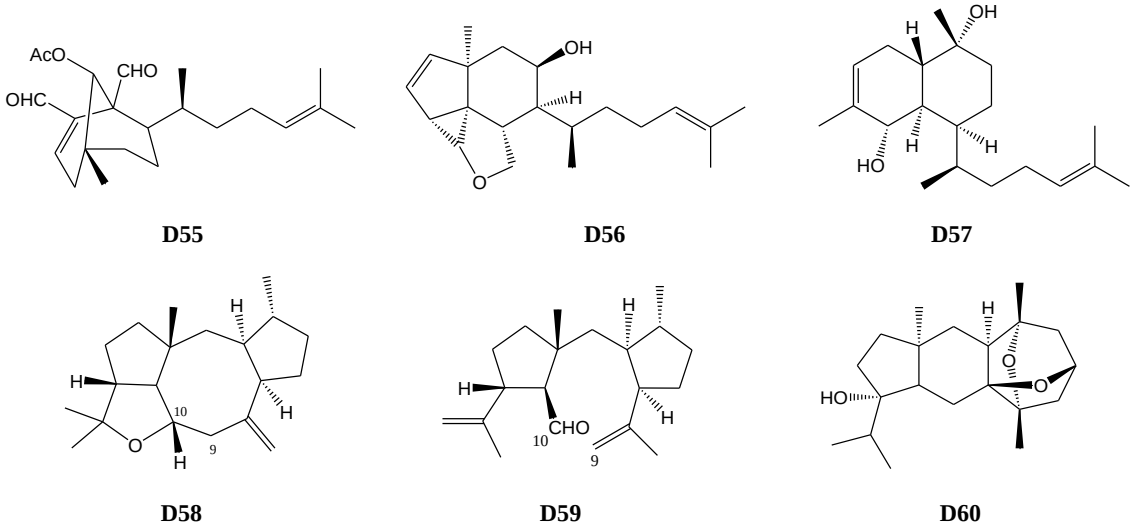


Figure 33 : *Composés possédant un squelette atypique isolés à partir de* D. dichotoma *(**D55-D60**)*

L'époxydictymène (**D58**) et le dictymal (**D59**) appartiennent au groupe III : ils ont tout deux été purifiés à partir d'extraits d'algues récoltées au Japon [92-93]. Le squelette du dictymal découle directement de celui de l'époxydictymène suite à la rupture de la liaison C-9/C-10 (cf Figure 33). Enfin, le dictyoxétane (**D60**) possède un squelette rare issu de la cyclisation en C-2/C-8 à partir du squelette dolabellane (cf Schéma 4) : il a été décrit à partir d'un échantillon de *D. dichotoma* provenant d'Inde [94].

II.3. Algue brune : *Cystoseira foeniculacea*

Un échantillon d'une algue brune appartenant à l'espèce *Cystoseira foeniculacea* a également été étudié. Une brève présentation des données biologiques et chimiques relatives à ce genre est rapportée ici.

II.3.1 Description biologique du genre Cystoseira

Classe Phaeophyceae

Ordre Fucales

Famille Sargassaceae

Actuellement, la famille des Sargassaceae, qui regroupe les anciennes familles des Sargassaceae et des Cystoseiraceae, comprend quatre genres principaux : *Cystophora*, *Cystoseira*, *Sargassum* et *Turbinaria*. Ces genres représentent à eux seuls plus de 90% des espèces de la famille des Sargassaceae et près de 85% des espèces de l'ordre des Fucales [7]. Le genre *Cystoseira*, qui regroupe 47 espèces, est essentiellement représenté dans les eaux froides et tempérées de l'hémisphère nord, la mer Méditerranée en constituant la zone centrale de spéciation. Plus particulièrement, l'espèce étudiée dans ce travail, *Cystoseira foeniculacea* (anciennement appelée *Cystoseira ercegovicii*), est principalement localisée en mer Méditerranée, de l'Espagne à la Turquie ainsi que sur les côtes nord-africaines, et en Atlantique nord-est [7] ; elle est d'ailleurs présente au cap Lardier, espace protégé co-géré par le parc national de Port-Cros [95].

II.3.2. Etude chimique du genre Cystoseira

Les algues brunes du genre *Cystoseira* sont connues pour métaboliser majoritairement des terpènes (principalement des méroditerpènes et des diterpènes) ainsi que des phlorotannins. Alors que les

diterpènes isolés de ces algues sont majoritairement linéaires, les méroditerpènes* peuvent être classés en quatre groupes en fonction de la nature de la chaîne diterpénique latérale : ainsi, ils peuvent être linéaires, monocycliques, bicycliques ou réarrangés (cf Figure 34).

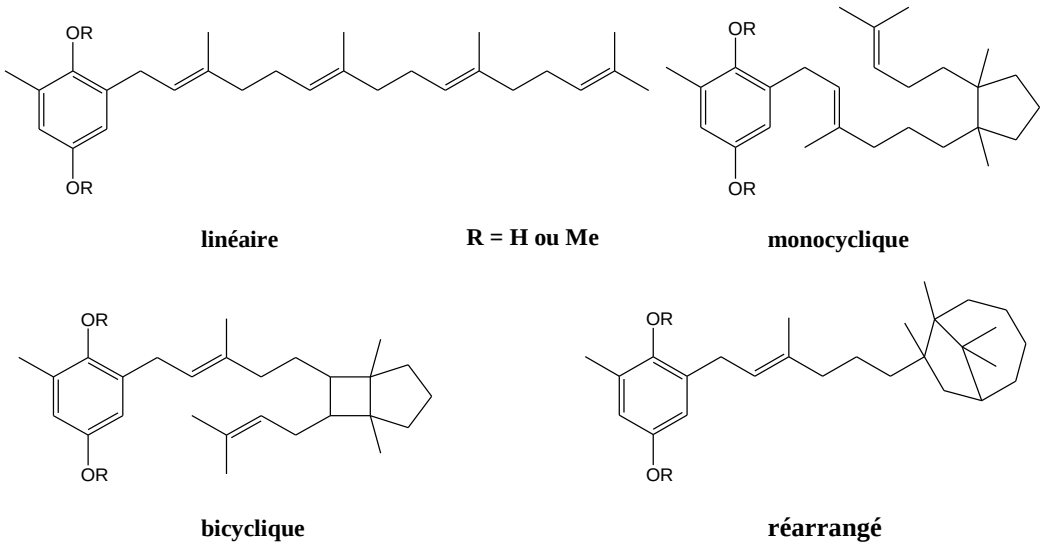


Figure 34 : *Exemples des différents types de squelettes de méroditerpènes isolés à partir d'algues du genre* Cystoseira

Contrairement à d'autres espèces telles que *C. stricta* ou *C. crinita*, très peu de métabolites secondaires ont été décrits à partir de *C. foeniculacea*. Seuls deux méroditerpènes linéaires (**Cys1** et **Cys2** cf Figure 35) ont été purifiés à partir d'un échantillon récolté en Sicile [96]. Ce dernier avait alors été identifié comme correspondant à l'espèce *C. ercegovicii*. Il convient néanmoins de prendre ces informations avec précaution, l'identification des cystoseires réalisée sur des bases morphologiques, étant généralement très délicate.

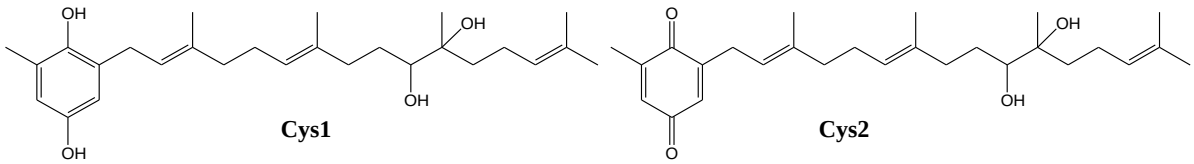


Figure 35 : *Méroditerpènes isolés à partir de* Cystoseira foeniculacea *[96]*

II.4. Bryozoaires

L'étude chimique de ces organismes s'inscrit dans le cadre du programme de recherche ECIMAR[6] (Ecologie ChImie MARine), au sein duquel les organismes ciblés sont ceux appartenant aux communautés benthiques de substrat dur de Méditerranée. Dans ce contexte, la composition chimique de certaines espèces de bryozoaires, étymologiquement "animaux mousses", a été étudiée par le biais de l'analyse chromatographique (« la signature chimique ») de leurs extraits lipidiques.

II.4.1. Description biologique

Les bryozoaires, ou ectoproctes, sont des animaux filtreurs microscopiques dont les individus, appelés zoïdes, sont, pour la plupart, organisés en colonies. Trois classes composent cet embranchement : Phylactolaemata (organismes mous vivant en eaux douces), Stenolaemata (organismes longs et cylindriques) et Gymnolaemata. Cette dernière est divisée en deux ordres : les Cténostomes et les Cheilostomes. Au cours de ce travail, seuls des bryozoaires appartenant à l'ordre des Cheilostomes ont été étudiés. Ceux-ci sont exclusivement marins et présentent la particularité de posséder un squelette calcaire.

II.4.2. Métabolites secondaires isolés de bryozoaires

En comparaison des molécules issues d'éponges, d'algues ou de cnidaires, les métabolites secondaires isolés à partir de bryozoaires ne constituent qu'une part minime (moins de 1%) des substances naturelles marines décrites à ce jour [6]. Cet état de fait peut s'expliquer par plusieurs raisons. Tout d'abord, les bryozoaires forment des colonies qui sont pour la plupart de taille modeste. De plus, ces organismes sont le plus souvent encroûtants, d'où une grande difficulté pour récolter des quantités d'échantillons suffisantes pour l'analyse de leur composition chimique. Seules quelques espèces présentant des colonies macroscopiques, pouvant aller dans de rares cas jusqu'à un mètre, sont adaptées à l'obtention de la biomasse nécessaire. Enfin, les bryozoaires de l'ordre des Cheilostomes sont constitués d'un squelette calcaire qui représente une part relativement importante de leur biomasse, diminuant d'autant les rendements d'extraction obtenus avec ce type d'organismes.

---

[6] Ce programme est financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) et l'Institut Français de la Biodiversité (IFB) sur la période 2007-2010. Les principaux objectifs d'ECIMAR sont de contribuer à la caractérisation de la biodiversité méditerranéenne à travers sa composante chimique et de valoriser la chimiodiversité des métabolites secondaires dans les domaines biomédical et environnemental.

Environ 60% des métabolites décrits à partir de bryozoaires l'ont été d'organismes appartenant à l'ordre des Cheilostomes [6]. La plupart de ces composés sont des stérols, des composés azotés (notamment des dérivés du pyrrole) ou des alcaloïdes bromés. Parmi ces molécules, les bryostatines isolées à partir de l'espèce *Bugula neritina* – plus précisément à partir d'une bactérie symbiotique de ce bryozoaire [97] – présentent une activité anticancéreuse prometteuse. La plus active d'entre-elles, la bryostatine I (**B1**, cf Figure 36), est actuellement en phase II d'essais cliniques pour le traitement de différents types de cancer [1].

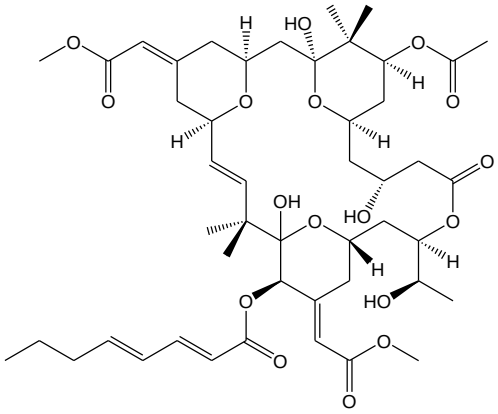
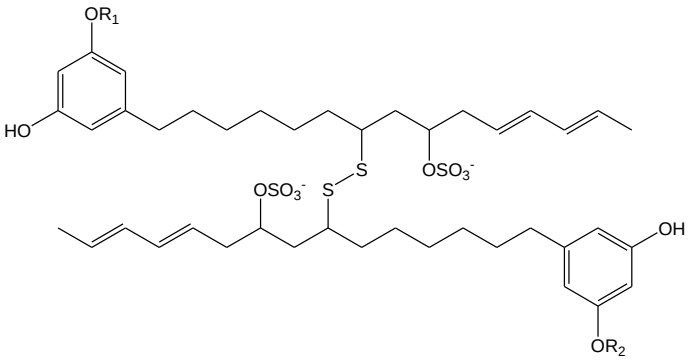


Figure 36 : *Bryostatine 1(**B1**) isolée à partir de* Bugula neritina *[98]*

Plusieurs espèces appartenant aux genres *Adeonella*, *Celleporina*, *Dentiporella*, *Myriapora*, *Omalosecosa*, *Pentapora*, *Reteporella*, *Smittina* et *Turbicellepora* ont été étudiées dans le cadre du programme ECIMAR. La plupart des bryozoaires appartenant à ces genres sont présents à Port-Cros où ils ont d'ailleurs subi une mortalité significative lors de l'épisode caniculaire de l'été 2009 [99]. D'un point de vue bibliographique, peu de métabolites ont été décrits à partir des bryozoaires appartenant à ces genres. En particulier, trois composés soufrés, les pentaporines A, B et C (**B2-B4**, cf Figure 37), ont été isolés de *Pentapora fascialis* [100].



B2 : $R_1=R_2=H$

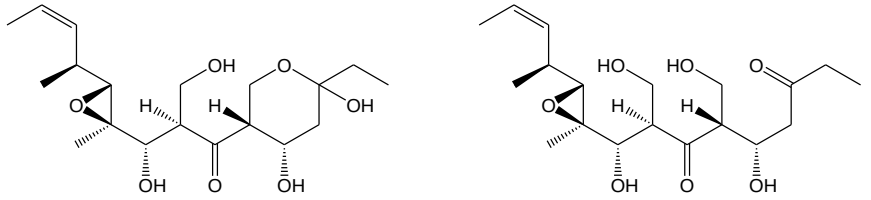
B3 : $R_1=SO_3^-$; $R_2=H$

B4 : $R_1=R_2=SO_3^-$

Figure 37 : *Pentaporines A (**B2**), B (**B3**) et C (**B4**) isolées à partir de* Pentapora fascialis

Par ailleurs, trois stérols [101] et quatre dérivés oxygénés, les myriaporones 1-4 [102], ont été purifiés à partir de *Myriapora truncata*. Les myriaporones 3 et 4 (**B5** et **B6**, cf Figure 38) présentent des activités cytotoxiques importantes envers des cellules leucémiques murines L1210 [102].

B5



B6

Figure 38 : *Myriaporones 3 (**B5**) et 4 (**B6**) isolées à partir de* Myriapora truncata

Les organismes marins étudiés dans le cadre de ces travaux sont donc des sources privilégiées pour la recherche de métabolites secondaires, et notamment de dérivés terpéniques : sesquiterpènes dans *Caulerpa taxifolia*, diterpènes cycliques pour les algues brunes du genre *Dictyota* et méroditerpènes pour *Cystoseira foeniculacea*.

III. Biofouling et antifouling

L'appellation biofouling, littéralement salissure biologique, représente l'ensemble du processus de colonisation de toute surface immergée – vivante ou inerte – par des organismes vivants. Plusieurs types de biofouling peuvent être distingués en fonction du stade d'avancement de la colonisation :

- ✓ Le microfouling, ou fouling primaire, au sein duquel les organismes impliqués dans la colonisation sont des micro-organismes tels que des bactéries, des champignons, des diatomées, des microalgues ou des larves d'invertébrés.
- ✓ Le macrofouling, ou fouling secondaire, s'établit généralement dans un second temps après le microfouling. Cette étape correspond à la colonisation par des macro-organismes (macroalgues, invertébrés, etc).

Le terme "antifouling" qualifie tout ce qui se rapporte à la lutte contre le biofouling. L'antifouling peut représenter soit un phénomène naturel de défense entrant en jeu dans la compétition entre les différents organismes marins, soit les moyens mis en œuvre par l'Homme pour empêcher l'établissement du biofouling sur toutes sortes d'aménagements anthropiques.

III.1. Le fouling en milieu marin

Contrairement au milieu dulcicole où il constitue un phénomène secondaire, le biofouling est très important en milieu marin en raison notamment de la richesse et de la diversité en bactéries, en phytoplancton et en zooplancton. La colonisation se produit invariablement sur toute surface immergée qui n'est pas protégée, d'une manière ou d'une autre, par un revêtement antifouling.

III.1.1. Mécanisme d'action (biofilm)

Le mécanisme d'adhésion des salissures marines est décrit comme une succession d'évènements indépendants, chaque étape n'étant pas indispensable à l'autre [103]. Dans un premier temps, l'adsorption rapide de fragments organiques sur une surface vierge constitue un film conditionnant (ou film primaire). Puis des bactéries et des microalgues viennent coloniser cette surface plus ou moins conditionnée et se développent jusqu'à former une structure tridimensionnelle appelée biofilm. Enfin, les macroorganismes peuvent venir adhérer à ce substrat (cf Schéma 6).

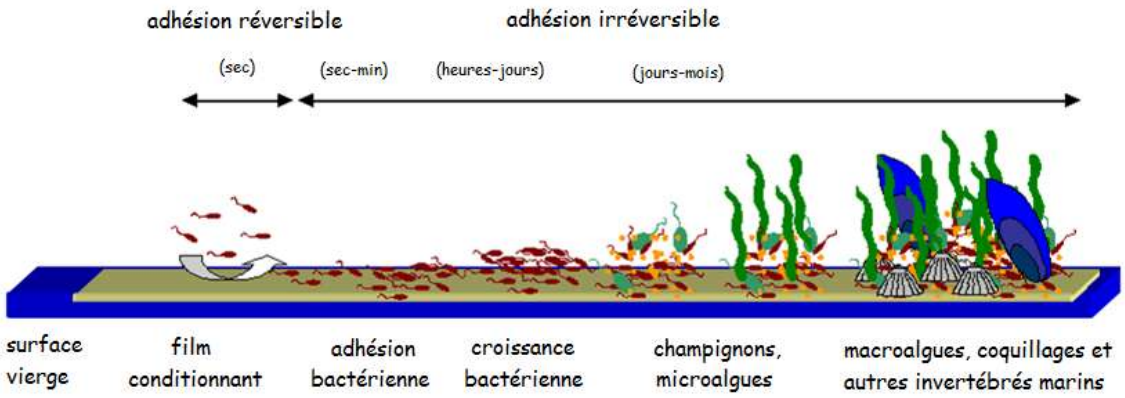


Schéma 6 : *Schéma de formation du biofouling en milieu marin [104]*

Le processus de formation du biofilm bactérien, et plus particulièrement celui d'adhésion au substrat, a retenu notre attention. En effet, si les bactéries sous forme planctonique peuvent évoluer librement dans le milieu, c'est sous forme sessile, organisées en biofilms qu'elles se développent le mieux. Le biofilm bactérien représente ainsi une étape prépondérante du processus de colonisation des surfaces immergées.

III.1.2. Impact du biofouling en milieu naturel

Le biofouling constitue un aspect primordial de la compétition entre les organismes marins. Les végétaux et animaux sessiles, qui doivent trouver un substrat pour se développer, s'établissent soit sur le fond, soit sur d'autres organismes : dans ce cas, ils sont appelés épiphytes (pour les végétaux) ou épibiontes (pour les animaux). Les organismes colonisés sont alors amenés à se défendre afin de maintenir un accès suffisant à la lumière et aux nutriments, nécessaires à leur survie. Par ailleurs, cette colonisation peut également provoquer une augmentation de la trainée de l'organisme sessile touché par ce phénomène, ayant pour conséquence un risque d'arrachage lié aux courants marins.

III.2. Conséquences sur les activités humaines

Le biofouling s'établissant sur toutes les surfaces immergées non protégées, qu'elles soient vivantes ou inertes, tout ouvrage humain placé dans le milieu marin pendant un temps suffisamment long subit inévitablement ce phénomène.

III.2.1. Impact économique

Ce phénomène se produit notamment sur les coques des bateaux, les structures portuaires, les pipelines, les installations liées à l'aquaculture ou encore toutes sortes de matériels scientifiques immergés. Le biofouling s'établit également sur les membranes des usines de dessalement ou sur les systèmes de refroidissement dont il diminue, de fait, l'efficacité. Dans le cas des navires, le biofouling entraine une augmentation de la rugosité de la surface, et donc des forces de friction lors du déplacement dans l'eau, ainsi qu'une surcharge due à la biomasse. Ceci implique une réduction de la vitesse et donc un accroissement de la consommation en carburant. Les salissures marines peuvent plus généralement avoir des effets sur les matériaux eux-mêmes en altérant leurs propriétés originelles : c'est le cas de la corrosion qui est accélérée, on parle alors de biocorrosion. Les revêtements antifouling s'avèrent donc indispensables, mais leur renouvellement, ainsi que leur récupération, entraînent une augmentation drastique des coûts d'entretien des infrastructures immergées.

III.2.2. Impact écologique

La présence du biofouling sur les installations humaines présente également un impact écologique. En effet, outre les désagréments économiques inhérents à la présence de biofouling sur les coques de

bateaux, ces surfaces peuvent être le vecteur d'une dissémination des organismes à grande échelle, conduisant ainsi des espèces invasives à perturber profondément certains écosystèmes dont l'équilibre est fragile. D'autre part, les espèces présentant une résistance aux métaux – et notamment au cuivre, largement utilisé depuis l'interdiction des oxydes de tributylétain (TBTO) – peuvent alors être transportées et seront favorisées vis-à-vis des espèces natives lors de leur établissement dans des milieux pollués [105].

Le phénomène de biofouling a également été exploité dans un but plus positif. Par exemple, afin de lutter contre la disparition progressive de certains écosystèmes et la diminution de la biodiversité, des récifs artificiels, généralement composés de blocs de béton, ont été immergés un peu partout dans le monde, principalement sur des fonds sableux où la vie est moins riche que sur les fonds rocheux. Ces nouveaux substrats ont ensuite été colonisés permettant de recréer de nouveaux écosystèmes.

III.2.3. La prévention contre le fouling

Si la protection des ouvrages anthropiques contre le biofouling représente actuellement un enjeu capital, elle n'en a pas moins été une préoccupation constante depuis des millénaires pour tous les peuples vivant à proximité des mers et des océans.

a/ Historique

De l'antiquité à la moitié du XXème siècle

A partir du moment où les hommes ont utilisé des bateaux comme moyens de locomotion, ils ont ressenti le besoin de les protéger contre les salissures marines. Les premiers revêtements connus étaient constitués de cire, de goudron et d'asphalte. Vers 700 av. J.C., les Phéniciens et les Carthaginois semblent être les premiers à avoir utilisé du cuivre. Par la suite, de nombreux revêtements à base de bitume, de suif ou contenant toutes sortes de métaux (fer, arsenic, plomb, cuivre) ont été utilisés jusqu'au XVIIIème siècle. Les revêtements à base de cuivre ont alors été à nouveau utilisés jusqu'au milieu du XIXème siècle, date à laquelle les premières peintures à base de métaux (cuivre, arsenic ou oxydes mercuriques) dispersés dans un polymère (résine, vernis) sont apparues. Ces peintures composées d'un liant polymère associé à un biocide – en général métallique – vont être utilisées jusqu'à la moitié du XXème siècle. A cette époque, les progrès considérables réalisés en chimie des polymères ont permis l'apparition de trois grands types de peintures antifouling aux modes d'action différents. C'est également à ce moment que l'incorporation de dérivés organométalliques, tel que les oxydes de tributylétain (TBTO), s'est développée.

Depuis la moitié du XXème siècle

Les peintures à matrice soluble ont commencé à être commercialisées vers 1950 ; elles présentent une matrice polymère qui se dissout dans l'eau de mer au cours du temps, libérant ainsi les biocides – généralement un métal ou un oxyde de fer – de manière constante. Elles ont l'avantage de pouvoir être appliquées sur des surfaces lisses. L'inconvénient majeur de ce type de revêtement est la grande sensibilité de la matrice polymère à l'oxydation atmosphérique ; de plus il possède une durée d'action assez faible (entre 12 et 15 mois) et s'avère peu efficace en conditions stationnaires ou à faible vitesse.

Les peintures à matrice dure, apparues vers 1955, sont constituées de polymères ayant une masse moléculaire importante et insolubles dans l'eau. Le biocide, incorporé en quantité importante dans ces peintures, est relargué progressivement dans le milieu. Néanmoins, l'efficacité de cette peinture décroit au fil du temps car le biocide – qui peut être métallique ou organométallique - se trouve de plus en plus en profondeur dans la matrice. Ce type de peinture, dont l'efficacité est d'environ 2 ans, est adapté pour les bateaux se déplaçant à des vitesses importantes (pas de risque d'érosion) et restant immobiles pendant de longues périodes.

Enfin, les peintures autopolissantes sont utilisées depuis les années 1970. Elles sont composées de copolymères acryliques sur lesquels sont greffés les agents biocides – typiquement le TBTO. Le biocide est dans ce cas progressivement libéré par hydrolyse, puis le copolymère restant est dissout, laissant apparaître une nouvelle couche de copolymère greffé. L'érosion de ce type de peintures est lente et contrôlée, ce qui autorise une durée d'action d'environ 5 ans [106].

Cette efficacité, associée à un coût faible, a permis à ces peintures autopolissantes à base de TBTO de se répandre largement au cours de ces dernières décennies jusqu'à représenter près de 70% du marché des peintures antifouling [106].

b/ La lutte antifouling aujourd'hui

Cette utilisation à grande échelle des peintures à base de TBTO ne se fait pas sans poser des problèmes : en effet, les concentrations en TBTO dans le milieu marin, et à plus forte raison dans les zones portuaires, sont devenues importantes au point de devenir toxiques pour toutes sortes d'organismes marins. Dans ce contexte, l'organisation maritime internationale (*International Maritime Organization (IMO)*) a décidé d'interdire l'application de revêtements à base de TBTO à partir de 2003. En 2008, l'interdiction devient totale, aucun navire possédant un revêtement de ce type n'est autorisé à circuler. La recherche d'une alternative à ces peintures devient alors un enjeu majeur et plusieurs approches ont été abordées pour trouver de nouvelles solutions plus respectueuses de l'environnement [107].

Les peintures à base de métaux

Des peintures autopolissantes à base de zinc ou d'oxydes de cuivre sont actuellement utilisées mais elles sont nettement moins efficaces que celles formulées avec du TBTO. Pour cette raison, l'emploi de co-biocides organiques s'est développé et les revêtements ainsi élaborés atteignent des durées de vie d'environ trois ans, contre cinq ans pour les précédents revêtements à base de TBTO. Néanmoins, les concentrations en métaux et en co-biocides doivent être assez importantes pour se rapprocher de l'efficacité des peintures à base de TBTO, ce qui entraîne de réelles inquiétudes concernant l'impact environnemental de telles substances. Ce type de revêtement ne peut donc constituer qu'une solution transitoire en attendant de trouver une réelle alternative non-toxique.

L'approche répulsive

L'objectif de cette nouvelle approche est d'éviter que les organismes viennent se fixer sur la coque, ou tout du moins de favoriser leur détachement quand le bateau circule à une vitesse donnée. Il s'agit pour cela de minimiser l'énergie de surface du revêtement. Deux technologies permettent actuellement d'obtenir une telle caractéristique : les polymères à base de silicone et les polymères fluorés. Les polymères à base de silicone possèdent un caractère hydrophobe marqué tandis que l'électronégativité du fluor, impliquant une forte polarisation des liaisons C-F, et sa très faible polarisabilité confèrent aux chaînes perfluorées des propriétés à la fois hydrophobes et « oléophobes ». Ce type de technologie, dépourvue de tout agent biocide, présente un large spectre d'action. Néanmoins elle a le désavantage d'être inefficace en régime stationnaire : des organismes peuvent alors coloniser la coque avant d'être vectorisés dans d'autres écosystèmes, favorisant ainsi l'apparition d'espèces invasives.

L'approche biomimétique

Une troisième alternative possible aux peintures autopolissantes à base de TBTO serait l'utilisation d'une approche dite biomimétique. L'objectif d'une telle méthode consiste à s'inspirer des moyens de défense utilisés par les organismes marins, en particulier les organismes sessiles, qui apparaissent peu colonisés, et de tenter de les reproduire. Deux principaux types de mécanismes de défense peuvent être observés :

- La défense chimique : de nombreux organismes benthiques produisent des métabolites secondaires ayant pour but de repousser les organismes épiphytes, ou du moins de réguler leur colonisation.

- La défense physique : en plus des techniques de défense basées sur la présence d'épines, il a été démontré que la microtopographie de la surface présentait une importance considérable dans la lutte de ces organismes contre les espèces colonisatrices.

Les limites de cette approche résident dans l'application pratique de ces solutions que ce soit pour la défense chimique ou physique. En effet, il semble relativement difficile de trouver une molécule naturelle présentant (i) une activité antifouling à large spectre, (ii) une faible toxicité vis-à-vis des organismes non-ciblés et (iii) une structure chimique simple en vue de sa production à grande échelle. De même, repousser de nombreux organismes de taille et de mode de colonisation différents à l'aide d'une microarchitecture de surface donnée n'est pas un objectif aisé.

Le revêtement antifouling idéal – qui serait à la fois efficace, peu coûteux, à longue durée de vie et non toxique – pour préserver du biofouling toutes les surfaces immergées résidera certainement dans la combinaison de plusieurs de ces technologies.

III.3. Substances naturelles d'origine marine présentant des propriétés antifouling

III.3.1. Molécules actives en antifouling

Les organismes marins représentent un important réservoir de molécules actives pouvant avoir des propriétés diverses. Certains de ces composés peuvent être métabolisés dans un but de défense de l'individu contre les organismes avec qui il peut entrer en compétition. De ce fait, les propriétés antifouling de nombreux composés, fractions et extraits issus d'organismes marins ont été étudiées. L'inventaire des composés purs actifs en antifouling et isolés à partir d'algues (brunes, vertes et rouges) ou de bryozoaires est présenté dans les Tableaux 1 et 2. Les tests antifouling réalisés sur ces molécules portent sur différents organismes cibles – bactéries, micro- et macroalgues, invertébrés (balanes, moules, bryozoaires, etc) – représentant un large panel des espèces impliquées dans le processus de biofouling en milieu marin. Les composés répertoriés ici pour leur activité antifouling témoignent d'une grande diversité chimique : ce sont des terpènes (sesquiterpènes, diterpènes, méroditerpènes), des composés aromatiques, des dérivés lipidiques, des composés halogénés, des oses ou des alcaloïdes.

	Organisme	Composé	Cible	Activité testée	Référence
Algues brunes	*Dictyota menstrualis* *Dictyota ciliolata* *Dictyota menstrualis* et *Dictyota ciliolata*	dictyol E acétate de dictyol B pachydictyol A dictyodial	*Bugula neritina*, *Amathia convoluta* et *Eudendrium carneum* (invertébrés)	Taux de survie, croissance et développement des larves	[108]
	Dictyota pfaffii	(1*R**, 2*E*, 4*R**, 6*E*, 8*S**, 10*S**, 11*S**, 12*R**) 10, 18-diacétoxy-8-hydroxy-2,6-dolabelladiène	*Perna perna* (moule brune)	Adhésion des moules	[109]
	Halidrys siliquosa	méroditerpenoïdes (chaîne acyclique)	*Balanus amphitrite* Bactérie marine	Anti-adhésion Inhibition de croissance	[110]
	Stypopodium zonale	épitaondiol (méroditerpène cyclique)	*Perna perna* (moule brune)	Adhésion des moules	[111]
	Dilophus okamurai	spata-13,17-dién-10-ol (spatane) (13*Z*)-spata-13(15),17-dién-10-ol (spatane)	*Haliotis discus hannai* (abalone)	Inhibition de la métamorphose Anti-adhésion	[112]
	Bifurcaria bifurcata	eléganolone éléganediol	*Balanus amphitrite*	Anti-adhésion	[2] [113]
	Ishige okamurae	acide *L*-pyroglutamique (PGA) phthalate de di-*n*-octyle (DNOP) citrate de triéthyle (TEC)	*Mytilus edulis* *Ulva prolifera*	Attachement du pied Inhibition de l'adhésion des spores	[114]
	Sargassum confusum	phtalate de dibutyle phtalate de dioctyle phtalate de diisononyle phtalate de dicyclohexyle hexadécane eicosane 1-eicosanol 1-pentadécanol	*Ulva pertusa*	Inhibition de l'adhésion des spores	[115]

Zonaria diesingiana	acylphloroglucinols	*Chaetoceros gracilis* (diatomée) Bactérie	Inhibition de croissance Inhibition de croissance	[116]
Undaria pinnatifida et *Costaria costata*	galactosyl- et sulfoquinovosyldiacylglycérols	*Mytilus edulis galloprovincialis* (moule bleue)	Stimulation du pied	[117]
Canistrocarpus cervicornis	(4*R*, 9*S*, 14*S*)-4α-acétoxy-9β,14α-dihydroxydolast-1(15),7-diène (dolastane) (4*R*, 7*R*, 14S)-4α,7α-diacétoxy-14-hydroxydolast-1(15),8-diène (dolastane) isolinéarol (séco-dolastane)	*Perna perna* (moule brune)	Inhibition de l'adhésion des moules	[118]
Cystoseira baccata	méroditerpenoïdes et derivés	*Exanthemachrysis gayraliae* *Sargassum muticum*, *Ulva intestinalis* (macroalgues) Phénoloxydase *Echinus esculentus* (oursins) et *Crassostrea gigas* (huitres)	Inhibition de croissance Inhibition de croissance Activité anti-invertébré Toxicité	[119]
Sargassum muticum	phtalate de dioctyle acide palmitique mélange d'acides gras	Rhodobacteraceae bacterium *Cylindritheca closterium* (diatomée) *Ulva latuca*	Inhibition de croissance Inhibition de croissance Inhibition de la germination des spores	[120]
Sargassum muticum	mélange d'hydrocarbures linéaires saturés et insaturés (C12-C17) acide arachidonique mélange d'acides gras (acides palmitique, linolénique et palmitoléique) mélanges de galactoglycérolipides	*Shewanella putrefaciens* et *Polaribacter irgensii* (bactérie) *Halosphaeriopsis mediosetigera*, *Asteromyces cruciatus*, *Lulworthia uniseptata* et *Monodictys pelagica* (champignons marins)	Inhibition de croissance Inhibition de croissance	[121]

Tableau 1 : *Composés issus de macroalgues brunes présentant des propriétés antifouling*

Algues vertes	*Caulerpa flexilis*	flexiline	Bactérie marine et champignon	Inhibition de croissance	[122]
	Caulerpa sp.	caulerpényne	*Hydroides elegans* (polychète) Bactérie marine et champignon *Balanus amphitrite*	Anti-adhésion Inhibition de croissance Anti-adhésion	[123] [122] [124]
Algues rouges	*Plocamium costatum*	1,10,10-tribromo-2,4,7-trichloro-3,7-diméthyl-1,5-octadiène 3,7,11,15-tétraméthylhexadec-1-én-3-ol	*Balanus amphitrite*	Anti-adhésion	[125]
	Laurencia rigida	élatol deschloroélatol	*Ulva lactuca* (algue verte) *Bugula neritina* (bryozoaire) Champignon, bactérie et algue *Balanus amphitrite*	Anti-adhésion Anti-adhésion Inhibition de croissance	[126] [127]
	Laurencia obtusa	5-β-hydroxyaplysistatine palisol	*Ulva lactuca* *Bugula neritina*	Anti-adhésion	[126]
	Delisea pulchra	furanones halogénées (fimbrolides)	Bactérie marine *Ulva lactuca* *Balanus amphitrite*	Inhibition de croissance Inhibition de l'adhésion et de la germination Anti-adhésion	[128]
	Bonnemaisonia hamifera	1,1,3,3-tétrabromo-2-heptanone	*Hyphomonas neptunicum*, *Planococcus* sp. et *Photobacterium angustum* (bactérie)	Inhibition de croissance	[129]
Bryozoaires	*Zoobotryon pellucidum*	2,5,6-tribromo-1-méthylgramine (TBG)	*Balanus amphitrite*	Anti-adhésion	[130]

Tableau 2 : *Composés issus de macroalgues, vertes et rouges, et de bryozoaires présentant des propriétés antifouling*

Par ailleurs, en ce qui concerne l'activité antifouling d'organismes d'intérêt dans le cadre de ce mémoire, un extrait brut de l'algue verte *Caulerpa prolifera*, à partir duquel des dérivés aliphatiques de la caulerpényne ont été isolés, a été étudié. Ce test a montré une inhibition de la croissance de la microalgue *Phaedactylum tricornutum*, appartenant à la classe des Bacillariophyceae, au bout de cinq jours à une concentration de 30 μg.mL^{-1} [34]. Enfin, un extrait brut de *Caulerpa taxifolia* a montré une activité anti-adhésion (CE_{50} = 0,1 μg.mL^{-1}) envers des larves de balane au bout de 72 h [2].

III.3.2. Molécules actives en antibiofilm

Dans le cadre de cette étude, notre intérêt s'est focalisé sur l'étape de formation du biofilm bactérien et de son adhésion au substrat. En effet, si les propriétés antifouling de nombreuses molécules, naturelles ou dérivées, ont été largement étudiées vis-à-vis de différents types de bactéries marines, l'action de ces mêmes métabolites secondaires à l'encontre de biofilms bactériens l'a été beaucoup moins. Les publications traitant de ce sujet sont pour la plupart très récentes, elles datent généralement de moins de cinq ans, et leur nombre tend à augmenter. Le Tableau 3 rassemble les données bibliographiques portant sur des molécules d'origines marines – ou des dérivés synthétiques de celles-ci – dont l'activité sur différents biofilms marins a été étudiée.

Organisme	Composé	Cible	Activité testée	Référence
Zostera sp. (plante aquatique)	acide zostérique[a]	*Pseudomonas putida* bactérie du lac Erié	Anti-adhésion	[131-133]
Agelas sp. (éponge)	dérivés de l'oroïdine[a]	*Pseudomonas aeruginosa*	Inhibition de la formation du biofilm	[134-136]
Agelas sp.	dérivés de l'oroïdine[a]	*Pseudomonas aeruginosa* *Acinetobacter baumannii*	Anti-biofilm	[137-138]
Agelas sp.	dérivés de l'oroïdine[a]	*Acinetobacter baumannii*	Anti-biofilm	[139]
Erylus formosus et *Ectyoplasia ferox* (éponges)	triterpènes glycosylés	bactérie marine	Anti-adhésion	[140]
Delisea pulchra (algue rouge)	furanones halogénées	*Pseudomonas aeruginosa*	Inhibition du *quorum sensing**	[141]

[a] : Analogues de synthèse.

Tableau 3 : *Composés (et analogues synthétiques) issus d'organismes marins testés pour leur activité anti-biofilm*

Dans le cadre d'une démarche biomimétique pour la recherche de molécules actives en antifouling, et plus particulièrement lors des premiers stades de la colonisation, nous avons axé notre travail sur l'étude chimique de plusieurs espèces présentes dans les eaux du parc national de Port-Cros :

- l'algue verte *Caulerpa taxifolia* qui, sous l'eau, apparait propre et non épiphytée,
- l'algue brune *Dictyota* sp. qui, à l'inverse, épiphyte toutes sortes d'organismes,
- l'algue brune *Dictyota dichotoma*, très répandue en mer Méditerranée, est l'espèce type du genre *Dictyota* à partir de laquelle plusieurs composés actifs en antifouling ont précédemment été décrits [108-109, 112],
- l'algue brune *Cystoseira foeniculacea* appartenant à la famille des Sargassacées. Cette famille renferme un grand nombre d'espèces riches en dérivés diterpéniques : certains ont été évalués pour leurs propriétés antifouling et présentent des activités marquées [2, 113, 115, 119, 121, 142],
- des bryozoaires de grande taille qui sont généralement peu colonisés.

Partie B : Isolement et caractérisation structurale de métabolites issus d'algues marines

Les extraits bruts de plusieurs algues méditerranéennes, *Caulerpa taxifolia*, *Dictyota* sp., *Dictyota dichotoma* et *Cystoseira foeniculacea*, ont été soumis à différentes purifications en vue de l'isolement de métabolites. Les structures chimiques des molécules isolées seront déterminées à l'aide de différentes techniques spectrales (RMN 1D et 2D, SM, IR-TF, UV-Visible, etc) et une attention toute particulière sera portée à l'étude stéréochimique de ces composés.

D'autre part, la composition chimique de plusieurs échantillons de bryozoaires a été étudiée par le biais de l'analyse chromatographique de leurs extraits lipidiques.

I. A partir de Caulerpa taxifolia

I.1. Obtention des métabolites secondaires

I.1.1. Récolte et extraction

Plusieurs échantillons de *Caulerpa taxifolia* ont été récoltés en juillet 2007 sur la commune d'Hyères-les-Palmiers (La Capte, 43°4'29" N, 6°9'92" E) à une profondeur d'environ 4 mètres. Les algues fraîches ont été extraites trois fois avec de l'éthanol, puis les extraits bruts ont été rassemblés et concentrés. A l'issue de cette étape, un partage a été réalisé par addition d'éther diéthylique : il a conduit à l'obtention de deux extraits, l'un aqueux (4,1 g) et l'autre organique (4,2 g). Les algues ainsi extraites ont ensuite été séchées à l'air libre : à la fin de cette étape, 41,2 g de matériel sec sont obtenus. Le rendement d'extraction pour la partie organique est donc de 8,5% par rapport à la masse d'algue sèche.

I.1.2. Fractionnement et purification

La totalité de l'extrait organique ainsi obtenu a ensuite été soumis à un premier fractionnement par le biais d'une colonne chromatographique ouverte sur gel de silice (Si60). Un gradient de solvant de

polarité croissante (de hexane/AcOEt (9/1 ; v/v) à 100% AcOEt, puis 100% MeOH) a été utilisé. La fraction 6, éluée avec un mélange hexane/AcOEt (3/2 ; v/v), a été soumise à une seconde purification par HPLC en phase inverse. Un gradient de polarité décroissante a été appliqué pour séparer les différents métabolites. L'élution débute avec un éluant composé de MeCN/H_2O (2/3 ; v/v), puis en 10 min, la composition passe à 40% MeCN (rampe linéaire). La composition passe ensuite à 100% MeCN en 20 min (rampe linéaire), cet éluant est conservé jusqu'à un temps total d'analyse de 40 min.

Les composés **Ct1** (t_R = 25,7 min), **Ct2** (t_R = 24,2 min) et **Ct3** (t_R = 18,7 min) ont été obtenus après des purifications successives, sur colonne semi-préparative, réalisées à partir de cette fraction (cf Figure 39).

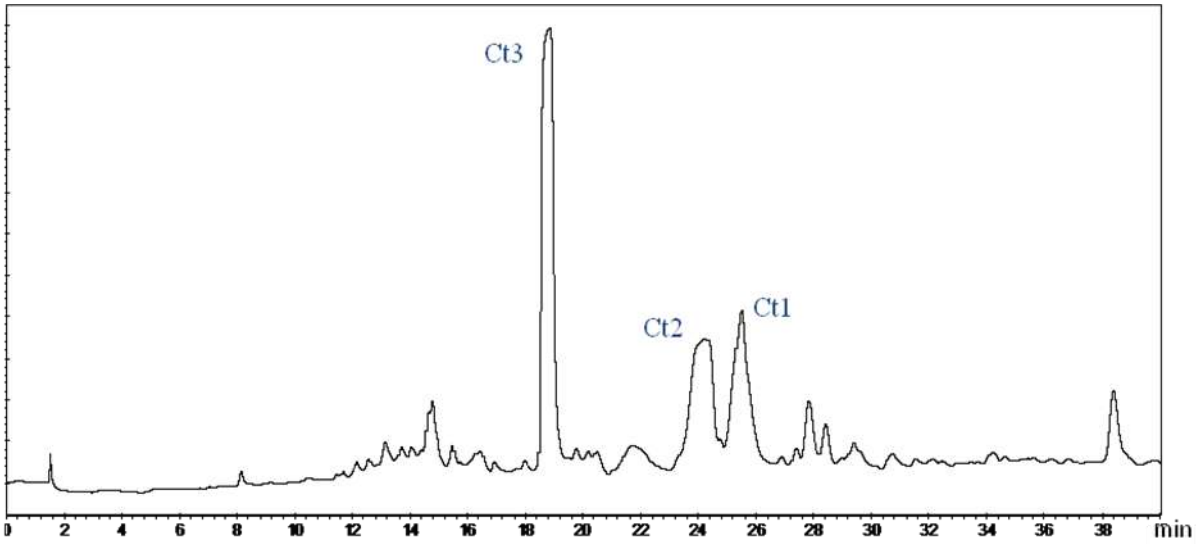


Figure 39 : *Chromatogramme UV (210 nm) de la fraction 6 de* C. taxifolia *(colonne RP18e)*

Par ailleurs, la fraction 12, éluée avec un mélange hexane/AcOEt (2/3 ; v/v), a été soumise à une seconde purification par HPLC en phase inverse en mode isocratique (MeCN/H_2O ; 17/3 ; v/v). Le composé **Ct4** (1,8 mg) a été obtenu à partir de cette fraction. Parallèlement, les données RMN du clionastérol (**Ct5**), isolé précédemment au laboratoire à partir d'autres extraits de *C. taxifolia*, ont été vérifiées.

I.2. Caractérisation structurale des composés

Après la purification vient l'étape de l'élucidation structurale des différents métabolites précédemment isolés. Dans le cadre d'une telle étude, plusieurs techniques d'analyse ont été utilisées. La résonance magnétique nucléaire (RMN), basée sur les propriétés magnétiques de certains noyaux, permet dans

notre cas d'obtenir des informations sur l'environnement et l'enchainement des différents atomes d'hydrogène et de carbone au sein de la structure chimique étudiée. Elle constitue de fait un outil indispensable pour la caractérisation structurale des métabolites isolés, néanmoins des techniques complémentaires sont également d'une grande utilité dans la réalisation d'un tel objectif. En particulier, la spectrométrie de masse (SM) permet de déterminer *via* l'étude du pic moléculaire, la masse molaire d'une molécule et de mettre en évidence ses caractéristiques structurales par l'analyse de sa fragmentation. Le développement de spectromètres à hautre résolution (SM-HR) conduit même à l'obtention directe de la formule brute de l'analyte. Enfin, différentes techniques d'analyse spectrale telles que la polarimétrie, le dichroïsme circulaire, ou les spectroscopies ultra-violette (UV) et infrarouge (IR) permettent de confirmer la structure et d'obtenir des données spectrales caractéristiques du composé isolé.

*I.2.1. Analyse structurale du composé **Ct1***

Le composé **Ct1** a été isolé sous forme d'une huile incolore et présente une bande d'absorption à 231 nm sur son spectre UV-Visible. Ce dernier a été obtenu par le biais d'une analyse chromatographique couplée à un détecteur UV à barrettes de diode (DAD). L'analyse de **Ct1** par spectrométrie de masse (ESI/MS) conduit à l'observation d'un ion adduit $[M+H]^+$ à *m/z* 279 en accord avec une masse molaire de 278 $g.mol^{-1}$. L'étude du spectre RMN du ^1H du composé **Ct1** est très riche en informations car il présente les différents signaux caractéristiques d'un acide gras polyinsaturé (cf Figure 40) :

- Les signaux A (δ_H 5,36 ppm, m) sont typiques de protons éthyléniques.
- Les signaux B (δ_H 2,81 ppm, m) sont ceux de groupements méthylènes en α de deux doubles liaisons
- Le signal C (δ_H 2,35 ppm, t, 7,5 Hz) correspond à un groupement méthylène en α d'une fonction acide carboxylique.
- Les signaux D (δ_H 2,06 ppm, m) représentent des groupements méthylènes en α d'une double liaison.
- Le signal E (δ_H 1,63 ppm, m) correspond à un groupement méthylène en β de la fonction acide carboxylique.
- Les signaux F (δ_H 1,32 ppm, m) sont ceux de groupements méthylènes éloignés de toute fonctionnalité.

- Le signal G (δ_H 0,97 ppm, t, 7,5 Hz) est caractéristique d'un groupement méthyle terminal.

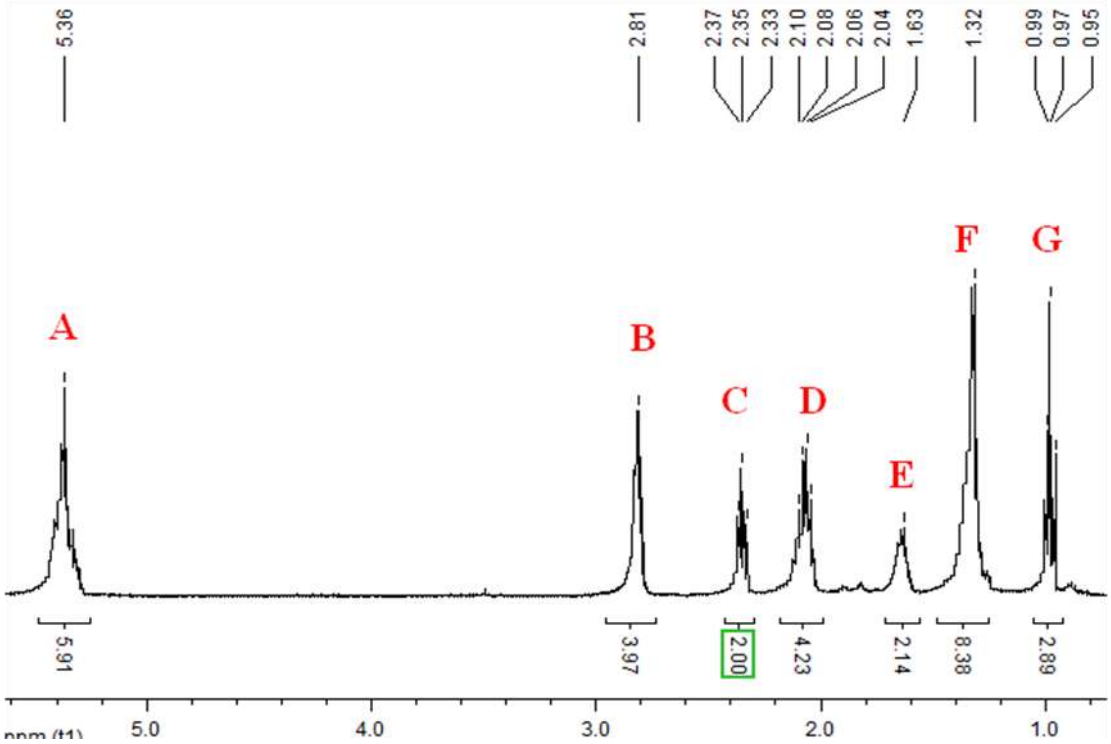


Figure 40 : *Spectre RMN ^{1}H du composé **Ct1***

Des expériences complémentaires réalisées en RMN (^{13}C et expériences bidimensionnelles) ont ensuite permis d'identifier formellement l'acide gras purifié (l'ensemble des spectres RMN et le tableau rassemblant les données RMN de **Ct1** sont consignés dans l'Annexe A). En plus du signal dû au carbonyle, le spectre RMN ^{13}C de **Ct1** présente dix-sept signaux qui correspondent à huit méthines oléfiniques, huit méthylènes hybridés sp^3 et un carbone méthylique. A l'aide de l'intégration des signaux en RMN ^{1}H et connaissant la masse molaire de **Ct1**, la formule brute de ce composé a été déterminée comme étant $C_{18}H_{30}O_2$. Cet acide gras présente quatre insaturations dont trois sont dues à des doubles liaisons oléfiniques. Une étude plus approfondie des différents spectres RMN a permis de localiser une de ces doubles liaisons en β de l'extrémité de la chaîne carbonée (position $\Delta^{15,16}$) grâce aux corrélations HMBC entre H_3-18/C-17, H_3-18/C-16 et H_2-17/C-15. L'identification de deux groupements méthylènes (en C-14 et C-11) en α de deux doubles liaisons permet le positionnement des deux autres doubles liaisons en C-9 et C-12 : ceci est confirmé par les couplages observés sur le spectre HMBC. Le composé **Ct1** est ainsi finalement identifié comme étant l'acide *Z,Z,Z*-octadéca-9,12,15-triénoïque (cf Figure 41).

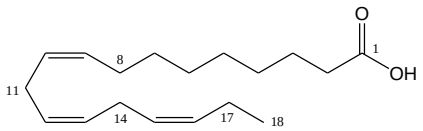


Figure 41 : *Structure du composé* ***Ct1***

Cet acide gras est également connu sous le nom d'acide α-linolénique ou C18:3(n-3) ; il fait partie de la famille des oméga-3. L'acide α-linolénique est couramment rencontré dans les huiles végétales ainsi que dans les algues qui sont une source connue d'acides gras polyinsaturés. Il a d'ailleurs déjà été identifié à partir d'un échantillon de *C. taxifolia* [143].

I.2.2. Analyse structurale du composé ***Ct2***

Le composé **Ct2** est une huile incolore optiquement inactive purifiée à partir de la même fraction que **Ct1**. Son spectre UV-Visible, obtenu grâce au détecteur DAD, présente une bande d'absorption à 231 nm. Sa masse molaire de 302 g.mol^{-1} a été déterminée en spectrométrie de masse (ESI/MS) par l'observation d'un ion adduit $[M+H]^+$ à *m/z* 303. Le spectre RMN ^{1}H de **Ct2** présente de nombreuses similarités avec celui de **Ct1** : les seules différences observées correspondent à une augmentation de l'intensité des signaux dus à des méthylènes en α de deux doubles liaisons (signaux B, cf Figure 40) et à une diminution des signaux relatifs aux groupements méthylènes d'une chaîne aliphatique saturée (signaux F, cf Figure 40). Le spectre RMN ^{13}C de **Ct2** révèle la présence de 20 signaux dont la moitié correspond à des méthines oléfiniques ($127{,}0 < \delta_C < 132{,}1$ ppm). L'ensemble de ces données spectrales (cf Annexe A) indiquent que la structure chimique de **Ct2** correspond à celle d'un acide gras ayant deux atomes de carbone et deux doubles liaisons éthyléniques supplémentaires par rapport à **Ct1**. A l'image du composé **Ct1**, les données RMN de **Ct2** (cf Annexe A) montrent que ces doubles liaisons sont successivement séparées entre elles par un seul méthylène et que leur positionnement par rapport au groupement méthyle terminal est identique (en ω-3).

La comparaison des données de RMN ^{13}C de **Ct2** avec celles issues de la littérature [144] confirme bien que ce composé est l'acide *Z,Z,Z,Z,Z*-eicosa-5,8,11,14,17-penténoïque (cf Figure 42), appelé également C20:5(n-3). Cet acide gras polyinsaturé de la famille des oméga-3 a précédemment été détecté, en faible quantité, dans les extraits de *C. taxifolia* [143].

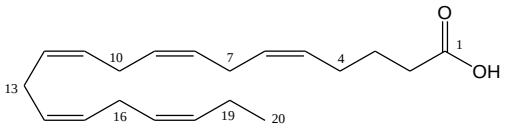


Figure 42 : *Structure du composé* ***Ct2***

*I.2.3. Analyse structurale du composé **Ct3***

A l'issue de sa purification, le composé **Ct3** est obtenu sous forme d'une huile jaune pâle. Son spectre UV-Visible présente trois maxima d'absorption à 255, 270 et 283 nm. Comme il s'agit du composé majoritaire de plusieurs fractions obtenues en quantités importantes (fractions qui représentent 10% de l'extrait brut total), **Ct3** constitue le métabolite majoritaire de l'extrait brut de *Caulerpa taxifolia*. L'étude des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C de **Ct3** montre la présence de vingt et un atomes de carbone dont six sont impliqués dans des groupements acétates (δ_C 170,0, 167,8, 167,1, 21,0, 20,7 et 20,7 ppm ; δ_H 2,07, 2,15 et 2,19 ppm). L'analyse de **Ct3** par spectrométrie de masse (ESI/MS) conduit à l'observation d'un ion adduit $[M+Na]^+$ à *m/z* 397 en accord avec une masse molaire de 374 $g.mol^{-1}$. De plus, une expérience de spectrométrie de masse couplée (MS/MS ou MS^2) donne un second adduit à *m/z* 337. La perte d'un fragment de masse molaire 60 $g.mol^{-1}$ est caractéristique de la présence d'un groupement acétate (perte de CH_3COOH). La structure chimique du composé **Ct3** correspond donc à celle d'un sesquiterpène triacétylé qui, après comparaison avec les données spectrales issues de la bibliographie, s'avère être la caulerpényne (cf Figure 43).

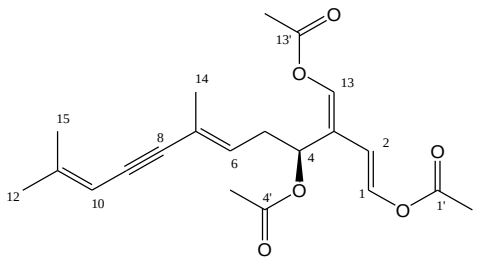


Figure 43 : *Structure du composé **Ct3***

La structure chimique de cette principale toxine de *C. taxifolia* est bien connue puisqu'elle a été isolée pour la première fois en 1978 à partir de *C. prolifera* [15]. Néanmoins, lors de son analyse spectrale deux erreurs d'attribution de signaux RMN ont été relevées par rapport aux données de référence [19]. En effet, l'observation sur le spectre HMBC d'une corrélation entre H-13 (δ_H 7,25 ppm) et le signal à δ_C 167,1 ppm (cf Figure 44) permet l'attribution de ce dernier à l'atome de carbone C-13' (et non pas C-1'). De la même manière, l'analyse de ce spectre a confirmé cette correction en permettant l'attribution à l'atome de carbone C-1' du signal à δ_C 167,8 ppm.

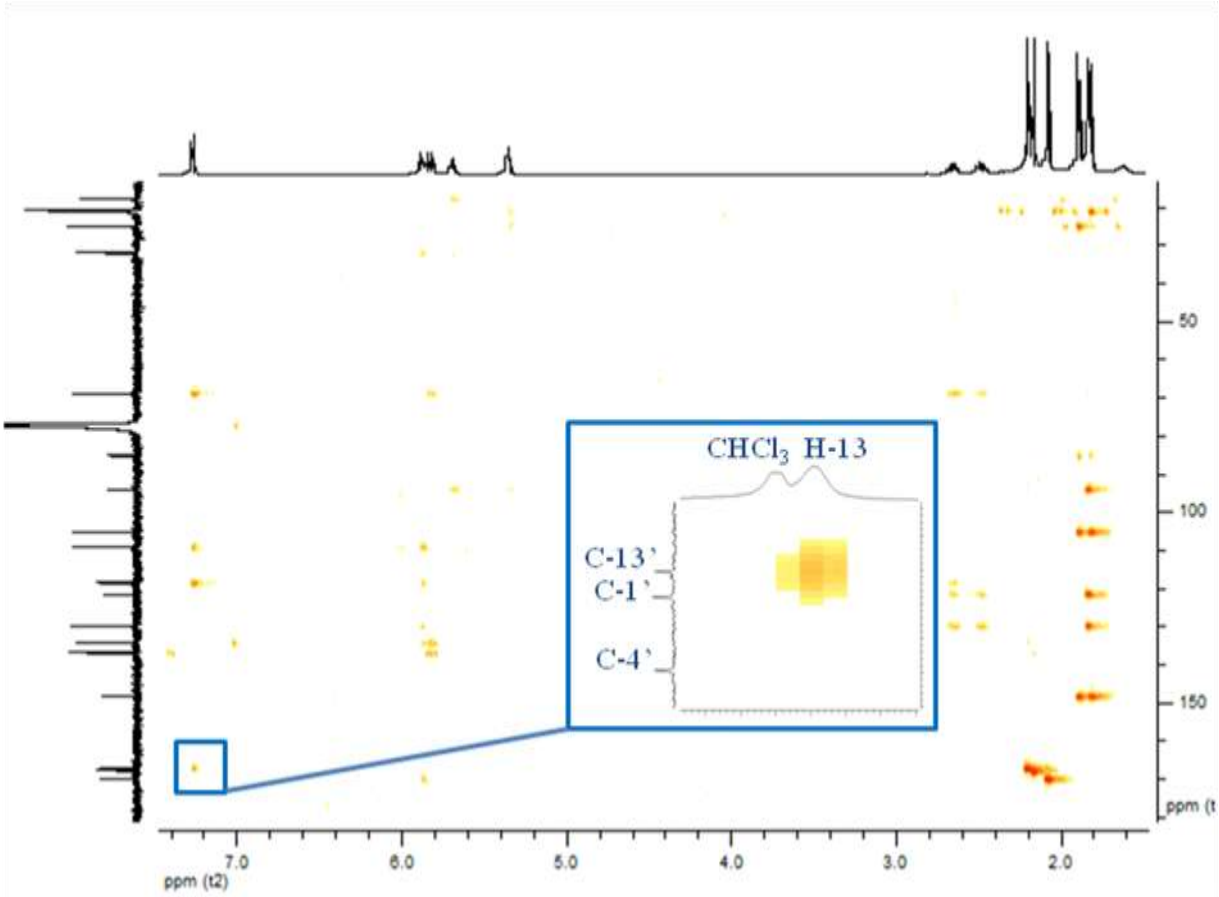


Figure 44 : *Spectre HMBC du composé* ***Ct3***

La caulerpényne a été identifiée dans de nombreuses espèces de caulerpes, provenant aussi bien de la mer Méditerranée que de l'hemisphère sud. En particulier, les principales espèces présentes en Méditerranée (*C. prolifera*, *C. racemosa* et *C. taxifolia*) contiennent toutes ce métabolite dans des proportions souvent supérieures aux quantités trouvées dans les espèces subtropicales [16].

I.2.4. Analyse structurale du composé ***Ct4***

a/ Identification

Le composé **Ct4** correspond à une molécule optiquement active ($[\alpha]_D^{25}$ = -30°) isolée sous l'apparence d'une huile incolore. Son spectre RMN ^{1}H montre la présence d'une majorité de signaux blindés présentant des déplacements chimiques inférieurs à 2,20 ppm. Parmi ceux-ci, sur la base de l'étude de l'intégration du spectre, huit signaux (δ_H 0,85, 0,87, 1,16, 1,21, 1,23, 2,11, 2,11 et 2,16 ppm) semblent être dus à des groupements méthyles. Parallèlement, différentes expériences de RMN monodimensionnelle (^{13}C, et expériences DEPT 45, 90 et 135) confirment cette hypothèse tout en mettant en évidence la présence d'un total de vingt neuf atomes de carbone dans la structure chimique

de **Ct4**. En sus des huit signaux afférents aux méthyles, ces spectres montrent les signaux caractéristiques de six atomes de carbone quaternaires hybridés sp^2 (δ_C 117,3, 118,6, 121,1, 122,6, 144,5 et 145,6 ppm) et de trois atomes de carbones sp^3 liés à un groupement oxygéné (δ_C 73,2 (CH), 74,5 (CH) et 79,5 (C) ppm). L'étude des corrélations visibles sur le spectre HMBC de **Ct4** indiquent que trois des groupements méthyles (δ_H 2,11, 2,11 et 2,16 ppm) sont portés par des atomes de carbone hybridés sp^2 : leur déblindage en RMN ^{1}H impliquent que ces groupements ne soient pas portés par des doubles liaisons isolées mais plutôt par un cycle aromatique totalement substitué. Par ailleurs, du fait du déblindage de leurs signaux en RMN ^{13}C, deux atomes de carbone de ce cycle aromatique sont certainement substitués par des atomes d'oxygène (δ_C 144,5 (C-3') et 145,6 (C-6') ppm). Le premier de ces deux atomes (C-3') porte une fonction phénol car il présente une corrélation HMBC avec le signal singulet à δ_H 4,26 ppm : en effet, comme ce signal ne montre aucun couplage sur le spectre HSQC, le proton correspondant est donc obligatoirement porté par un atome d'oxygène.

Par ailleurs, les différents couplages visibles sur les spectres HMBC et COSY ^{1}H-^{1}H (cf Tableau 4 et Figure 45) impliquent que le deuxième atome d'oxygène porté par le cycle aromatique soit impliqué dans un second cycle caractérisant ainsi la présence d'une partie chromanique dans la structure chimique de **Ct4**. Les autres signaux RMN sont caractéristiques d'une chaîne aliphatique de type « phytol » portant deux fonctions oxygénées vicinales à son extrémité (δ_C 79,2 (C-14) et 73,2 (C-15) ppm).

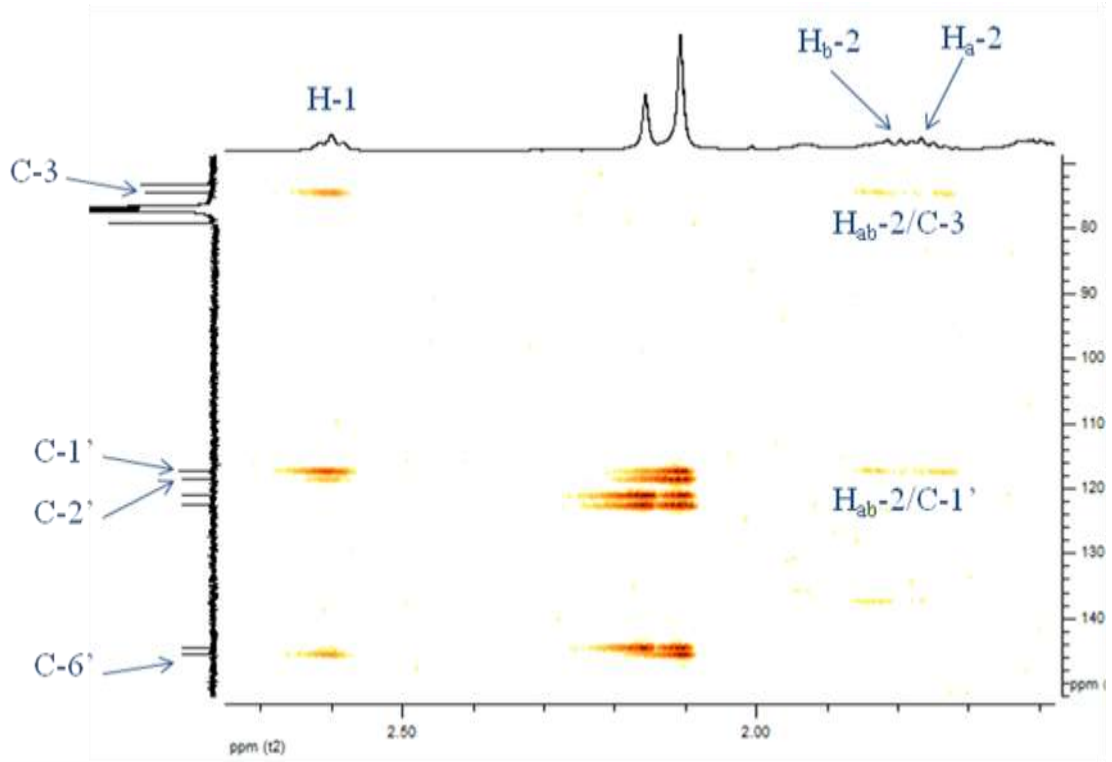


Figure 45 : *Détail du spectre HMBC du composé **Ct4***

Dès lors, la structure plane de **Ct4** a été caractérisée (cf Figure 46) et les données RMN (^{1}H et ^{13}C) de ce composé ont été comparées avec celles issues de la littérature [145-146]. Les données spectrales de **Ct4** s'avèrent proches de celles de l'α-tocophérol, qui correspond à l'une des huit formes connues de la vitamine E. Les différences entre ces deux composés portent uniquement sur la présence de fonctions oxygénées à l'extrémité de la chaîne linéaire de **Ct4**.

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélation HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H
1	20,8	CH_2	2,60 t (7,0)	C2, C3, C1', C6', C2'	H2, H4", H2"
2	31,6	CH_2	a : 1,76 m b : 1,81 m	C1, C20, C3 C1, C20, C3	H2b, H1, (H20) H2a, H1, (H20)
3	74,5	C			
4	39,7	CH_2	1,52 m		
5	21,0	CH_2	1,38 m		
6	37,3 [a]	CH_2	a : 1,07 m b : 1,27 m		H6b H6a
7	32,6	CH	1,39 m		H19
8	37,4 [a]	CH_2	a : 1,07 m b : 1,27 m		H8b H8a
9	24,4	CH_2	1,28 m		
10	37,2	CH_2	a : 1,07 m b : 1,27 m		H10b H10a
11	33,0	CH	1,39 m		H18
12	34,2	CH_2	a : 1,13 m b : 1,60 m		H12b H12a, H13b
13	29,3	CH_2	a : 1,25 m b : 1,50 m	C12	H13b, H14 H13a, H14, H12b
14	79,2	CH	3,32 d (10,0)		H13a, H13b, H17
15	73,2	C			
16	23,2	CH_3	1,16 s	C17	H17
17	26,6	CH_3	1,21 s	C16	H16, H14
18	19,8	CH_3	0,87 d (6,5)	C10, C11, C12	H11
19	19,7	CH_3	0,85 d (6,5)	C6, C7, C8	H7
20	23,9	CH_3	1,23 s	C2, C4, C3	(H2a, H2b)
1'	117,3	C			
2'	118,6	C			
3'	144,5	C			
4'	121,1	C			
5'	122,6	C			
6'	145,6	C			
2"	11,3	CH_3	2,11 s	C1', C2', C3'	H1
4"	12,2	CH_3	2,16 s	C3', C4', C5', C2', C1'	H1
5"	11,8	CH_3	2,11 s	C4', C5', C6'	H1
OH			4,26 s	C3'	

[a] : ces deux signaux peuvent être échangés

Tableau 4 : *Données RMN (1D et 2D) du composé **Ct4***

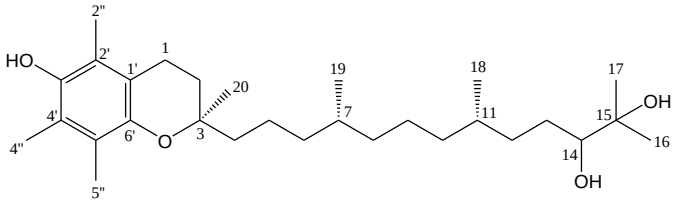


Figure 46 : *Structure du composé **Ct4***

Le composé **Ct4** a donc été identifié comme étant le 14,15-dihydroxy-*α*-tocophérol. Les configurations absolues des atomes de carbone C-3, C-7 et C-11 ont été attribuées sur la base de considérations biosynthétiques en accord avec les données bibliographiques portant sur l' *α*-tocophérol [145]. Par contre, la configuration de l'atome de carbone C-14 n'a pu être obtenue (méthode de Mosher modifiée) en raison des faibles quantités de produit isolé et de l'instabilité d'un tel composé. En définitive, le métabolite **Ct4** est une molécule originale dont la structure chimique n'a jamais été répertoriée dans la littérature.

b/ Discussion avec les données bibliographiques

L'*α*-tocophérol est un métabolite très répandu chez les organismes vivants et il est connu pour présenter d'excellentes propriétés antioxydantes et antiradicalaires. Contrairement aux constituants de la vitamine E que sont les différents tocophérols et tocotriénols, le composé **Ct4** présente une chaîne latérale oxygénée qui constitue une caractéristique structurale rare dans cette famille de molécules : un seul composé similaire a été décrit à partir du corail mou *Sinularia mayi* [147]. Généralement, les produits issus de l'oxydation de la vitamine E présentent préférentiellement des modifications au niveau du noyau chromane [148-149]. Dans le cas de **Ct4**, l'augmentation de l'hydrophilie de la chaîne latérale pourrait induire des effets physiologiques originaux. D'un point de vue biosynthétique, **Ct4** pourrait être issu de l'oxydation de l'*α*-tocomonoénol (cf Schéma 7). Ce composé récemment découvert [150] est considéré comme un intermédiaire probable dans la voie biosynthétique réductrice conduisant de l'*α*-tocotriénol à l'*α*-tocophérol.

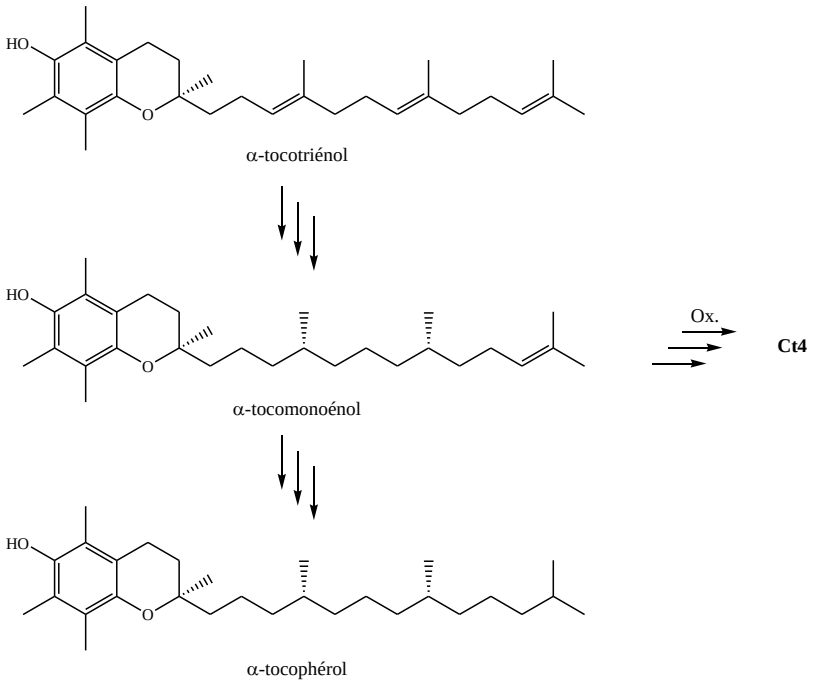


Schéma 7 : *Hypothèse de l'origine biosynthétique du composé **Ct4***

*I.2.5. Analyse structurale du composé **Ct5***

Le composé **Ct5** a été purifié précédemment au laboratoire à partir d'un autre extrait de *C. taxifolia* et a été identifié comme étant le clionastérol (cf Figure 47).

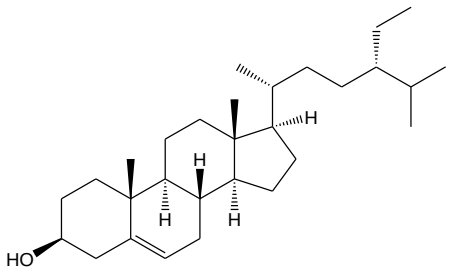


Figure 47 : *Structure du clionastérol*

Une étude RMN complète (RMN ^{1}H et ^{13}C, COSY ^{1}H-^{1}H, HSQC, HMBC) du composé **Ct5** a été réalisée. Les données RMN obtenues sont bien identiques à celles issues de la littérature [151].

II. A partir de Dictyota *sp.*

II.1. Obtention des métabolites secondaires

II.1.1. Récolte et extraction

L'algue brune *Dictyota* sp. a été récoltée en juillet 2007 dans la lagune du Brusc (43°4'28" N, 5°47'41" E) près de Six-Fours-les-plages (Var, France) à une profondeur d'environ 2 mètres. Lors de la récolte, cette algue représentait une biomasse importante sur ce site et épiphytait la majorité des organismes benthiques et des surfaces immergées. A l'issue de la récolte, l'algue a été séchée à température ambiante pendant 48 h pour donner 57 g de matériel sec, puis a été extraite par un mélange MeOH/$CHCl_3$ (1/1 ; v/v ; 3 × 250 mL). Après évaporation à sec du solvant, 5,9 g d'extrait brut sont obtenus.

II.1.2. Fractionnement et purification

La totalité de l'extrait brut a ensuite été soumise à un premier fractionnement réalisé par chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice (Si60). Un gradient de solvant de polarité croissante (de AcOEt/hexane (1/9 ; v/v) à 100% AcOEt puis passage à 100% MeOH) a été utilisé afin de réaliser ce fractionnement grossier. Certaines fractions ont été soumises à une série de purifications par HPLC en phase inverse (phase RP18e) en mode isocratique. Un détecteur réfractométrique a été utilisé pour toutes les expériences suivantes.

La fraction 5, éluée avec hexane/AcOEt (3/2 ; v/v), a été purifiée à l'aide d'un mélange MeCN/H_2O (4/1 ; v/v) pour conduire à trois composés purs : **Ds2** (1,6 mg), **Ds6** (62,0 mg) et **Ds7** (2,7 mg) (cf Figure 48).

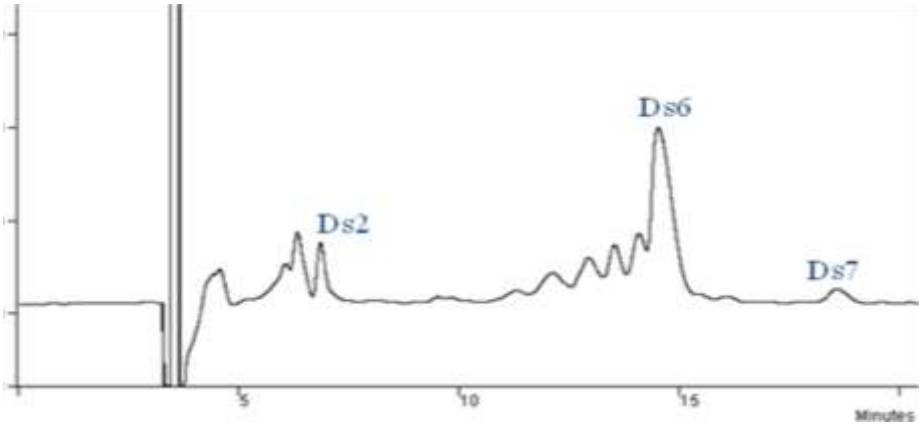


Figure 48 : *Chromatogramme de la fraction 5 de* Dictyota *sp.*

Deux métabolites, **Ds4** (2,2 mg) et **Ds8** (10,1 mg), ont été obtenus à partir de la fraction 6, également éluée avec un mélange hexane/AcOEt (3/2 ; v/v), après purification par HPLC avec un mélange MeCN/H_2O (9/1 ; v/v) (cf Figure 49).

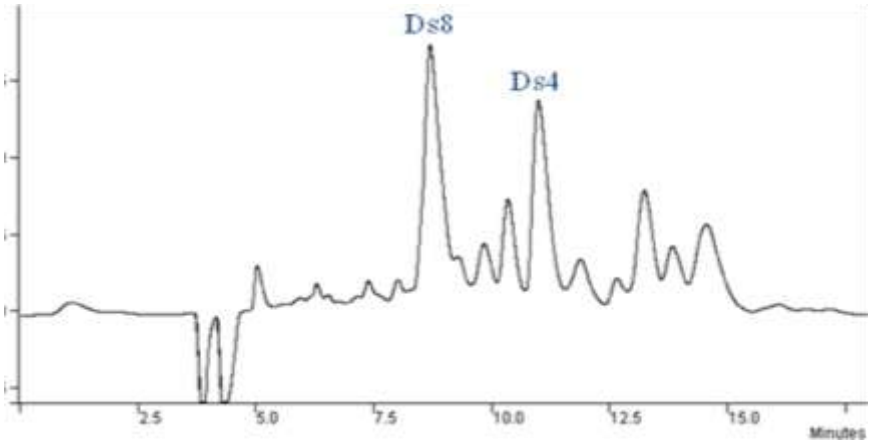


Figure 49 : *Chromatogramme de la fraction 6 de* Dictyota *sp.*

La fraction 7, éluée avec un mélange hexane/AcOEt (1/1 ; v/v), a été purifiée par HPLC à l'aide d'un mélange MeCN/H_2O (9/1 ; v/v) (cf Figure 50). A l'issue de cette étape de purification, deux composés purs, **Ds9** (25,0 mg) et **Ds10** (18,2 mg), ont été obtenus.

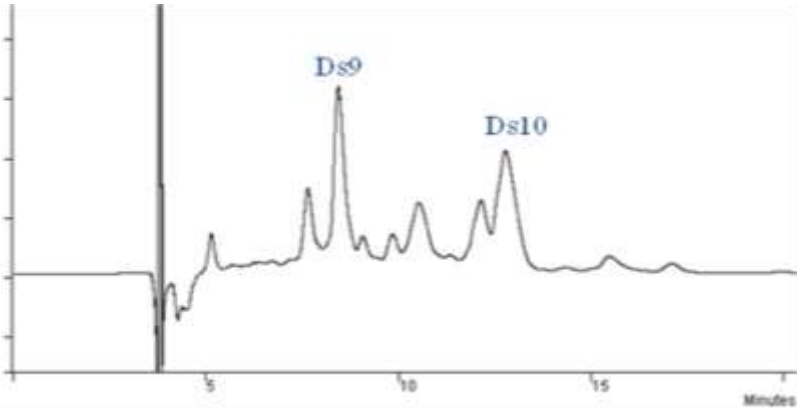


Figure 50 : *Chromatogramme de la fraction 7 de* Dictyota *sp.*

Les fractions 9 et 10 ont été toutes deux éluées avec un mélange hexane/AcOEt (2/3 ; v/v). Elles ont ensuite été purifiées par HPLC en utilisant les mêmes conditions que pour la fraction 7. Quatre composés, **Ds1** (1,4 mg), **Ds3** (32,1 mg), **Ds5** (3,0 mg) et **Ds11** (5,1 mg en mélange avec le composé **Ds3**), ont été obtenus à l'issue de ces séries de purifications (cf Figure 51Figure 51 et Figure 52).

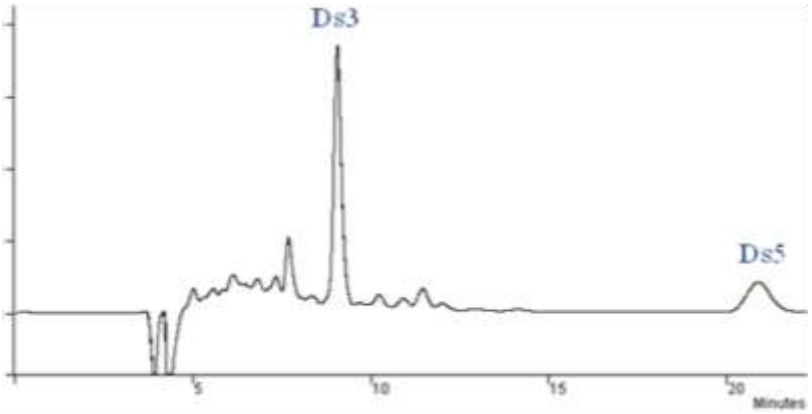


Figure 51 : *Chromatogramme de la fraction 9 de* Dictyota *sp.*

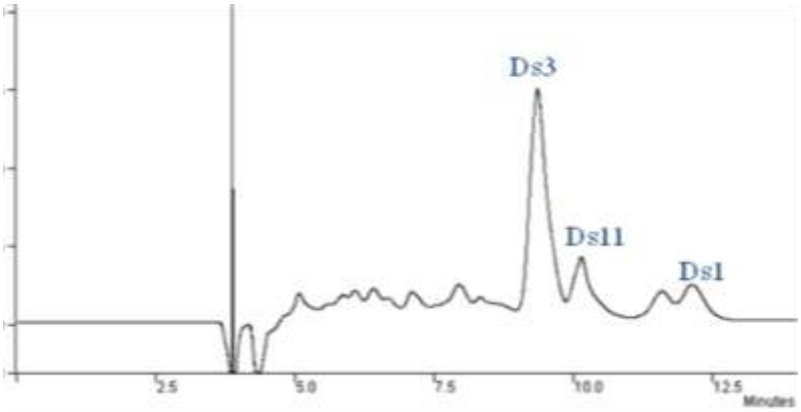


Figure 52 : *Chromatogramme de la fraction 10 de* Dictyota *sp.*

Enfin le composé **Ds12** (25,0 mg) a été obtenu à partir de la fraction 12, éluée avec un mélange hexane/AcOEt (3/7 ; v/v), après une purification par HPLC réalisée à l'aide d'un mélange MeCN/H_2O (4/1 ; v/v) (cf Figure 53).

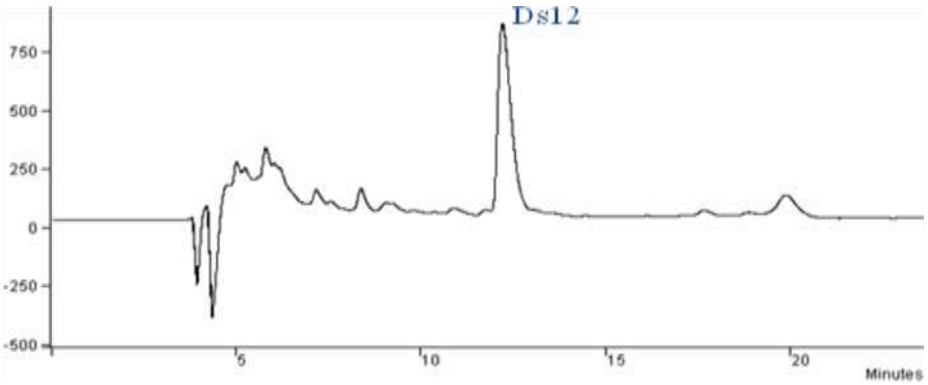


Figure 53 : *Chromatogramme de la fraction 12 de* Dictyota *sp.*

II.2. Caractérisation structurale des composés

A partir des extraits organiques de ces échantillons de l'algue brune *Dictyota* sp. douze molécules ont donc été isolées : cinq d'entre-elles (**Ds1-Ds5**) n'ont encore jamais été reportées dans la littérature tandis que les sept autres (**Ds6-Ds12**) ont déjà été décrites.

*II.2.1. Analyse structurale du composé **Ds1***

a/ Détermination de la structure plane

Le composé **Ds1**, obtenu sous forme d'une huile incolore optiquement active ($[\alpha]_D^{25}$ = -172°), ne présente pas de bande d'absorption caractéristique sur son spectre UV-Visible. Des études de spectrométrie de masse à haute résolution (HR-ESI/MS) ont abouti pour le composé **Ds1** à la détection d'un ion adduit $[M+H-MeOH]^+$ à *m/z* 303,2339 correspondant à la formule brute $C_{21}H_{34}O_3$ (valeur calculée : *m/z* 303,2324). L'analyse du spectre IR de **Ds1** se caractérise par l'absence de bandes caractéristiques d'absorption du groupement carbonyle ; cette information est confirmée par l'absence de signaux au-delà de δ_C 150 ppm sur le spectre RMN ^{13}C. Au niveau de la structure chimique de **Ds1**, les atomes d'oxygène sont donc impliqués dans des fonctions alcool et/ou éther. Ceci est vérifié par la présence de bandes d'absorption à 3472 (liaison O-H), 1112 et 1076 cm^{-1} (liaisons C-O) en IR, d'une part, et par les signaux à δ_C 55,0 (groupement méthoxy), 69,8, 73,0 et 105,6 ppm (groupement acétal) visibles sur le spectre RMN ^{13}C, d'autre part (cf Figure 54).

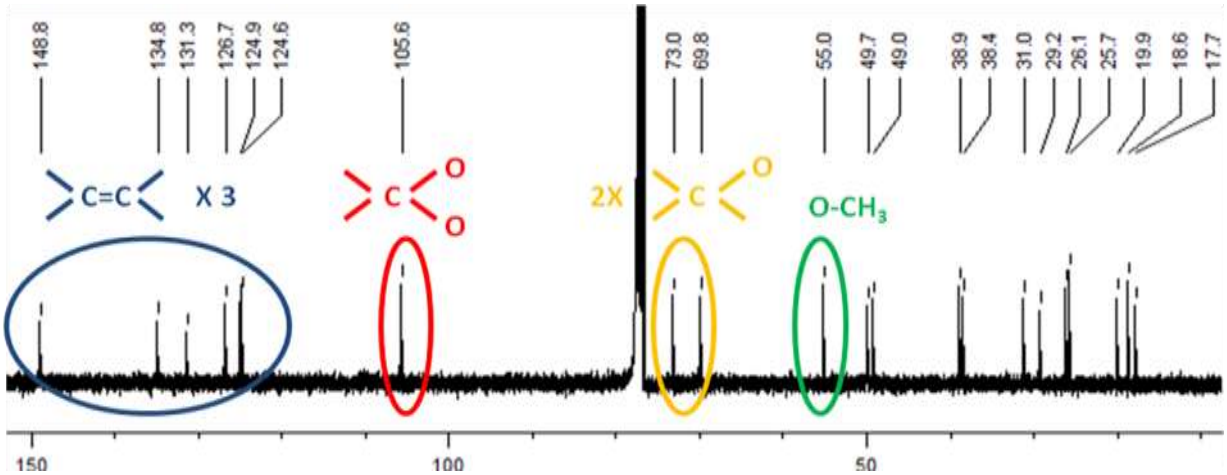


Figure 54 : *Spectre RMN du ^{13}C du composé **Ds1***

La formule brute de **Ds1** indique que ce composé présente cinq degrés d'insaturation. Néanmoins, comme sur son spectre RMN ^{13}C seules trois doubles liaisons éthyléniques sont détectées (signaux à δ_C 124,6, 124,9, 126,7, 131,3, 134,8 et 148, 8 ppm ; cf Figure 55), **Ds1** est donc bicyclique. L'étude des différents spectres DEPT (45, 90 et 135) permet le dénombrement de cinq méthyles, cinq méthylènes, huit méthines et trois atomes de carbone quaternaires.

Le spectre RMN ^{1}H confirme la présence de cinq méthyles par le biais de signaux correspondant à un groupement méthoxy (δ_H 3,40 ppm, s), trois méthyles sur double liaison (δ_H 1,59, 1,68 et 1,86 ppm) et un méthyle dédoublé (δ_H 1,09 ppm, d, 7,0 Hz ; cf Figure 55). Ce spectre montre également des signaux déblindés (δ_H 4,26, 5,08, 5,19, 5,34, et 5,84 ppm) dus à cinq méthines ainsi que des signaux attribués à un méthylène lié à un atome d'oxygène (δ_H 3,81 et 4,09 ppm).

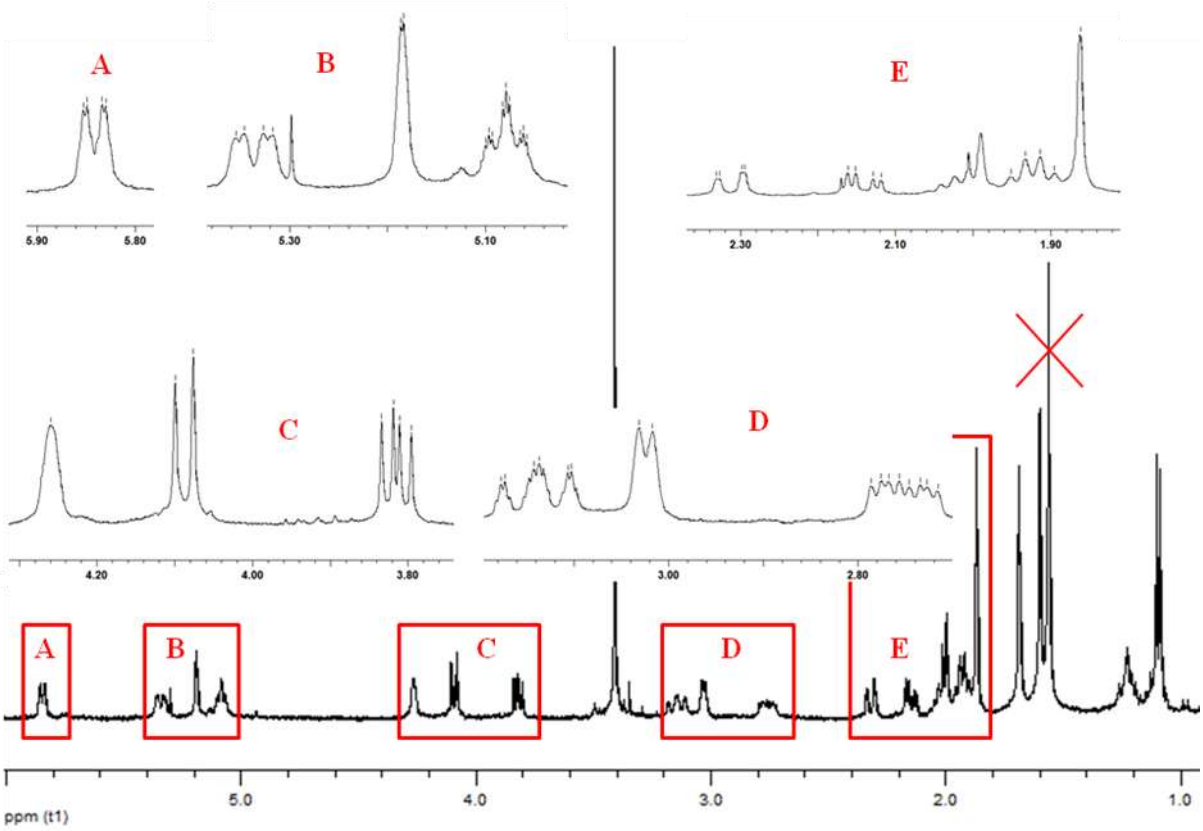


Figure 55 : *Spectre RMN du ^{1}H du composé **Ds1***

A l'issue de l'attribution des signaux de tous les atomes de carbone protonés grâce au spectre HSQC, l'analyse des corrélations à longue-distance obtenues *via* les expériences COSY ^{1}H-^{1}H et HMBC (cf Tableau 5) a conduit à l'obtention du squelette carboné de **Ds1** (cf Figure 56) : il s'agit d'un macrocycle à neuf atomes de carbone substitué par une chaine latérale terpénique de type 6-méthylhept-5-én-2-yle. **Ds1** correspond donc à un diterpène de type xénicane au sein duquel un atome de carbone supplémentaire est présent sous la forme d'un groupement méthoxyle (C-21). Plus précisément, des corrélations entre C-4/H-3 et C-4/H_b-5 sur le spectre HMBC ainsi que des couplages en COSY ^{1}H-^{1}H entre H-4/$H_{a,b}$-5 ont permis de situer le groupement hydroxyle en C-4 sur le macrocycle. D'autre part, la présence d'un acétal a été mise en évidence par le biais de signaux RMN caractéristiques (δ_H 5,19 ppm et δ_C 105,7 ppm), tandis que des corrélations HMBC spécifiques

(C-18/H-19, C-19/H-18, C-19/H-21 et C-21/H-19) ont montré que l'atome de carbone C-19 fait partie d'un acétal cyclique impliquant C-18 ainsi que le groupement méthoxy (C-21).

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H	NOESY ^{1}H-^{1}H
1	148,8	C	-	-	-	-
2	38,9	CH	3,02 d (6,0)	C3, C1, C19, C10	H18a, H18b, H9, H3	H20, H18a
3	49,7	CH	1,99 m	C17, C1, C18, C5, C4, C11, C10, C2	H17	H7, H5a
4	73,1	CH	4,26 br s		H5a, H5b	H17, H5a
5	49,0	CH_2	a: 2,14 dd (13,5, 4,0)	C6, C7, C20	H5b, H4	H5b, H7, H4, H3
			b: 2,31 dd (13,5, 2,0)	C6, C7, C4, C3	H5a, H4	H5a
6	134,8	C	-	-	-	-
7	126,7	CH	5,34 dd (11,5, 4,0)		H8b, H20, H8a	H3, H5a
8	29,2	CH_2	a: 2,74 ddd (16,0, 7,5, 4,0)		H8b, H9, H7	H8b, H9
			b: 3,14 dd (11,5, 4,0)		H8a, H7, H9, H19	H8a, H20
9	124,9	CH	5,84 dddd (7,5, 1,5, 1,5, 1,5)	C2, C19, C7	H19, H8a, H2, H8b	H8a
10	31,0	CH	2,01 m	C11	H17, H2	
11	38,4	CH_2	a:1,09 m	C12, C3, C10, C13	H11b, H12	H11b
			b:1,20 m	C12, C3, C10, (C13)	H11a, H12	H11a
12	26,1	CH_2	1,92 q (7,5)	C14, C13, C11, C10	H13, H16, H15, H11a, H11b, H17	
13	124,6	CH	5,08 t hept (7,0, 1,5)	(C15)	H12, H16, H15	H16
14	131,3	C	-	-	-	-
15	17,7	CH_3	1,59 br s	C14, C13, C16	H13, H12	
16	25,7	CH_3	1,68 br s	C14, C13, C15	H13, H12	H13
17	18,6	CH_3	1,09 d (7,0)	C3, C10, C11	H10, H12, H3	H4, H18b
18	69,8	CH_2	a: 3,81 dd (9,5, 6,0)	C3	H18b, H2	H18b, H2
			b: 4,09 d (9,5)	C19, C1, C3, C2	H18a, H2	H18a, H17
19	105,7	CH	5,19 br dd (1,5, 1,0)	C18, C21	H9, H8b	H21
20	19,9	CH_3	1,86 s	C6, C7, C5	H7	H2, H8b
21	55,0	CH_3	3,40 s	C19		H17

Tableau 5 : *Données RMN (1D et 2D) du composé **Ds1***

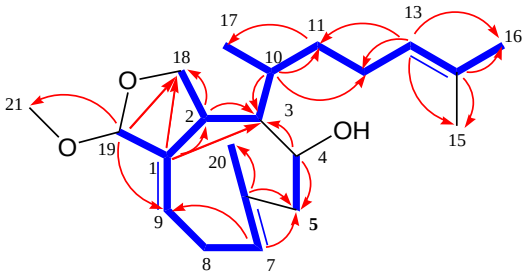


Figure 56 : *Représentation des principaux couplages en COSY ^{1}H-^{1}H (▬) et HMBC (⌒ de C à H) du composé **Ds1***

La configuration *E* de la double liaison $\Delta^{6,7}$ a été déterminée à la fois par : (i) l'existence de corrélations entre H-7/H_a-5 et H_3-20/H_b-8 sur le spectre NOESY ^{1}H-^{1}H de **Ds1** et, (ii) le blindage du signal correspondant au groupement méthyle vinylique en C-20 (δ_C 19,9 ppm) sur le spectre RMN ^{13}C [110, 152]. L'absence de corrélation en NOESY entre H_3-20/H-7 est en accord avec cette hypothèse.

De la même façon, l'attribution des signaux correspondant aux méthyles en C-15 et C-16 a été obtenue à l'aide de la corrélation entre H-13 (δ_H 5,08 ppm) et H_3-16 (δ_H 1,68 ppm) visible sur le spectre NOESY ^{1}H-^{1}H. Cette attribution est confirmée par l'observation, sur le spectre RMN ^{13}C, d'un signal déblindé pour le méthyle en C-16 (δ_C 25,7 ppm) et d'un signal blindé pour celui en C-15 (δ_C 17,7 ppm).

b/ Détermination de la stéréochimie en C-2, C-3, C-4 et $\Delta^{9,1}$

La configuration de la double liaison en $\Delta^{9,1}$ et des différents centres asymétriques en C-2, C-3 et C-4 présents sur le macrocycle a été étudiée. En raison des faibles quantités de **Ds1** isolées (1,3 mg) il n'a pas été possible d'obtenir des cristaux adaptés à une analyse en diffraction des rayons X, ni d'appliquer la méthode de Mosher modifiée [58, 153] au niveau de l'alcool secondaire. Cet état de fait nous a conduits à utiliser la modélisation moléculaire, en association avec les résultats expérimentaux obtenus en RMN, afin de déterminer la stéréochimie de **Ds1** au niveau du macrocycle.

Résultats expérimentaux obtenus par RMN et modélisation moléculaire

L'étude des différentes données RMN, et notamment celles issues de l'expérience NOESY ^{1}H-^{1}H, a permis de déterminer plusieurs paramètres importants pour la détermination de la stéréochimie du macrocycle (cf Figure 57) :

- ✓ Les constantes de couplage entre H-2/H-3 et H-3/H-4 sont très faibles, proches de 0 Hz, sur le spectre RMN ^{1}H de **Ds1** : ceci implique des angles dièdres ayant des valeurs voisines de 90° entre ces protons respectifs.

- ✓ Des corrélations intenses ont été observées entre H-3/H-7 et H-2/H_3-20 sur le spectre NOESY ^{1}H-^{1}H de **Ds1** : elles sont synonymes d'une proximité spatiale entre ces protons.

- ✓ Une relation *cis* entre H-3/H-4 est déduite par l'intermédiaire des différentes corrélations, visibles sur le spectre NOESY ^{1}H-^{1}H de **Ds1**, entre H-4/H_a-5, H_a-5/H-7 et H-7/H-3.

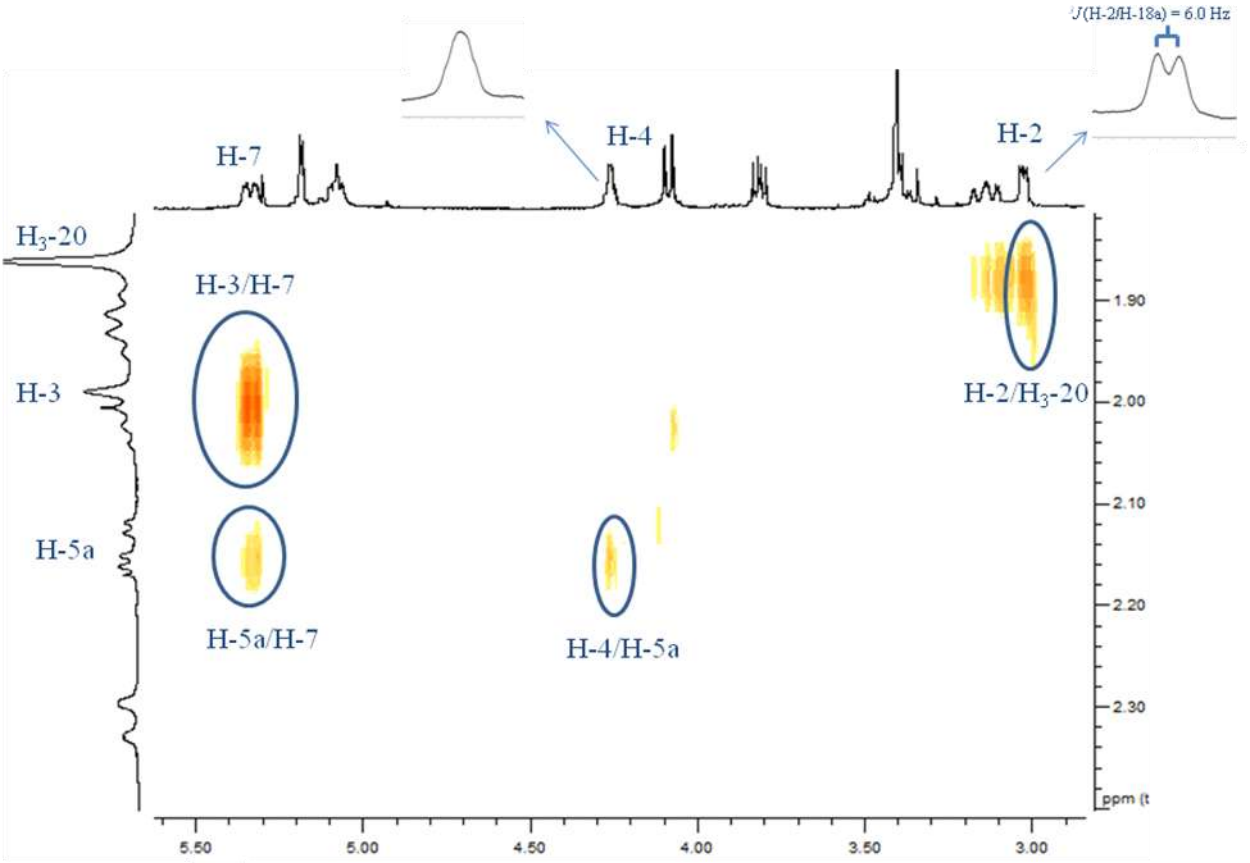


Figure 57 : *Détail du spectre NOESY ^{1}H-^{1}H du composé* ***Ds1***

En faisant varier les configurations de C-2, C-3, C-4, et $\Delta^{9,1}$, les 16 diastéréoisomères possibles de **Ds1** ont ensuite été successivement modélisés. La représentation tridimensionnelle de ces différentes structures a été optimisée par modélisation moléculaire, puis affinée à l'aide de calculs semi-empiriques afin d'obtenir la conformation la plus stable[7]. Plusieurs paramètres discriminants liés aux données RMN expérimentales ont été rassemblés dans le Tableau 6.

[7] Les études de modélisation moléculaire ont été réalisées avec le logiciel HyperChem Release 8.05 Pro (cf Matériels et méthodes pour le détail des calculs).

Diastéréoisomère	Chaleur de formation (kJ.mol^{-1})	$d_{H-2/C2-0}$ (Å)	$d_{H-3/H-7}$ (Å)	Φ (H-2, H-3)	^3J (Hz)[a]	Φ (H-3, H-4)	^3J (Hz)[a]
2*R*, 3*R*, 4*R*, 9*E*	-480.2	4.6	4.3	-171°	11.4	73°	1.8
2*R*, 3*R*, 4*R*, 9*Z*	-466.4	5.4	5.0	-89°	0.9	52°	4.5
-		-	-	-	-	-	-
2*R*, 3*S*, 4*R*, 9*E*	-494.9	5.1	1.8	50°	4.5	-109°	2.6
2*R*, 3*S*, 4*R*, 9*Z*	-417.4	4.9	6.2	-60°	3.2	76°	1.5
-		-	-	-	-	-	-
2*R*, 3*R*, 4*S*, 9*E*	-466.4	4.5	4.3	-170°	11.4	-58°	3.6
2*R*, 3*R*, 4*S*, 9*Z*	-434.6	4.6	5.2	154°	9.9	83°	0.6
-		-	-	-	-	-	-
2*R*, 3*S*, 4*S*, 9*E*	-476.0	5.2	1.7	51°	4.2	114°	3.2
2*R*, 3*S*, 4*S*, 9*Z*	-415.3	5.6	2.4	69°	1.8	110°	2.7
-		-	-	-	-	-	-
2*S*, 3*R*, 4*R*, 9*E*	-513.7	2.8	4.2	114°	2.8	-80°	0.6
2*S*, 3*R*, 4*R*, 9*Z*	-505.8	6.4	5.2	-58°	3.2	-127°	5.4
-		-	-	-	-	-	-
2*S*, 3*S*, 4*R*, 9*E*	**-517.5**	**2.7**	**1.8**	**-95°**	**1.2**	**-87°**	**0.8**
2*S*, 3*S*, 4*R*, 9*Z*	-515.8	6.3	6.2	113°	2.7	73°	1.8
-		-	-	-	-	-	-
2*S*, 3*R*, 4*S*, 9*E*	-482.3	2.6	4.7	101°	1.4	-67°	2.4
2*S*, 3*R*, 4*S*, 9*Z*	-407.0	4.6	4.8	53°	4.3	-88°	0.8
-		-	-	-	-	-	-
2*S*, 3*S*, 4*S*, 9*E*	-495.3	2.7	1.8	-93°	1.0	147°	8.4
2*S*, 3*S*, 4*S*, 9*Z*	-409.9	4.7	2.7	-164°	11.0	116°	3.5

a : Les constantes de couplage ont été estimées à l'aide du logiciel MestReJ

Tableau 6: *Paramètres théoriques mesurés sur le conformère le plus stable (optimisé par modélisation moléculaire) de chaque diastéréoisomère de* ***Ds1***

L'analyse des valeurs des constantes de couplage théoriques entre H-2/H-3 et H-3/H-4 permet de dire que le stéréoisomère 2*S**, 3*S**, 4*R**, 9*E* est le seul à être en accord avec les valeurs expérimentales observées en RMN ^{1}H. Les distances théoriques mesurées entre H-3/H-7 et H-2/C-20 sont cohérentes avec les corrélations observées sur le spectre NOESY ^{1}H-^{1}H. Enfin, les configurations en C-3 et C-4 (3*S*, 4*R*) impliquent bien une relation *cis* entre H-3/H-4. Par ailleurs, ce même stéréoisomère 2*S*, 3*S*, 4*R*, 9*E* a été déterminé comme étant le plus stable d'un point de vue énergétique car sa chaleur de formation théorique est la plus faible parmi celles calculées pour les 16 composés étudiés[8].

En revanche, la libre rotation qui existe entre C-10 et C-3 ne nous permet pas d'obtenir des informations sur la stéréochimie en C-10 avec cette même méthodologie.

[8] On peut remarquer que les isomères présentant une configuration *Z* pour Δ^9 sont toujours moins stables que leur homologue de configuration *E* à cause de la tension induite dans le macrocycle par ce type d'élément structural.

Comparaison avec la littérature

Des études stéréochimiques ont été réalisées sur l'hydroxyacétyldictyolal (cf Figure 58), ainsi que sur d'autres xénicanes proches structuralement de **Ds1** isolés à partir d'algues de la famille des Dictyoteae [57-59]. Les résultats obtenus par diffraction des rayons X, ou à l'aide de la méthode de Mosher modifiée, sont similaires à ceux trouvés pour **Ds1** par modélisation moléculaire à savoir une stéréochimie 2*S*, 3*S*, 4*R* et 9*E* pour le macrocycle.

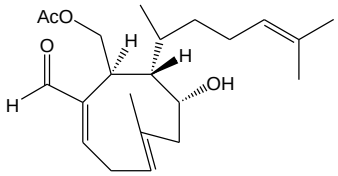


Figure 58 : *Hydroxyacetyldictyolal*

D'autre part, pour ces mêmes molécules, compte-tenu de la configuration relative trouvée précédemment pour le macrocycle, une configuration 10*R* a été déterminée par diffraction des rayons X [57, 154].

c/ Détermination de la stéréochimie en C-19

La méthodologie précédemment utilisée pour déterminer la stéréochimie au niveau du macrocycle s'avère insuffisante pour connaître celle en C-19. D'une part, le spectre NOESY ^{1}H-^{1}H du composé **Ds1** révèle pour H-19 la présence d'une seule corrélation avec le groupement méthoxy (H_3-21) mais aucune avec H_a-18, H_b-18 ou H-9 : ces dernières auraient pu donner des informations sur la stéréochimie en C-19. D'autre part, des études complémentaires de modélisation moléculaire ont été réalisées sur quatre stéréoisomères en faisant varier la configuration du C-19 (cf

Tableau 7).

Diastereoisomère	ϕ (H-2, H-3)	ϕ (H-3, H-4)	$d_{H-3/H-7}$ (Å)
2*S*, 3*S*, 4*R*, 9*E*, 19*R*	-95°	-87°	1,83
2*S*, 3*S*, 4*R*, 9*E*, 19*S*	-95°	-87°	1,82
-	-	-	-
2*S*, 3*R*, 4*S*, 9*E*, 19*R*	101°	-67°	4,70
2*S*, 3*R*, 4*S*, 9*E*, 19S	101°	-69°	4,70
-	-	-	-
2*R*, 3*R*, 4*S*, 9*E*, 19*R*	-170°	-58°	4,30
2*R*, 3*R*, 4*S*, 9*E*, 19S	-170°	-57°	4,30
-	-	-	-
2*R*, 3*S*, 4*R*, 9*E*, 19*R*	50°	-109°	1,78
2*R*, 3*S*, 4*R*, 9*E*, 19*S*	49°	-111°	1,77

Tableau 7 : *Etude de l'influence de la configuration du C-19*

Celles-ci montrent que le changement de configuration n'influe pas sur les paramètres utilisés pour discriminer les différents diastéréoisomères. Il n'est donc pas possible de distinguer les deux épimères, **Ds1**(19*R*) et **Ds1**(19*S*), par cette méthode.

Dégradation (épimérisation)

De manière opportune, le composé **Ds1** s'est avéré être instable dans le chloroforme deutéré et se transforme en une seule molécule (notée **Ds1'**). Les quantités de **Ds1** initialement purifiées étant faibles, l'analyse structurale de **Ds1'** a été réalisée par RMN directement sur le mélange des deux composés, sans purification préalable. Le spectre RMN ^{1}H de ce mélange montre que **Ds1'** et **Ds1** sont très proches structuralement car ces deux composés présentent de nombreux signaux similaires (cf Figure 59). En outre, lorsque des variations de déplacements chimiques interviennent, elles restent très faibles ($|\Delta\delta_H| < 0{,}12$ ppm) excepté dans le cas du signal correspondant à H-19 (cf Figure 60) pour lequel $\Delta\delta_H = -0{,}26$ ppm[9].

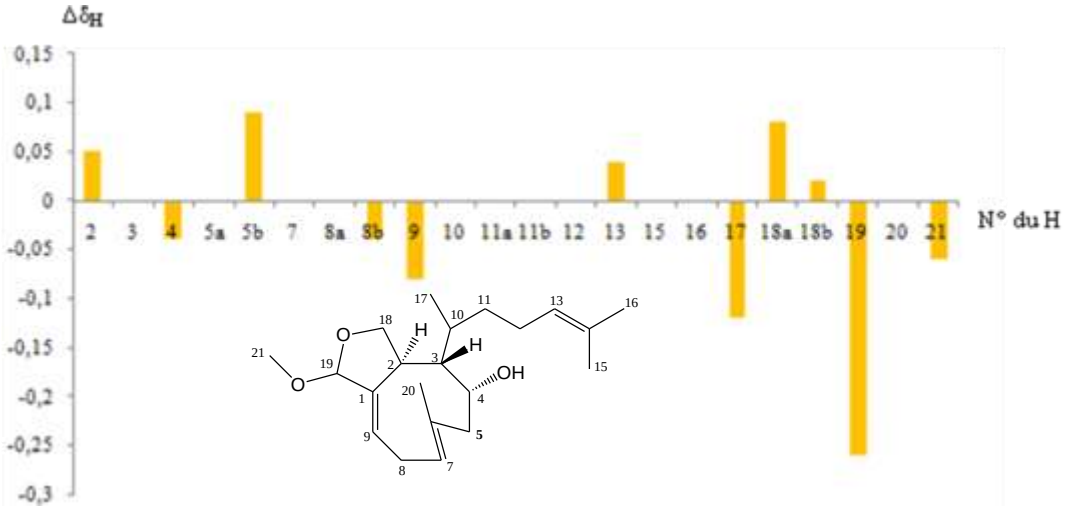


Figure 59 : *Différence des déplacements chimiques (en RMN ^{1}H) entre **Ds1'** et **Ds1**[10]*

Des mesures d'intégration des différents signaux en RMN ^{1}H montrent que le composé d'origine **Ds1** représente environ les deux tiers du mélange, contre un tiers pour le composé de dégradation **Ds1'**.

---

[9] $\Delta\delta_H = \delta_H$(**Ds1'**) - δ_H(**Ds1**)

[10] Concernant les protons H-3, H_a-5, H-7, H_a-8, H-10, $H_{a,b}$-11, H_2-12, H_3-15, H_3-16, et H_3-20, il n'est pas possible de discriminer les signaux de **Ds1** par rapport à ceux de **Ds1'** sur le spectre RMN ^{1}H du mélange.

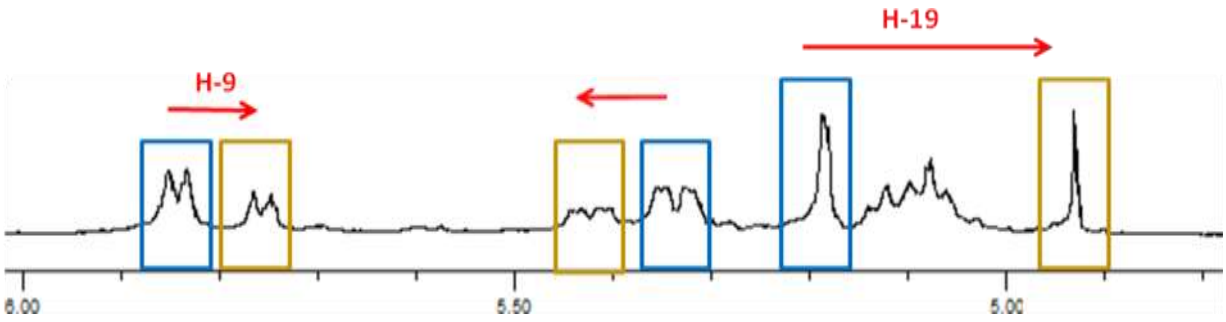


Figure 60 : *Détail du spectre RMN ^{1}H du mélange **Ds1/Ds1'***

Un spectre NOESY ^{1}H-^{1}H de ce même mélange a ensuite été réalisé afin de rechercher les différences structurales entre **Ds1** et **Ds1'**. Le spectre montre l'apparition d'une nouvelle corrélation entre H-9'/H-19' (cf Figure 61), ce qui confirme bien que la modification structurale entre les deux molécules se situe au niveau de H-19.

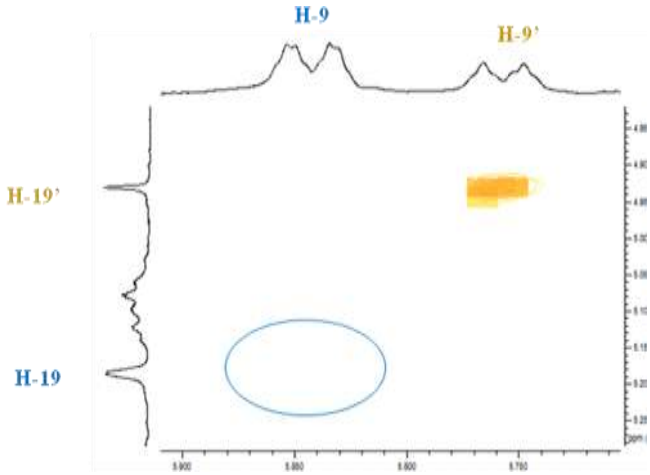


Figure 61 : *Détail du spectre NOESY ^{1}H-^{1}H du mélange **Ds1/Ds1'***

Les différences observées en RMN entre **Ds1** et **Ds1'**, que ce soit sur le spectre de RMN ^{1}H ou sur le spectre NOESY ^{1}H-^{1}H, indiquent que la dégradation du composé **Ds1** provient d'une épimérisation en C-19. En effet, la réaction d'épimérisation d'un groupement acétal peut se produire facilement en milieu légèrement acide (formation de traces de HCl dans $CDCl_3$).

Pour étayer cette hypothèse, les deux épimères en C-19 ont été étudiés par modélisation moléculaire.

Corrélation NOESY ^{1}H-^{1}H /modélisation moléculaire

La géométrie de chacun de ces deux épimères (cf Figure 62) a été optimisée par modélisation en appliquant le même protocole que celui mis en œuvre précédemment pour étudier la stéréochimie du macrocycle. On peut constater que la distance calculée entre H-9 et H-19 est nettement plus courte

dans le cas de l'épimère **Ds1(19*S*)**. Ces données sont en accord avec le fait que le composé de dégradation **Ds1'**, pour lequel une corrélation entre H-9/H-19 est visible sur le spectre NOESY ^{1}H-^{1}H, correspond à l'épimère **Ds1(19*S*)** tandis que le composé original **Ds1** présenterait une configuration 19*R*.

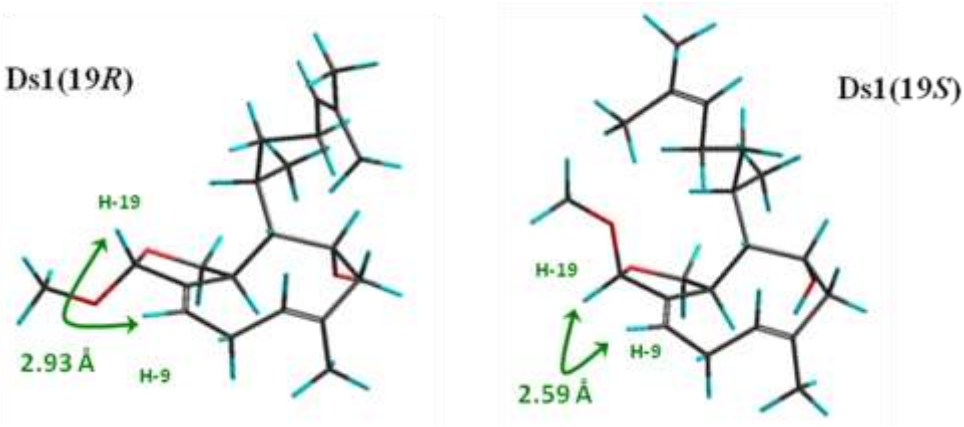


Figure 62 : *Modélisation moléculaire des 2 épimères*

Cette hypothèse est soutenue par les calculs semi-empiriques effectués sur les deux épimères qui indiquent que le composé **Ds1(19*S*)** est plus stable énergétiquement ($\delta\Delta H°_f$ = -11,3 kJ.mol^{-1}) que **Ds1(19*R*)** : ceci peut justifier le déplacement de l'équilibre de la réaction d'épimérisation de **Ds1** (**Ds1(19*R*)**) vers **Ds1'** (**Ds1(19*S*)**).

A l'issue de l'ensemble de cette étude stéréochimique, la configuration proposée pour le composé **Ds1** est donc 2*S**, 3*S**, 4*R**, 6*E*, 9*E*, 19*R** (cf Figure 63).

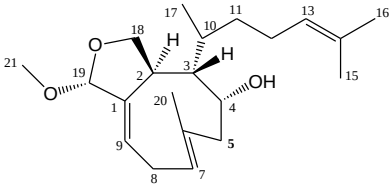


Figure 63 : *Structure du composé **Ds1***

*II.2.2. Analyse structurale du composé **Ds2***

Le composé **Ds2** a été isolé sous la forme d'une huile jaune pâle optiquement active ($[\alpha]_D^{25}$ = +4°) et présente une bande d'absorption en UV à 242 nm (ε 4060). L'étude par HR-ESI/MS de **Ds2** conduit à l'observation de l'ion adduit $[M+Na]^+$ à *m/z* 327,2292 compatible avec la formule brute $C_{20}H_{32}O_2$ (valeur calculée : *m/z* 327.2300) : la structure de ce composé comporte donc cinq degrés d'insaturation.

Le spectre IR révèle une large bande à 3483 cm^{-1}, correspondant à l'élongation de la liaison (O-H) des fonctions alcools, ainsi que deux bandes à 1671 et 1623 cm^{-1} révélant la présence d'un groupement carbonyle conjugué. Ces indications sont confirmées par les données issues des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C qui montrent :

- ✓ Un signal à δ_C 73,9 ppm en RMN ^{13}C correspondant à un atome de carbone oxygéné, probablement celui de la fonction alcool.
- ✓ Des signaux à δ_C 208,7, 154,4 et 121,6 ppm en RMN ^{13}C associés à un singulet à δ_H 6,36 ppm en RMN ^{1}H correspondant à une cétone *α,β* insaturée et *β,β* disubstituée.

Par ailleurs, la présence d'une seconde double liaison carbone-carbone (δ_C 135,5 et 124,2 ppm, δ_H 4,97 ppm) implique que le composé **Ds2** doit être bicyclique. Une étude approfondie des spectres RMN ^{1}H, ^{13}C, HSQC, COSY ^{1}H-^{1}H et HMBC (cf Tableau 8) et la comparaison de ces données avec celles issues de la littérature ont permis de déduire que le composé **Ds2** présentait un squelette carboné de type dolabellane.

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H	NOESY ^{1}H-^{1}H
1	57,9	C	-	-	-	-
2	208,7	C	-	-	-	-
3	121,6	CH	6,36 s	C2, C5, C16	H16, H5b	H14b, H16
4	154,4	C	-	-	-	-
5	32,2	CH_2	a : 1,96 m b : 3,12 d (11,0)		H5b, H6b H5a, H3	H5b H5a
6	21,7	CH_2	a : 1,78 m b : 2,72 dd (12,5, 6,0)		H6b, H7 H6a, H7, H5a	H6b H6a, H9b
7	124,2	CH	4,97 br d (12,5)		H17, H6b, H6a	H17
8	135,5	C	-	-	-	-
9	28,6	CH_2	a : 1,63 m b : 2,21 td (14,5, 2,0)	(C11) C17, C10, (C7, C8)	H9b H9a, H10b, H10a	H9b H6b, H9a
10	29,0	CH_2	a : 1,41 m b : 2,03 m	(C11) C1, C9	H10b, H9b, H11 H10a, H9b	H10b H10a
11	45,6	CH	2,27 ddd (12,0, 8,0, 3,0)	C1	H12, H10a	H19, H20, H14b
12	55,8	CH	1,76 m	C11, C14, C13	H11, H13a, H13b	
13	27,8	CH_2	a : 1,63 m b : 1,97 m	(C18, C11) C14, (C18, C12)	H13b, H12, H14a H13a, H12	
14	39,8	CH_2	a : 1,41 m b : 2,00 m	C12, (C11)	H14b, H13a H14a	H15 H3, H11
15	16,7	CH_3	1,07 s	C2, C1, C11, C14		H14a
16	30,4	CH_3	1,81 s	C5, C3, C4, (C2)	H3	H3
17	22,6	CH_3	1,65 s	C7, C8, C9	H7	H7
18	73,9	C	-	-	-	-
19	26,6	CH_3	1,26 s	C20, C12, C18		H11
20	29,8	CH_3	1,27 s	C19, C12, C18		H11

Tableau 8 : *Données RMN (1D et 2D) du composé **Ds2***

Le groupement méthyle H_3-15 (δ_H 1,07 ppm, s), relié à un atome de carbone quaternaire hybridé sp^3, montre de fortes corrélations HMBC avec C-1 (δ_C 57,9 ppm, s), C-2 (δ_C 208,7 ppm, s), C-11 (δ_C 45,6 ppm, d) et C-14 (δ_C 39,8 ppm, t) : ces données indiquent que ce groupement méthyle est porté par C-1, lui-même étant relié à C-2, C-11 et C-14. Les corrélations HMBC entre H-3/C-2, d'une part, et entre H_3-16 et C-3, C-4 et C-5, d'autre part, permettent de reconstituer et de positionner la cétone *α,β* insaturée et *β,β* disubstituée. Les différents couplages observés sur le spectre COSY ^{1}H-^{1}H entre H-3/H_b-5, H_a-5/H_b-6 et H_b-6/H-7 permettent de situer la deuxième double liaison en $\Delta^{7,8}$. Les corrélations présentes sur le spectre HMBC entre le groupement méthyle H_3-17 (δ_H 1,65 ppm, s) et C-7, C-8 et C-9 donnent la substitution complète de cette double liaison. Finalement, les couplages en COSY ^{1}H-^{1}H entre H_b-9/H_a-10 et H_a-10/H-11 permettent d'achever la construction du cycle à 11 atomes de carbone. Le dernier degré d'insaturation de **Ds2** est le fait d'un groupement cyclopentane, accolé au premier cycle en C-1 et C-11, qui a été identifié grâce aux différents couplages entre H-11/H-12, H-12/H_a-13 et H_a-13/H_a-14 visibles sur le spectre COSY ^{1}H-^{1}H. Enfin, une chaîne latérale de type 2-(2-hydroxypropyle), classique chez les dolabellanes, a été identifiée grâce à ses signaux caractéristiques en RMN ^{1}H et ^{13}C (δ_H 1,26 (s, 3H) et 1,27 ppm (s, 3H) ; δ_C 26,6 (q), 29,8 (q) et 73,9 ppm (s)). Son positionnement en C-12 a été réalisé grâce à l'observation de fortes corrélations entre C-12/H_3-19 et H_3-20 sur le spectre HMBC (cf Figure 64).

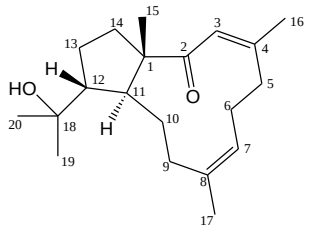


Figure 64 : *Structure du composé **Ds2***

La structure plane de **Ds2** ayant été établie, la configuration des deux doubles liaisons $\Delta^{3,4}$ et $\Delta^{7,8}$ a ensuite été déterminée comme étant *Z* en s'appuyant sur :

- ✓ L'observation de signaux déblindés en RMN ^{13}C pour les groupements méthyles (δ_C 30,4 (C-6) et 22,6 (C-17) ppm) portés par ces doubles liaisons.
- ✓ Les corrélations observées entre, respectivement, H-3/H_3-16 et H-7/H_3-17 sur le spectre NOESY ^{1}H-^{1}H (cf Figure 65).

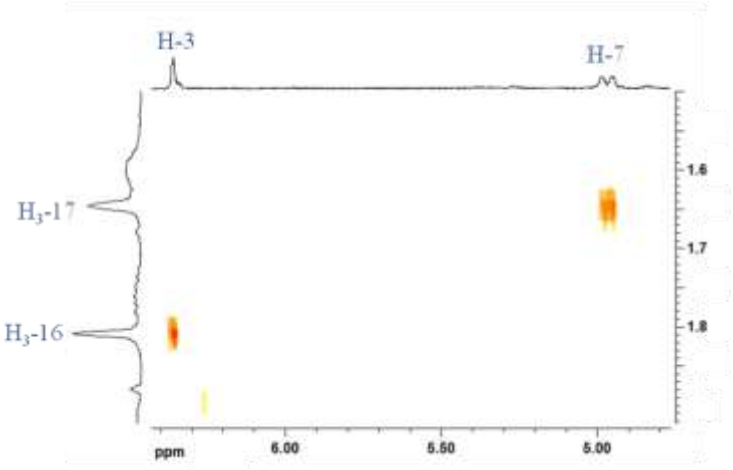


Figure 65 : *Détail du spectre NOESY ^{1}H-^{1}H du composé* ***Ds2***

Afin de finaliser l'étude stéréochimique de **Ds2**, la configuration des carbones asymétriques C-1, C-11 et C-12 a été étudiée. Les corrélations NOE entre H-11/H_b-14 et H_a-14/H_3-15 indiquent que la jonction entre les deux cycles est *trans* (l'absence de corrélation entre H-11/H_3-15 se porte en faveur de cette hypothèse). Par ailleurs, les corrélations visibles sur le spectre NOESY ^{1}H-^{1}H entre H-11/H_3-19 et H-11/H_3-20 impliquent que les protons H-11 et H-12 soient situés de part et d'autre du plan moyen de la molécule (orientation *trans*).

La stéréochimie proposée pour le composé **Ds2**, identifié comme étant la 18-hydroxydolabella-3,7-dién-2-one, est donc 1*S**, 3*Z*, 7*Z*, 11*S**, 12*R**.

II.2.3. Analyse structurale du composé ***Ds3***

Le composé **Ds3** a été isolé sous forme d'une huile jaune optiquement active ($[\alpha]_D^{25}$ = +58°) et ne présente aucune bande d'absorption significative sur son spectre UV-visible. L'étude de **Ds3** par HR-ESI/MS donne l'ion adduit $[M+Na]^+$ à *m/z* 345,2404 relatif à la formule brute $C_{20}H_{34}O_3$ (valeur calculée : *m/z* 345,2406). Le composé **Ds3** présente donc quatre degrés d'insaturation. Le spectre RMN ^{13}C indiquant la présence d'une seule double liaison carbone-carbone (δ_C 125,6 et 133,7 ppm) et l'absence de groupement carbonyle (pas de signaux au-delà de δ_C 150 ppm), **Ds3** est donc tricyclique (cf Figure 66). Le spectre IR montre, pour seule caractéristique, la présence d'une large bande typique des fonctions alcools (3313 cm^{-1}). Cette information est confirmée par l'observation de deux signaux à δ_C 73,4 et 81,7 ppm sur le spectre RMN ^{13}C de **Ds3**. Dans cette même zone du spectre, plusieurs autres signaux sont observés :

- ✓ le signal à δ_C 61,3 ppm correspond à un atome de carbone qui porte un hydrogène dont le signal (δ_H 1,72 ppm) indique clairement l'absence d'un atome d'oxygène en position géminale.

- ✓ les deux signaux relativement blindés à δ_C 63,9 et 66,3 ppm qui, en accord avec la formule brute de **Ds3**, semblent être dus à la présence d'un groupement époxyde.

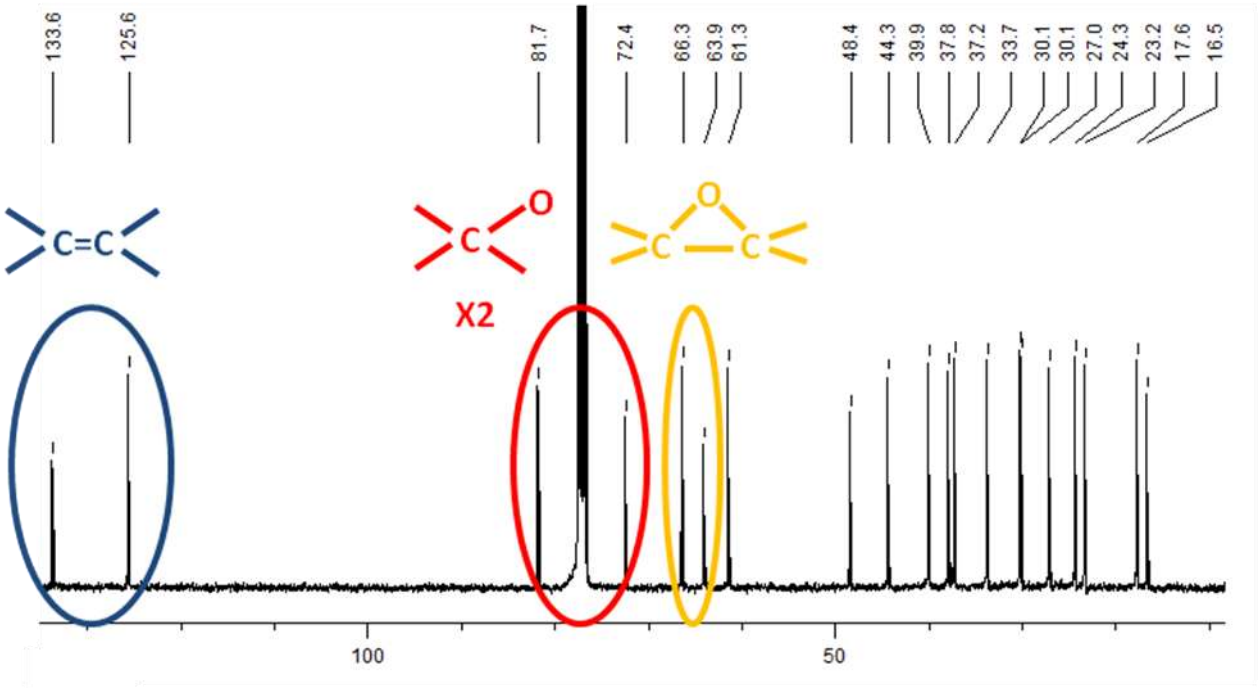


Figure 66 : *Spectre RMN ^{13}C du composé **Ds3***

Cette caractéristique structurale liée à la présence d'une double liaison montre que **Ds3** possède un squelette carboné bicyclique. L'analyse de l'ensemble des données RMN de **Ds3** (cf Tableau 9) a permis d'établir sa structure comme celle d'un diterpène de la famille des dolabellanes présentant deux fonctions alcools (l'une secondaire et l'autre tertiaire) et un groupement époxyde. La comparaison des données RMN de **Ds3** avec celles de **Ds2** montre clairement que les différences structurales entre ces deux molécules interviennent seulement au niveau du macrocycle. Ainsi, la fonction alcool secondaire est localisée en C-2 grâce aux corrélations observées en HMBC entre H-2/C-1, C-3, C-4, C-11, C-14 et C15. D'autre part, l'observation d'un couplage, sur le spectre COSY ^1H-^1H, entre H-2/H-3 ainsi que de corrélations HMBC entre C-3/H-2, $H_{a,b}$-5 et H_3-16 et entre C-4/H-3, $H_{a,b}$-5 et H_3-16 permettent de localiser l'époxyde en C-3/C-4. Enfin, comme précédemment pour **Ds2**, la présence de plusieurs autres couplages homo- et hétéronucléaires a conduit à positionner la double liaison en $\Delta^{7,8}$ et à finaliser ainsi la structure plane du macrocycle.

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H	NOESY ^{1}H-^{1}H
1	48,4	C				
2	81,7	CH	4,08, d (2,0)	C1, C3, C4, C11, C14, (C15)	H3	H15, H3, H14b
3	66,3	CH	2,86, d (2,0)	C2, C5, C4	H2, (H16)	H2, H7, H15, H5a
4	63,9	C				
5	39,9	CH2	a : 1,18 m b : 2,05 m	C16, C3, C4, C6, C7 C3, C4, C6, C7, (C16)	H5b, H6b, (H16) H5a	H3, H6a, H5b H5a
6	24,3	CH2	a : 2,11 m b : 2,38 m	C8 C8, C5, C7	H6b H6a, H5a	H5a
7	125,6	CH	5,07, d (12,0)	C9, C17	H17, H9a, (H9b)	H9b, H15/H19, H3
8	133,6	C				
9	37,8	CH2	a : 2,06 m b : 2,41 m	C7, (C8) C7, C8, C10, C17	H9b, H10, H7 H9a, (H7)	H9b H9a, H15/H19, H7, H17
10	33,7	CH2	1,73 m	C9, C12	H9b, H9a	H15/H19
11	37,2	CH	1,97 m	C10, C9, C14, C18, C1, C12		H12, H19
12	61,3	CH	1,72 m	C10, C11, C13, C1, (C18, C20, C19)	H13a	H11
13	27,0	CH2	a : 1,61 m b : 1,98 m	C14, (C12, C11) C12, (C14, C1)	H13b, H12 H13a, H14b	H13b H13a
14	44,3	CH2	a : 1,63 m b : 1,90 m	C15, C13, C12, C11 C13, C12, C11	H14b H14a, H13b	H14b H14a, H2
15	23,2	CH3	1,26 s	C1, C11, C2, C14, C10		H3, H2, (H9b, H7, H10)?
16	17,6	CH3	1,52 s	C5, C4, C3	(H3, H5a)	
17	16,6	CH3	1,74 s	C7, C8, C9, (C5)	H7	H9b
18	73,4	C				
19	30,14	CH3	1,26 s	C20, C19, C12, C13, (C11)	H20	(H9b, H7, H11, H10)?
20	30,06	CH3	1,12 s	C19, C18, C12, (C11)	H16	

Tableau 9 : *Données RMN (1D et 2D) du composé* ***Ds3***

En ce qui concerne la stéréochimie de **Ds3** en C-1, C-11 et C-12, la superposition de nombreux signaux en RMN ^{1}H (H_3-15 avec H_3-19 (δ_H 1,26 ppm), H-11 avec H_b-13 (δ_H 1,97 ppm) et H-12 avec H-10 (δ_H 1,72 ppm)) n'a pas permis de déterminer de manière irréfutable la stéréochimie de ces atomes par le biais de l'expérience NOESY ^{1}H-^{1}H. Néanmoins, la configuration (1*R*, 11*S*, 12*R*), observée chez tous les dolabellanes isolés des algues du genre *Dictyota*, a tout de même été proposée sur la base de considérations biosynthétiques et en accord avec le couplage observé en NOESY ^{1}H-^{1}H entre H-11/H_3-20 (cf Figure 67).

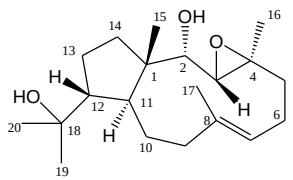


Figure 67 : *Structure du composé* ***Ds3***

Pour ce qui a trait à la double liaison $\Delta^{7,8}$, une configuration *E* a été attribuée grâce : (i) au blindage du signal correspondant au groupement méthyle porté par cette double liaison (δ_C 16,6 ppm, C-17), (ii) à la corrélation en NOESY ^{1}H-^{1}H entre H-7/H$_b$-9 (cf Figure 68).

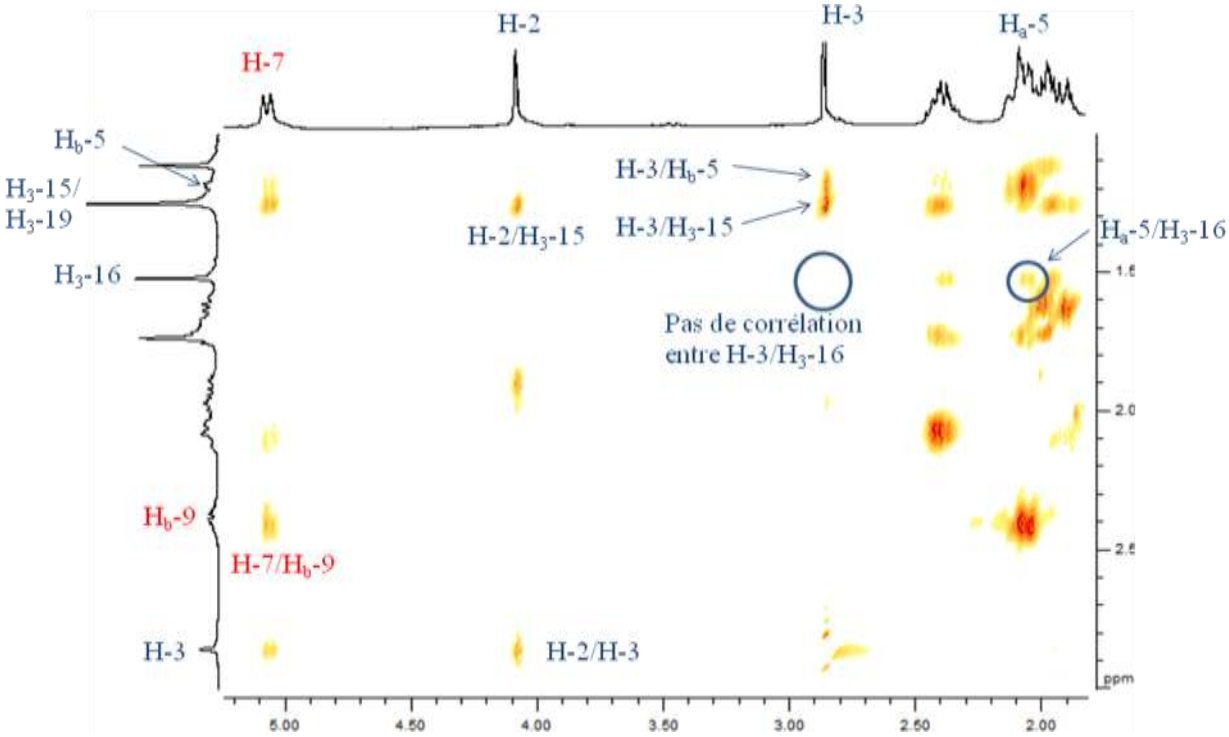


Figure 68 : *Détail du spectre NOESY ^{1}H-^{1}H du composé **Ds3** indiquant les corrélations importantes pour la déterminations des configurations de $\Delta^{7,8}$ (en rouge) et de C-2, C-3 et C-4 (en bleu)*

Enfin, la configuration de trois autres stéréocentres en C-2, C-3 et C-4 a été déterminée à l'aide d'une analyse minutieuse du spectre NOESY ^{1}H-^{1}H (cf Figure 68). Les corrélations visibles entre H-2/H$_3$-15, H-3/H$_3$-15 et H-2/H-3 montrent que tous ces protons sont sur la même face de la molécule : la configuration du C-1 étant définie, celles de C-2 et C-3 peuvent donc être déduites directement. D'autre part, les couplages entre H-3/H$_b$-5 et H$_3$-16/H$_a$-5 indiquent que H-3 et H$_3$-16 se trouvent de part et d'autre du plan moyen de **Ds3** impliquant ainsi une géométrie *trans* pour le groupement époxyde.

L'ensemble de ces données a permis de déterminer le composé **Ds3** comme étant le (1*S**, 2*S**, 3*S**, 4*S**, 7*E*, 11*S**, 12*R**) 3,4-époxy-2,18-dihydroxydolabell-7-ène.

*II.2.4. Analyse structurale du composé **Ds4***

Le composé **Ds4** est une substance optiquement active ($[\alpha]_D^{25}$ = +45°) ayant l'apparence d'une huile jaune. Son spectre UV-visible ne présente aucune bande d'absorption significative. La formule brute de **Ds4** – $C_{20}H_{34}O_2$ – a été déterminée à partir de son analyse par HRMS donnant un ion adduit $[M+Na]^+$ à *m/z* 329,2464 (valeur calculée : *m/z* 329,2457). La comparaison des données RMN du composé **Ds3** avec celles de **Ds4** montre une très grande similitude (cf Tableau 10) : la seule différence notable se situe au niveau du C-2 qui était oxygéné dans **Ds3** et qui ne l'est plus dans **Ds4**.

C	δ_C **Ds3**	δ_C **Ds4**	$\Delta\delta_C$
1	48,4	43,7	-4,7
2	**81,7**	**41,3**	**-40,4**
3	66,3	64,0	-2,3
4	63,9	62,5	-1,4
5	39,9	38,8	-1,1
6	24,3	24,4	0,1
7	125,6	125,9	0,3
8	133,6	134,0	0,4
9	37,8	37,6	-0,2
10	33,7	32,5	-1,2
11	37,2	41,2	4,0
12	61,3	61,0	-0,3
13	27,0	26,3	-0,7
14	44,3	44,7	0,4
15	23,2	23,2	0,0
16	17,6	16,8	-0,8
17	16,6	16,3	-0,4
18	73,4	72,4	-1,0
19	30,14	28,0	-2,1
20	30,06	30,7	0,6

Tableau 10 : *Comparaison entre les déplacements chimiques de RMN ^{13}C de **Ds3** et **Ds4***

Sachant que la formule brute de ces composés ne diffère que par la présence d'un atome d'oxygène supplémentaire pour **Ds3**, **Ds4** a donc rapidement été identifié comme étant le pendant déhydroxylé en C-2 de **Ds3**. Compte-tenu des corrélations NOE observées pour **Ds4** et de la similitude des déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C, la stéréochimie proposée pour **Ds4** est identique à celle de **Ds3** (cf Figure 69).

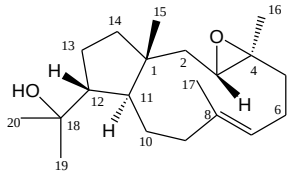


Figure 69 : *Structure du composé **Ds4***

Le composé **Ds4**, identifié comme étant le 3,4-époxy-18-hydroxydolabell-7-ène, présente la stéréochimie suivante : 1*R**, 3*S**, 4*S**, 7*E*, 11*S**, 12*R**[11].

*II.2.5. Analyse structurale du composé **Ds5***

Le composé **Ds5** a été purifié sous la forme d'une huile jaune optiquement active ($[\alpha]_D^{25}$ = -12°) et ne présente aucune bande d'absorption significative sur son spectre UV-visible. Le spectre IR de **Ds5** montre, outre la bande caractéristique des fonctions alcools (3283 cm^{-1}), deux bandes à 1732 et 1683 cm^{-1} correspondant à une fonction ester et un groupement carbonyle conjugué. Les premières expériences réalisées en RMN ^1H et ^{13}C montrent que **Ds5** est un dérivé terpénique qui possède une structure chimique beaucoup plus complexe que les molécules précédentes (**Ds1**-**Ds4**). En effet, le spectre RMN ^1H montre un grand nombre de signaux : huit groupements méthyles (cinq singulets et trois doublets) sont visibles (cf Figure 70) alors qu'un diterpène n'en comporte généralement que quatre ou cinq. Cette tendance est confirmée par la présence de 40 signaux sur le spectre RMN ^{13}C de **Ds5**.

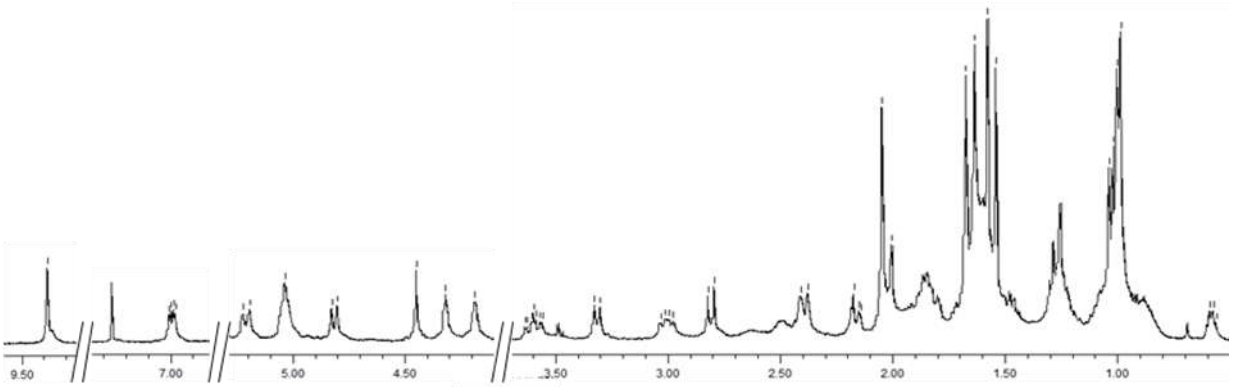


Figure 70 : *Spectre RMN ^1H du composé **Ds5***

[11] Du fait de la perte du groupement hydroxyle en C-2, la configuration de l'atome de carbone C-1 a été intervertie en passant de **Ds3** à **Ds4** mais la stéréochimie de la molécule reste cependant inchangée.

Dans un premier temps, l'hypothèse d'un mélange de deux diterpènes a été avancée mais l'étude de cet échantillon par spectrométrie de masse à haute résolution (HR-ESI/MS) a conduit à la détection d'un seul ion $[M+H]^+$ à *m/z* 637,4464. Ce résultat, en accord avec la formule brute $C_{40}H_{60}O_6$ (valeur calculée : *m/z* 637,4468), semble indiquer que **Ds5** possède une structure *bis*-diterpénique comprenant onze degrés d'insaturation.

L'étude du spectre RMN ^{13}C révèle la présence de 12 atomes de carbone hybridés sp² engagés dans deux groupements carbonyles (δ_C 174,9 et 197,3 ppm) et cinq doubles liaisons carbone-carbone (δ_C 124,7, 124,8, 125,1, 131,0, 131,3, 132,3, 138,6, 151,1, 159,8 et 164,2 ppm). Quatre protons éthyléniques (δ_H 5,04, m ; 5,04, m ; 5,21, d, 12,0 Hz et 6,99 ppm, dd, 9,0 et 3,5 Hz) sont associés à ces dernières. Ces signaux ne présentant aucune corrélation entre eux sur le spectre COSY ^1H-^1H, nous sommes donc en présence de quatre doubles liaisons trisubstituées et d'une double liaison tetrasubstituée.

Par ailleurs, le signal représentant la première fonction carbonyle (δ_C 174,9 ppm, C-18') est impliqué dans un groupement γ-butyrolactone *α,β* insaturé. La présence de ce groupement est confirmée : (i) par le déplacement chimique de C-18' (δ_C 174,9 ppm) qui correspond bien à celui d'une lactone conjuguée ; (ii) par les corrélations HMBC entre C-2' (δ_C 132,3 ppm), C-1' (δ_C 164,2 ppm), C-18' et H-19' (δ_H 4,45 ppm) (cf Figure 71 en bleu).

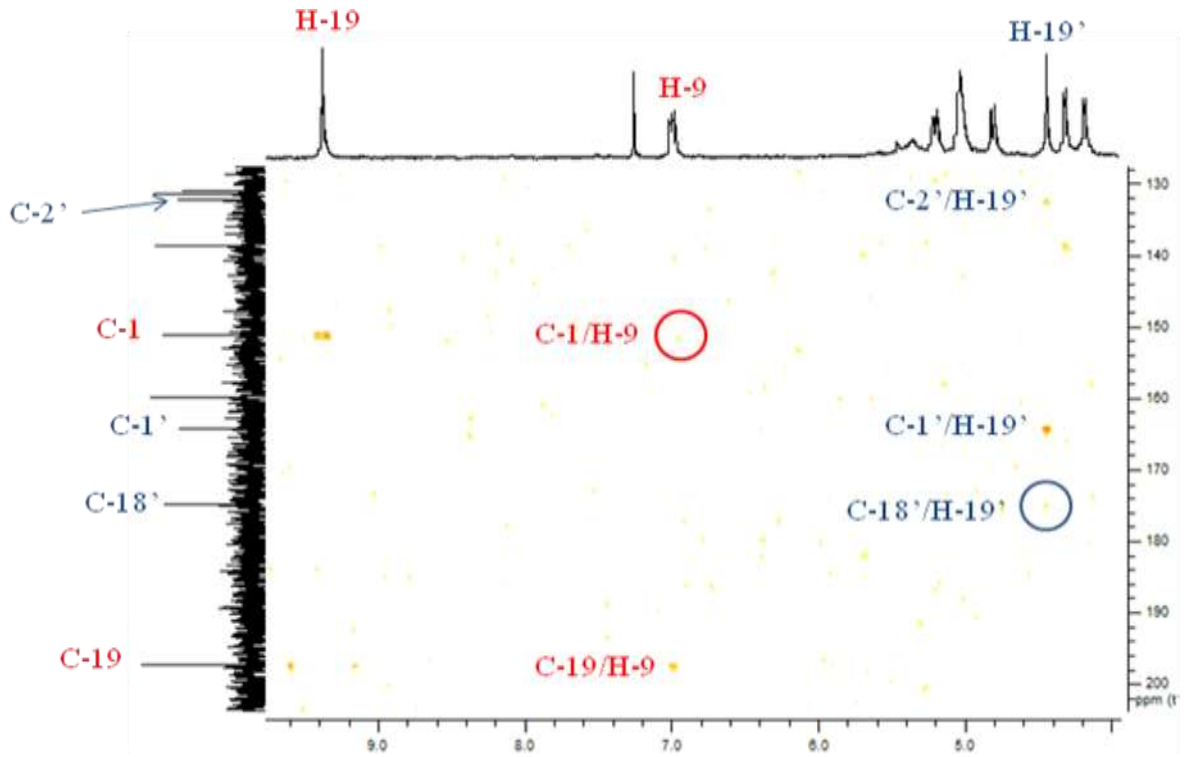


Figure 71 : *Détail du spectre HMBC du composé* ***Ds5***

Le second groupement carbonyle (δ_C 197,3 ppm, δ_H 9,38 ppm) est en réalité une fonction aldéhyde *α,β* insaturée-*α,α,β*-trisubstituée, en témoigne la corrélation en COSY ^{1}H-^{1}H entre les signaux à δ_H 6,99 (H-9) et 9,38 ppm (H-19) et les corrélations HMBC entre C-1 (δ_C 151,1 ppm), C-19 (δ_C 197,3 ppm) et H-9 (cf Figure 71 en rouge).

La présence de deux chaines latérales terpéniques de type 6-méthylhept-5-én-2-yle, communes aux diterpènes appartenant aux groupes I et II, a été identifiée. Elles sont, entre autres, représentées par les signaux correspondant aux trois groupements méthyles (δ_H 1,03, 1,58, et 1,67 ppm, d'une part, et δ_H 0,99, 1,54, et 1,64 ppm, d'autre part) et au proton éthylénique (δ_H 5,04 ppm dans les deux cas). De plus, la présence d'un groupement cyclopropane est révélée par l'existence de signaux fortement blindés en RMN ^{13}C (δ_C 7,3 ppm, d, C-8') et ^{1}H (δ_H 0,58 ppm, H_a-8' ; 0,93, H_b-8' ; et 1,00 ppm, H-7'). Enfin, trois atomes de carbone oxygénés supplémentaires (δ_C 65,5, 70,6 et 75,1 ppm) portant chacun un atome d'hydrogène (respectivement δ_H 4,81, 4,19 et 4,32 ppm) ont été référencés.

a/ Identification des deux parties diterpéniques de **Ds5**

L'analyse des spectres DEPT a permis de recenser pour la structure de **Ds5** : (i) 8 méthyles, (ii) 8 méthylènes, (iii) 17 méthines et (iv) 7 atomes de carbone quaternaires. Plus précisément, le spectre DEPT 135 présente deux signaux particulièrement caractéristiques (cf Figure 72) :

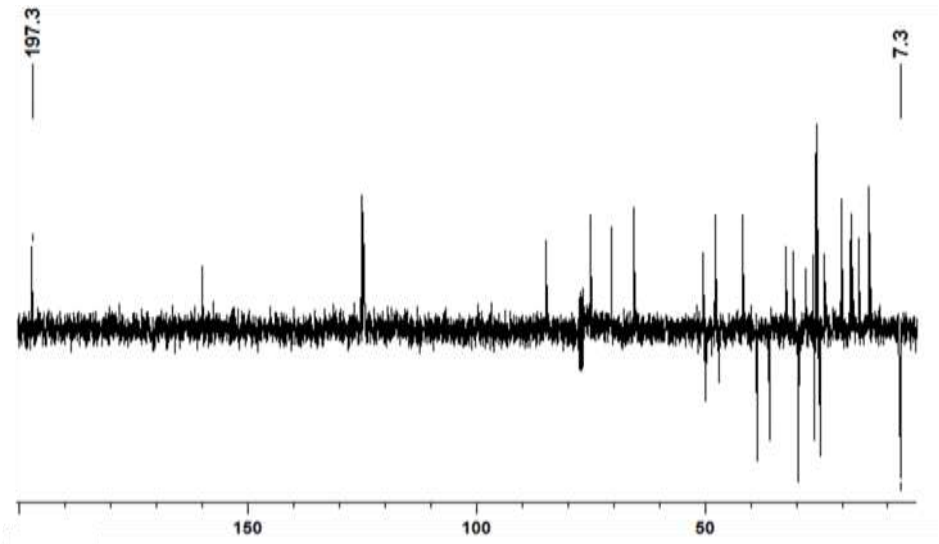
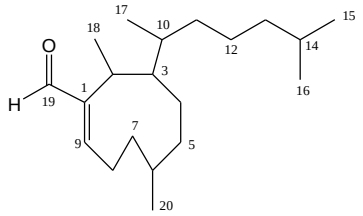
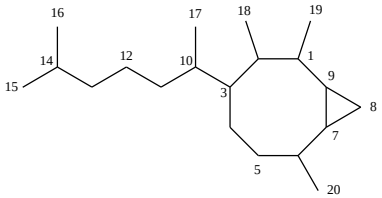


Figure 72 : *DEPT 135 du composé* ***Ds5***

- ✓ Le signal à δ_C 197,3 ppm, correspondant à un méthine, est associé au singulet à δ_H 9,38 ppm sur le spectre HSQC : il révèle la présence d'une fonction aldéhyde *α,β*-insaturée (δ_C > 200 ppm pour un aldéhyde saturé). Au sein de l'ensemble des diterpènes isolés à partir d'algues appartenant au genre *Dictyota*, cette fonction chimique n'a été recensée que dans le groupe des xénicanes.



- ✓ Le signal très blindé à δ_C 7,3 ppm, correspondant à un méthylène et associé au multiplet à δ_H 0,58 ppm sur le spectre HSQC, est typique d'un groupement cyclopropane. Si seuls les diterpènes issus de Dictyotales sont pris en compte, cette particularité structurale n'est présente que dans des structures diterpéniques présentant un squelette carboné de type crénulide.



L'étude approfondie des corrélations longue distance obtenues à l'aide des spectres COSY ^{1}H-^{1}H et HMBC de **Ds5** a ensuite permis l'identification formelle de ces squelettes à partir de ces groupements caractéristiques.

Concernant la partie xénicane, le proton H-9 (δ_H 6,99 ppm) identifié précédemment présente de forts couplages sur le spectre COSY ^{1}H-^{1}H avec H_a-8 (δ_H 3,00 ppm) et H_b-8 (δ_H 3,60 ppm). Ces mêmes protons possèdent des couplages avec H-7 (δ_H 5,21 ppm), ce qui confirme bien que C-8 est situé en α de deux doubles liaisons ($\Delta^{9,1}$ et $\Delta^{6,7}$). Les corrélations présentes sur le spectre HMBC entre le groupement méthyle H_3-20 (δ_H 2,05 ppm, s) et C-7 (δ_C 125,1 ppm), C-6 (δ_C 138,6 ppm) et C-5 (δ_C 49,8 ppm) donnent la substitution complète de cette double liaison. Le couplage entre H_a-5 (δ_H 2,16 ppm), H_b-5 (δ_H 2,39 ppm) et H-4 (δ_H 4,32 ppm) visible sur le spectre COSY ^{1}H-^{1}H permet de situer un premier groupement méthine oxygéné (δ_C 75,1 ppm, C-4). Cet atome de carbone possède des corrélations HMBC avec H-3 (δ_H 2,00 ppm) et H-2 (δ_H 3,31 ppm). Enfin, la corrélation HMBC entre H-2 et C-1 permet d'achever la construction du cycle à 9 atomes de carbone. La chaîne latérale a été positionnée en C-3 grâce à l'observation d'une forte corrélation HMBC entre H_3-17 (δ_H 2,05 ppm) et C-3.

Concernant la partie crénulide, le groupement cyclopropane est constitué des atomes de carbone C-9' (δ_C 14,1 ppm), C-8' (δ_C 7,3 ppm) et C-7' (δ_C 26,5 ppm). Les corrélations HMBC existant entre H_3-17' (δ_H 0,99 ppm, d) et C-5' (δ_C 46,8 ppm), C-6' (δ_C 27,9 ppm) et C-7' ainsi que le fort couplage entre H_a-5' (δ_H 1,61 ppm), H_b-5' (δ_H 1,81 ppm) et H-4' (δ_H 4,19 ppm) permettent de situer un second groupement

méthine oxygéné. Parallèlement, le proton H-3' (δ_H 2,81 ppm) présente des corrélations HMBC avec : (i) l'atome de carbone C-10' (δ_C 30,6 ppm) qui appartient à la chaîne latérale, (ii) les atomes de carbone C-2' (δ_C 132,3 ppm), C-1' (δ_C 164,2 ppm) et C-18' (δ_C 174,9 ppm) qui appartiennent au groupement γ-butyrolactone *α,β* insaturé identifié précédemment. L'assemblage de ces deux fragments, *via* la formation de liaison en C-3/C-4 et en C-1/C-9 permet donc l'obtention du squelette crénulide.

Finalement, on obtient les deux parties diterpéniques suivantes (cf Figure 73) :

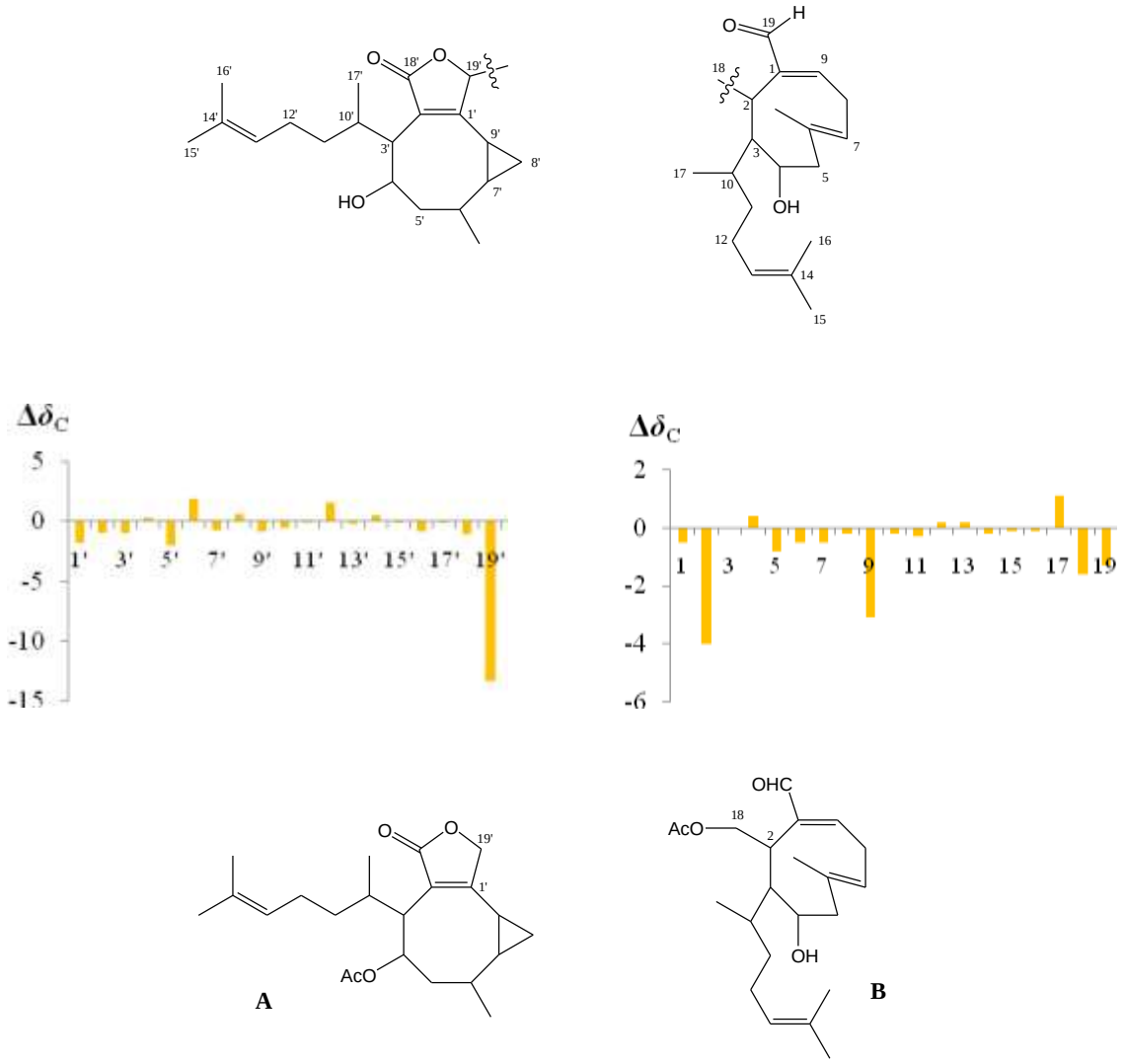


Figure 73 : *Comparaison entre les données RMN ^{13}C du composé **Ds5** et celles de l'isoacétylcrénulatine (**A**) [155] et de l'hydroxyacétyldictyolal (**B**) [53]*

Les données RMN de la partie crénulide présentent de très fortes similarités avec celles de l'isoacétylcrénulatine (**A**, cf Figure 73), un diterpène précédemment isolé à partir de l'algue brune *Pachydictyon coriaceum* [155] (aujourd'hui appelé *Dictyota coriacea* [7]). Les faibles différences de déplacements chimiques observées au niveau de C-3', C-5' et C-6' proviennent simplement de la

présence d'une fonction acétate à la place de la fonction alcool sur l'atome de carbone C-4' du composé **Ds5**. Les autres différences visibles se situent au niveau de C-1' et surtout de C-19'. En effet, en plus des variations observées en RMN ^{13}C, l'analyse des spectres DEPT montre que C-19' est un méthine et non pas un méthylène comme dans le cas de l'isoacétylcrénulatine : ces résultats expérimentaux sont en accord avec le fait que la jonction entre les deux parties diterpéniques puisse s'effectuer par le biais de cet atome de carbone.

L'autre partie diterpénique de **Ds5** est constituée par un squelette xénicane pour lequel les données expérimentales de RMN sont extrêmement proches de celles de l'hydroxyacétyldictyolal, un composé préalablement décrit à partir de *Dictyota dichotoma* [53]. Entre ces deux structures chimiques, la comparaison des spectres DEPT montre que seule la multiplicité du C-18 est modifiée : elle passe de méthylène, dans le cas de l'hydroxyacétyldictyolal, à méthine pour le composé **Ds5**. Sur les spectres RMN ^{13}C, les différences les plus significatives sont observées pour C-2, C-9 et C-19, c'est-à-dire des atomes qui se trouvent à proximité immédiate de C-18. Il est dès lors vraisemblable que la jonction de cette partie xénicane avec la partie crénulide puisse être réalisée *via* l'atome de carbone C-18.

b/ Liaison entre les deux parties diterpéniques de **Ds5**

Après avoir identifié la structure plane des deux unités diterpéniques qui constituent le squelette du composé **Ds5**, la nature de la liaison entre ces deux parties doit être explicitée. Pour cela, une attention particulière a été portée sur les données RMN relatives aux atomes situés à proximité de cette jonction, c'est-à-dire les atomes de carbones C-18 et C-19', ainsi que les atomes situés à proximité.

Tout d'abord, les déplacements chimiques des signaux correspondant en RMN ^{1}H et ^{13}C à C-18 (δ_C 65,5 ppm ; δ_H 4,81 ppm, d, 9,5 Hz) et C-19' (δ_C 84,6 ppm ; δ_H 4,45 ppm, s) indiquent que ces deux atomes de carbone sont deux méthines oxygénés. Les corrélations observées sur le spectre HMBC entre H-19'/C-1', C-2' et C-18' permettent de localiser sans ambiguïté C-19' au sein de la γ-butyrolactone α,β-insaturée, tandis que la corrélation H-19'/C-18 confirme l'hypothèse d'une jonction des deux parties diterpéniques *via* une liaison entre C-18 et C-19' (cf Figure 74). D'autre part, les corrélations supplémentaires observées entre C-2/H-18 sur le spectre HMBC (cf Tableau 11) et entre H-18/H-19' sur le spectre COSY ^{1}H-^{1}H (cf Figure 75) sont en accord avec la jonction proposée.

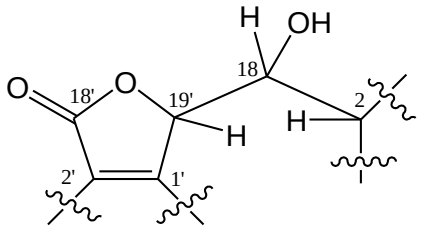


Figure 74 : *Représentation de la jonction entre les deux parties diterpéniques de* ***Ds5***

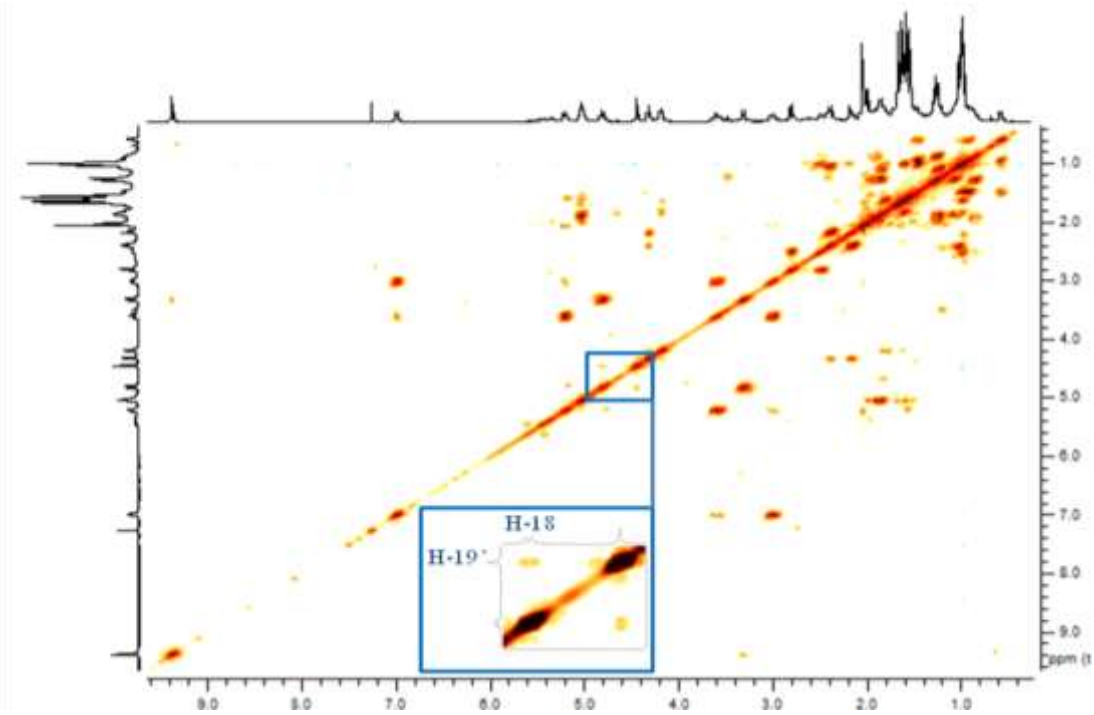


Figure 75 : *Spectre COSY ^{1}H-^{1}H du composé* ***Ds5***

En définitive, la structure plane du composé **Ds5** correspond à celle d'un *bis*-diterpène disymétrique présentant une jonction entre deux atomes de carbone (cf Figure 76). Ce nouveau métabolite est original par plusieurs aspects. Tout d'abord, même si plusieurs *bis*-diterpènes ont été décrits à partir d'organismes marins, et en particulier de gorgones, ce type de structures chimiques reste rare et aucun composé de ce type n'a encore été isolé à ce jour à partir d'une algue. De plus, la jonction entre les parties diterpéniques, formée par une liaison C-C, n'est pas courante. Cependant, la formation de cette liaison, probablement *via* un processus enzymatique (cf Schéma 8), est rendue possible par la présence :

- d'un groupement γ-butyrolactone *α,β* insaturé sur la partie crénulide présent par exemple sur l'isoacétylcrénulatine (cf Figure 73),
- d'une fonction aldéhyde en C-18 sur la partie xénicane présente par exemple sur les composés **D27** et **D28** (cf Figure 28).

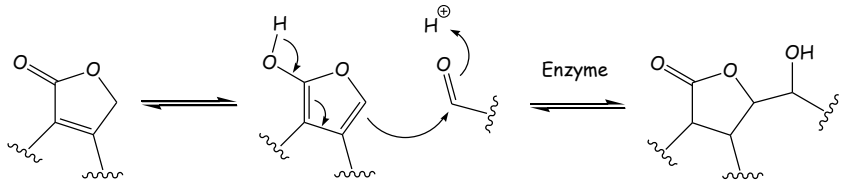


Schéma 8 : *Hypothèse de l'origine biosynthétique du composé* ***Ds5***

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H	NOESY ^{1}H-^{1}H
1	151,1	C				
2	41,8	CH	3,31 d (9,5)	C19, C1, C18, C3, C4, C10	H18, H19	H20, H3, H18, H8b, H15, (H19')
3	50,4	CH	2,00 br s	C1, C2, C18, C10, C17, C11, C4		H7, H4, H2, H10, H5a, H11a, H12
4	75,1	CH	4,32 br s	C6, C2	H5a, H5b	H17, H5a, H5b, H3, H15, H11a, H11b
5	49,8	CH_2	a : 2,16 dd (13,0, 3,5)		H5b, H4	H5b, H7, H4, H3
			b: 2,39 m	C7, C6, C4	H5a, H4	H5a, H4, H20
6	138,6	C				
7	125,1	CH	5,21 d (12,0)	C20	H8b, H20, H8a	H3, H5a, H8a, (H8b)
8	29,5	CH_2	a : 3,00 br dd (13,0, 3,5)	C9, C1, C6, C7	H8b, H9, (H7)	H8b, H9, H7,
			b : 3,60 ddd (15,0, 12,0, 3,5)		H8a, H7, H9	H8a, H20, H2, (H9, H7)
9	159,8	CH	6,99 dd (9,0, 3,5)	C19, C2, C1	H8a, H8b, H10	H19, H8a, (H8b)
10	32,3	CH	2,39 m	C4, C5, C11, C12	H17, H9	H17, H11b, H18, H12, H3
11	38,5	CH_2	a : 1,08 m		H11b, H12	H4, H3, H12, H11b
			b : 1,24 m	C12, C6	H11a, H12	H4, H10, H3, H17, H11a, H12
12	26,1	CH_2	1,86 m	C13, C14	H11a, H11b, H13	H17, H3, H13, H10, H11a, H11b
13	124,7	CH	5,04 m	C16, C15	H12	H16, H12
14	131,3	C				
15	17,7	CH_3	1,58 s	C13, C14, C16		H4, H2
16	25,6	CH_3	1,67 s	C13, C14, C15		H13
17	16,5	CH_3	1,03 d (7,0)	C3, C10, C11	H12	H18, H4, H10, H11b, H8'a?
18	65,5	CH	4,81 d (9,5)	C2, C19'	H2, H19'	H8'a, H17, H10, H19', H2
19	197,3	CH	9,38 s	C1, C2	H2	H9
20	20,2	CH_3	2,05 s	C7, C6, C5, C9	H7	H2, H8b, H5b
1'	164,2	C				
2'	132,3	C				
3'	47,8	CH	2,81 d (11,5)	C18', C1', C10', C2'	H10'	H4', H17/H20', H16', H9', H11'a, H10'
4'	70,6	CH	4,19 br s		H5'b, H5'a	H17'/H20', H5'a, H5'b, H3', H10'
5'	46,8	CH_2	a : 1,61 m		H5'b, H4', H20'/H7'	H5'b, H4'
			b : 1,81 m		H5'a, H4', H20'/H7'	H5'a, H4', H20', H6'?
6'	27,9	CH	1,60 m		H20', H7'	H5'b?
7'	26,5	CH	1,00 m		H9', H6'	H8'b
8'	7,3	CH_2	a : 0,58 ddd (5,0, 5,0, 5,0)		H8'b, H9'	H8'b, H18, H9', H7'/H17
			b : 0,93 m		H8'a, H9'	H8'a, H9'
9'	14,1	CH	1,48 m	C5'	H8'a, H8'b, H7'	H3', H8'b, H8'a, H17'/H20', H19'
10'	30,6	CH	2,49 m		H3', H17'	H17', H4', H3'
11'	35,7	CH_2	a : 0,86 m		H11'b, H12'	H11'b, H3', H12'
			b : 1,26 m	C11'	H11'a, H12'	H11'a
12'	24,8	CH_2	1,93 m	C13'	H11'b, H11'a	H17', H11'a
13'	124,9	CH	5,04 m	C15', C16'	H11'	
14'	131,0	C				
15'	17,6	CH_3	1,54 s	C13', C14', C16'		
16'	25,6	CH_3	1,64 s	C13', C14', C15'		H13'
17'	18,1	CH_3	0,99 d (6,5)	C3', C10', C11'	H10'	H10', H12', H4'?, H3'?, H9'?
18'	174,9	C				
19'	84,6	CH	4,45 s	C2', C1', C18'	H18	H18, H9', (H2)
20'	23,8	CH_3	0,99 d (6,5)	C7', C6', C5'	H6'	H5'b, H4'?, H3'? H9'

Tableau 11 : *Données RMN (1D et 2D) du composé* ***Ds5***

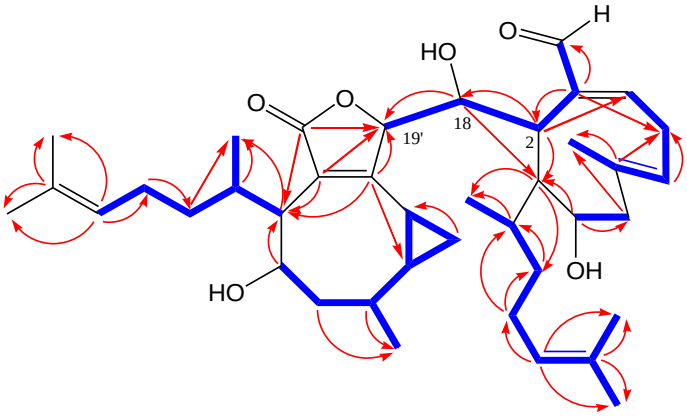


Figure 76 : *Représentation des principaux couplages en COSY ^{1}H-^{1}H (▬) et HMBC (⌒ de C à H) du composé* ***Ds5***

c/ Détermination de la stéréochimie relative de **Ds5**

Malgré le fait que le composé **Ds5** présente trois fonctions alcool secondaire, en C-4, C-4' et C-18, les faibles quantités isolées (moins de 3 mg) n'ont pas permis d'appliquer la méthode de Mosher modifiée en vue de la détermination de la configuration absolue de ces stéréocentres. Pour la même raison, aucun monocristal de qualité suffisante n'a pu être obtenu pour une analyse structurale par diffraction des rayons X. Dans un premier temps, la configuration relative de différents carbones asymétriques présents dans la structure chimique de **Ds5** a néanmoins été étudiée à l'aide des corrélations NOE et par comparaison des données spectrales de **Ds5** avec celles de composés similaires.

Dans le cas de la partie xénicane, la géométrie des doubles liaisons $\Delta^{1,9}$ et $\Delta^{6,7}$ a été définie comme étant *E* sur la base de l'observation de corrélations NOE entre H-9/H-19 pour la première, et entre H_b-8/H_3-20 et H_a-5/H-7 pour la seconde. Dans ce même fragment diterpénique, les corrélations NOE entre H-3/H_a-5, H-3/H-7 et H-7/H_a-8 permettent de placer l'ensemble de ces protons sur la même face du cycle xénicane tandis que les corrélations entre H-2/H_b-8, H-2/H_3-20 et H_b-5/H_3-20 positionnent ce deuxième jeu de protons sur la face opposée. Ces informations sont en accord avec les résultats obtenus avec des diterpènes de la même famille déjà isolés à partir d'algues de la famille des Dictyotaceae, tels que l'hydroxyacétyldictyolal [53], **Ds1** [156] ainsi que de nombreux autres xénicanes [54, 56-58].

Pour la partie crénulide, les corrélations observées sur le spectre NOESY ^{1}H-^{1}H entre H_3-20'/H-3', H-4', H_b-5' et H-9' permettent de justifier que tous ces protons soient positionnés sur la même face du cycle crénulide. D'autre part, la configuration relative du groupement cyclopropane et du centre asymétrique en C-19' sont déduites par l'intermédiaire des corrélations entre H-9'/H_b-8', H-7'/H'_b-8 et H-9'/H-19'. Comme précédemment, ces résultats sont en accord avec la configuration relative du

macrocycle habituellement obtenue pour les composés similaires issus de ce type de macro-algues [63, 155, 157-158].

Enfin, même si la détermination de la stéréochimie en C-10 et C-10' n'a pas pu être réalisée, en considérant que l'ensemble des études précédentes portant sur ce type de diterpènes a conduit à l'obtention d'une configuration *R* [53, 63], il parait probable d'un point de vue biosynthétique que ces stéréocentres présentent cette même configuration au sein de **Ds5**.

Concernant le stéréocentre en C-18, son analyse stéréochimique n'a pas pu être envisagée à l'aide des seules corrélations NOE en raison de la possibilité de libre rotation au niveau des liaisons C-2/C-18 et C-18/C-19'. Une analyse par modélisation moléculaire a donc été mise en œuvre en se basant sur les données RMN expérimentales particulières au proton H-18, à savoir (cf Figure 77) :

- ✓ Une grande valeur (9,5 Hz) pour la constante de couplage entre H-18 et H-2.
- ✓ Une valeur faible (moins de 2 Hz) pour la constante de couplage entre H-18 et H-19'.
- ✓ L'observation d'une forte corrélation entre H-18/H-8'a sur le spectre NOESY ^{1}H-^{1}H.

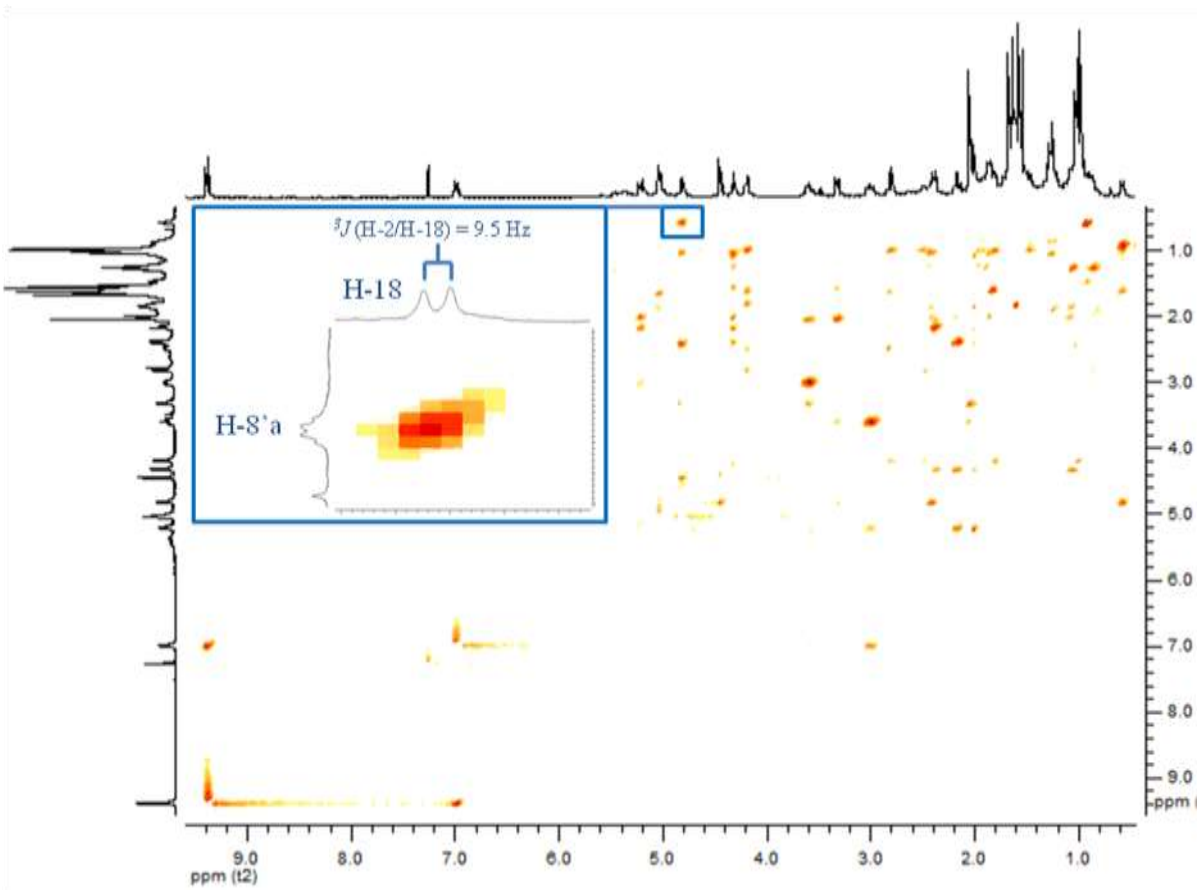


Figure 77 : *Spectre NOESY ^{1}H-^{1}H du composé* ***Ds5***

Huit stéréoisomères ont ensuite été modélisés en faisant varier les configurations en C-2, C-18 et C-19'. Pour chaque combinaison, les configurations des autres stéréocentres de **Ds5** ont été modifiées successivement afin de maintenir les configurations relatives obtenues précédemment au sein de chaque partie diterpénique : par rapport à la configuration de C-2 dans le fragment xénicane et par rapport à la configuration de C-19' dans le fragment crénulide. Chaque structure tridimensionnelle a ensuite été optimisée par modélisation moléculaire, puis à l'aide de calculs semi-empiriques afin d'obtenir pour chaque stéréoisomère la conformation la plus stable. Plusieurs paramètres discriminants calculés ont été rassemblés dans le Tableau 12 afin d'être comparés aux données RMN expérimentales.

On peut remarquer que deux stéréoisomères (en gras dans le Tableau 12) présentent des paramètres qui concordent avec les données RMN expérimentales. A l'issue de cette étude, il s'avère donc impossible d'attribuer une configuration, même relative, à l'atome de carbone asymétrique en C-18 (cf Figure 78).

Stéréoisomère	Φ (H-18, H-19')	^3J (Hz)[a]	Φ (H-2, H-18)	^3J (Hz)[a]	$d_{H\text{-}18/H\text{-}8'a}$ (Å)
2*S*, 18*R*, 19'*R*	-98,4°	1,6	101,3°	1,7	1,8
2*S*, 18*R*, 19'*S*	170,5°	9,8	-59,9°	3,5	5,0
2*S*, 18*S*, 19'*R*	93,5°	0,9	-112,5°	1,9	4,4
2*S*, 18*S*, 19'*S*	77,5°	0,2	92,3°	0,8	4,0
2*R*, 18*R*, 19'*R*	**-80,5°**	**0,4**	**-175,1°**	**10,6**	**1,8**
2*R*, 18*R*, 19'*S*	165,9°	8,7	78,0°	0,8	2,7
2*R*, 18*S*, 19'*R*	-175,0°	9,9	-63,5°	1,5	2,8
2*R*, 18*S*, 19'*S*	**63,5°**	**2,0**	**175,6°**	**10,6**	**2,2**
Données RMN		<2		9,5	Corrélation NOE

[a] : Les constantes de couplage ont été estimées à l'aide du logiciel MestReJ

Tableau 12 : *Paramètres théoriques calculés pour le conformère le plus stable (optimisé par modélisation moléculaire) de plusieurs diastéréoisomères de **Ds5***

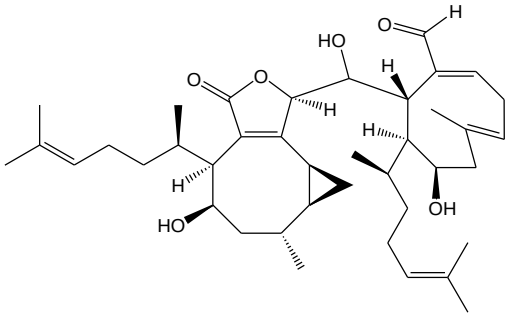


Figure 78 : *Structure du composé **Ds5***

II.2.6. Autres composés connus

En plus de ces cinq métabolites originaux, sept autres composés, précédemment isolés à partir d'algues du genre *Dictyota*, ont été purifiés à partir de ces mêmes extraits de *Dictyota* sp.

a/ Analyse structurale du composé **Ds6**

Le composé **Ds6** est le métabolite majoritaire dans l'extrait brut de *Dictyota* sp. Obtenu sous la forme d'une huile jaune optiquement active ($[\alpha]_D^{25}$ = +28°), **Ds6** ne présente pas de bande d'absorption sur son spectre UV-Visible. En IR, le spectre de **Ds6** comporte une bande large à 3365 cm^{-1} montrant la présence d'une ou plusieurs fonctions alcool. L'analyse du spectre RMN ^{13}C de **Ds6** permet de comptabiliser 20 signaux : ceci autorise de statuer rapidement quant à la nature diterpénique de ce composé. En particulier, les spectres de RMN ^{1}H, ^{13}C, HSQC et HMBC, indiquent la présence : (i) d'un groupement vinyle (δ_C 151,9 (C-10) et 107,5 ppm (C-18) ; δ_H 4,75 et 4,77 ppm ($H_{a,b}$-18)) et (ii) d'une chaîne latérale terpénique, caractéristique des diterpènes appartenant aux groupes I et II, mise en évidence par le biais d'une double liaison trisubstituée portant deux groupements méthyles (δ_C 124.3 (C-14), 131.8 (C-15), 25.7 (C-16) et 17.6 ppm (C-20) ; δ_H 5.14 (H-14), 1.68 (H-16), 1.61 ppm (H-20)). Les seuls métabolites isolés d'algues du genre *Dictyota* et comportant à la fois un groupement vinyle et une chaîne latérale possèdent le squelette hydroazulénique du dictyane. La comparaison des données RMN de **Ds6** avec celles issues de la littérature pour des composés de ce type [78] a montré que la structure du composé **Ds6** correspondait à celle du dictyol E (cf Figure 79).

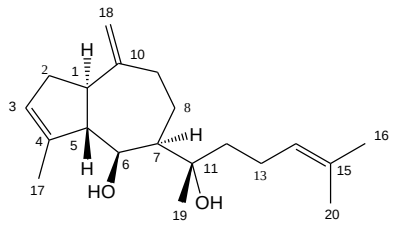


Figure 79 : *Structure du composé **Ds6***

Ce métabolite a précédemment été décrit à partir d'échantillons de *D. dichotoma* et *D. linearis* récoltés en Méditerranée [77-78].

b/ Analyse structurale du composé **Ds7**

Ds7 est un composé optiquement actif ($[\alpha]_D^{25}$ = -8°) isolé sous forme d'une huile jaune pâle. Son spectre UV-visible présente une bande d'absorption à 206 nm (ε 3980) tandis que son spectre IR comporte une bande intense à 1734 cm^{-1} accompagnée d'une seconde bande à 1242 cm^{-1}, indiquant la présence d'un groupement carbonyle. Cette dernière caractéristique liée à la présence de 22 signaux sur le spectre RMN ^{13}C, dont un à δ_C 169,1 ppm, indique que **Ds7** correspond certainement à une

structure diterpénique acétylée. De plus, une chaîne latérale de type 2-(2-hydroxypropyle) a été identifiée grâce à des signaux caractéristiques en RMN ^{1}H (δ_H 1,19 (s, 3H) et 1,26 ppm (s, 3H)) et ^{13}C (δ_C 22,6 (q), 31,8 (q) et 73,0 (s) ppm). Ce groupement, classique chez les dolabellanes, a été précédemment identifié au niveau des composés **Ds2**, **Ds3** et **Ds4**. L'étude approfondie des différents spectres RMN 1D et 2D a permis l'obtention de la structure de **Ds7** qui, après comparaison avec la littérature, s'avère être le 10-acétoxy-18-hydroxydolabella-2,7-diène (cf Figure 80).

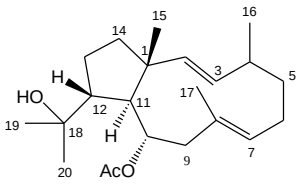


Figure 80 : *Structure du composé **Ds7***

Ce composé, initialement isolé à partir du lièvre de mer *Dolabella californica* [67, 81], a été ensuite souvent décrit à partir de différentes algues brunes appartenant au genre *Dictyota* [77, 80, 159-160] dont *D. dichotoma* [77, 80] et *D. linearis* [77].

c/ Analyse structurale du composé **Ds8**

Le composé **Ds8**, isolé sous la forme d'une huile jaune pâle, constitue un métabolite minoritaire dans les extraits de *Dictyota* sp. Une première analyse des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C de **Ds8** a permis d'identifier ce composé comme étant un diterpène acétylé (22 signaux sur le spectre de RMN ^{13}C) et de mettre en évidence une fonction aldéhyde α,β insaturée (δ_C 196,3 ppm (C-19) ; δ_H 9,30 ppm (H-19)). Une étude plus approfondie de ces spectres a conduit à l'observation d'une grande analogie avec ceux des composés **Ds1** et **Ds5** : la comparaison des données RMN de **Ds8** avec celles issues de la littérature a rapidement permis d'identifier le composé **Ds8** comme étant l'hydroxyacétyldictyolal (cf Figure 81), une molécule déjà largement étudiée dans le cadre de l'identification des composés **Ds1** et **Ds5**.

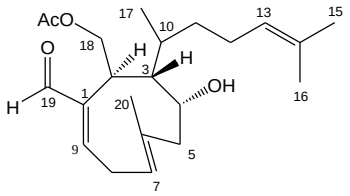


Figure 81 : *Structure du composé **Ds8***

Ce métabolite a initialement été purifié à partir d'échantillons de *D. dichotoma* récoltés au Japon [53]. Une étude plus récente décrit également sa présence dans des extraits de cette même algue récoltée en Méditerranée [77].

d/ Analyse structurale du composé **Ds9**

Ds9 est un composé ayant l'aspect d'une huile jaune pâle dont le spectre UV-Vis présente une bande d'absorption à 230 nm (ε 2250). Sa formule brute, $C_{20}H_{30}O_3$, a été déterminée à partir de l'étude HRMS donnant l'ion adduit $[M+H]^+$ à *m/z* 319,22699 (valeur calculée : *m/z* 319,22732). Le spectre IR de **Ds9** présente des bandes d'absorption à 3459 et 1734 cm^{-1} correspondant, respectivement, à des groupements hydroxyle et carbonyle. Les données RMN ^1H et ^{13}C permettent de mettre en évidence la présence d'un cycle cyclopropane (δ_C 8,1 ppm (C-8) ; δ_H 0,35 et 1,00 ppm ($H_{a,b}$-8)) : ceci indique que **Ds9** possède très probablement un squelette crénulide. L'étude des spectres de RMN bidimensionnelle (HSQC, COSY ^1H-^1H et HMBC) et la comparaison de ces données avec celles issues de la littérature ont permis de déterminer la structure de **Ds9** comme étant celle de l'hydroxycrénulide (cf Figure 82).

L'hydroxycrénulide a été initialement isolé à partir des glandes digestives d'un lièvre de mer se nourrissant d'algues brunes du genre *Dictyota* [63], puis a été identifié dans un extrait de *D. dichotoma* récolté en Grèce [77]. Néanmoins, l'étude structurale complète réalisée dans le cadre de ce travail a permis d'apporter des rectifications dans l'attribution des données RMN par rapport à celles relevées dans la littérature (cf Tableau 13).

C	δ_C **Ds9**	δ_C hydroxycrénulide [63]
1	128,0	128,1
2	[a]	168,5
3	48,8	48,9
4	69,9	70
5	48,5	48,6
6	28,3	28,5
7	**26,0**	**10,2**
8	8,1	8,2
9	**10,1**	**26,1**
10	32,7	32,9
11	35,7	35,8
12	25,7	25,7
13	123,7	123,8
14	132,3	132,3
15	17,7	17,7
16	25,5	25,6
17	17,3	17,4
18	72,3	72,3
19	174,8	174,7
20	23,7	23,7

[a] Ce signal d'intensité trop faible, correspondant à un atome de carbone quaternaire, n'a pas été détecté.

Tableau 13 : *Comparaison des données RMN ^{13}C du composé **Ds9** avec celles de l'hydroxycrénulide*

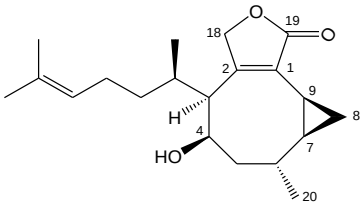


Figure 82 : *Structure du composé **Ds9***

En effet, les attributions des signaux RMN ^{13}C correspondant aux atomes de carbone C-7 et C-9, qui font tous deux partie du cyclopropane, ont été inversées par rapport à la publication d'origine. La forte corrélation observée sur le spectre HMBC entre H_3-20/C-7 ôte toute ambiguïté quant à l'attribution de C-7. Cette même erreur d'attribution a précédemment été corrigée pour plusieurs molécules très proches structuralement de l'hydroxycrénulide, tels les crénulacétals [157] ou le crénuladial [158].

e/ Analyse structurale du composé **Ds10**

Le composé **Ds10** a été isolé sous forme d'une huile jaune pâle optiquement active ($[\alpha]_D^{25}$ = +2°) et ne présente pas de bande d'absorption significative en UV-visible. Le spectre IR de **Ds10** montre une large bande d'absorption à 3420 cm^{-1} correspondant à un groupement hydroxyle. La comparaison des données RMN ^{13}C de **Ds10** avec celles des métabolites déjà isolés lors de cette étude a permis de remarquer de nombreuses similitudes entre **Ds6** (dictyol E) et **Ds10** (cf Tableau 14) : le composé **Ds10** présente donc un squelette hydroazulénique de type dictyane.

C	δ_C **Ds6** (Dictyol E)	δ_C **Ds10** (Dictyol C)
1	46,1	50,0
2	**33,7**	**33,0**
3	**124,3**	**123,4**
4	**140,8**	**142,8**
5	60,3	52,8
6	**74,3**	**74,4**
7	**48,8**	**49,2**
8	**21,5**	**19,7**
9	40,5	46,7
10	151,9	72,4
11	76,2	34,5
12	40,8	34,8
13	**23,2**	**25,5**
14	**124,3**	**124,8**
15	**131,8**	**131,5**
16	**25,7**	**25,7**
17	**15,8**	**16,3**
18	107,5	30,0
19	25,3	17,5
20	**17,6**	**17,7**

Tableau 14 : *Comparaison des données RMN ^{13}C du composé **Ds10** avec celles de **Ds6** (dictyol E)*

Les principales différences constatées entre ces deux composés se situent au niveau des atomes de carbones C-10 et C-18, d'une part, et C-11 et C-19, d'autre part. La fonction alcool portée par C-11 a disparu (δ_C 34,5 ppm au lieu de 76,2 ppm) et la double liaison entre C-10 et C-18 a été remplacée par une fonction alcool en C-10 (δ_C 72,4 ppm au lieu de 151,4 ppm). Après comparaison avec la littérature, le composé **Ds10** a été identifié comme étant le dictyol C (cf Figure 83).

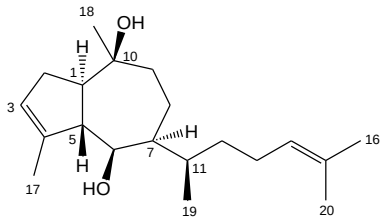


Figure 83 : *Structure du composé **Ds10***

Le dictyol C a précédemment été décrit dans un spécimen de *D. linearis* [77] ainsi qu'à partir de différents échantillons de *D. dichotoma* prélevés en Méditerranée [77-78] ou en Atlantique [80, 83].

f/ Analyse structurale du composé **Ds11**

Le composé **Ds11** a été isolé en faibles quantités sous forme d'une huile jaune pâle. L'étude des données RMN ^{1}H et ^{13}C a rapidement permis de mettre en évidence la présence d'un autre composé en mélange avec **Ds11**. Ce second métabolite, présent environ à hauteur de 20% dans le mélange d'après les mesures d'intégration des signaux en RMN ^{1}H, a été identifié comme étant le composé **Ds3**. Du fait de la faible masse de **Ds11** obtenue, l'ensemble de l'analyse structurale RMN a été effectué sur ce mélange.

Outre la présence des signaux correspondant au composé **Ds3**, non annotés sur la Figure 84, le spectre RMN ^{13}C du mélange présente une particularité : les signaux correspondant au composé **Ds11**, annotés sur la Figure 84, sont de tailles très inégales ; certains sont très fins et donc de grande taille alors que d'autres sont petits et larges. Cette observation a déjà été reportée dans la littérature [161-163] pour des métabolites de la famille des dilophanes. La grande mobilité conformationnelle du macrocycle a été avancée pour expliquer la faible résolution des signaux en RMN ^{13}C.

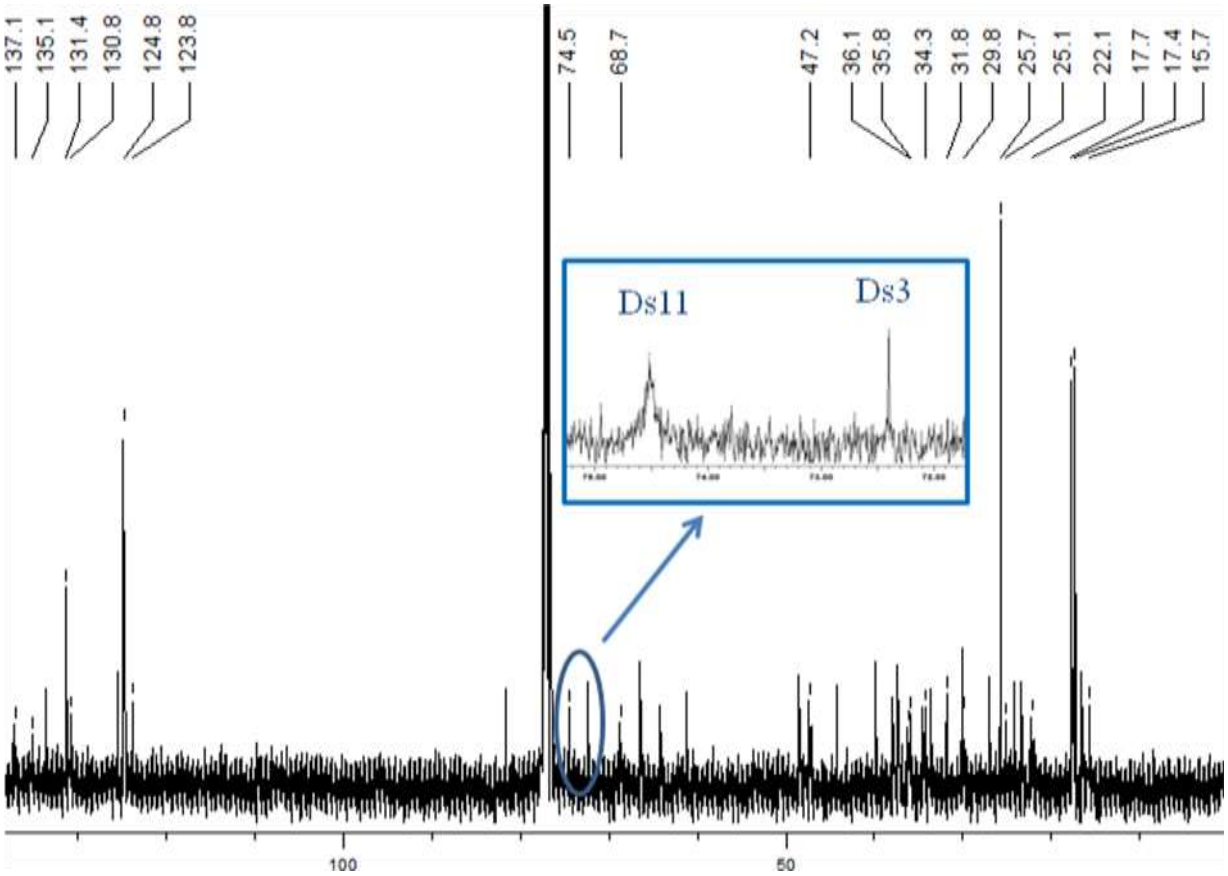


Figure 84 : *Spectre RMN ^{13}C du mélange des composés **Ds11** et **Ds3***

La comparaison de ces données RMN avec celles des différents dilophanes isolés à partir d'algues appartenant au genre *Dictyota* a permis d'identifier le composé **Ds11** comme étant le 3-hydroxydilophol (cf Figure 85).

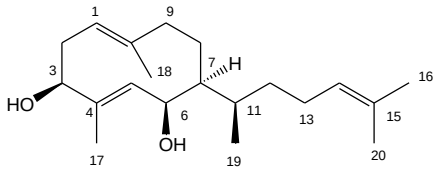


Figure 85 : *Structure du composé **Ds11***

Les cinq signaux qui présentent une intensité plus élevée (δ_C 17,4 (C-19), 17,7 (C-20), 25,7 (C-16), 124,8 (C-14) et 131,4 ppm (C-15)) sont tous situés sur la chaîne latérale : ceci tend à confirmer que le macrocycle constitué de dix atomes de carbone n'est pas assez rigide pour contraindre la molécule dans une conformation particulière.

Ce composé a été isolé à une seule reprise, en tant que produit naturel, à partir d'un échantillon australien de *Dictyota divaricata* [163]. Néanmoins, plusieurs autres métabolites proches

structuralement de **Ds11** ont été décrits à partir des algues brunes *D. dichotoma* [161] et *Pachydictyon coriaceum* [162]. Les signaux observés en RMN ^{1}H et ^{13}C sont identiques à ceux relevés dans la littérature [163], néanmoins quelques rectifications ont été apportées au niveau de l'attribution de certains signaux (cf Tableau 15).

Tout d'abord, les signaux correspondant aux deux groupements méthyles terminaux de la chaîne latérale – C-16 et C-20 – ont été échangés. En effet, le groupement méthyle situé en position *trans* par rapport à la chaîne carbonée (CH_3-16) possède toujours un déplacement chimique supérieur à 20 ppm en RMN ^{13}C (ici δ_C 25,8 ppm), par analogie avec les méthyles portés par des doubles liaisons de configuration *Z* [110, 152]. A l'inverse, le groupement méthyle situé en position *cis* par rapport à la chaîne carbonée (CH_3-16) présente généralement un déplacement chimique inférieur à 20 ppm (ici δ_C 17,7 ppm).

C	δ_C 3-Hydroxydilophol	δ_C **Ds11**	$\Delta\delta_C$
1	123,9	123,8	-0,1
2	**34,4**	**31,8**	**-2,6**
3	74,5	74,5	0,0
4	135,2	135,1	-0,1
5	131	130,8	-0,2
6	68,7	68,7	0,0
7	47,2	47,2	0,0
8	**35,9**	**29,9**	**-6,0**
9	**29,8**	**35,8**	**6,0**
10	137,2	137,1	-0,1
11	36,1	36,1	0,0
12	**31,9**	**34,3**	**2,4**
13	25,1	25,1	0,0
14	124,8	124,8	0,0
15	131,4	131,4	0,0
16	**17,7**	**25,8**	**8,1**
17	15,7	15,7	0,0
18	22,1	22,1	0,0
19	17,4	17,4	0,0
20	**25,8**	**17,7**	**-8,1**

H	δ_H 3-Hydroxydilophol	δ_H **Ds11**
1	5,23 d (12,0)	5,23 d (11,0)
2a	**2,44 m**	**2,30 m**
2b	**2,44 m**	**2,45 m**
3	4,33 s	4,33 s
5	5,54 d (6,0)	5,54 d (6,5)
6	4,72 d (7,5)	4,72 d (7,0)
7	1,05 m	1,06 m
8a	**1,64 m**	**1,39 m**
8b	**1,64 m**	**1,92 m**
9a	**1,42 m**	**1,62 m**
9b	**1,42 m**	**2,44 m**
11	1,64 m	1,62 m
12a	**2,30 m**	**1,24 m**
12b	**2,30 m**	**1,63 m**
13a	1,93 m	1,96 m
13b	2,06 m	2,08 m
14	5,13 t (7,0)	5,13 t (7,0)
16	**1,62 s**	**1,69 s**
17	1,45 s	1,44 s
18	1,62 s	1,62 s
19	1,01 d (7,0)	1,01 d (6,5)
20	**1,70 s**	**1,62 s**

Tableau 15 : *Comparaison des données RMN ^{13}C et ^{1}H du composé **Ds11** avec celles du 3-hydroxydilophol [163]*

La correspondance entre les protons et les atomes de carbone qui les portent présente des différences avec la littérature au niveau de C-2, C-8, C-9 et C-12. L'étude du spectre HSQC a permis l'identification de toutes les connections C-H (cf Figure 86). La valeur du déplacement chimique du

proton H_a-9 a été confirmée à δ_H 1,62 ppm grâce à un fort couplage géminal observé sur le spectre COSY ^{1}H-^{1}H entre les signaux à δ_H 1,62 ppm (H_a-9) et δ_H 2,44 ppm (H_b-9).

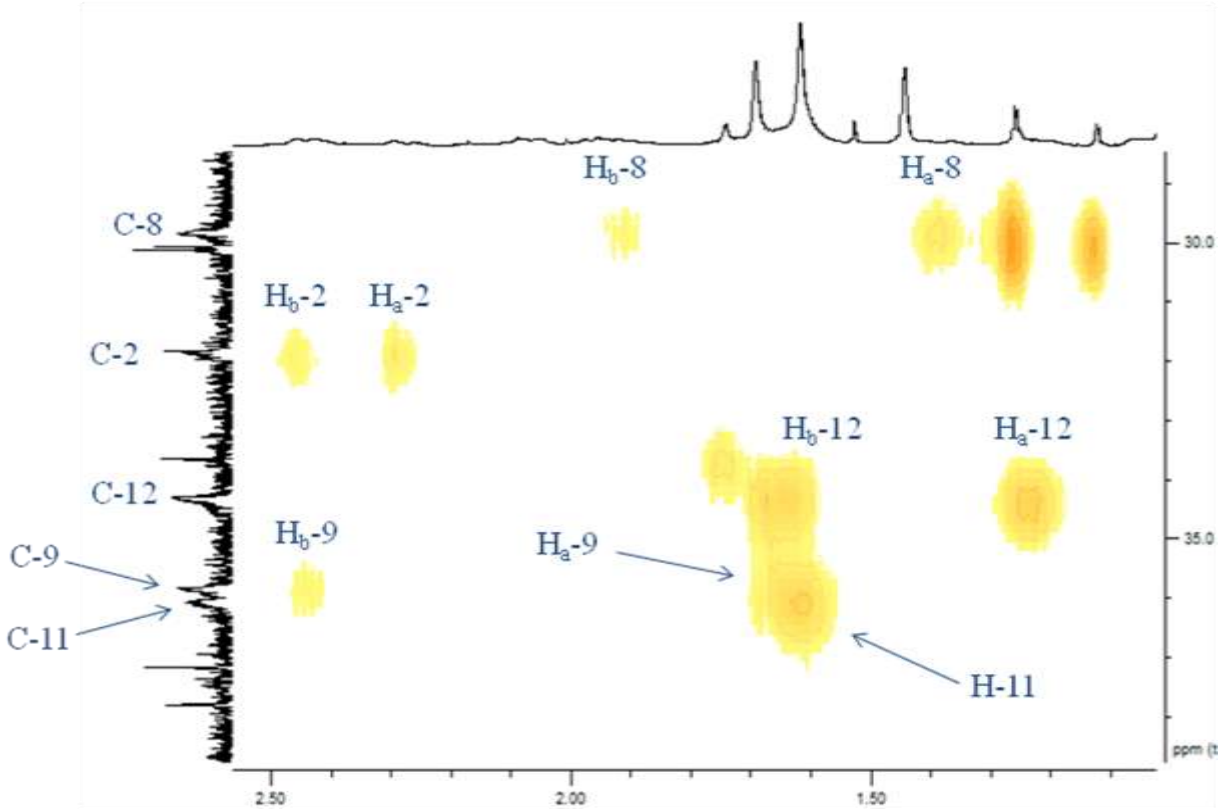


Figure 86 : *Détail du spectre HSQC du mélange de* ***Ds11*** *et* ***Ds3***

L'attribution des atomes de carbone C-2 et C-12 a été intervertie, par rapport à la publication d'origine [163], grâce notamment à la forte corrélation HMBC entre le groupement méthyle H_3-19 (δ_H 1,03 ppm, d) et C-12 (δ_C 34,3 ppm). On pourra remarquer que les signaux correspondant à $H_{a,b}$-12 sont peu déblindés alors que ceux de $H_{a,b}$-2 le sont plus : ceci est cohérent en regard du positionnement de ces protons dans la molécule. De la même manière, le déblindage des signaux de $H_{a,b}$-9 (δ_H 1,62 et 2,44 ppm) par rapport à ceux de $H_{a,b}$-8 (δ_H 1,39 et 1,92 ppm) est en accord avec le fait que ces protons soient plus proches de la double liaison $\Delta^{1,10}$.

g/ Analyse structurale du composé **Ds12**

Le composé **Ds12** a été isolé sous forme d'une huile présentant une forte coloration rouge-orangée. Il s'agit du métabolite majoritaire de la fraction contenant les xanthophylles ; celle-ci a été identifiée comme telle grâce, d'une part, à sa couleur rouge caractéristique et, d'autre part, à sa zone d'élution en chromatographie sur colonne. La comparaison des données RMN ^{1}H et ^{13}C de **Ds12** avec celles relevées dans la littérature [164] ont rapidement permis d'identifier la structure chimique de **Ds12**

comme étant celle de la fucoxanthine (cf Figure 87). Ce métabolite est connu pour être le xanthophylle majoritaire dans les extraits organiques d'algues brunes [1].

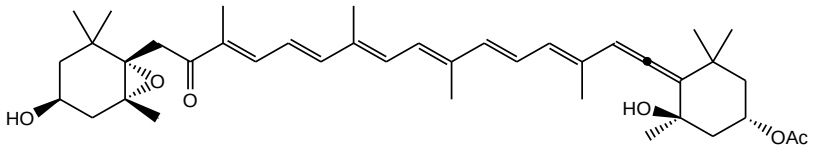


Figure 87 : *Structure du composé* ***Ds12***

III. A partir de Dictyota dichotoma

Un second échantillon d'algue brune relevant du genre *Dictyota* a été étudié. Celui-ci a été identifié comme appartenant à l'espèce *Dictyota dichotoma*.

III.1. Obtention des métabolites secondaires

III.1.1. Récolte et extraction

Des échantillons de *Dictyota dichotoma* ont été récoltés en août 2008 à Tipaza (36°37'12" N, 2°39'00" E) en Algérie. L'algue a ensuite été séchée pour donner 290 g de matériel sec, puis a été extraite avec un mélange MeOH/$CHCl_3$ (1/1 ; v/v ; 3 × 750 mL). Les différents extraits ont été rassemblés pour obtenir, après évaporation du solvant, 26 g d'extrait brut, correspondant à un rendement de 9,0%.

III.1.2. Fractionnement et purification

Une partie de l'extrait brut (11,0 g) ainsi obtenu a ensuite été soumis à un premier fractionnement par le biais d'une colonne chromatographique ouverte sur gel de silice (Si60). Un gradient de solvants de polarité croissante (de hexane/AcOEt (9/1 ; v/v) à 100% AcOEt, puis 100% MeOH) a été utilisé. Certaines fractions ont été soumises à une série de purifications par HPLC en phase inverse (phase RP18e) en mode isocratique. Un détecteur réfractométrique a été utilisé lors de cette dernière étape.

La fraction 9, éluée avec un mélange hexane/AcOEt (3/2 ; v/v), a été purifiée par HPLC à l'aide d'un mélange MeCN/H_2O (9/1 ; v/v) pour donner le composé **Dd1** (1,3 mg) (cf Figure 88).

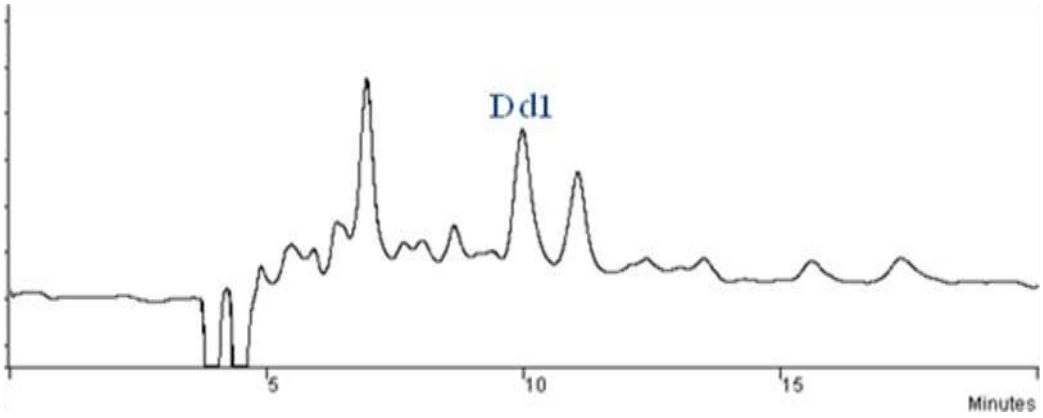


Figure 88 : *Chromatogramme de la fraction 9 de* Dictyota dichotoma

Deux métabolites, **Dd2** (3,1 mg) et **Dd3** (2,1 mg), ont été obtenus après purification de la fraction 10, également éluée avec hexane/AcOEt (3/2 ; v/v), par HPLC avec un mélange MeCN/H_2O (7/3 ; v/v) (cf Figure 89).

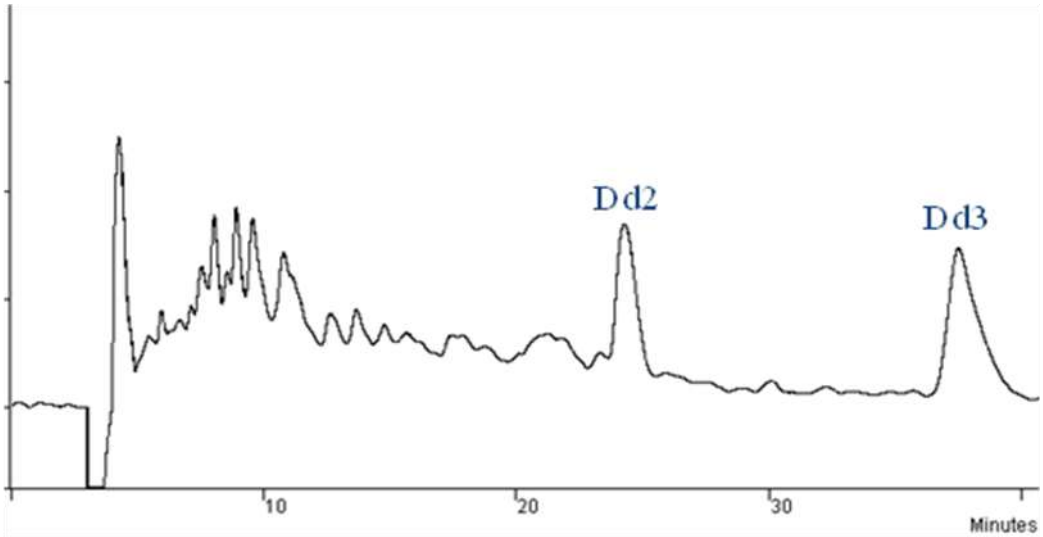


Figure 89 : *Chromatogramme de la fraction 10 de* Dictyota dichotoma

Enfin, le composé **Dd4** a été obtenu à partir de la fraction 17, éluée avec hexane/AcOEt (3/7 ; v/v), après purification par HPLC à l'aide d'un mélange MeCN/H_2O (9/1 ; v/v) (cf Figure 90).

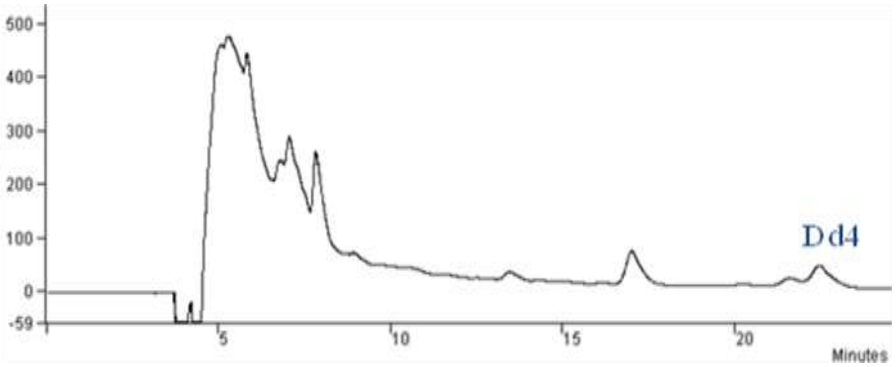


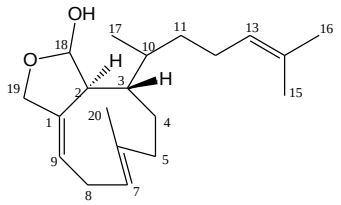
Figure 90 : *Chromatogramme de la fraction 17 de* Dictyota dichotoma

III.2. Elucidation structurale des différents composés isolés

*III.2.1. Analyse structurale du composé **Dd1***

Le composé **Dd1**, d'un aspect huileux et d'une couleur jaune pâle, est optiquement actif ($[\alpha]_D^{25}$ = -22°) et ne présente pas de bande d'absorption significative sur son spectre UV-visible. L'étude de **Dd1** par ESI-MS donne un pic adduit $[M+Na]^+$ à *m/z* 341,3 en accord avec une masse molaire de 318 $g.mol^{-1}$. L'analyse des spectres RMN ^{13}C et DEPT permet de comptabiliser dans la structure chimique de **Dd1** vingt atomes de carbones, dont quatre méthyles, cinq méthylènes, sept méthines et quatre atomes de carbone quaternaires. Ces informations permettent de proposer la formule brute $C_{20}H_{30}O_3$ pour **Dd1** : ce métabolite comporte donc six degrés d'insaturation. Sachant d'après les données obtenues en RMN ^{13}C (cf Tableau 22) que **Dd1** comporte trois doubles liaisons oléfiniques (δ_C 122,8, 124,0, 131,8, 136,7, 140,5 et 142,6 ppm) et un groupement carbonyle (δ_C 174,9 ppm), ce composé est donc bicyclique. La comparaison des données RMN ^1H et ^{13}C de **Dd1** avec celles de composés déjà isolés lors cette étude – **Ds1** et **Ds8** notamment – puis avec celles de diterpènes décrits à partir de Dictyotacées, nous a permis de constater de fortes similitudes avec des molécules possédant un squelette de type xénicane.

C	δ_C **Dd1**	δ_C **D38** [53]	$\Delta\delta_C$
1	**140,5**	**145,6**	**-5,1**
2	**51,8**	**45,9**	**5,9**
3	**46,6**	**53,9**	**-7,3**
4	30,2	28,3	1,9
5	40,1	40,7	-0,6
6	136,7	134,6	2,1
7	122,8	124,7	-1,9
8	29,0	29,9	-0,9
9	**142,6**	**120,0**	**22,6**
10	32,8	31,7	1,1
11	37,5	38,0	-0,5
12	25,9	26,2	-0,3
13	124,0	121,7	2,3
14	131,8	131,0	0,8
15	17,7	17,7	0,0
16	25,7	25,7	0,0
17	17,7	17,1	0,6
18	**97,5**	**100,6**	**-3,1**
19	**174,9**	**71,3**	**100,6**
20	17,4	17,7	-0,3



isodictyohémiacétal (D38)

Tableau 16 : *Comparaison des données RMN du ^{13}C du composé **Dd1** avec celles de l'isodictyohémiacétal*

En particulier, les données RMN du composé **Dd1** sont proches de celles de l'isodictyohémiacétal (**D38**), en ce qui concerne la chaîne latérale (C-10 jusqu'à C-17) et une partie du macrocycle (C-4 jusqu'à C-8). A ce stade de la caractérisation de **Dd1**, cinq insaturations ont été recensées : un macrocycle, un groupement carbonyle et trois doubles liaisons oléfiniques (Δ^{1-9}, Δ^{6-7} et Δ^{13-14}). Il reste donc à identifier un dernier degré d'insaturation. Les signaux RMN du methine en C-18 présentent des déplacements chimiques caractéristiques d'un groupement acétal (δ_C 97,5 ppm, δ_H 5,92 ppm). Ce groupement, inclus dans un cycle furanique formé avec C-1, C-2, C-18 et C-19, est fréquent chez les xénicanes isolés des algues du genre *Dictyota* [53, 56-57, 163]. Enfin, étant donné la formule brute obtenue, $C_{20}H_{30}O_3$, le dernier degré d'insaturation est dû à la présence d'une lactone : une telle fonction a déjà observée chez les Dictyotacées, dans la dictyolactone notamment [154] (cf Figure 91).

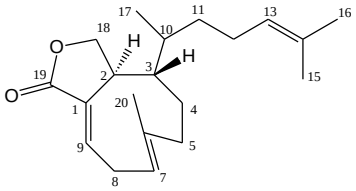


Figure 91 : *Structure de la dictyolactone*

L'analyse de l'ensemble des données RMN (cf

Tableau 17) a donc permis d'identifier le composé **Dd1** comme étant un nouveau diterpène de la famille des xénicanes (cf Figure 92).

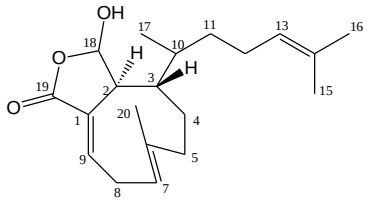


Figure 92 : *Structure du composé **Dd1***

La configuration des différents stéréocentres de **Dd1** a été déterminée grâce à l'étude des corrélations NOE observées et par comparaison avec les données obtenues pour deux xénicanes précédemment isolés : **Ds1** et **Ds8**. Le spectre NOESY ^{1}H-^{1}H de **Dd1** montre la présence de deux corrélations entre H-3/H-7 et H-2/H_3-20, qui sont également présentes chez **Ds1** et **Ds8**. La stéréochimie relative du macrocycle, et ainsi la configuration des atomes de carbone C-2 et C-3, est donc identique à celle obtenue précédemment pour les xénicanes **Ds1** et **Ds8**. Par ailleurs, le proton H-18 présente une seule corrélation NOE avec le groupement méthyle de la chaîne latérale (H_3-17) et n'en possède pas avec le proton H-2. Ces informations sont insuffisantes pour déterminer la configuration relative en C-18.

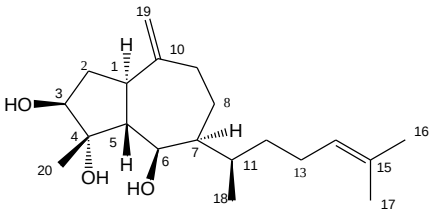
N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H	NOESY ^{1}H-^{1}H
1	140,5	C				
2	51,8	CH	2,52 s		H9, H8b	H20, H3/H4a?
3	46,6	CH	1,68 m			H2?, H7?
4	30,2	CH_2	a: 1,66 m b: 1,76 m		H4b, H5b, H5a H4a, H5b, H5a	H2?, H7?
5	40,1	CH_2	a: 1,97 m b: 2,27 br d (11,5)		H5b, H4a, H4b H5a, H4a, H20, H4b	H5b, H7 H5a, H20
6	136,7	C				
7	122,8	CH	5,36 dd (11,5, 3,5)		H8b, H20, H8a	H3/H4a?, H5a, (H8b)
8	29,0	CH_2	a: 2,93 ddd (17,5, 7,5, 4,5) b: 3,16 dddd (17,5, 11,5, 2,0, 2,0)		H8b, H9, H7 H8a, H7, H9, H2	H8b, (H9) H8a, (H7)
9	142,6	CH	7,03 dt (7,5, 2,0)		H8a, H8b, H2	(H8a)
10	32,8	CH	1,61 m		H17, H11	
11	37,5	CH_2	1,21 m		H12, H10	
12	25,9	CH_2	1,91 m		H11, H13	
13	124,0	CH	5,02 br t (7,0)		H12, H15, H16	
14	131,8	C				
15	17,7	CH_3	1,57 s	C13, C14, C16	H13	H18?
16	25,7	CH_3	1,66 s	C13, C14, C15	H13	
17	17,7	CH_3	0,95 d (6,5)	C10, C3, C11	H10	H18
18	97,5	CH	5,92 s			H17, H15?
19	174,9	C				
20	17,4	CH_3	1,75 s	C5, C6, C7	H7, H5b	H2, H5b

Tableau 17 : *Données RMN (1D et 2D) du composé **Dd1***

*III.2.2 Analyse structurale du composé **Dd2***

Le composé **Dd2** correspond à une huile jaune pâle optiquement active ($[\alpha]_D^{25}$ +3°) qui ne présente pas de bande d'absorption significative sur son spectre UV-visible. Le spectre RMN ^{13}C de **Dd2** montre 22 signaux, ce qui, pour les algues du genre *Dictyota*, correspond généralement à une molécule diterpénique acétylée. Cette hypothèse est confirmée par la présence, sur les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C, des signaux caractéristiques d'un groupement acétate (δ_C 172,4 (C-21) et 21,0 ppm (C-22), δ_H 2,12 ppm (H_3-22)). Ensuite, une analyse détaillée de ces spectres a permis de mettre en évidence les signaux typiques d'un groupement méthylène vinylique (δ_C 107,0 ppm (C-19), δ_H 4,65, s (H_a-19) et 4,72 ppm, s (H_b-19)) et d'une chaîne latérale de type 6-méthylhept-5-én-2-yle commune aux diterpènes des groupes I et II. Parmi les diterpènes décrits à partir d'algues de la famille des Dictyotaceae, la présence de ces deux groupements n'a été exclusivement observée qu'à partir de molécules possédant un squelette bicyclique de type dictyane. La comparaison de l'ensemble des données RMN de **Dd2** avec celles issues de la littérature montre que ce composé présente de fortes similitudes avec le dictyotatriol A (cf Tableau 18), un dictyane précédemment décrit à partir d'un échantillon de *D. dichotoma* de Méditerranée [80].

C	δ_C **Dd2**	δ_C dictyotatriol A [80]	$\Delta\delta_C$
1	39,2	38,9	0,3
2	32,5	34,4	-1,9
3	**83,4**	**79,6**	**3,8**
4	79,5	80,5	-1,0
5	58,6	57,8	0,8
6	72,3	72,7	-0,4
7	46,6	47,1	-0,5
8	23,6	23,4	0,2
9	38,8	39,3	-0,5
10	151,6	152,1	-0,5
11	35,1	34,5	0,6
12	34,4	35,2	-0,8
13	25,7	25,7	0,0
14	124,9	124,7	0,2
15	131,3	131,6	-0,3
16	25,7	25,7	0,0
17	17,7	17,7	0,0
18	17,5	17,5	0,0
19	107,0	106,7	0,3
20	26,3	25,7	0,6
21	172,4	-	-
22	21,0	-	-



dictyotatriol A

Tableau 18 : *Comparaison des données RMN ^{13}C du composé **Dd2** avec celles du dictyotatriol A*

Outre la présence de deux carbones supplémentaires, la principale différence entre les données RMN ^{13}C du composé **Dd2** et celles du dictyotatriol A se situe au niveau de l'atome de carbone C-3 dont le signal est légèrement plus déblindé chez **Dd2** (δ_C 83,4 ppm pour **Dd2** contre 79,6 ppm pour le dictyotatriol A). Cette variation est justement due à la présence d'un groupement acétate additionnel lié au squelette diterpénique au niveau de C-3. Cette observation est confirmée par la présence d'un couplage HMBC entre H-3 et C-21 (cf Tableau 19). La structure du composé **Dd2** équivaut donc au dictyotatriol A acétylé en C-3 (cf Figure 93). Il est à noter que la configuration absolue des centres asymétriques du dictyotatriol A a précédemment été déterminée à l'aide de la méthode de Mosher modifiée et de l'étude des corrélations visibles sur le spectre NOESY ^1H-^1H [80].

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^1H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^1H-^1H	NOESY ^1H-^1H
1	39,2	CH	2,41 td (10,5, 7,0)	C6, C10, C2, C5	H2b, H5, H2a	H22
2	32,5	CH_2	a : 1,81 m	C3	H2b, H3, H1	H2b, H19a
			b : 2,08 m	C3, C4, C5, C1	H2a, H1, H3	H2a, H3
3	83,4	CH	4,87 dd (10,0, 6,0)	C4, C2, C20, C21	H2a, H2b, H5	H2b, H5, H22
4	79,5	C	-	-	-	-
5	58,6	CH	1,78 dd (10,5, 9,0)	C1, C6, C20, C10, C3, C4	H3, H1, H6	H3, H20
6	72,3	CH	4,28 dd (9,0, 4,0)	C5, C8, C4	H5, H7	H7
7	46,6	CH	1,53 m	C12	H6	H6
8	23,6	CH_2	a : 1,52 m	C10, C6, C9	H8b, H9b, H9a	
			b : 1,62 m		H8a, H9a	
9	38,8	CH_2	a : 2,09 m		H9b, H8b, H8a, H19a, H19b	H9b
			b : 2,56 ddd (14,5, 5,5, 3,5)	C8, C10	H9a, H8a	H9a, H19b
10	151,6	C	-	-	-	-
11	35,1	CH	1,23 m	C13	H12	
12	34,4	CH_2	1,62 m		H18, H11	
13	25,7	CH_2	a : 1,92 m	C14, C15, C11	H13b, H14	
			b : 2,04 m		H13a, H14	
14	124,9	CH	5,12 tt (7,0, 1,0)	C13, C17	H16, H17, H13a, H13b	
15	131,3	C	-	-	-	-
16	25,7	CH_3	1,68 s	C17, C15, C14	H14	
17	17,7	CH_3	1,60 s	C16, C15, C14	H14	
18	17,5	CH_3	0,97 d (6,5)	C7, C11, C12	H12	
19	107,0	CH_2	a : 4,65 s	C1	H19b, H9a	H19b, H2a
			b : 4,72 s		H19a, H9a	H19a, H9b
20	26,3	CH_3	1,24 s	C3, C4, C5		H5
21	172,4	C	-	-	-	-
22	21,0	CH_3	2,12 s	C21		H3, H1

Tableau 19 : *Données RMN (1D et 2D) du composé **Dd2***

La stéréochimie de **Dd2** a été déterminée à l'aide de l'étude de son spectre NOESY ^1H-^1H, ainsi que par comparaison avec les données RMN de molécules similaires ayant une stéréochimie connue. Tout

d'abord, la jonction des deux cycles a été déterminée comme étant *trans* grâce à : (i) l'absence de corrélation NOE entre H-1/H-5, (ii) aux corrélations entre H-3/H-5, H-3/H_b-2 et H-5/H_3-20, d'une part, et entre H-1/H_3-22, d'autre part, montrant que ces deux ensembles de protons sont situés sur les faces opposées du cyclopentane. Ce type de jonction est retrouvé dans tous les diterpènes de cette famille issus d'algues brunes, et notamment dans le dictyotatriol A. De même, en accord avec des considérations biosynthétiques, l'orientation en α de la chaîne latérale au niveau de l'atome C-17 a été déterminée grâce à la présence d'une corrélation NOE entre H-6/H-7 et à l'absence de couplage entre H-6/H-5 en NOESY ^{1}H-^{1}H. En définitive, le composé **Dd2** présente la stéréochimie suivante : 1*R**, 3*R**, 4*S**, 5*R**, 6*R**, 7*S**. On remarquera que la stéréochimie en C-3 est opposée à celle trouvée pour le dictyotatriol A chez qui une corrélation entre H-3/H-1 a été détectée [80].

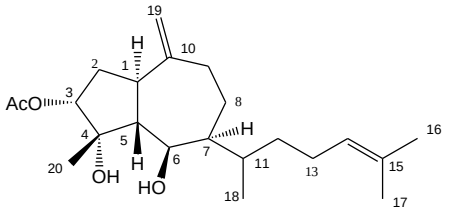


Figure 93 : *Structure du composé **Dd2***

III.2.3. Autres composés connus

a/ Analyse structurale du composé **Dd3**

Le composé **Dd3**, isolé sous forme d'une huile jaune pâle, ne montre pas de bande d'absorption significative sur son spectre UV-visible. Son spectre RMN ^{13}C dévoile la présence de vingt atomes de carbone en accord avec une structure diterpénique. Plus particulièrement, deux doubles liaisons (δ_C 135,2, 134,2, 129,4 et 128,4 ppm) et deux atomes de carbone oxygénés (δ_C 68,6 et 73,6 ppm) ont été mis en évidence grâce à ce spectre. La comparaison des données RMN du composé **Dd3** avec celles provenant de la littérature a permis d'identifier ce métabolite comme étant le 10,18-dihydroxydolabella-2,7-diène (cf Figure 94).

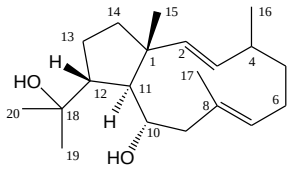


Figure 94 : *Structure du composé **Dd3***

Ce composé, initialement isolé à partir de l'algue brune *Glossophora galapagensis* [159], a également déjà été identifié dans un extrait de *D. dichotoma* récoltée en Méditerranée [165].

b/ Analyse structurale du composé **Dd4**

Le composé **Dd4** a été isolé sous forme d'une huile incolore. L'étude de **Dd4** par ESI-MS donne un ion adduit $[M+Na]^+$ à *m/z* 379,3. L'analyse de son spectre RMN ^{1}H montre des signaux caractéristiques d'une chaîne carbonée aliphatique majoritairement saturée : un signal singulet important à δ_H 1,25 ppm correspondant aux méthylènes d'une chaîne carbonée aliphatique et un signal triplet à δ_H 0,87 ppm (7,0 Hz) dû à un groupement méthyle terminal. Sur ce même spectre, cinq signaux situés entre δ_H 3,50 et 4,30 ppm correspondant à des protons portés par des atomes de carbone oxygénés ont été détectés. L'étude du spectre RMN ^{13}C, qui comporte vingt et un atomes de carbone, indique la présence d'un groupement ester (δ_C 174,3 ppm), d'une double liaison (δ_C 129,7 et 130,0 ppm), de trois atomes de carbone oxygénés (δ_C 63,3, 65,2 et 70,2 ppm) ainsi que quatorze méthylènes (signaux compris entre δ_C 22,7 et 34,1 ppm). Ces indications permettent de déduire une formule brute de $C_{21}H_{40}O_4$ pour **Dd4**. Ce métabolite comporte deux degrés d'insaturations pour lesquels l'un correspond au groupe carbonyle de la fonction ester et l'autre à la double liaison oléfinique : le composé **Dd4** est donc acyclique. L'ensemble de ces données RMN a permis de définir la structure chimique du composé **Dd4** comme étant celle d'un monoglycéride d'acide gras en C18:1, cet acide étant vraisemblablement l'acide oléique (cf Figure 95).

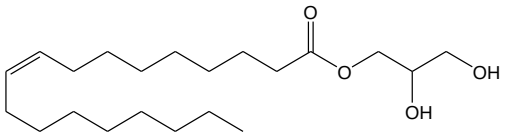


Figure 95 : *Structure du composé **Dd4***

Une telle structure a déjà été décrite à partir d'une algue brune appartenant au genre *Sargassum* [166].

c/ Autres composés

Deux autres molécules isolées précédemment à partir de *Dictyota* sp. l'ont également été à partir des échantillons de *D. dichotoma* analysés dans le cadre de cette étude : il s'agit des composés **Ds6** (4 mg) et **Ds7** (21,0 mg) qui avaient préalablement été décrits à partir d'échantillons de *D. dichotoma* [77-78].

IV. A partir de Cystoseira foeniculacea

Enfin, un échantillon d'algue brune appartenant à l'espèce *Cystoseira foeniculacea* a été soumis à une série de purifications en vue de l'isolement de métabolites secondaires.

IV.1. Obtention des métabolites secondaires

IV.1.1. Récolte et extraction

L'échantillon de *Cystoseira foeniculacea* a été récolté en juin 2005 à Cherchell (36°36'40" N, 2°12'19" E), le long des côtes algériennes. L'algue sèche (537 g) a été extraite par un mélange MeOH/$CHCl_3$ (1/1 ; v/v ; 3 × 1L) pour donner, après évaporation du solvant, 9,1 g d'extrait brut.

IV.1.2. Fractionnement et purification

Une partie de cet extrait brut (7,0 g) a ensuite été soumis à un premier fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte sur gel de silice (Si-60). Un gradient d'élution de polarité croissante allant de hexane/AcOEt 9/1 à 100% AcOEt, puis 100% MeOH a été utilisé pour ce fractionnement. Généralement, dans les extraits d'algues du genre *Cystoseira*, les dérivés isopréniques (diterpènes et méroditerpènes) sont élués avec des solvants de polarité intermédiaire – approximativement entre hexane/AcOEt (3/2 ; v/v) et hexane/AcOEt (3/7 ; v/v) – et sont présents en grande quantité dans les fractions ainsi obtenues. Dans le cas de cet extrait, l'étude par RMN ^{1}H de ce type de fractions a montré qu'elles étaient très riches en dérivés lipidiques et n'a pas permis un isolement conséquent et varié de terpènes : en effet, un seul méroditerpène (**Cf1**) a été isolé, en faible quantité (1,5 mg), à partir de la fraction 20 éluée avec un mélange hexane/AcOEt (2/3 ; v/v).

Par ailleurs, deux autres composés (**Cf2** et **Cf3**) ont pu être purifiés à partir de la fraction 14, éluée avec un mélange hexane/AcOEt (3/2 ; v/v). Cette fraction présentait un aspect cristallin, contrairement à la majorité des autres fractions de nature plutôt huileuse : il s'agit vraisemblablement de la fraction stérolique. L'étude par HPLC de cette fraction a été entreprise, dans un premier temps, à l'aide d'une colonne en phase inverse greffée C18, malheureusement la rétention des analytes était trop importante (supérieure à 25 min) et la résolution assez faible. De ce fait, une deuxième étude par HPLC a été réalisée en utilisant une colonne plus courte (150 mm contre 250 mm pour la colonne greffée C18) munie d'une phase stationnaire greffée en C8, au caractère apolaire moins marqué. Le profil chromatographique, obtenu avec une détection UV à 205 nm, présente entre autres deux pics bien séparés correspondant aux composés **Cf2** et **Cf3** (cf Figure 96).

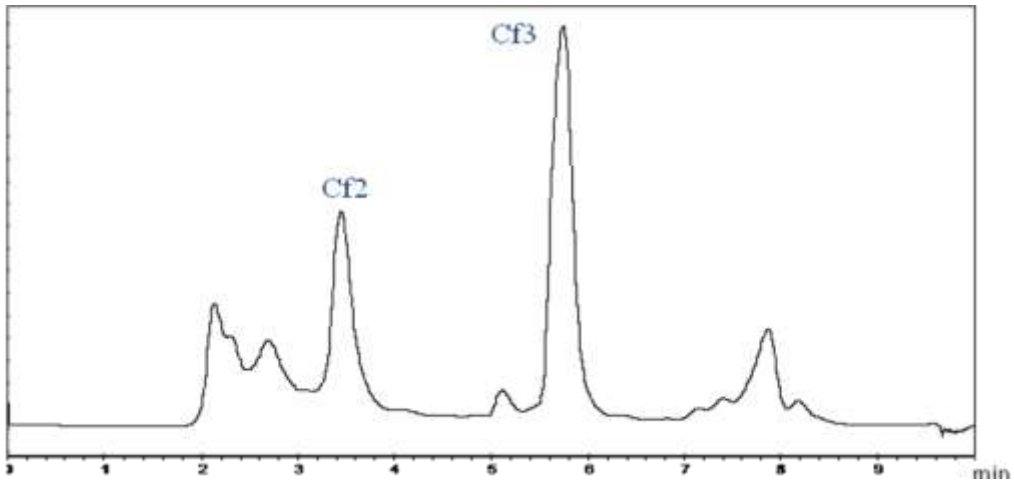


Figure 96 : *Chromatogramme UV (205 nm) de la fraction stérolique avec une colonne ayant une phase stationnaire RP8e*

IV.2. Elucidation structurale des différents composés isolés

*IV.2.1. Analyse structurale du composé **Cf1***

Le composé **Cf1** a été isolé sous forme d'une huile jaune pale. La structure du composé **Cf1** a été déterminée à l'aide de différentes études RMN mono- et bidimensionnelles ainsi que par comparaison de ces données avec celles des nombreux métabolites isolés au laboratoire à partir d'algues du genre *Cystoseira*. Ce métabolite a été identifié comme un méroditerpène linéaire acétylé, portant également deux groupements hydroxyles et un groupement méthoxyle (cf Figure 97).

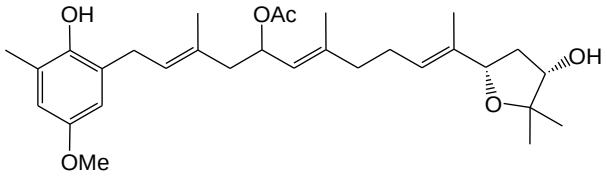


Figure 97 : *Structure du composé **Cf1***

Ce composé a déjà été décrit comme étant le métabolite majeur dans les extraits de l'algue brune *Cystoseira crinita* [167]. Dans notre cas, le composé **Cf1** est non seulement le seul méroditerpène présent et, en outre, il a été isolé en très faible quantité. Or chez les algues brunes du genre *Cystoseira*, les métabolites secondaires de type méroditerpène sont soit absents, soit présents en grande quantité. On peut alors supposer que les échantillons de *C. foeniculacea* ont été pollués par une faible quantité de *C. crinita* prélevée par erreur.

*IV.2.2. Analyse structurale du composé **Cf2***

Le composé **Cf2** a été isolé sous forme d'un solide cristallin blanc. Le spectre RMN ^{1}H présente deux signaux correspondant à un proton éthylénique (δ_H 5,35 ppm) et un proton porté par un carbone oxygéné (δ_H 3,53 ppm) qui sont présents sur le squelette tétracyclique des stérols. Par ailleurs, trois signaux dus à des protons oléfiniques sont visibles sur le spectre. Le premier signal (δ_H 5,15 ppm) est un doublet ayant une constante de couplage de 18,0 Hz spécifique d'un couplage *trans* ; le second (δ_H 5,28 ppm) est également un doublet ayant, cette fois-ci, une constante de couplage de 11,5 Hz spécifique d'un couplage *cis* ; enfin, le troisième (δ_H 5,74 ppm) est un doublet dédoublé présentant des constantes de couplage 18,0 et 11,5 Hz. Ces trois signaux sont caractéristiques d'un groupement vinyle monosubstitué. Une étude RMN complète a ensuite permis, après comparaison avec les données présentes dans la littérature [168-170], d'identifier le composé **Cf2** comme étant le saringostérol (cf Figure 98).

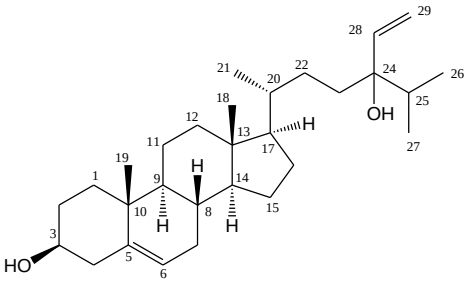


Figure 98 : *Structure du composé **Cf2***

Par ailleurs, lors de cette analyse structurale, l'étude minutieuse du spectre HMBC a permis d'apporter plusieurs corrections aux données RMN ^{13}C de **Cf2** par rapport à celles reportées dans la littérature pour le saringostérol [170] (cf Tableau 20).

C	δ_C **Cf2**	δ_C saringostérol [170]
1	**37,3**	**37,2**
2	**31,7**	**32,6**
3	71,8	72,5
4	**42,3**	**37,1**
5	140,7	141,4
6	121,7	122,4
7	**31,9**	**32,3**
8	**31,9**	**36,9**
9	50,1	50,8
10	**36,5**	**37,9**
11	21,1	21,7
12	39,7	40,4
13	42,3	43,0
14	56,7	57,4
15	24,3	25,0
16	28,3	29,0
17	55,9	56,5
18	11,9	12,5
19	**19,4**	**17,3**
20	36,0	36,5
21	**18,9**	**18,4**
22	**28,5**	**32,3**
23	28,5	28,9
24	89,1	89,8
25	**31,9**	**29,2**
26	**17,7**	**20,1**
27	**16,6**	**19,5**
28	137,2	137,8
29	116,4	117,0

Tableau 20 : *Comparaison des données RMN ^{13}C du composé **Cf2** avec celles de la littérature*

Outre le décalage systématique d'environ $\Delta\delta_C = 0{,}6$ ppm existant entre les signaux issus de la littérature et ceux obtenus expérimentalement, douze d'entre eux compris dans la zone δ_C 28-45 ppm (cf Tableau 20 en gras) ont vu leur attribution modifiée.

D'autre part, il peut être remarqué que la plupart des atomes de carbone de la chaîne latérale (C-17, C-20, C-22, C-23, C-24, C-27, C-28 et C-29) présente des signaux dédoublés en RMN ^{13}C (cf Annexe D). Ceci est le signe de la présence d'un mélange de plusieurs épimères : un tel phénomène a déjà été observé dans le cas du saringostérol car ce composé est en fait souvent décrit comme un mélange des deux épimères en C-24 [168].

*IV.2.2. Analyse structurale du composé **Cf3***

Le composé **Cf3**, a été étudié dans un premier temps par RMN ^{1}H. De manière surprenante étant donné l'allure du pic chromatographique dont il provient (cf Figure 96), **Cf3** s'avère être en fait un mélange de deux composés (cf spectre (b) Figure 99). Le premier d'entre eux est rapidement identifié comme étant le fucostérol, un stérol entrant majoritairement dans la composition chimique des algues brunes. Le second a été caractérisé grâce à la présence de signaux spécifiques correspondant à la présence d'un groupement vinyle (cf spectre (c) Figure 99) : il s'agit en fait du saringostérol (**Cf2**) décrit précédemment dans cette étude. Or ce composé a été isolé parallèlement lors de la même purification et les temps de rétention de ces deux stérols sont suffisamment éloignés (t_r(**Cf2**) = 3,5 min et t_r(**Cf3**) = 5,8 min) pour pouvoir exclure toute contamination lors de la purification.

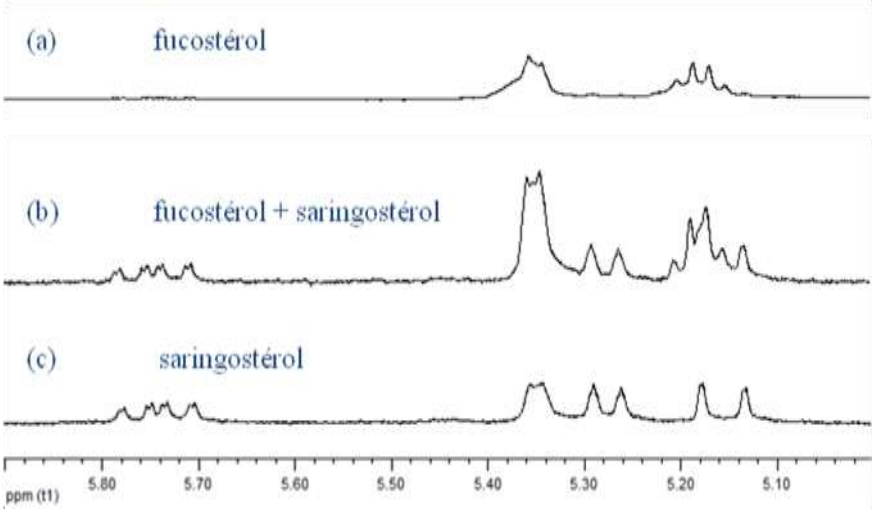
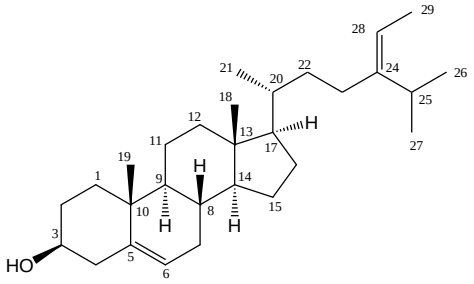


Figure 99 : *Détails des spectres RMN ^{1}H de **Cf2** (saringostérol), **Cf3** (fucostérol) et du mélange des deux (b)*

Néanmoins, le saringostérol (**Cf2**) est souvent décrit comme un produit de dégradation issu de l'oxydation du fucostérol. Ceci pourrait ainsi expliquer la présence de ce composé à l'issue de la purification du pic correspondant à **Cf3**. Pour vérifier cette hypothèse, une seconde série de purifications a été effectuée avec les mêmes conditions opératoires. Puis une analyse en RMN ^{1}H a été réalisée immédiatement après la purification afin d'éviter toute dégradation éventuelle du produit. Le spectre obtenu dans ce cas correspond bien à celui du fucostérol pur (cf spectre (a) Figure 99). Les signaux caractéristiques du saringostérol ne sont pas visibles, accréditant ainsi l'hypothèse de la dégradation du fucostérol en saringostérol. D'autre part, la présence de signaux dédoublés en RMN ^{13}C sur le spectre du saringostérol laisse supposer que l'on est en présence de deux isomères qui correspondent probablement aux deux épimères en C-24 formés lors de l'oxydation du fucostérol.

Le fucostérol est un métabolite très commun chez les algues brunes au sein desquelles il constitue le stérol majoritaire, néanmoins des corrections ont été apportées en RMN ^{13}C par rapport aux données obtenues dans la littérature [171] (cf Tableau 21).

C	δ_C **Cf3**	δ_C fucostérol [171]
1	37,3	37,3
2	31,7	31,9
3	71,8	71,8
4	42,3	42,3
5	140,8	140,8
6	121,7	121,7
7	31,9	31,7
8	**31,9**	**36,4**
9	50,1	50,1
10	36,5	36,5
11	21,1	21,1
12	39,8	39,7
13	42,4	42,3
14	56,8	56,8
15	24,3	24,3
16	28,2	28,2
17	55,8	55,8
18	11,8	11,8
19	19,4	19,4
20	**36,4**	**34,8**
21	18,7	18,7
22	35,3	35,2
23	25,7	25,7
24	147,0	147
25	**34,8**	**31,9**
26	22,2	22,2
27	22,1	22,1
28	115,6	115,5
29	13,2	13,2



fucostérol

Tableau 21 : *Comparaison des données RMN ^{13}C du composé **Cf3** avec celles de la littérature*

Après une étude RMN complète (^1H, ^{13}C, DEPT 45, 90 et 135, COSY ^1H-^1H, HSQC, HMBC et NOESY ^1H-^1H), il apparait que trois signaux RMN ^{13}C correspondant aux atomes de carbone C-8, C-20 et C-25 ont été intervertis par rapport aux données de la littérature [171]. Pour justifier ces corrections, le couplage en COSY ^1H-^1H entre le signal des deux groupements méthyles H_3-26, H_3-27 (δ_H 0,98 ppm) et celui à δ_H 1,39 ppm correspondant à H-25 a été utilisé, l'atome de carbone porteur de ce proton ayant ensuite été attribué à l'aide du spectre HSQC (δ_C 36,8 ppm (C-25)) (cf Figure 100). De la même manière, différents couplages observés sur le spectre COSY ^1H-^1H (entre H_3-21/H-20 et H-8/H-9) ont permis de modifier, après recherche des correspondances $^1H/^{13}C$ en HSQC, les attributions

des signaux des atomes de carbone C-20 et C-8 (cf Figure 100). Les corrélations HMBC entre C-25/ H_3-26 et H_3-27, C-20/H_3-21 et C-8/H-9 confirment ces attributions.

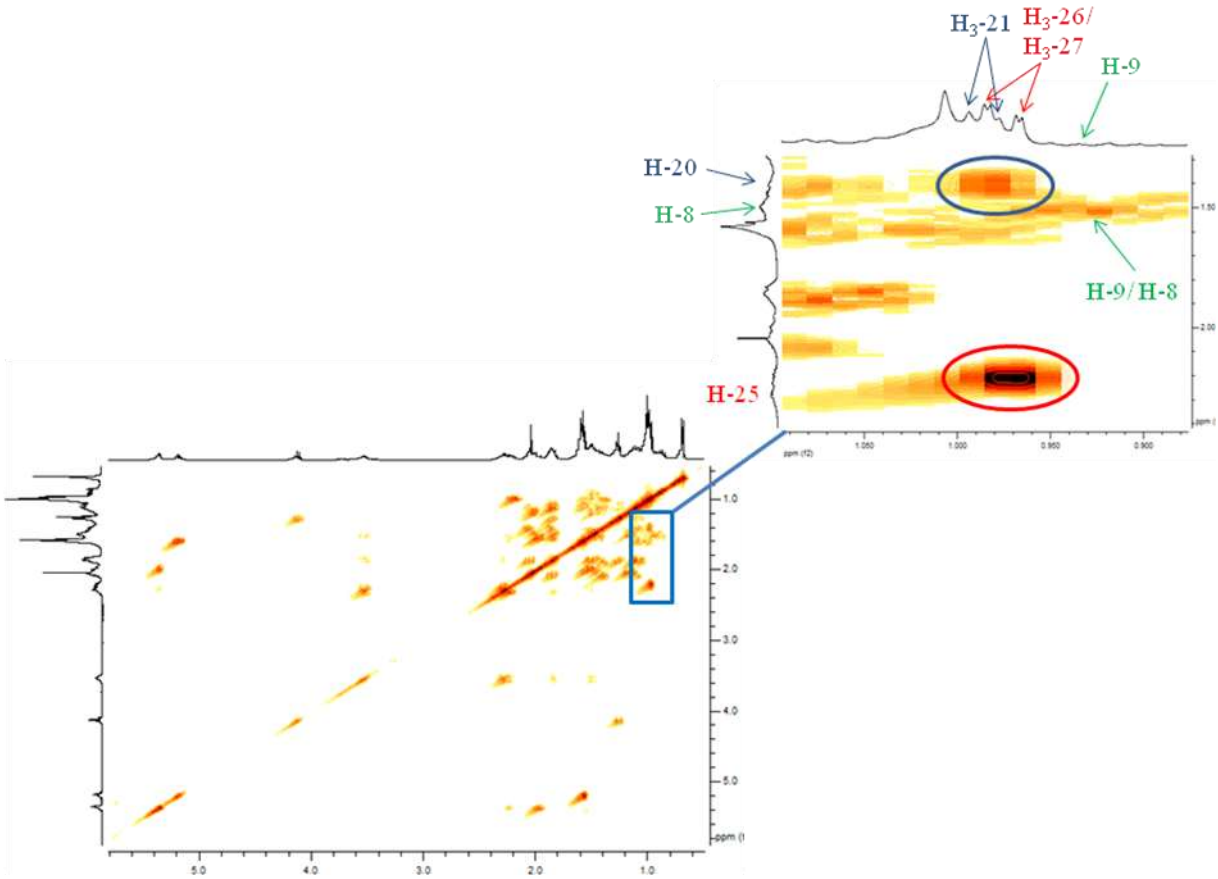


Figure 100 : *Spectre COSY ^{1}H-^{1}H du composé* ***Cf3***

Partie C : Fluctuation de l'expression métabolique – Chimiotaxonomie – Activités biologiques

Après les étapes de purification et de caractérisation structurale de substances naturelles, le second stade des travaux consiste à leur valorisation scientifique *via* leur utilisation pour des études d'écologie chimique ou chimiotaxonomique, ainsi que pour évaluer leurs activités biologiques par différents types de bio-essais.

D'un point de vue écologique, la connaissance du métabolisme secondaire constitue un outil de choix à corréler avec les connaissances biologiques portant sur un organisme. Ainsi, la production métabolique d'un organisme peut varier au cours des saisons en fonction de différents types de facteurs biotiques et/ou abiotiques. Ces variations peuvent influer fortement sur les propriétés biologiques d'un extrait naturel : par exemple, il a été démontré que les extraits bruts de l'algue brune *Bifurcaria bifurcata* présentaient des activités antifouling maximales pendant les mois estivaux, durant lesquels la compétition était la plus forte [142]. Dans cette optique, un suivi mensuel de la composition chimique des extraits de l'algue invasive *Caulerpa taxifolia* a été réalisé et a été corrélé à l'évaluation de leur activité en antifouling. Une seconde approche a consisté à étudier les variations spatiales (à micro- et macro-échelle) et temporelles intervenant dans le métabolisme de plusieurs espèces de bryozoaires.

La connaissance de l'expression métabolique peut également être une aide à la classification des organismes *via* l'identification de marqueurs chimiotaxonomiques, comme le sont par exemple les diterpènes cycliques pour les algues du genre *Dictyota*. Une recherche de tels composés a été réalisée au sein d'un panel d'échantillons de bryozoaires.

Enfin, plusieurs extraits et composés ont été évalués pour leur activité biologique, en particulier pour leur potentiel en antifouling.

I. Caulerpa taxifolia

L'algue verte *Caulerpa taxifolia* a précédemment fait l'objet de plusieurs études en écologie chimique, ayant trait principalement à la production de la caulerpényne. Ces travaux étaient destinés à mieux comprendre son acclimatation rapide à la mer Méditerranée. Après une optimisation du protocole

d'étude de l'extrait de *C. taxifolia*, une évaluation de la variation de l'expression métabolique de l'algue a été effectuée.

I.1. Optimisation du protocole

I.1.1. Protocole d'extraction de C. taxifolia *et optimisation du gradient HPLC*

Deux protocoles d'extraction ont été appliqués afin d'étudier la partie lipidique de l'extrait de *C. taxifolia* :

- Méthode 1 : l'algue est séchée pendant deux jours à 30°C dans une étuve ventilée, puis le matériel sec est extrait trois fois à l'éther diéthylique afin d'obtenir un extrait brut lipidique.
- Méthode 2 : l'algue fraîche est extraite trois fois à l'éthanol. Les extraits sont ensuite rassemblés et concentrés puis un partage est effectué par ajout d'éther diéthylique. A l'issue du partage, un extrait aqueux et un extrait lipidique sont obtenus.

Tout d'abord, le rendement d'extraction de la partie lipidique par rapport à la masse d'algue sèche diffère grandement en fonction de la méthodologie d'extraction employée : il est de 1,9 % avec la méthode 1 alors que le second protocole permet d'obtenir un rendement plus de quatre fois supérieur (8,5 %).

Les extraits bruts lipidiques ainsi obtenus sont ensuite étudiés par HPLC. Les analyses chromatographiques ont été effectuées en phase inverse (silice greffée C18). Différents gradients d'élution ont été utilisés afin d'optimiser, à la fois, la séparation des différents signaux, mais également le temps total de l'analyse. Un gradient binaire avec un mélange MeCN/H_2O de polarité croissante a été appliqué : l'élution débute avec un éluant composé de MeCN/H_2O (2/3 ; v/v), puis, en 10 min, la composition passe à 40% MeCN (rampe linéaire), ensuite, en 20 min, une composition d'éluant de 100% MeCN est atteinte (rampe linéaire), cet éluant est conservé jusqu'à un temps total d'analyse de 40 min.

Les chromatogrammes des extraits bruts obtenus à l'aide des deux méthodes d'extraction sont rapportés dans les Figure 101 et Figure 102.

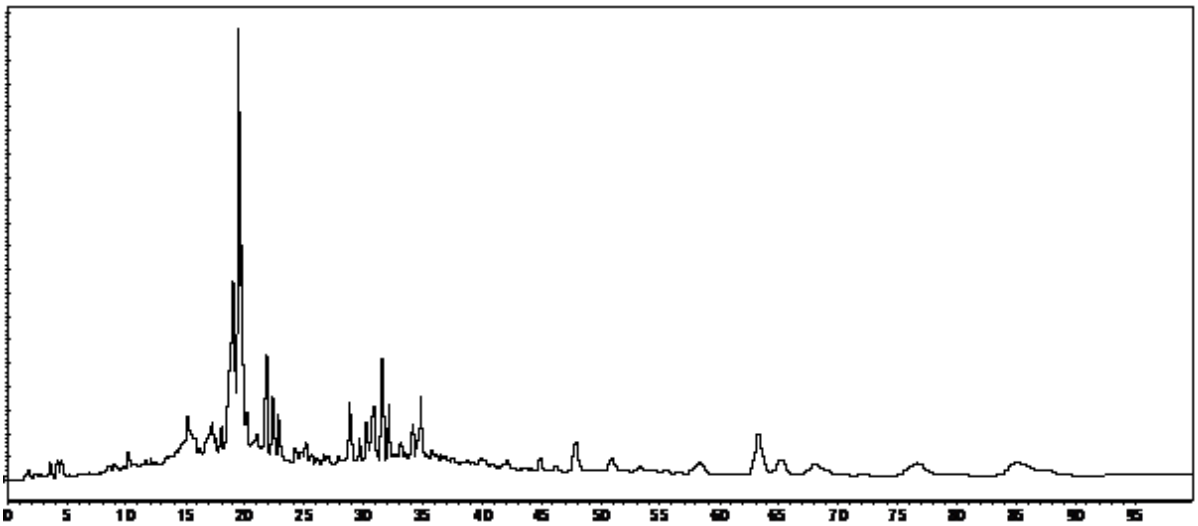


Figure 101 : *Chromatogramme UV (205 nm) de l'extrait brut de* C. taxifolia *obtenu avec la méthode 1*

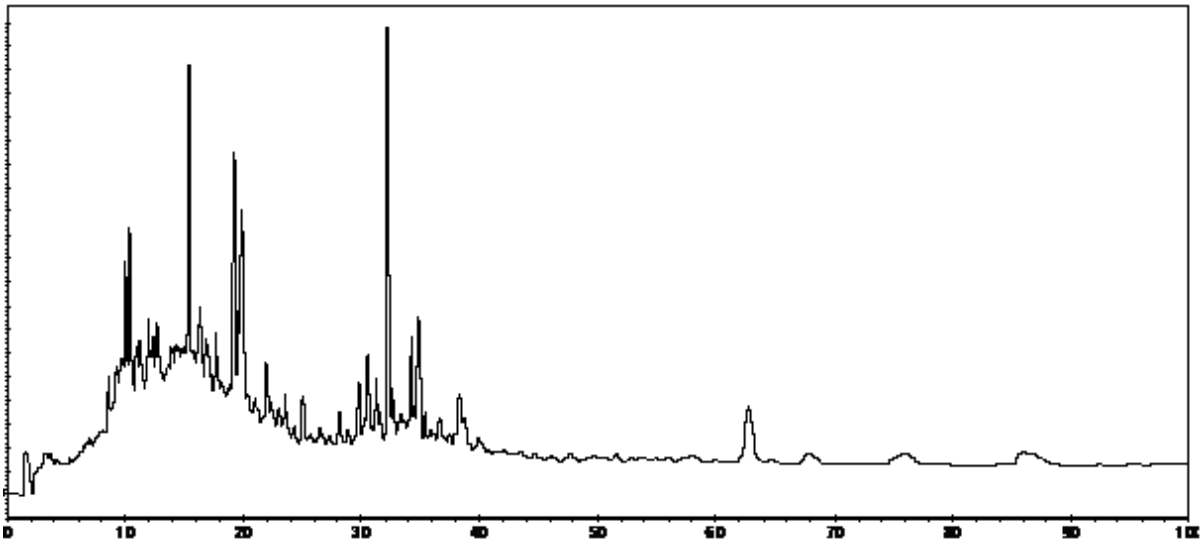


Figure 102 : *Chromatogramme UV (205 nm) de l'extrait brut de* C. taxifolia *obtenu avec la méthode 2*

Ces deux chromatogrammes présentent des différences significatives, notamment dans la zone d'élution comprise entre t_R = 10 et 40 min, correspondant aux composés de polarité intermédiaire. Le second protocole permet visiblement d'extraire un plus grand nombre de ces produits et donc d'avoir une vision d'un spectre plus large de molécules produites par l'algue.

En regard des rendements d'extraction et des chromatogrammes obtenus avec ces deux protocoles, la seconde méthode d'extraction a été utilisée pour les différentes études chimiques effectuées sur *C. taxifolia*. Cette méthode permet, en outre, d'éviter la dégradation de certains métabolites qui pourrait intervenir lors de l'étape de séchage de l'algue.

I.1.2. Conservation de l'extrait de C. taxifolia

Suite au choix du protocole d'extraction utilisé, des études portant sur la conservation de l'extrait brut ont été menées en le maintenant stocké à trois températures différentes : -20°C, 4°C et 30°C. Les chromatogrammes des extraits bruts conservés à 4°C et à -20°C sont parfaitement superposables (cf Figure 103) alors que celui correspondant à l'extrait conservé à 30°C présente quelques différences avec les deux précédents.

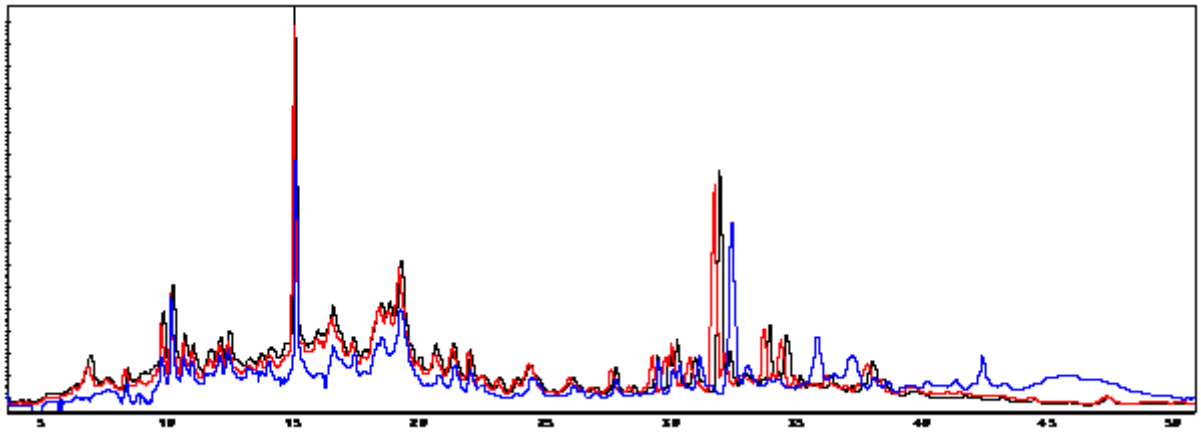


Figure 103 : *Détail du chromatogramme UV (205 nm) de l'extrait brut de* C. taxifolia *après deux mois de conservation à 30°C (bleu), 4°C (rouge) et -20°C (noir)*

I.2 Variation saisonnière de l'extrait

La variation saisonnière des trois molécules principales de l'extrait de *C. taxifolia* (**Ct1**, **Ct2** et **Ct3**) a été étudiée sur une période de douze mois. Pour cela, un échantillon d'algue a été prélevé chaque mois le long des côtes nord de l'île de Porquerolles sur le même site (43°0'45" N, 6°13'57" E). L'algue est ensuite extraite en appliquant la méthode 2 précédemment décrite. Des solutions d'extraits bruts à 10 $mg.mL^{-1}$ ont été préparées pour chaque échantillon. Celles-ci sont ensuite étudiées par HPLC à l'aide du gradient optimisé précédemment. Les quantités relatives des composés **Ct1**, **Ct2** et **Ct3** ont été obtenues par intégration des signaux correspondant à chaque molécule sur le chromatogramme UV (210 nm) (cf Figure 104).

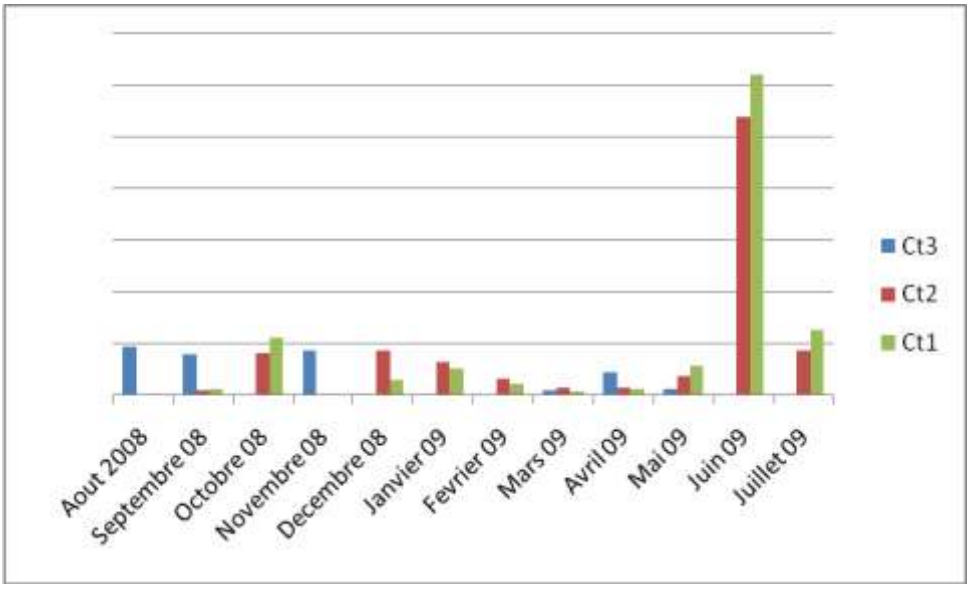


Figure 104 : *Variation saisonnière relative des composés **Ct1**, **Ct2** et **Ct3** au sein de l'extrait brut de* C. taxifolia

Tout d'abord, la présence et les proportions relatives des deux acides gras **Ct1** et **Ct2** semblent être corrélées. Le fait le plus marquant est la présence en grandes quantités des composés **Ct1** et **Ct2** en juin et juillet, indiquant que les extraits correspondants sont très riches en acides gras. Par ailleurs, la caulerpényne (**Ct3**) est majoritairement présente dans les extraits d'août, septembre et novembre, et en moindre proportion dans ceux de mars, avril et mai. Cette molécule est en revanche absente des autres extraits bruts. Il est d'ailleurs remarquable que la caulerpényne (**Ct3**) et les acides gras (**Ct1** et **Ct2**) ne soient jamais présents simultanément en grandes quantités dans un même extrait.

II. Les bryozoaires

L'ensemble des échantillons de bryozoaires récoltés dans le cadre du programme ECIMAR a été étudié par le biais d'une analyse chromatographique des extraits bruts appelée « signature chimique ». Les extraits bruts ont été obtenus à l'aide d'un protocole standardisé (cf Annexe E) développé en début de programme et destiné à avoir une vision globale du contenu chimique de chaque type d'organisme tout en tenant compte des spécificités liées à l'étude de tels échantillons (taux de sels élevés, faibles quantités de biomasse, etc).

Ces extraits bruts ont ensuite été étudiés par HPLC en utilisant une colonne chromatographique de polarité moyenne (silice greffée C6-phényle). En fait, plusieurs signatures chimiques sont obtenues simultanément lors de l'analyse chromatographique des extraits bruts grâce à l'utilisation de trois détecteurs :

- Un détecteur à barrettes de photodiodes qui permet d'obtenir une mesure simultanée sur toute l'étendue du spectre UV-Visible (entre 200 et 900 nm).

- Un détecteur DEDL[12] qui autorise l'analyse de composés exempts de chromophores ou faiblement ionisables. Ce type de détection, s'il ne donne pas d'informations structurales, permet l'obtention d'indications semi-quantitatives et conduit à l'obtention d'un chromatogramme assez réaliste quant à la proportion relative de chaque analyte.

- Un spectromètre de masse à ionisation par électronébulisation équipé d'un analyseur à trappe d'ions donnant accès à des informations spectrales, telle que la masse molaire d'un composé, et à l'analyse du rapport *m/z*.

Cette analyse chromatographique à triple détection est non seulement extrêmement puissante pour la caractérisation des différents constituants chimiques d'un extrait, mais elle permet également de comparer de façon très précise des différences de composition chimique entre plusieurs extraits.

Lors des missions organisées dans le cadre du programme ECIMAR, des échantillons de bryozoaires ont été prélevés à Marseille, à Ceuta (enclave espagnole au Maroc), en Corse, et en Crète (Grèce). Plusieurs sites de prélèvement ont été investigués pour chaque mission, les détails des prélèvements pour chaque échantillon sont donnés dans l'Annexe E. Le Tableau 22 rassemble le nombre et la provenance d'échantillons de chaque espèce étudiée.

Famille	Genre	Espèce	Marseille	Ceuta	Corse	Grèce
Smittinidae	*Smittina*	*cervicornis*	3		1	
Bitectiporidae	*Pentapora*	*fascialis*	5		3	
	Pentapora	sp.		2	1	
Myriaporidae	*Myriapora*	*truncata*	1		3	1
Phidoloporidae	*Reteporella*	sp.	4		1	1
Lepraliellidae	*Dentiporella*	*sardonica*	1			
Celloporidae	*Turbicellepora*	*avicularis*	4			
	Omalosecosa	*ramulosa*		1		
Celleporidae	*Celleporina*	*caminata*	1			
Adeonellidae	*Adeonella*	*calveti*	3	1	1	1

Tableau 22 : *Nombre et origine des différents échantillons de bryozoaires analysés*

[12] DEDL : Détecteur Evaporatif à Diffusion de la Lumière

II.1. Chimiotaxonomie

L'étude des profils chromatographiques, et plus particulièrement des spectres de masse associés à chaque pic chromatographique, permet d'obtenir des informations structurales sur les composés, ou les familles de composés, présents dans les différents échantillons de bryozoaires étudiés. Le recoupement de ces données peut ainsi permettre d'identifier des marqueurs chimiotaxonomiques communs à tous les échantillons d'une espèce ou d'un genre.

II.1.1. Détection de l'homarine

L'homarine est un alcaloïde zwitterionique (cf Figure 105) très répandu chez les cnidaires, les arthropodes, les mollusques et certaines éponges. Ce composé a été décrit comme possédant des activités antimicrobiennes [172-173] et antifouling (inhibition de la croissance de la diatomée benthique *Navicula salinicola* [174]). L'homarine est une molécule connue pour être impliquée dans la régulation de la pression osmotique chez les arthropodes [175-176]. Au niveau des bryozoaires, ce métabolite a déjà été identifié dans plusieurs espèces appartenant aux genres *Cellaria*, *Chartella*, *Bugula* [177] et *Cribricellina* [178].

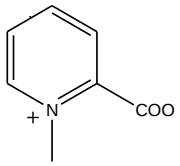


Figure 105 : *Homarine*

Dans le cadre de ce travail, la présence d'homarine a été détectée dans certains échantillons de bryozoaires. L'identification de ce métabolite a pu être réalisée par comparaison du temps de rétention et des spectres de masse avec ceux de l'homarine pure : ce métabolite a été précédemment isolé et identifié formellement au laboratoire à partir de la gorgone méditerranéenne *Paramuricea clavata*. Avec les conditions chromatographiques utilisées pour la réalisation de ces signatures chimiques, l'homarine est éluée à t_R = 3,0 min et son spectre de masse présente en mode positif un pic pseudo-moléculaire caractéristiques à *m/z* 138 correspondant à l'ion adduit $[M+H]^+$ (cf Figure 106).

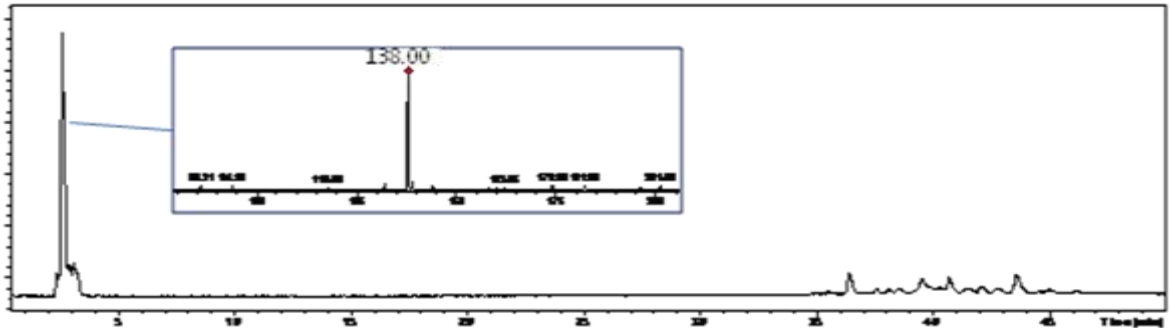


Figure 106 : *Chromatogramme DEDL d'un échantillon de* Myriapora truncata *avec le spectre de masse de l'homarine*

Dans le cadre de cette étude, la présence d'homarine a ainsi été mise en évidence dans toutes les espèces étudiées appartenant aux genres *Celleporina, Smittina, Dentiporella, Turbicellepora, Omalosecosa, Adeonella* et *Myriapora*. A titre d'exemple, la signature chimique d'un échantillon de *Myriapora truncata*, renfermant de l'homarine, est rapportée à la Figure 106. A l'inverse, la présence d'homarine n'a pas été décelée dans les échantillons correspondant aux espèces des genres *Reteporella* et *Pentapora*. Il est à noter que la présence, ou l'absence, d'homarine est une constante au sein des différents échantillons appartenant à un même genre. Ce paramètre peut donc être considéré comme une caractéristique chimique des espèces étudiées même si une étude sur un plus grand panel d'espèces serait indispensable afin de mieux évaluer le potentiel chimiotaxonomique d'un tel métabolite.

II.1.2. Présence de métabolites bromés

Parmi les différents bryozoaires étudiés, trois espèces (*Celleporina caminata, Smittina cervicornis* et *Myriapora truncata*) présentent des signatures chimiques particulièrement intéressantes avec notamment la présence de dérivés bromés.

a/ *Celleporina caminata*

La signature chimique obtenue en DEDL (cf Figure 107) à partir de l'unique échantillon de *C. caminata* étudié montre la présence de trois groupes majeurs de métabolites. Le premier groupe (t_R proche de 2 min) correspond à un ensemble des composés polaires incluant l'homarine. Le deuxième groupe comprend des composés lipidiques non identifiés (acides gras et dérivés) et élués tardivement (entre 34 et 45 min). Le troisième groupe est constitué par un seul pic chromatographique (t_R = 28,7 min) pour lequel le spectre de masse présente un massif isotopique caractéristique d'une

molécule dibromée[13]. Seuls trois composés de ce type – la chartelline C, les sécuramines C et E – ont été décrits à partir de bryozoaires de l'ordre des Cheilostomes [6]. Cependant, aucune de ces trois molécules ne peut correspondre au composé détecté car : (i) elles contiennent toutes un atome de chlore, impliquant donc un massif isotopique différent de celui trouvé ici[14] (cf Figure 107), et (ii) aucune d'entre elles ne peut correspondre à la masse molaire obtenue. Ce métabolite dibromé constitue donc un composé non encore décrit dans l'ordre des Cheilostomes : son étude structurale devra être abordée avec des quantités suffisantes d'organisme-source.

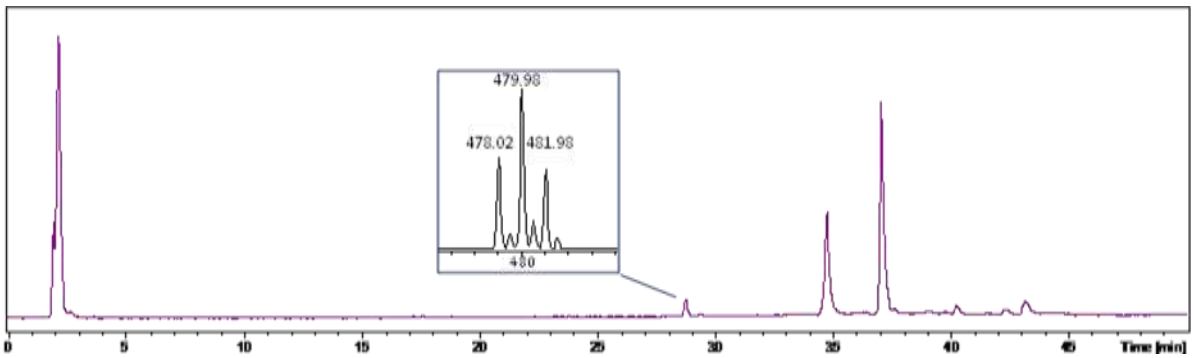


Figure 107 : *Chromatogramme DEDL de* C. caminata *(avec le spectre de masse du pic à t_R = 28,7 min)*

b/ *Smittina cervicornis*

Un échantillon de *S. cervicornis* récolté en Corse montre une signature chimique (cf Figure 108) qui se caractérise également par la présence de trois groupes de composés chimiques. Un ensemble de molécules polaires, comprenant l'homarine, est élué rapidement (massif aux alentours de t_R = 2 min) tandis que plusieurs composés lipidiques sont fortement retenus sur la colonne (t_R compris entre 40 et 45 min). Par ailleurs, un troisième groupe est constitué par trois pics chromatographiques élués entre 30 et 33 min et présents en quantité non négligeable. Ces molécules présentent des spectres de masse comportant un massif isotopique caractéristique de molécules monobromés.

[13] L'atome de brome est présent naturellement sous la forme de deux isotopes, ^{79}Br et ^{81}Br, d'abondances équivalentes.

[14] L'atome de chlore est présent naturellement sous la forme de deux isotopes, ^{35}Cl et ^{37}Cl (proportions relatives 3/1).

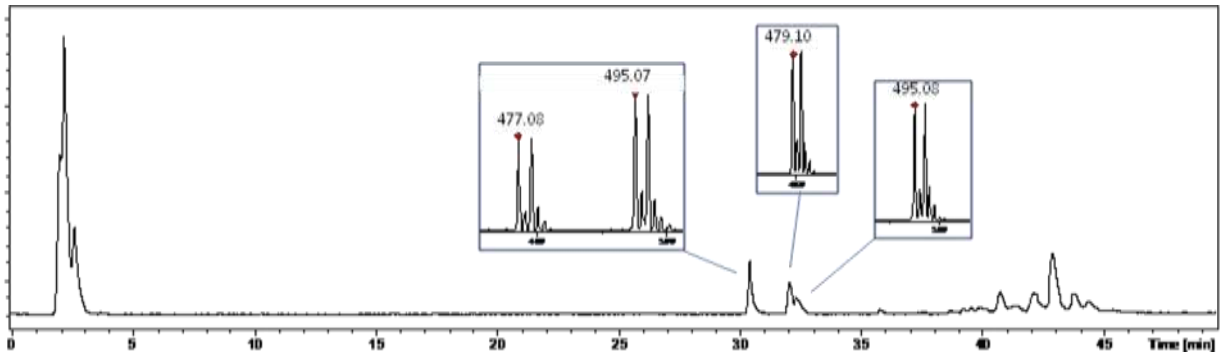


Figure 108 : *Chromatogramme DEDL de* S. cervicornis *(avec les spectres de masse des composés bromés)*

c/ *Myriapora truncata*

Parmi les cinq échantillons de *Myriapora truncata* étudiés, l'un d'eux, prélevé en Corse, montre la présence de deux signaux correspondant à deux composés, l'un monobromé (t_R = 19,8 min) et l'autre dibromé (t_R = 21,1 min) (cf Figure 109).

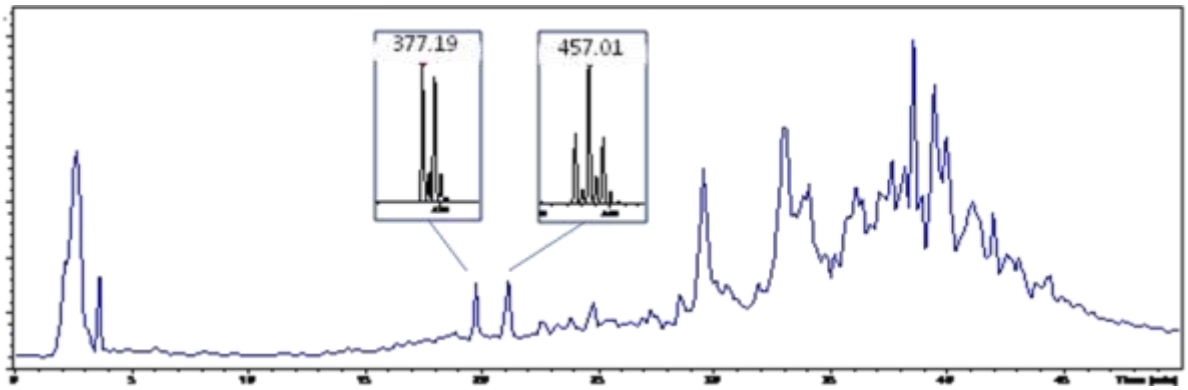


Figure 109 : *Profil +MS*[15] *d'un échantillon de* M. truncata *(avec les spectres de masse des composés bromés)*

De nombreux composés bromés ont été décrits à partir des bryozoaires de l'ordre des Cheilostomes. En particulier, près d'une quarantaine de métabolites monobromés ont été isolés à partir d'espèces appartenant aux familles des Flustridae (*Flustra foliacea* et *Securiflustra securifrons*), Bugulidae (*Sessibugula translucens*, *Bugula dentata* et *Caulibugula intermis*) et Euthyroididae (*Euthyroides episcopalis*) [6]. Néanmoins, aucun de ces métabolites ne possède une masse molaire compatible avec les ions adduits ($[M+H]^+$ ou $[M+Na]^+$) mentionnés ci-dessus.

[15] Le profil +MS représente l'ensemble des ions adduits détectés en mode positif en spectrométrie de masse

II.2. Variations géographiques

Plusieurs espèces ont fait l'objet d'un échantillonnage multiple, à la fois, en des zones très éloignées géographiquement et réparties sur l'ensemble de la mer Méditerranée, mais également sur des sites différents au sein d'une même zone géographique. Dans ce rapport, le terme "microéchelle" qualifiera les variations constatées entre plusieurs sites de prélèvement dans une même zone tandis que "macroéchelle" sera utilisé pour les comparaisons entre plusieurs zones géographiques très éloignées.

II.2.1 Myriapora truncata

Cinq échantillons de *Myriapora truncata*, appelé également « faux corail » en raison de sa ressemblance avec *Corallium rubrum*, provenant de Corse (3 échantillons), de Marseille (1 échantillon) et de Crète (1 échantillon) ont été étudiés. Les chromatogrammes UV (205 nm) des trois échantillons prélevés en Corse, en deux sites différents, sont tout à fait superposables à l'exception des deux composés bromés mentionnés précédemment à t_R = 19,8 et 21,1 min (cf Figure 110 en bleu).

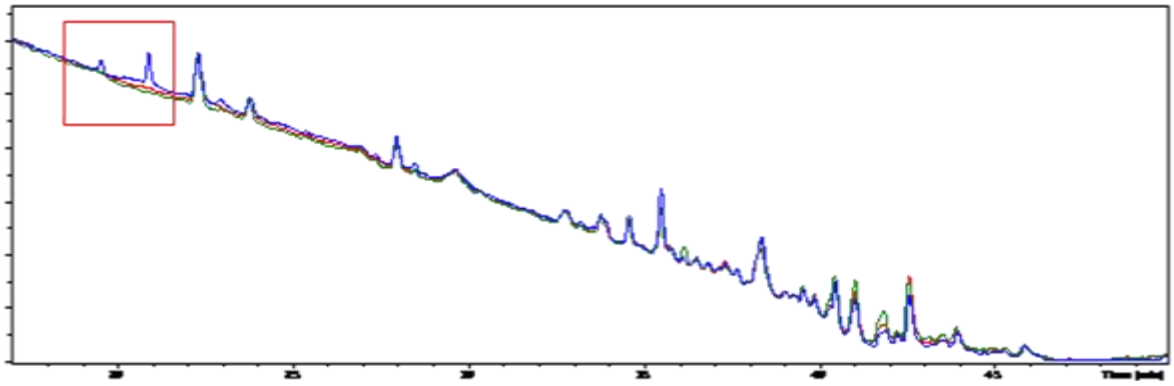


Figure 110 : *Détails des chromatogrammes UV (205 nm) des trois échantillons de* M. truncata *prélevés en Corse*

Par ailleurs, la comparaison des chromatogrammes UV (205 nm) des échantillons récoltés en Crète, à Marseille et en Corse a révélé de faibles différences (cf Figure 111).

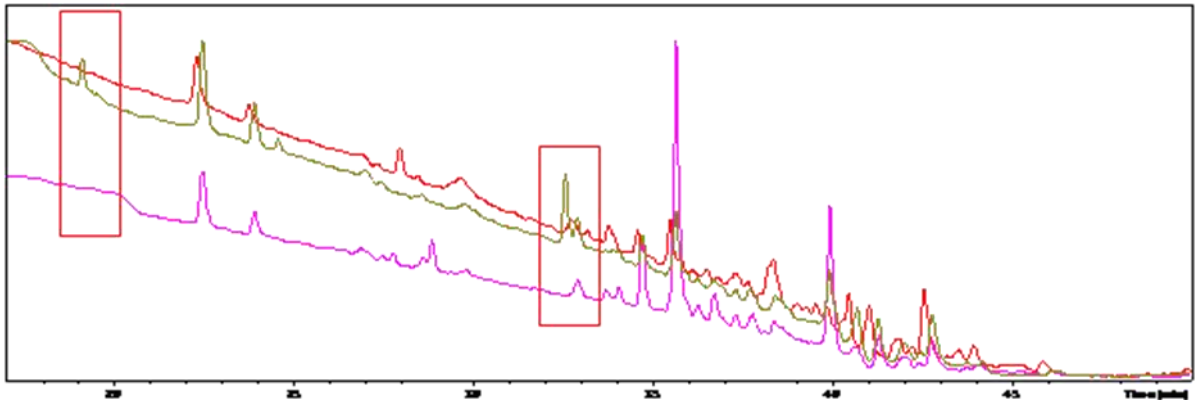


Figure 111 : *Détails des chromatogrammes UV (205 nm) de trois échantillons de* M. truncata *prélevés en Corse (rouge), en Crète (rose) et à Marseille (or)*

En effet, il existe quelques variations qualitatives entre les trois profils, notamment concernant les composés à t_R = 19,2 et 32,5 min qui sont seulement présents dans l'échantillon récolté à Marseille. Néanmoins, les profils chromatographiques sont relativement similaires et ne présentent dans l'ensemble que quelques variations quantitatives. L'espèce *Myriapora truncata* semble donc présenter de faibles variations à macroéchelle.

II.2.2 Turbicellepora avicularis

Quatre échantillons de *Turbicellepora avicularis*, tous prélevés à Marseille, ont été étudiés. Les quatre signatures sont qualitativement très proches. Seul un échantillon présente de légères différences par rapport aux trois autres : présence de deux pics supplémentaires à t_R = 28,6 et 39,9 min et absence d'un pic à t_R = 27,6 min (cf Figure 112). Cet échantillon présente la particularité d'avoir été récolté en 2008 alors que les trois autres échantillons l'ont été en 2007.

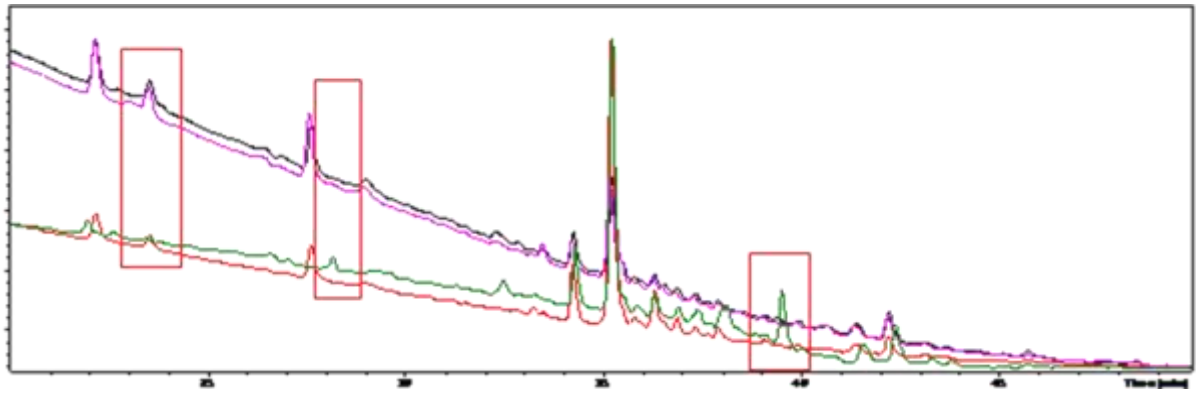


Figure 112 : *Détails des chromatogrammes UV (205 nm) des quatre échantillons de* T. avicularis *prélevés à Marseille en 2007 et en 2008 (vert)*

L'espèce *Turbicellepora avicularis* présente donc une très faible variabilité de sa composition chimique à microéchelle et au niveau temporel.

II.2.3 Smittina cervicornis

Quatre échantillons de *Smittina cervicornis* prélevés à Marseille, pour 3 d'entre eux, et en Corse, pour le dernier, ont été étudiés. Il apparait que l'échantillon provenant de Corse (cf Figure 113 en rouge) a une signature chimique relativement différente des trois organismes prélevés à Marseille qui eux sont superposables. La différence la plus significative réside dans l'absence de pics à t_R = 27,9 et 39,7 min .

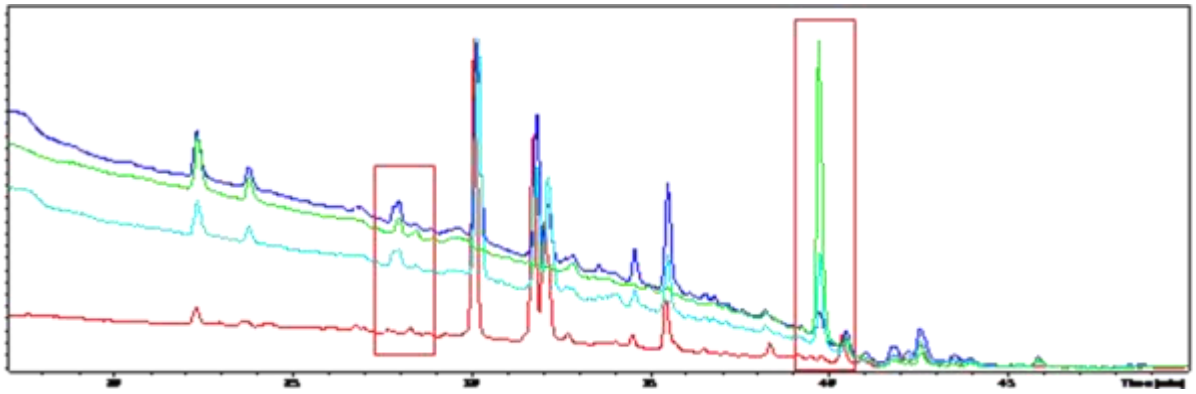


Figure 113 : *Détails des chromatogrammes UV (205 nm) de quatre échantillons de* S. cervicornis *prélevés en Corse (rouge) et à Marseille*

En réalité, il existe surtout des différences quantitatives entre ces profils. A titre d'exemple, les composés bromés, élués entre t_R = 30 et 33 min, sont présents en grande quantité dans l'échantillon de Corse alors qu'ils ne sont détectés qu'en faibles quantités dans deux échantillons de Marseille et qu'ils sont même absents dans le troisième (cf échelles d'intensité Figure 114).

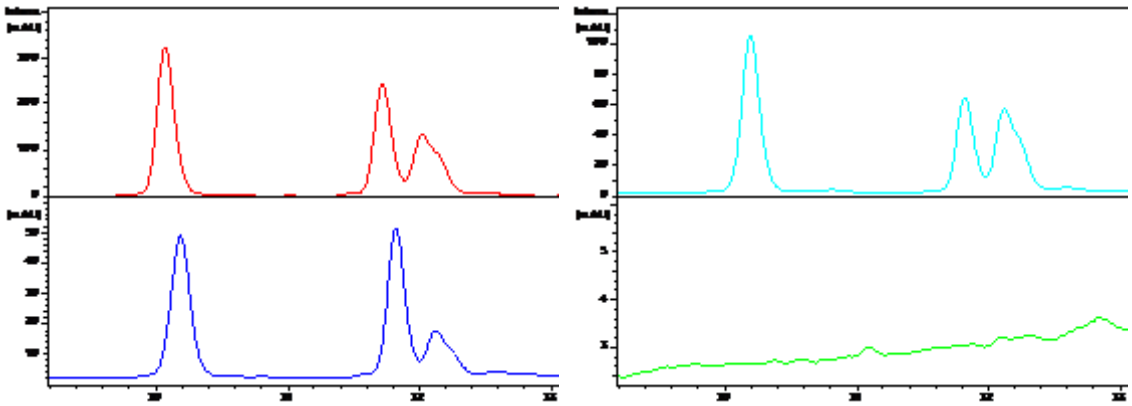


Figure 114 : *Détails des chromatogrammes UV (254 nm) des échantillons de* S. cervicornis *prélevés en Corse (rouge) et à Marseille*

Ces composés bromés caractéristiques ne semblent donc pas pouvoir être considérés comme un marqueur chimiotaxonomique de l'espèce *S. cervicornis*.

II.2.4 Reteporella sp.

Six échantillons de *Reteporella* sp. récoltés à Marseille en 2007 (2 échantillons) et 2008 (2 échantillons), en Corse (1 échantillon) et en Grèce (1 échantillon) ont été analysés. Hormis pour les deux prélèvements réalisés à Marseille en 2007 sur deux sites distincts, toutes les signatures chimiques obtenues présentent d'importantes différences qualitatives. L'identification de ces organismes n'ayant été réalisée qu'au niveau générique, il parait donc difficile de discuter de ces différences de signatures chimiques du point de vue de la variabilité géographique ou temporelle.

II.2.5 Adeonella calveti

Six échantillons d'*Adeonella calveti* récoltés à Marseille en 2007 (1 échantillon) et 2008 (2 échantillons), en Corse (1 échantillon), à Ceuta (1 échantillon) et en Grèce (1 échantillon) ont été comparés. Seuls les deux échantillons prélevés à Marseille en 2008 présentent des signatures chimiques identiques. La Figure 115 rassemble les chromatogrammes DEDL des deux signatures similaires (Marseille 2008) et, à titre d'exemple, de deux échantillons (Corse et Crète) présentant des profils quantitativement et qualitativement différents.

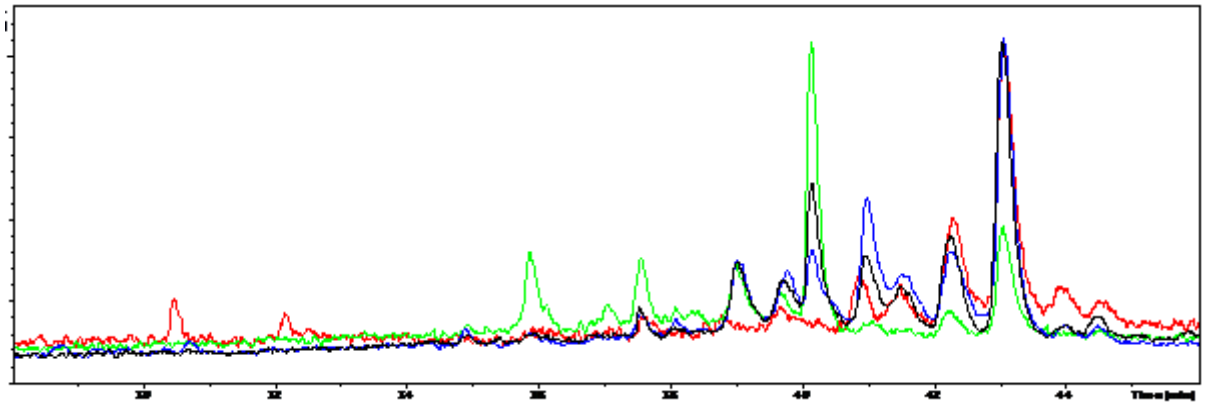


Figure 115 : *Détails des chromatogrammes DEDL de quatre échantillons d'*A. calveti *prélevés en Corse (rouge), en Crète (vert) et à Marseille en 2008 (bleu et noir)*

En outre, une étude approfondie de la signature chimique de l'organisme prélevé en Corse révèle la présence de composés bromés élués entre t_R = 30 et 33 min. Cette particularité a déjà été observée dans un échantillon de *S. cervicornis*. Après comparaison des deux chromatogrammes, de très fortes similitudes sont apparues (cf Figure 116).

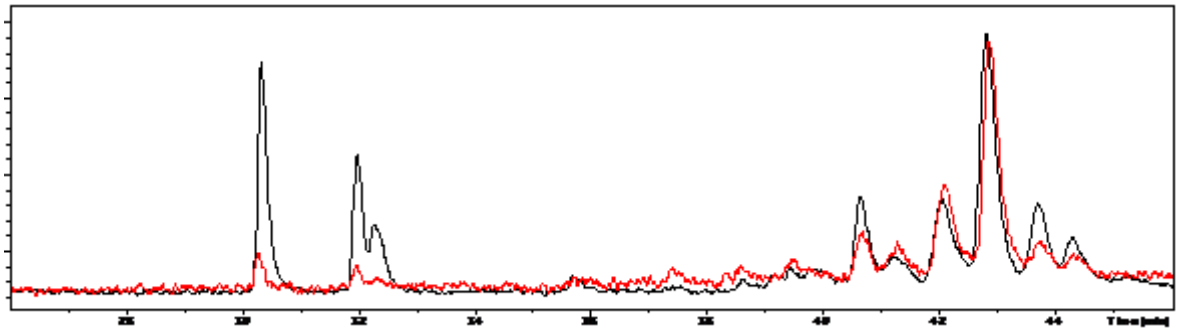


Figure 116 : *Détails des chromatogrammes DEDL de deux échantillons de* S. cervicornis *(noir) et d'*A. calveti *(rouge) prélevés en Corse*

Les bryozoaires *S. cervicornis* et *A. calveti* sont morphologiquement très proches et il est parfois difficile de les différencier. La similitude frappante des signatures chimiques pourrait donc être due à une erreur d'identification lors de la récolte.

II.2.6 Pentapora fascialis et *Pentapora* sp.

Onze échantillons d'organismes appartenant au genre *Pentapora* (huit *Pentapora fascialis* et trois *Pentapora* sp.) ont été étudiés. Parmi les échantillons de *P. fascialis*, cinq ont été prélevés à Marseille (quatre en 2008 et un en 2007) et trois ont été prélevés en Corse. Les signatures chimiques des spécimens prélevés à Marseille en 2008, sur trois sites différents, sont rigoureusement identiques (cf Figure 117).

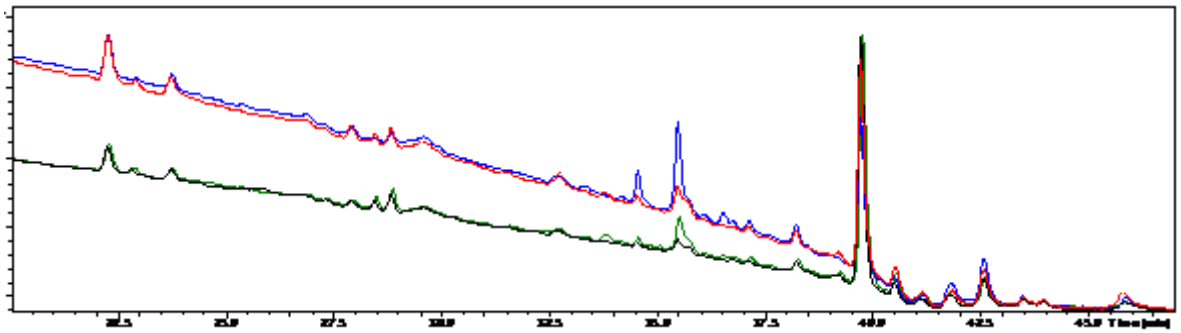


Figure 117 : *Détails des chromatogrammes UV (205 nm) des quatre échantillons de* P. fascialis *prélevés à Marseille en 2008*

Par ailleurs, les trois échantillons prélevés en Corse, sur deux sites différents, ont également des signatures chimiques superposables (cf Figure 118). Ces observations confirment que les variations à microéchelle sont très faibles pour cette espèce également.

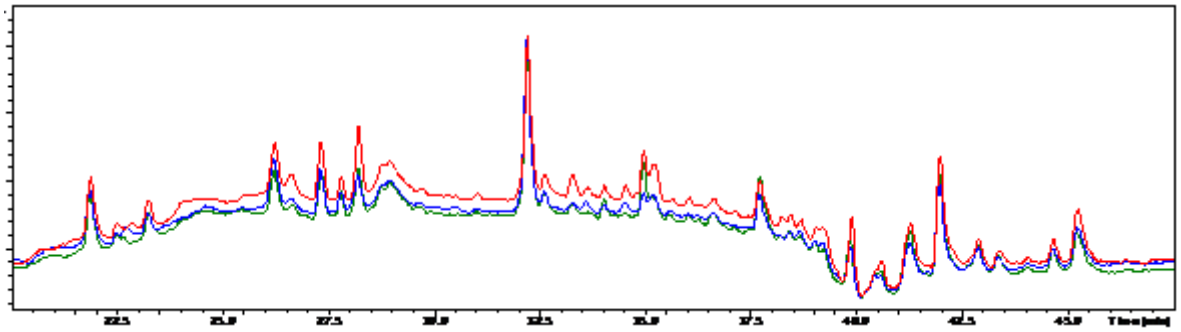


Figure 118 : *Détails des chromatogrammes UV (205 nm) des trois échantillons de* P. fascialis *prélevés en Corse en 2008*

A l'inverse, la comparaison des signatures chimiques de *P. fascialis* prélevés en Corse et à Marseille en 2008 montrent des différences qualitatives significatives. Les variations à macroéchelle semblent donc importantes pour cette espèce. De plus, la comparaison des profils chromatographiques obtenus pour deux spécimens prélevés à Marseille en 2007 et 2008 montre de grandes différences, tant quantitatives que qualitatives.

Parallèlement, les signatures chimiques de deux échantillons de *Pentapora* sp. prélevés à Ceuta en 2007 montre une très grande ressemblance, tant au niveau qualitatif que quantitatif (cf Figure 119). Cette observation semble confirmer la faible variabilité à microéchelle constatée précédemment.

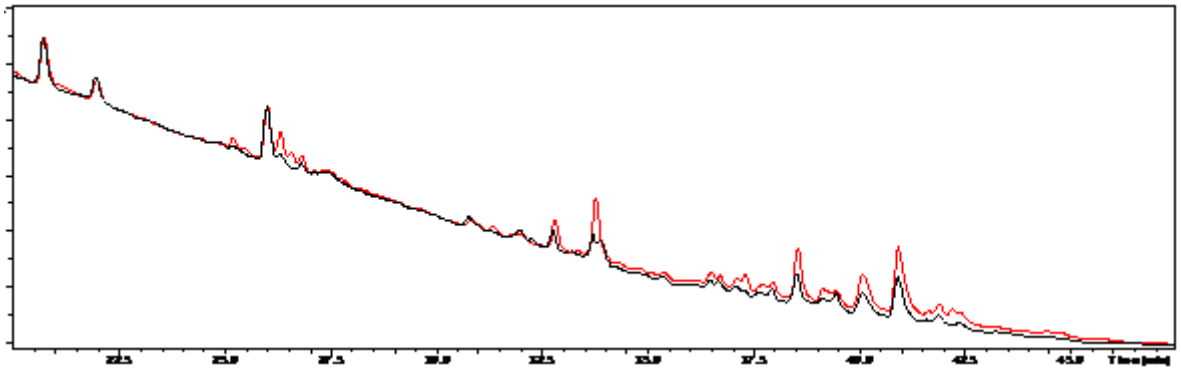


Figure 119 : *Détails des chromatogrammes UV (205 nm) des deux échantillons de* Pentapora *sp. prélevés à Ceuta en 2007*

Par ailleurs, la signature chimique de l'échantillon de *Pentapora* sp. prélevé en Corse a été comparée à celle de *Pentapora fascialis* provenant du même site. De nombreuses différences apparaissent entre ces deux profils chromatographiques (cf Figure 120). De faibles variations à microéchelle ont été observées précédemment pour les différents échantillons appartenant au genre *Pentapora*. Il semblerait donc que l'échantillon de *Pentapora* sp. appartienne à une espèce différente de *Pentapora fascialis*.

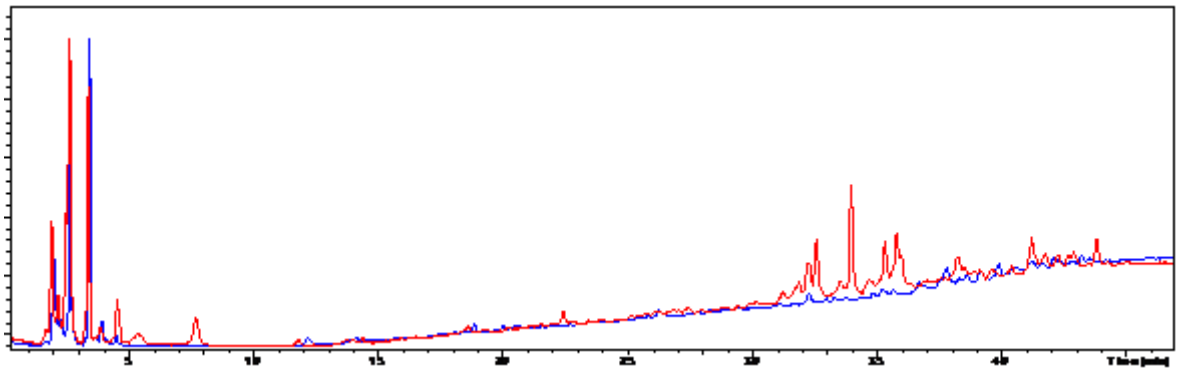


Figure 120 : *Détails des chromatogrammes UV (254 nm) de deux échantillons de* Pentapora *sp. et* P. fascialis *prélevés en Corse en 2008 sur le même site*

Les signatures chimiques des bryozoaires étudiés dans le cadre du programme ECIMAR présentent généralement peu de variations quantitatives et pas de variations qualitatives à microéchelle pour une même espèce. Par ailleurs, si certaines espèces comme *Myriapora truncata* et *Smittina cervicornis* ont des signatures chimiques relativement similaires entre deux échantillons prélevés sur des zones d'étude différentes, d'autres bryozoaires comme *Adeonella calveti* ou *Pentapora fascialis* présentent de nombreuses variations qualitatives à macroéchelle.

III. Activité antifouling

L'activité antifouling des métabolites isolés en quantité suffisante – au moins 5 mg – à partir de *Dictyota* sp., *Dictyota dichotoma* et *Caulerpa taxifolia* a été évaluée. Parallèlement, des prélèvements mensuels de *C. taxifolia* ont été effectués afin d'étudier la variation temporelle des propriétés antifouling de l'extrait brut.

III.1. Présentation du test antifouling (anti-adhésion)

Les études réalisées au sein de notre laboratoire consistent à évaluer l'activité de composés ou d'extraits plus particulièrement envers le microfouling. Pour cela, une souche bactérienne de *Pseudoalteromonas* sp. a été utilisée. Cette bactérie "pionnière" fait partie des premières espèces présentes lors de la formation d'un biofilm primaire marin. L'originalité de cette méthodologie réside dans la nature de l'activité testée : en effet, si la plupart des tests réalisés sur les bactéries concernent leur croissance (ou plutôt l'inhibition de celle-ci), c'est l'inhibition de l'adhésion du biofilm au substrat qui est étudiée dans notre cas. Cette expérience, adaptée d'un test déjà décrit [179], consiste à étudier

le pourcentage d'adhésion bactérienne en fonction de la présence, et de la concentration dans le milieu, d'un métabolite ou d'un extrait testé.

III.2. Résultats obtenus avec des métabolites purs

III.2.1. Métabolites isolés à partir d'algues du genre Dictyota

L'activité anti-adhésion de sept composés, isolés en quantité suffisante à partir de *Dictyota* sp., a été évaluée (cf Tableau 23). L'activité de ces métabolites a été comparée à celle de plusieurs biocides standards : d'une part le TBTO, aujourd'hui interdit, et d'autre part des co-biocides actuellement utilisés dans les revêtements antifouling comme le Seanine 211, le Preventol ou le $CuSO_4$ [180].

Composé	CE_{50} [a] (μM)	R^2 [b]
TBTO	10	0,92
Seanine 211	70	0,90
Preventol	> 500	
$CuSO_4$	> 500	
Ds3	110	0,78
Ds4	250	0,99
Ds6	100	0,99
Ds7	330	0,84
Ds9	230	0,92
Ds10	30	0,96
Ds12	70	0,92

[a] : Concentration effective correspondant à une inhibition de 50% de l'adhésion bactérienne
[b] : Qualité de l'ajustement de la courbe sigmoïde dose-réponse

Tableau 23 : *Inhibition de l'adhésion du biofilm de* Pseudoalteromonas *sp. par des biocides standards et plusieurs composés isolés à partir de* Dictyota *sp.*

Les composés **Ds4**, **Ds7** (appartenant à la famille des dolabellanes) et **Ds9** (hydroxycrénulide) présentent de faibles activités en anti-adhésion (CE_{50} > 200 μM) envers le biofilm de *Pseudoalteromonas* sp. tandis que **Ds3**, **Ds6** (dictyol E) et **Ds12** (fucoxanthine) témoignent d'activités modérées (75 μM < CE_{50} < 150 μM). Parmi les substances naturelles testées, le dictyol C (**Ds10**) est le composé le plus actif : il présente une CE_{50} trois fois plus élevée que celle obtenue avec le TBTO mais plus faible que celle obtenue avec le Seanine 211.

Précédemment, deux métabolites appartenant au groupe I, le dictyol E et l'acétate de dictyol B, avaient fait l'objet d'études en antifouling et avaient été évalués pour leur action sur la fixation de larves de plusieurs invertébrés marins : *Eudendrium carneum* (cnidaire), *Bugula neritina* et *Amathia convoluta* (bryozoaires) [108]. Ces deux composés, qui présentaient des propriétés anti-adhésion intéressantes envers ces larves, ont été identifiés comme étant présents à la surface de l'algue [181]. Ils peuvent

donc être considérés d'un point de vue écologique comme prenant part à la défense chimique de l'algue contre les colonisateurs.

III.2.2. Métabolites isolés de Caulerpa taxifolia

L'activité anti-adhésion de **Ct3** ainsi que celle du clionastérol, purifié précédemment au laboratoire à partir d'extraits de *C. taxifolia*, a été évaluée à l'encontre d'un biofilm bactérien de *Pseudoalteromonas* sp. (cf Tableau 24)[16].

Composé	CE_{50} [a] (μM)	R^2 [b]
TBTO	10	0,92
Seanine 211	70	0,90
Preventol	> 500	
$CuSO_4$	> 500	
Ct3 (caulerpényne)	20	0,98
Ct5 (clionastérol)	110	0,91

[a] : Concentration effective correspondant à une inhibition de 50% de l'adhésion bactérienne
[b] : Qualité de l'ajustement de la courbe sigmoïde dose-réponse

Tableau 24 : *Inhibition de l'adhésion du biofilm de* Pseudoalteromonas *sp. par des biocides standards et plusieurs composés isolés à partir de* Caulerpa taxifolia.

Le clionastérol présente une activité anti-adhésion modérée envers le biofilm de *Pseudoalteromonas* sp. (CE_{50} = 110 μM). En revanche, la caulerpényne montre une très forte activité, proche de celle du TBTO et bien supérieure à celle du Seanine 211. Ce métabolite, dont la participation à la défense chimique de *C. taxifolia* contre les herbivores a déjà été mise en évidence [21, 122, 124], pourrait être impliqué plus spécifiquement dans le processus de régulation des communautés bactériennes à la surface de l'algue.

III.3. Résultats obtenus avec des extraits bruts (*Caulerpa taxifolia*)

Les différents extraits bruts étudiés précédemment par HPLC ont également fait l'objet d'une analyse de leur activité anti-adhésion. La Figure 121 rassemble les CE_{50} (en $\mu g.mL^{-1}$) de l'ensemble des douze extraits mensuels.

[16] L'activité des composés **Ct1** et **Ct2** n'a pu être obtenue en raison de problèmes d'adsorption non spécifique du fluorochrome en présence des composés purs, ce qui empêche l'interprétation des données obtenues.

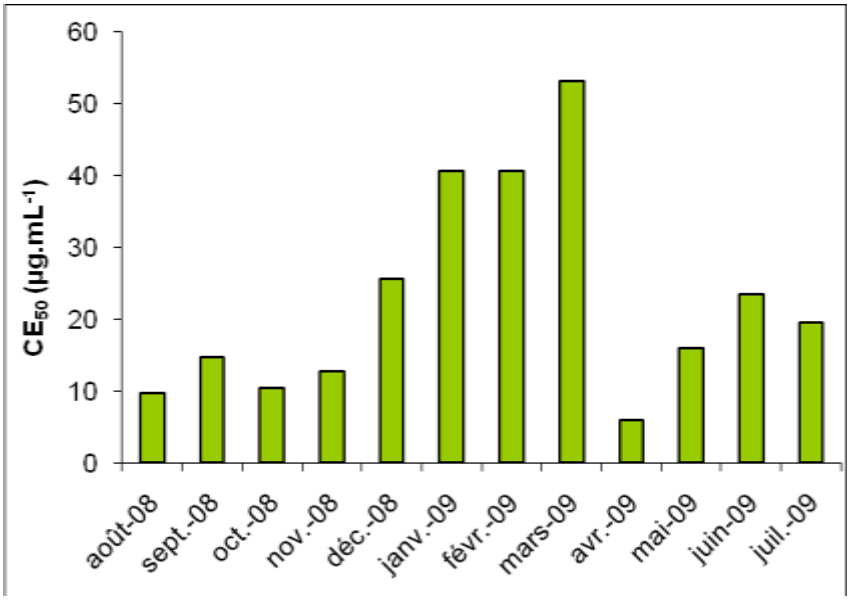


Figure 121 : *Inhibition de l'adhésion du biofilm de* Pseudoalteromonas *sp. par les extraits bruts de* C. taxifolia

L'activité anti-adhésion des extraits bruts varient assez fortement au cours de l'année. On peut distinguer deux phases principales : (i) une période hivernale, de janvier à mars, durant laquelle les extraits présentent une activité relativement faible ($CE_{50} > 40$ $\mu g.mL^{-1}$), et (ii) le reste de l'année, durant laquelle les extraits présentent une activité plus élevée (6 $\mu g.mL^{-1} < CE_{50} < 26$ $\mu g.mL^{-1}$).

Ces résultats peuvent être corrélés avec les analyses effectuées en HPLC sur ces mêmes extraits pour lesquels la concentration en composés **Ct1**, **Ct2** et **Ct3** a été évaluée. On peut constater que la caulerpenyne (**Ct3**), qui possède une forte activité anti-adhésion envers le biofilm de *Pseudoalteromonas* sp. ($CE_{50} = 20$ $\mu g.mL^{-1}$), est présente en quantité importante dans les échantillons d'août, septembre, novembre et avril, or ces extraits possèdent une CE_{50} relativement faible et donc une activité assez importante. Parallèlement, le composé **Ct3** est présent en faible quantité, voire absent, dans les extraits de décembre, janvier, février et mars pour lesquels une faible activité anti-adhésion a été constatée (CE_{50} élevée). Néanmoins, les propriétés anti-adhésion des échantillons testés ne peuvent s'expliquer simplement par le taux de caulerpenyne qu'ils contiennent. En effet, le clionastérol (**Ct5**), qui n'a pu être dosé dans l'extrait brut, possède également une activité anti-adhésion non négligeable ($CE_{50} = 110$ $\mu g.mL^{-1}$). Par ailleurs, l'obtention des CE_{50} correspondant aux composés **Ct1** et **Ct2** aurait pu permettre d'expliquer notamment l'activité trouvée pour l'échantillon du mois de juin dans lequel ces deux métabolites sont présents en grande quantité. Plus généralement, les activités anti-adhésion constatées peuvent également être dues à d'autres métabolites présents en plus faible quantité et non identifiés, ou bien peuvent être dues à des phénomènes plus complexes de synergie entre plusieurs molécules.

IV. Autres activités

L'activité biologique de certains extraits bruts de bryozoaires a été évaluée dans le cadre du programme ECIMAR (cf Tableau 25). Trois types de tests ont ainsi été réalisés : (i) des études d'activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales humaines KB (carcinome humain nasopharyngé) à deux concentrations (10 et 1 μg.mL^{-1}), (ii) une évaluation de l'activité anti-farnésyl transférase vis-à-vis de l'enzyme de la levure *Saccharomyces cerevisiae* à la concentration de 20 μg.mL^{-1} et (iii) une évaluation de l'activité antimalarique *via* l'étude de la croissance *in vitro* de *Plasmodium falciparum* à deux concentrations différentes (10 et 1 μg.mL^{-1}).

Espèce	Echantillon[17]	KB[a] 10 μg.mL^{-1}	KB[a] 1 μg.mL^{-1}	PTFase[b] 20 μg.mL^{-1}	FcB1[c] 10 μg.mL^{-1}	FcB1[c] 1 μg.mL^{-1}
Pentapora sp.	070630Ce1-06	35	11	**93**[d]	24	0
Pentapora sp.	070630Ce2-03	**101**	8	**89**[d]	17	0
Adeonella calveti	070630Ce2-07	13	8	65[d]	-22	4
Turbicellepora avicularis	070716Ma2-24	7	3	79[d]	**84**	**5**
Reteporella sp.	070717Ma4-23	20	-10	73	5	1
Pentapora fascialis	070717Ma4-25	20	9	76[d]	-7	4
Turbicellepora avicularis	070717Ma4-27	7	-2	72	55	3
Adeonella calveti	070717Ma4-28	1	1	62[d]	-13	5
Turbicellepora avicularis	070718Ma5-26	12	3	80[d]	**90**	**12**
Reteporella sp.	070718Ma5-30	16	-9	76	10	0

[a] : pourcentage d'inhibition d'activité cellulaire
[b] : pourcentage d'inhibition d'activité de l'enzyme
[c] : pourcentage d'inhibition de croissance de la bactérie
[d] : Résultats à prendre avec prudence en raison d'une inégalité de réponse aux deux longueurs d'ondes testées

Tableau 25 : *Activités biologiques de différents extraits de bryozoaires*

Un des échantillons de *Pentapora* sp. (070630Ce2-03) présente une activité cytotoxique prometteuse sur les cellules KB ainsi qu'une activité antiPFTase intéressante, cette dernière demandant néanmoins à être confirmée en raison des difficultés expérimentales. Le second échantillon de *Pentapora* sp. (070630Ce1-06) présente une bonne activité antiPFTase qui doit être également confirmée. Enfin, l'espèce *Turbicellepora avicularis* parait prometteuse pour son activité antiplasmodiale (inhibition > 80% à 10 μg.mL^{-1}). De manière surprenante, alors que plusieurs échantillons d'une même espèce présentent des signatures chimiques superposables, leurs activités biologiques montrent des différences marquées : c'est le cas de *Pentapora* sp et de *Turbicellepora avicularis* pour lesquelles, respectivement, les activités cytotoxiques et antipaludiques varient en fonction de l'échantillon testé.

[17] Le nom des échantillons, par exemple 070630Ce1-06, est formé de la manière suivante : 070630 correspond à la date de prélèvement (aammjj), Ce1 renseigne le site de prélèvement (cf Annexe E) et le dernier nombre (06) indique le numéro de l'échantillon.

Matériels et méthodes

I. Appareillage

I.1. Analyses chromatographiques

Les colonnes chromatographiques ouvertes ont été effectuées en utilisant une colonne en verre (hauteur : 100 cm ; diamètre : 3 cm) remplie avec de la silice (Si60, 40-63 μm, Merck).

Plusieurs colonnes chromatographiques ont été utilisées lors de ce travail :

- Une colonne semi-préparative (Merck Purospher STAR RP18e ; 5 μm ; 10 × 250 mm ; 3 mL.min^{-1}) a été utilisée pour la majorité des purifications.
- Une colonne analytique (Merck Purospher STAR RP18e ; 5 μm ; 4,0 × 125 mm ; 1 mL.min^{-1}) a été utilisée pour les études de l'extrait brut de *C. taxifolia*.
- Une colonne analytique (Merck Purospher STAR RP8e ; 5 μm ; 4,6 × 125 mm ; 1 mL.min^{-1}) a été utilisée pour l'étude de la fraction stérolique de *C. foeniculacea*.
- Une colonne analytique (Phenomenex Gemini C-6-Phenyl ; 5 μm ; 3,0 × 250 mm ; 1 mL.min^{-1}) a été utilisée pour les analyses effectuées sur les bryozoaires.

Les études chromatographiques réalisées par Chromatographie Liquide Haute Performance ont été effectuées avec trois appareils différents :

- Une chaîne HPLC de marque Bio-Tek Instrument composée d'un dégazeur (Bio-Tek Instrument, Degasser 3493), d'une pompe ternaire (System 525), d'un injecteur automatique (560 Autosampler), d'un four à colonnes (582 Column Thermostat) et d'un détecteur UV mono-longeur d'onde (LCD Analitycal).
- Une chaîne HPLC de marque Varian, composée d'un dégazeur, d'une pompe monovoie (modèle Prostar 210) et d'un détecteur réfractométrique (modèle 350 RI Dectector).
- Une chaîne HPLC de marque VWR-Hitachi composée d'une pompe quaternaire L-2130, d'un injecteur automatique L-2200 et d'un four L-2300. Cette chaîne est équipée d'une triple détection : (i) un spectromètre de masse (Brüker, Esquire 6000 à ionisation par électronébulisation (ESI) équipé d'un analyseur à trappe d'ion, (ii) un détecteur UV-visible à barrettes de diodes (L-2455) et (iii) un détecteur DEDL (EUROSEP, Chromachem).

Tous les solvants utilisés lors de ces expériences sont de qualité HPLC.

I.2. Analyses spectrales

Les spectres de masse haute résolution (HR-ESI/MS) ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre de masse LTQ/FT-Orbitrap (ThermoFinnigan).

Les valeurs de pouvoir rotatoire ont été obtenues avec un polarimètre Perkin-Elmer 343 (cellule de 10 cm) dans du méthanol à une concentration de 0,1 $mg.mL^{-1}$.

Les spectres obtenus en UV-Visible ont été effectués dans du méthanol avec un spectrophotomètre Shimadzu UV-2501PC.

Les spectres infra-rouge ont été réalisés sur un spectrophotomètre Jasco J-410 en formant un film entre deux pastilles de KBr.

L'ensemble des expériences RMN ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 400 MHz en utilisant le $CDCl_3$ comme solvant. Les spectres RMN ont été calibrés en utilisant les pics résiduels du solvant, soit δ_H 7,26 ppm en RMN ^1H et δ_C 77,0 ppm en RMN ^{13}C.

I.3. Analyses biologiques

Lors de la réalisation des tests en anti-adhésion, l'intensité de fluorescence a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques Infinit 200 (Tecan).

II. Modélisation moléculaire

Les études de modélisation moléculaire ont été réalisées avec le logiciel HyperChem Release 8.05 Pro pour Windows (Hypercube). Pour chaque stéréoisomère à modéliser, la géométrie initiale a été construite, puis le système a été optimisé par mécanique moléculaire (MM+) jusqu'à un gradient final de valeur quadratique moyenne de 0,01 *in vacuo* (méthode Polak-Ribière). Des contraintes de longueur (distances interatomiques devant être inférieures à 3 Å) ont été imposées pour se conformer aux données RMN obtenues expérimentalement. Le système a ensuite été optimisé avec ces contraintes par mécanique moléculaire (MM+) jusqu'à un gradient final de valeur quadratique moyenne de 0,01 *in vacuo* (méthode Polak-Ribière). A l'issue de cette étape, les contraintes de longueur ont été supprimées, puis un programme de dynamique moléculaire est appliqué sur une durée de 1 ps (pas de 0,01 ps, temps de relaxation de 0,1 ps) jusqu'à une température simulée de 300 K. Cette étape est suivie par un processus d'optimisation de la géométrie (MM+) jusqu'à un gradient final de valeur quadratique moyenne de 0,2. Ce protocole a été répété deux fois, puis la géométrie a été optimisée jusqu'à un gradient final de valeur quadratique moyenne de 0,01 *in vacuo* (méthode Polak-

Ribière) par la méthode semi-empirique AM1 (RHF : restricted Hartree-Fock), charge : 0, multiplicité de spin : 1, état fondamental).

III. Tests antifouling anti-adhésion

La souche bactérienne, *Pseudoalteromonas* sp. D41[18] a été cultivée dans un milieu VNSS (Vaatanen Nine Salt solution) à 25°C et a été prélevée au début de la phase stationnaire. Après centrifugation, les cellules ont été remises en suspension dans de l'eau de mer artificielle stérile (EMA) jusqu'à atteindre une densité optique de 0,6 à 600 nm. Puis, 200 μL d'EMA sont placés dans les puits du bord de la microplaque (stérile, noire, en polystyrène, NUNC), et 100 μL de suspension bactérienne sont placés dans les autres puits à l'aide d'une pipette multicanal. Des échantillons dilués de 100 μL du biocide standard (TBTO) et des autres molécules, à différentes concentrations, sont ajoutés dans ces puits. Chaque concentration a été testée en triplicat. Enfin 100 μL d'eau de mer artificielle sont ajoutés dans six puits qui constitueront les échantillons témoins de l'adhésion bactérienne. Après 15h, les bactéries qui n'ont pas adhéré sont éliminées par trois lavages à l'aide d'une solution stérile de NaCl à 36 $g.L^{-1}$. Les bactéries ayant adhéré sont alors fixées pendant 90 min à 4°C avec une solution stérile de NaCl (36 $g.L^{-1}$) contenant 2% de formaldéhyde. Les bactéries sont ensuite marquées par ajout de 200 μL de solution de DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) à 4 $\mu g.mL^{-1}$. L'excès de DAPI est éliminé par trois lavages successifs à l'aide d'une solution de NaCl à 36 $g.L^{-1}$. Le DAPI est ensuite solubilisé dans 200 μL d'éthanol à 95%, et la fluorescence est mesurée (λ_{exc} 380 nm, λ_{em} 495 nm). Les valeurs de CE_{50} sont déterminées comme les concentrations correspondant à 50% de l'adhésion bactérienne témoin mesurée dans l'eau de mer artificielle témoin dans six puits.

Un second fluorochrome, le Syto red 61, est utilisé pour la révélation des tests effectués sur les extraits bruts et les produits purs obtenus à partir *de C. taxifolia*. Après les 15h d'ensemencement, une première série de lavages est réalisée à l'aide d'une solution stérile de NaCl à 36 $g.L^{-1}$. Le marquage des bactéries est ensuite effectué avec 200 μL de Syto red 61 à 1 μM. Après 10 min passées à l'obscurité, une deuxième série de trois lavages est réalisée à l'aide d'une solution de NaCl à 36 $g.L^{-1}$. La fluorescence est mesurée (λ_{exc} 615 nm, λ_{em} 670 nm) sur la dernière solution de lavage.

[18] Cette souche a été gracieusement fournie par C. Compère (Service Interfaces et Capteurs, IFREMER Brest, France)

Conclusion

Ce mémoire rassemble les résultats obtenus lors de l'étude phytochimique de différents types d'organismes marins de Méditerranée communément rencontrés le long des côtes varoises, dans le but d'identifier des molécules non toxiques potentiellement actives en antifouling.

Le premier volet de cette étude est constitué d'une revue bibliographique comprenant un bref descriptif du parc national de Port-Cros, partenaire de cette thèse, ainsi qu'un inventaire ordonné des différents constituants chimiques des espèces étudiées et une description du phénomène de biofouling et de ses implications économiques et écologiques.

Les travaux effectués ont porté sur plusieurs espèces d'algues et de bryozoaires ; ils comportent plusieurs aspects distincts :

- L'isolement et la caractérisation structurale de métabolites secondaires à partir de ces organismes, avec une attention toute particulière portée à l'analyse stéréochimique des molécules décrites (expérience NOESY ^{1}H-^{1}H, modélisation moléculaire).

- L'étude des variations dans l'expression métabolique des organismes étudiés par le biais de la mise en place et de l'optimisation de protocoles d'extraction et d'analyses chromatographiques.

- L'étude des activités biologiques, en particulier l'activité antifouling par le biais d'un test en anti-adhésion, des métabolites purs et des extraits bruts obtenus à partir des organismes analysés.

Tout d'abord, les extraits bruts obtenus à partir de quatre échantillons d'algues (une algue verte, *Caulerpa taxifolia* et trois algues brunes, *Dictyota* sp., *Dictyota dichotoma* et *Cystoseira foeniculacea*) ont fait l'objet d'un travail de purification et d'identification des métabolites secondaires contenus dans ces organismes. Les différentes étapes de purifications successives ont été effectuées à l'aide de plusieurs méthodes chromatographiques (CC, HPLC). Les métabolites purs ainsi obtenus ont ensuite été identifiés à l'aide de méthodes d'analyses spectroscopiques (RMN 1D et 2D, SM, SM-HR, IR-TF, UV-visible, polarimétrie) afin de déterminer la structure chimique de chacun. Au total, 23 molécules

ont été décrites parmi lesquelles 8 sont originales. Il s'agit d'un dérivé d'oxydation du tocophérol (**Ct4**) isolé à partir de *C. taxifolia*, de quatre diterpènes (**Ds1**-**Ds4)** et d'un *bis*-diterpène (**Ds5**) décrits à partir d'une espèce de *Dictyota* non identifiée, et de deux diterpènes (**Dd1** et **Dd2**) issus de *D. dichotoma*. Le composé **Ds5** présente un squelette particulièrement original car constitué de deux unités diterpéniques différentes reliés par une liaison C-C. La configuration relative des différents stéréocentres de la plupart de ces molécules a été obtenue grâce à l'étude des spectres NOESY ^{1}H-^{1}H et par comparaison avec les données de la littérature. En ce qui concerne les composés **Ds1** et **Ds5**, l'étude effectuée par l'analyse des corrélations NOE s'est avérée insuffisante pour déterminer la stéréochimie de certains centres asymétriques. La géométrie des différents stéréoisomères envisageables a alors été optimisée par modélisation moléculaire, à l'aide de calculs semi-empiriques notamment, afin d'obtenir le conformère le plus stable pour chacun d'entre eux. Les valeurs théoriques obtenues pour certains paramètres structuraux (angles dièdres et distances interatomiques) ont alors été confrontées aux données RMN expérimentales (constantes de couplage et corrélations NOE) afin de déterminer le stéréoisomère effectivement isolé. Parallèlement, 15 molécules connues ont été purifiées et caractérisées, pour certaines d'entre-elles (**Ct3**, **Ds9**, **Ds11**, **Cf2** et **Cf3**) des corrections ont été apportées dans l'attribution de certains signaux RMN par rapport aux données issues de la littérature.

Dans un second temps, afin d'améliorer la compréhension des phénomènes de fluctuations de la composition chimique d'organismes marins, un suivi temporel de l'algue invasive *C. taxifolia* a été réalisé. Pour cette étude, des protocoles spécifiques d'extraction, de conservation des extraits et d'analyse chromatographique ont été mis au point. Les résultats obtenus montrent notamment d'importantes quantités de la caulerpényne durant la période automnale.

D'autre part, dix espèces de bryozoaires récoltés en mer Méditerranée ont fait l'objet d'une analyse de leur expression métabolique via l'étude de leurs profils chromatographiques (« signatures chimiques »). Un composé couramment rencontré chez les invertébrés marins, l'homarine, ainsi que plusieurs métabolites bromés originaux ont d'ailleurs été détectés dans les extraits de certaines espèces grâce à l'étude de leurs spectres de masse. Les signatures chimiques obtenues ont également permis de caractériser, pour certaines espèces, des variations significatives de l'expression métabolique à macro-échelle ; tandis que pour la majorité de ces bryozoaires peu de modifications dans la composition chimique ont été observées à macro-échelle.

Enfin, dans une dernière partie, les propriétés antifouling de plusieurs métabolites isolés en quantités suffisantes ont été évaluées à l'encontre d'un biofilm bactérien de *Pseudoalteromonas* sp., une espèce pionnière du microfouling. Plus précisément, neuf molécules ont été testées parmi lesquelles **Ds3**, **Ds4**, **Ds6**, **Ds7**, **Ds9**, **Ds10** et **Ds12** décrites à partir de *Dictyota* sp., ainsi que **Ct3** et le clionastérol purifiés à partir de *C. taxifolia*. Le dictyol C (**Ds10**) et la caulerpényne (**Ct3**), qui sont les composés

les plus actifs, présentent respectivement une CE_{50} de 30 μM et 20 μM, soit des valeurs supérieures à celle du TBTO mais largement inférieures à celles des molécules utilisées actuellement comme co-biocide dans des revêtements antifouling. Par ailleurs, les extraits mensuels de *C. taxifolia* présentent des activités plus faibles lors de la période hivernale. Les activités observées sont parfois corrélées avec le taux de caulerpényne, néanmoins, ce seul facteur ne peut expliquer à lui seul les propriétés anti-adhésion observées.

Les organismes marins constituent donc un important réservoir de molécules bioactives, notamment dans le domaine du biofouling. Il nous parait nécessaire aujourd'hui de poursuivre l'étude chimique de ces organismes, à l'heure où les activités humaines menacent de plus en plus les écosystèmes marins.

Perspectives

A l'issue de ces travaux, il parait important de poursuivre la recherche de molécules originales à partir d'algues. En effet, malgré les multiples études portant sur les algues brunes et notamment sur la famille des *Dictyotaceae*, plusieurs métabolites nouveaux, dont l'un possède un squelette original, ont pu être identifiés, preuve que toute la chimiodiversité produite par ces organismes n'a pas été encore recensée de manière exhaustive. De la même manière, des travaux de purification pourront être envisagés sur différentes espèces de bryozoaires car ces organismes ont été, jusqu'à présent, relativement peu étudiés d'un point de vue chimique comparativement aux autres phyla marins. A l'instar des métabolites bromés présents dans plusieurs espèces, *Smittina cervicornis*, *Myriapora truncata* et *Celleporina caminata*, de nouvelles molécules peuvent être décrites à partir de ces organismes.

Dans un second temps, la détermination complète de la stéréochimie de certains métabolites, tel que **Ds5** par exemple, constitue en enjeu scientifique qui nécessitera l'utilisation conjointe de différentes techniques spectrales couplées à des analyses par modélisation moléculaire de chacun des stéréoisomères du composé étudié. Des études de ce type pourraient être ainsi envisagées par dichroïsme circulaire ou par modélisation de données RMN ^{13}C.

Enfin, l'évaluation de l'activité antifouling de ces substances naturelles peut être développée. En effet, des tests anti-adhésion peuvent être réalisés sur d'autres extraits et molécules, mais également avec d'autres souches bactériennes (notamment celles présentes dans le même milieu), ce qui permettrait de mieux appréhender le rôle de ces métabolites dans la défense chimique de l'organisme. Par ailleurs, des analogues des molécules les plus actives, telles que le dictyol C, le clionastérol ou la caulerpényne, peuvent être synthétisés dans le but : (i) d'améliorer l'activité de ces molécule vis-à-vis de l'adhésion du microfouling, (ii) d'obtenir des quantités plus importantes en vue de les incorporer dans des revêtements antisalissures.

Travaux scientifiques

Publications

Viano Y., D. Bonhomme, M. Camps, J.-F. Briand, A. Ortalo-Magné, Y. Blache, L. Piovetti and G. Culioli "Diterpenoids from the mediterranean brown alga *Dictyota* sp. evaluated as antifouling substances against a marine bacterial biofilm" *J. Nat. Prod.*, **2009**. *72*(7): 1299-1304.

En préparation :

Viano Y., D. Bonhomme, A. Ortalo-Magné, M. El Hattab, L. Piovetti, Y. Blache and G. Culioli "Dictyotodimer A, an asymmetric *bis*-diterpenoid from the brown alga *Dictyota* sp. "

Viano Y., C. Lefebvre, A. Ortalo-Magné, A. Barcelo, L. Piovetti, and G. Culioli "A new tocopherol derivative from the invasive green alga *Caulerpa taxifolia*"

Aliche Z., Y. Viano, M. El Hattab, N. Bouzidi, A. Ortalo-Magné, L. Piovetti, Y. Blache and G. Culioli "Diterpenoids from an Algerian collection of the brown alga *Dictyota dichotoma*"

Communications orales

Viano Y., D. Bonhomme, M. Camps, J.-F. Briand, A. Ortalo-Magné, Y. Blache and G. Culioli "Algal diterpenoids as antifouling substances against a marine bacterial biofilm" *6th European Conference on Marine Natural Products*, Porto (Portugal), 19-23 juillet 2009.

Communications par affiche

Viano Y., D. Bonhomme, M. Camps, J.-F. Briand, A. Ortalo-Magné, Y. Blache et G. Culioli " Des composés diterpéniques d'origine marine en tant qu'inhibiteurs de biofilms bactériens" *21èmes Journées de la Chimie SFC-PACA*, Marseille, 21 Avril 2009.

Viano Y., D. Bonhomme, G. Culioli and L. Piovetti "Phytochemical study of the mediterranean seaweed *Dictyota linearis* (dictyotales, phaeophyta)" *4° Journées Franco Italiennes de Chimie*, Nice, 17-18 Avril 2008.

Aliche Z., Viano Y., M. El Hattab, N. Bouzidi, Y. Daghbouche, G. Culioli and L. Piovetti "Analyse phytochimique de l'algue brune méditerranéenne *Cystoseira ercegovicii*" *1er Colloque International de Chimie (CiC-1)*, Batna (Algérie), Novembre 2007.

Bonhomme D., Viano Y., G. Culioli and L. Piovetti "Etude des phytoconstituants de l'algue méditerranéenne *Dictyota linearis* (Dictyotales, Phaeophyta)" *3ème Colloque de la Chimie Azuréenne*, Nice, 19 Octobre 2007.

Aliche Z., Viano Y., M. El Hattab, N. Bouzidi, Y. Daghbouche, G. Culioli and L. Piovetti "Etude de la composition chimique de *Cystoseira ercegovicii*" *20èmes Journées de la Chimie SFC-PACA*, Avignon, 24 Mai 2007.

Bibliographie

1. Kornprobst, J.M., "Substances naturelles d'origine marine". Tec & Doc. **2005**, Paris.

2. Geraci, S., M. Faimali, L. Piovetti and G. Cimino. "Antifouling from nature: laboratory test with *Balanus amphitrite* darwin on algae and sponges". in *10th International Congress on Marine Corrosion and Fouling*. **2001**. Melbourne: University of Melbourne.

3. Barcelo, A., "Application de la stratégie de lutte contre l'espèce *Caulerpa taxifolia* de 2005 à 2007 à Port-Cros et à Porquerolles". **2008**. Rapport

4. Cottalorda, J.-M., J. Gratiot, P.-A. Mannoni, J. de Vaugelas and A. Meinesz, "Suivi de l'invasion des algues introduites *Caulerpa taxifolia* et *Caulerpa racemosa* en Méditerranée : situation devant les côtes françaises au 31 décembre 2007". **2008**. E.A. 4228 ECOMERS - Laboratoire Environnement Marin Littoral - Université de Nice-Sophia Antipolis publ., 42 pp. + 96 pages d'annexes

5. Faulkner, D.J., "Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999)". *Natural Product Reports*, **2000**. *17*: 1-6.

6. Blunt, J.W. and M.H.G. Munro, "MarinLit database". Department of Chemistry, University of Canterbury

7. Guiry, M.D. and G.M. Guiry. *Algaebase, World-wide electronic publication*. National University of Ireland, Galway Mars 2010; accessible depuis: http://www.algaebase.org/.

8. Meinesz, A. and B. Hesse, "Introduction et invasion de l'algue tropicale *Caulerpa taxifolia* en Méditerranée nord-occidentale". *Oceanologica Acta*, **1991**. *14*(4): 415.

9. Thibaut, T., "Etude fonctionnelle, contrôle et modélisation de l'invasion d'une algue introduite en Méditerranée : Caulerpa taxifolia". **2001**. Université Paris VI. 272 p.

10. Jousson, O., J. Pawlowski, L. Zaninetti, A. Meinesz and C.F. Boudouresque, "Molecular evidence for the aquarium origin of the green alga *Caulerpa taxifolia* introduced to the Mediterranean Sea". *Marine Ecology Progress Series*, **1998**. *172*: 275-280.

11. Komatsu, T., A. Meinesz and D. Buckles, "Temperature and light responses of alga *Caulerpa taxifolia* introduced into the Mediterranean Sea". *Marine Ecology Progress Series*, **1997**. *146*: 145-153.

12. Meinesz, A., T. Belsher, T. Thibaut, B. Antolic, K.B. Mustapha, C.-F. Boudouresque, D. Chiaverini, F. Cinelli, J.-M. Cottalorda, A. Djellouli, A. El Abed, C. Orestano, A.M. Grau, L. Ivesa, A. Jaklin, H. Langar, E. Massuti-Pascual, A. Peirano, L. Tunesi, J. de Vaugelas, N. Zavodnik and A. Zuljevic, "The introduced green alga *Caulerpa taxifolia* continues to spread in the Mediterranean". *Biological Invasions*, **2001**. *3*(2): 201-210.

13. *C.O.L. : Moteur de recherche Caulerpa On Line* Mars 2010; accessible depuis: http://www.unice.fr/LEML/PagesStatiques/CaulStart.htm.

14. Belsher, T., M. Lunven, E. Le Gall, X. Caisey, O. Dugornay and C. Mingant, "Acquisition de données sur l'expansion de *Caulerpa taxifolia* et *Caulerpa racemosa* en rade d'Hyères et en rade de Toulon (France)". *Oceanologica Acta*, **2003**. *26*(2): 161-166.

15. Amico, V., G. Oriente, M. Piattelli and C. Tringali, "Caulerpenyne, an unusual sesquiterpenoid from the green alga *Caulerpa prolifera* ". *Tetrahedron Letters*, **1978**(38): 3593.

16. Amade, P. and R. Lemée, "Chemical defence of the mediterranean alga *Caulerpa taxifolia*: variations in caulerpenyne production". *Aquatic Toxicology*, **1998**. *43*: 287-300.

17. Dumay, O., G. Pergent, C. Pergent-Martini and P. Amade, "Variations in caulerpenyne contents in *Caulerpa taxifolia* and *Caulerpa racemosa*". *Journal of Chemical Ecology*, **2002**. *28*(2): 343-352.

18. Guerriero, A., F. Marchetti, M. D'Ambrosio, S. Senesi, F. Dini and F. Pietra, "New ecotoxicologically and biogenetically relevant terpenes of the tropical green seaweed *Caulerpa taxifolia* which is invading the Mediterranean". *Helvetica Chimica Acta*, **1993**. *76*(2): 855-864.

19. Guerriero, A., A. Meinesz, M. D'Ambrosio and F. Pietra, "Isolation of toxic and potentially toxic sesqui- and monoterpenes from the tropical green seaweed *Caulerpa taxifolia* which has invaded the region of cap Martin and Monaco". *Helvetica Chimica Acta*, **1992**. *75*(3): 689-695.

20. Raffaelli, A., S. Pucci and F. Pietra, "Ionspray tandem mass spectrometry for sensitive, rapid determination of minor toxic sesquiterpenoids in the presence of analogues of the foreign green seaweed *Caulerpa taxifolia* which is invading the northwestern Mediterranean". *Analytical Communications*, **1997**. *34*: 179-182.

21. Jung, V. and G. Pohnert, "Rapid wound-activated transformation of the green algal defensive metabolite caulerpenyne". *Tetrahedron*, **2001**. *57*(33): 7169-7172.

22. Schwede, J.G., J.H. Cardellina, S.H. Grode, T.R. James and A.J. Blackman, "Distribution of the pigment caulerpin in species of the green alga *Caulerpa*". *Phytochemistry*, **1986**. *26*(1): 155-158.

23. Aguilar-Santos, G., "Caulerpin, a new red pigment from green algae of the genus *Caulerpa* ". *Journal of the Chemical Society*, **1970**. *C*: 842.

24. Maiti, B.C., R.H. Thomson and M. Mehendra, "The structure of caulerpin, a pigment from *Caulerpa* algae". *Journal of Chemical Research*, **1978**: 126-127.

25. Valls, R., J. Artaud, A. Archavlis, N. Vicente and L. Piovetti, "Composition stérolique de l'extrait de *Caulerpa taxifolia* récemment introduite en Méditerranée". *Oceanologica Acta*, **1994**. *17*(2): 223.

26. Doty, M.S. and G. Aguilar-Santos, "Transfer of toxic alga substances in marine food chains". *Pacific Science* **1970**. *24*(3): 331-355.

27. Bheemasankara Rao, C. and C. Pullaiah, "Chemical examination of marine algae of visakhapatnam coast: constituents of *Caulerpa taxifolia*". *Idian Journal of Chemistry*, **1981**. *21B*: 264-265.

28. Mao, S.-C., Y.-W. Guo and X. Shen, "Two novel aromatic valerenane-type sesquiterpenes from the Chinese green alga *Caulerpa taxifolia*". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2006**. *16*(11): 2947-2950.

29. Mancini, I., G. Guella, A. Defant, M.L. Candenas, C.P. Armesto, D. Depentori and F. Pietra, "Polar metabolites of the tropical seaweed *Caulerpa taxifolia* which is spreading in the Mediterranean Sea: Glycoglycerolipids and stable enols (α-keto esters)". *Helvetica Chimica Acta*, **1998**. *81*(9): 1681-1691.

30. Rao, N.V.S.A.V.P. and E.V. Rao, "Structural features of the sulphated polysaccharide from a green seaweed, *Caulerpa taxifolia*". *Phytochemistry*, **1986**. *25*(7): 1645.

31. De Napoli, L., E. Fattorusso, S. Magno and L. Mayol, "Furocaulerpin, a new acetylenic sesquiterpenoid from the green alga *Caulerpa prolifera*". *Experientia*, **1981**. *37*(11): 1132.

32. De Napoli, L., E. Fattorusso, S. Magno and L. Mayol, "Three squalene derivatives from *Caulerpa prolifera*". *Phytochemistry*, **1982**. *21*(3): 782-784.

33. De Napoli, L., S. Magno, L. Mayol and E. Novellino, "Further caulerpenyne-like esters from the green alga *Caulerpa prolifera*". *Experientia*, **1983**. *39*(2): 141.

34. Smyrniotopoulos, V., D. Abatis, L.A. Tziveleka, C. Tsitsimpikou, V. Roussis, A. Loukis and C. Vagias, "Acetylene sesquiterpenoid esters from the green alga *Caulerpa prolifera*". *Journal of Natural Products*, **2003**. *66*(1): 21-24.

35. Doty, M.S. and G. Aguilar-Santos, "Caulerpicin, a toxic constituent of *Caulerpa*". *Nature*, **1966**. *211*: 990.

36. Nielsen, P.G., J.S. Carle and C. Christophersen, "Final structure of caulerpicin, a toxin mixture from the green alga *Caulerpa racemosa*". *Phytochemistry*, **1982**. *21*(7): 1643-1645.

37. Anjaneyulu, A.S.R., C.V.S. Prakash, K.V.S. Raju and U.V. Mallavadhani, "Isolation of new aromatic derivatives from a marine algal species *Caulerpa racemosa*". *Journal of Natural Products*, **1992**. *55*(4): 496-499.

38. Paul, V.J. and W. Fenical, "Toxic feeding deterrents from the tropical alga *Caulerpa bikinensis* (Chlorophyta)". *Tetrahedron Letters*, **1982**. *23*(48): 5017.

39. Paul, V.J. and W. Fenical, "Diterpenoid metabolites from pacific marine algae of the order Caulerpales (Chlorophyta)". *Phytochemistry*, **1985**. *24*(10): 2239-2243.

40. Paul, V.J., M.M. Littler, D.S. Littler and W. Fenical, "Evidence for chemical defense in tropical green alga *Caulerpa ashmeadii* (Caulerpaceae: Chlorophyta): Isolation of new bioactive sesquiterpenoids". *Journal of Chemical Ecology*, **1987**. *V13*(5): 1171.

41. Blackman, A.J. and R.J. Wells, "Caulerpol, a diterpene alcohol, related to vitamin A, from *Caulerpa brownii* (algae)". *Tetrahedron Letters*, **1976**(31): 2729.

42. Blackman, A.J. and R.J. Wells, "Flexilin and trifarin, terpene 1,4-diacetoxybuta-1,3-dienes from two species (chlorophyta)". *Tetrahedron Letters*, **1978**. *19*(33): 3063-3064.

43. Capon, R.J., E.L. Ghisalberti and P.R. Jefferies, "Metabolites of the green algae, *Caulerpa* species". *Phytochemistry*, **1983**. *22*(6): 1465-1467.

44. Handley, J.T. and A.J. Blackman, "Monocyclic diterpenes from the marine alga *Caulerpa trifaria* (Chlorophyta)". *Australian Journal of Chemistry*, **2000**. *53*: 67-71.

45. Handley, J.T. and A.J. Blackman, "Secondary metabolites from the marine alga *Caulerpa brownii* (Chlorophyta)". *Australian Journal of Chemistry*, **2005**. *58*: 39-46.

46. Caye, G., P. Chambet, L. Delahaye, A. Meinesz, D. Pietkiewicz and K. Ryder, eds. Différences entre *Caulerpa taxifolia* de Méditerranée et *Caulerpa taxifolia* des mers tropicales. Second International Workshop on *Caulerpa taxifolia*. **1996**: Barcelona, Spain, p171-176.

47. Cabioc'h, J., J.Y. Floc'h, A. Le Toquin, C.F. Boudouresque, A. Meinesz and M. Verlaque, "Guide des algues des mers d'Europe". Ed. Delachaux et Niestlé. **1992**, Paris. 232 p.

48. Faulkner, D.J., "Marine natural products: metabolites of marine algae and herbivorous marine molluscs". *Natural Product Reports*, **1984**. *1*: 251-280.

49. Iwagawa, T., K. Nakamura, T. Hirose, H. Okamura and M. Nakatani, "New xenicane diterpenes isolated from the acetone extract of the soft coral *Xenia florida*". *Journal of Natural Products*, **2000**. *63*(4): 468-472.

50. König, G.M., J.C. Coll, B.F. Bowden, J.M. Gulbis, M.F. MacKay, S.C. Labarre and D. Laurent, "The Structure Determination of a Xenicane Diterpene from Xenia garciae". *Journal of Natural Products*, **2004**. *52*(2): 294-299.

51. Duh, C.-Y., A.A.H. El-Gamal, C.-Y. Chiang, C.-J. Chu, S.-K. Wang and C.-F. Dai, "New cytotoxic xenia diterpenoids from the formosan soft coral *Xenia umbellata*". *Journal of Natural Products*, **2002**. *65*(12): 1882-1885.

52. Miyaoka, H., H. Mitome, M. Nakano and Y. Yamada, "Xeniaoxolane: a new xenicane-type diterpenoid from the Okinawan soft coral, *Xenia* sp.; absolute configurations of xeniaoxolane, Xeniolide-A and Xenialactol". *Tetrahedron*, **2000**. *56*(39): 7737-7740.

53. Enoki, N., R. Ishida and T. Matsumoto, "Structures and conformations of new nine-membered ring diterpenoids from the marine alga *Dictyota dichotoma*". *Chemistry Letters*, **1982**. *11*(11): 1749-1752.

54. König, G.M., A.D. Wright and O. Sticher, "New xenicane and hydroazulenoid diterpenes from an Australian collection of *Dictyota divaricata*". *Tetrahedron*, **1991**. *47*(8): 1399-1410.

55. Ravi, B.N. and R.J. Wells, "New nine-membered ring diterpenes from the brown alga *Dictyota prolificans*". *Australian Journal of Chemistry*, **1982**. *35*(1): 121-128.

56. Manzo, E., M.L. Ciavatta, S. Bakkas, G. Villani, M. Varcamonti, A. Zanfardino and M. Gavagnin, "Diterpene content of the alga D*ictyota ciliolata* from a Moroccan lagoon". *Phytochemistry Letters*, **2009**. *2*(4): 211-215.

57. Norte, M., A.G. Gonzalez, P. Arroyo, M. Zarraga, C. P,rez, M.L. Rodriguez, C. Ruiz-Perez and L. Dorta, "New xenicane diterpenes from the brown algae of Dictyotaceae". *Tetrahedron*, **1990**. *46*(17): 6125.

58. Ohtani, I., T. Kusumi, M.O. Ishitsuka and H. Kakisawa, "Absolute configurations of marine diterpenes possessing a xenicane skeleton. An application of an advanced Mosher's method". *Tetrahedron Letters*, **1989**. *30*(24): 3147-3150.

59. Ohtani, I., T. Kusumi, Y. Kashman and H. Kakisawa, "High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids". *Journal of the American Chemical Society*, **1991**. *113*(11): 4092-4096.

60. Blount, J.F., R.W. Dunlop, K.L. Erickson and R.J. Wells, "Two diterpenes with new carbocyclic ring systems from an australian collection of the brown alga *Dictyota dichotoma*". *Australian Journal of Chemistry*, **1982**. *35*(1): 145.

61. Kirkup, M.P. and R.E. Moore, "Identity of sanadaol with [beta]-crenulal, a diterpene from the brown alga *Dictyota crenulata*". *Phytochemistry*, **1983**. *22*(11): 2527-2529.

62. Sun, H.H., F.J. McEnroe and W. Fenical, "Acetoxycrenulide, a new bicyclic cyclopropane-containing diterpenoid from the brown seaweed *Dictyota crenulata*". *Journal of Organic Chemistry*, **1983**. *48*(11): 1903-1906.

63. Midland, S.L., R.M. Wing and J.J. Sims, "New crenulides from the sea hare, *Aplysia vaccaria*". *Journal of Organic Chemistry*, **1983**. *48*(11): 1906-1909.

64. Amico, V., G. Oriente, M. Piattelli, C. Tringali, E. Fattorusso, S. Magno and L. Mayol, "Dilphol, a new ten-membered-ring diterpene alcohol from the brown alga *Dilophus ligulatus*". *Journal of Chemical Society, Chemical Communications*, **1976**(24): 1024-1025.

65. Hirschfeld, D.R., W. Fenical, G.H.Y. Lin, R.M. Wing, P. Radlick and J.J. Sims, "Marine natural products. VIII. Pachydictyol A, an exceptional diterpene alcohol from the brown alga, *Pachydictyon coriaceum*". *Journal of the American Chemical Society*, **1973**. *95*(12): 4049-4050.

66. Yamase, H., K. Umemoto, T. Ooi and T. Kusumi, "Structures and absolute stereochemistry of five new secospatanes and a spatane isolated from the brown alga *Dilophus okamurai* Dawson". *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **1999**. *47*(6): 813-818.

67. Ireland, C., D.J. Faulkner, J. Finer and J. Clardy, "A novel diterpene from *Dollabella californica*". *Journal of the American Chemical Society*, **1976**. *98*(15): 4664-4665.

68. Pettit, G.R., R.H. Ode, C.L. Herald, R.B. Von Dreele and C. Michel, "Antineoplastic agents. 46. The isolation and structure of dolatriol". *Journal of the American Chemical Society*, **1976**. *98*(15): 4677-4678.

69. Ochi, M., I. Miura and T. Tokoroyama, "Structure of Linearol, a novel diterpenoid from the brown seaweed *Dictyota linearis* ". *Journal of Chemical Society. Chemical Communications*, **1981**. *3*: 100.

70. Patterson, G.W., "The distribution of sterols in algae". *Lipids*, **1971**. *V6*(2): 120.

71. Perez-Bermudez, P., M. Garcia-Carrascosa, M.J. Cornejo and J. Segura, "Water-depth effects in photosynthetic pigment content of the benthic algae Dictyota dichotoma and Udotea petiolata". *Aquatic Botany*, **1981**. *11*: 373-377.

72. Müller, D.J., G. Gassmann, W. Boland, F. Marner and L. Jaenicke, "*Dictyota dichotoma* (Phaeophyceae): Identification of the sperm attractant". *Science*, **1981**. *212*: 1040.

73. Crews, P., T.E. Klein, E.R. Hogue and B.L. Myers, "Tricyclic diterpenes from the brown marine algae *Dictyota divaricata* and *Dictyota linearis*". *Journal of Organic Chemistry*, **1982**. *47*(5): 811-815.

74. Ochi, M., K. Asao, H. Kotsuki, I. Miura and K. Shibata, "Amijitrienol and 14-deoxyisoamijiol, two new diterpenoids from the brown seaweed *Dictyota linearis*". *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **1986**. *59*(2): 661-662.

75. Ochi, M., M. Watanabe, M. Kido, Y. Ichikawa and I. Miura, "Amijidictyol, a new diterpenoid from the brown seaweed *Dictyota linearis*: X-ray cristal and molecular structure". *Chemistry Letters*, **1980**: 1233-1234.

76. Ochi, M., M. Watanabe, I. Miura, M. Taniguchi and T. Tokoroyama, "Amijiol, Isoamijiol, and 14-Deoxyamijiol, three new diterpenoids from the brown seaweed *Dictyota Linearis*". *Chemistry Letters*, **1980**: 1229-1232.

77. Siamopoulou, P., A. Bimplakis, D. Iliopoulou, C. Vagias, P. Cos, D. Vanden Berghe and V. Roussis, "Diterpenes from the brown algae *Dictyota dichotoma* and *Dictyota linearis*". *Phytochemistry*, **2004**. *65*(14): 2025-2030.

78. Danise, B., L. Minale, R. Riccio, V. Amico, G. Oriente, M. Piattelli, C. Tringali, E. Fattorusso, S. Magno and L. Mayol, "Further perhydroazulene diterpenes from marine organisms". *Experientia*, **1977**. *33*(4): 413.

79. Amico, V., G. Oriente, M. Piattelli and C. Tringali, "Dictyoxide, a new diterpene from the brown alga *Dilophus ligulatus*". *Phytochemistry*, **1979**. *18*(11): 1895-1897.

80. Duran, R., E. Zubia, M.J. Ortega and J. Salva, "New diterpenoids from the alga *Dictyota dichotoma*". *Tetrahedron*, **1997**. *53*(25): 8675-8688.

81. Ireland, C. and D.J. Faulkner, "Diterpenes from *Dolabella californica*". *The Journal of Organic Chemistry*, **1977**. *42*(19): 3157-3162.

82. Fattorusso, E., S. Magno, L. Mayol, C. Santacroce, D. Sica, V. Amico, G. Oriente, M. Piattelli and C. Tringali, "Dictyol A and B, two novel diterpene alcohols from the brown alga *Dictyota dichotoma*". *Journal of Chemical Society, Chemical Communications*, **1976**(14): 575.

83. Faulkner, D.J., B.N. Ravi, J. Finer and J. Clardy, "Diterpenes from *Dictyota dichotoma*". *Phytochemistry*, **1977**. *16*(7): 991.

84. De Rosa, S., S. De Stefano and N. Zavodnik, "Hydroazulenoid diterpenes from the brown alga *Dictyota dichotoma* var. *implexa*". *Phytochemistry*, **1986**. *25*(9): 2179-2181.

85. Amico, V., G. Oriente, M. Piattelli, C. Tringali, E. Fattorusso, S. Magno and L. Mayol, "Diterpenes based on the dolabellane skeleton from *Dictyota dichotoma* ". *Tetrahedron*, **1980**. *36*: 1409.

86. Amico, V., R. Currenti, G. Oriente, M. Piattelli and C. Tringali, "18-hydroxy-3,7-dolabelladiene from the brown alga *Dictyota dichotoma*". *Phytochemistry*, **1981**. *20*(4): 848.

87. Teixeira, V.L., S.A.D.S. Almeida and A. Kelecom, "Chemosystematic and biogeographic studies of the diterpenes from the marine brown alga *Dictyota dichotoma*". *Biochemical Systematics and Ecology*, **1990**. *18*(2-3): 87-92.

88. Saleh, M.A., N.M. Abdel-Moein and N.A. Ibrahim, "Insect antifeeding azulene derivative from the brown alga *Dictyota dichotoma*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1984**. *32*(6): 1432.

89. De Rosa, S., A. De Giulio, C. Iodice and N. Zavodink, "Sesquiterpenes from the brown alga *Taonia atomaria*". *Phytochemistry*, **1994**. *37*(5): 1327-1330.

90. Enoki, N., R. Ishida, S. Urano and T. Matsumoto, "New tricarbocyclic cyclopropanoid diterpenes from the brown alga *Dictyota dichotoma*". *Tetrahedron Letters*, **1985**. *26*(14): 1731.

91. Ishitsuka, M.O., T. Kusumi, A. Ichikawa and H. Kakisawa, "Bicyclic diterpenes from two species of brown algae of the dictyotaceae". *Phytochemistry*, **1990**. *29*(8): 2605-2610.

92. Enoki, N., A. Furusaki, K. Suehiro, R. Ishida and T. Matsumoto, "Epoxydictymene, a new diterpene from the brown alga". *Tetrahedron Letters*, **1983**. *24*(40): 4341-4342.

93. Segawa, M., N. Enoki, M. Ikura, K. Hikichi, R. Ishida, H. Shirahama and T. Matsumoto, "Dictymal, a new seco-fusicoccin type diterpene from the brown alga". *Tetrahedron Letters*, **1987**. *28*(32): 3703-3704.

94. Pullaiah, K.C., R.K. Surapaneni, C.B. Rao, K.F. Albizati, B.W. Sullivan, D.J. Faulkner, C.H. He and J. Clardy, "Dictyoxetane, a novel diterpene from the brown alga *Dictyota dichotoma* from the Indian Ocean". *The Journal of Organic Chemistry*, **1985**. *50*(19): 3665-3666.

95. Thibaut, T. and P.-A. Mannoni, *Cartographie des paysages marins : encorbellements à Lithophyllum et faciès à Cystoseires*, in *Site Natura 2000 FR 9301624 - Cap Lardier – Cap Taillat – Cap Camarat*. 2007.

96. Amico, V., M. Piattelli, P. Neri and G. Ruberto, "Meroterpenoids from *Cystoseira* spp". *Journal of Natural Products*, **1988**. *51*(1): 191-192.

97. Davidson, S.K., S.W. Allen, G.E. Lim, C.M. Anderson and M.G. Haygood, "Evidence for the biosynthesis of bryostatins by the bacterial symbiont "*Candidatus Endobugula sertula*" of the bryozoan *Bugula neritina*". *Applied and Environmental Microbiology*, **2001**. *67*(10): 4531-4537.

98. Pettit, G.R., C.L. Herald, D.L. Doubek, D.L. Herald, E. Arnold and J. Clardy, "Isolation and structure of bryostatin 1". *Journal of the American Chemical Society*, **1982**. *104*(24): 6846-6848.

99. Perez, T., J. Garrabou, S. Sartoretto, J.-G. Harmelin, P. Francour and J. Vacelet, "Mortalité massive d'invertébrés marins : un événement sans précédent en Méditerranée nord-occidentaleMass mortality of marine invertebrates: an unprecedented event in the Northwestern Mediterranean". *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, **2000**. *323*(10): 853-865.

100. Eisenbarth, S., M. Gehling, A. Harderc and B. Steffan, "Pentaporins A, B and C: disulfides from the marine bryozoan *Pentapora fascialis*". *Tetrahedron*, **2002**. *58*: 8461-8464.

101. Cafieri, F., E. Fattorusso, M. Gavagnin and C. Santacroce, "3β,5α,6β-trihydroxysterols from the nediterranean bryozoan *Myriapora truncata*". *Journal of Natural Products*, **1985**. *48*(6): 944-947.

102. Cheng, J.-F., J.-S. Lee, R. Sakai, E.A. Jares-Erijman, M.V. Silva and K.L. Rinehart, "Myriaporones 1−4, cytotoxic metabolites from the mediterranean bryozoan *Myriapora truncata*". *Journal of Natural Products*, **2007**. *70*(3): 332-336.

103. Wahl, M., "Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects". *Marine Ecology Progress Series*, **1989**. *58*: 175.

104. Haras, D., "Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention". *Matériaux & Techniques*, **2005**. *93*: 27-41.

105. Piola, R.F., K.A. Dafforn and E.L. Johnston, "The influence of antifouling practices on marine invasions". *Biofouling*, **2009**. *25*(7): 633-644.

106. Almeida, E., T.C. Diamantino and O. de Sousa, "Marine paints: The particular case of antifouling paints". *Progress in Organic Coatings*, **2007**. *59*(1): 2-20.

107. Chambers, L.D., K.R. Stokes, F.C. Walsh and R.J.K. Wood, "Modern approaches to marine antifouling coatings". *Surface and Coatings Technology*, **2006**. *201*(6): 3642-3652.

108. Schmitt, T.M., N. Lindquist and M.E. Hay, "Seaweed secondary metabolites as antifoulants: effects of *Dictyota* spp. diterpenes on survivorship, settlement, and development of marine invertebrate larvae". *Chemoecology*, **1998**. *8*(3): 125-131.

109. Barbosa, J.P., B.G. Fleury, B.A.P. da Gama, V.L. Teixeira and R.C. Pereira, "Natural products as antifoulants in the Brazilian brown alga *Dictyota pfaffii* (Phaeophyta, Dictyotales)". *Biochemical Systematics and Ecology*, **2007**. *35*(8): 549-553.

110. Culioli, G., A. Ortalo-Magné, R. Valls, C. Hellio, A.S. Clare and L. Piovetti, "Antifouling activity of meroditerpenoids from the marine brown alga *Halidrys siliquosa*". *Journal of Natural Products*, **2008**. *71*(7): 1121-1126.

111. Soares, A., B. da Gama, A. da Cunha, V. Teixeira and R. Pereira, "Induction of attachment of the mussel *Perna perna* by natural products from the brown seaweed *Stypopodium zonale*". *Marine Biotechnology*, **2008**. *10*(2): 158-165.

112. Taniguchi, K., K. Shiraishi, K. Kurata and M. Suzuki, "Inhibitory effects of the settlement and the metamorphosis of the abalone *Haliotis discus hannai* Veligers by the methanol extracts from the brown alga *Dilophus okamurai* ". *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, **1989**. *55*(7): 1133.

113. Hellio, C., H. Thomas-Guyon, G. Culioli, L. Piovetti, N. Bourgougnon and Y. Le Gal, "Marine antifoulants from *Bifurcaria bifurcata* (Phaeophyceae, Cystoseiraceae) and other brown macroalgae". *Biofouling*, **2001**. *17*: 189-201.

114. Cho, J.-Y.C., J.-S.; Kang, S.-E.; Kim, J.-K.; Shin, H.-W.; Hong, Y.-K., "Isolation of antifouling active pyroglutamic acid, triethyl citrate and di-n-octylphthalate from the brown seaweed *Ishige okamurae*". *Journal of Applied Phycology*, **2005**. *17*: 431-435.

115. Ganti, V.S., K.H. Kim, H.D. Bhattarai and H.W. Shin, "Isolation and characterisation of some antifouling agents from the brown alga *Sargassum confusum*". *Biofouling*, **2006**. *8*(4): 309-315.

116. Wisespongpand, P.K., M., "Bioactive phloroglucinols from the brown alga *Zonaria diesingiana*". *Journal of Applied Phycology*, **2003**. *15*: 225-228.

117. Katsuoka, M.O., C.; Etoh, H.; Sakata, K., "Galactosyl- and Sulfoquinovosyldiacylglycerols isolated from the brown algae, *Undaria pinnatifida* and *Costaria costata* as repellents of the blue mussel, *Mytilus edulis*". *Agricultural and Biological Chemistry*, **1990**. *54*: 3043-3044.

118. Bianco, É.M., R. Rogers, V.L. Teixeira, and R.C. Pereira, "Antifoulant diterpenes produced by the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis*". *Journal of Applied Phycology*, **2009**. *21*(3): 341-346.

119. Mokrini, R., M.B. Mesaoud, M. Daoudi, C. Hellio, J.-P. Maréchal, M. El Hattab, A. Ortalo-Magné, L. Piovetti and G.r. Culioli, "Meroditerpenoids and derivatives from the brown alga *Cystoseira baccata* and their antifouling properties". *Journal of Natural Products*, **2008**. *71*(11): 1806-1811.

120. Bazes, A., A. Silkina, P. Douzenel, F. Faÿ, N. Kervarec, D. Morin, J.-P. Berge, and N. Bourgougnon, "Investigation of the antifouling constituents from the brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt". *Journal of Applied Phycology*, **2009**. *21*(4): 395-403.

121. Plouguerné, E., E. Ioannou, P. Georgantea, C. Vagias, V. Roussis, C. Hellio, E. Kraffe, and V. Stiger-Pouvreau, "Anti-microfouling activity of lipidic metabolites from the invasive brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt". *Marine Biotechnology*, **2009**.

122. Paul, V.J. and W. Fenical, "Natural products chemistry and chemical defense in tropical marine algae of the phylum Chlorophyta". *Bioorganic Marine Chemistry*, **1987**. *1*: 1-29.

123. Dobretsov, S.D., H.-U.; Harder, T.; Qian, P.-Y., "Allelochemical defense against epibiosis in the macroalga *Caulerpa racemosa* var. *turbinata*". *Marine Ecology - Progress Series*, **2006**. *318*: 165-175.

124. Paul, V.J. and W. Fenical, "Chemical defense in tropical green algae, order Caulerpales". *Marine Ecology Progress Series*, **1986**. *34*: 157-169.

125. Konig, G.M., A.D. Wright and R. de Nys, "Halogenated monoterpenes from *Plocamium costatum* and their biological activity". *Journal of Natural Products*, **1999**. *62*(2): 383-385.

126. Steinberg, P.D., R. De Nys and S. Kjelleberg, "Chemical inhibition of epibiota by Australian seaweeds". *Biofouling*, **1998**. *12*: 227-244.

127. König, G.M. and A.D. Wright, "*Laurencia rigida*: chemical investigations of its antifouling dichloromethane extract". *Journal of Natural Products*, **1997**. *60*(10): 967-970.

128. De Nys, R., P.D. Steinberg, P. Willemsen, S.A. Dworjanyn, C.L. Gabelish and R.J. King, "Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays". *Biofouling*, **1995**. *8*: 259.

129. Nylund, G.M., G. Cervin, F. Persson, M. Hermansson, P.D. Steinberg, and H. Pavia, "Seaweed defence against bacteria: a poly-brominated 2-heptanone from the red alga *Bonnemaisonia hamifera* inhibits bacterial colonisation". *Marine Ecology - Progress Series*, **2008**. *369*: 39-50.

130. Kon-ya, K., N. Shimidzu, K. Adachi and W. Miki, "2,5,6-tribromo-1-methylgramine, an antifouling substance from the marine bryozoan *Zoobotryon pellucidum*". *Fisheries Science*, **1994**. *60*(6): 773.

131. Newby, B.-m., T. Cutright, C. Barrios and Q. Xu, "Zosteric acid - An effective antifoulant for reducing fresh water bacterial attachment on coatings". *Journal of Coatings Technology and Research*, **2006**. *3*(1): 69-76.

132. Xu, Q., C. Barrios, T. Cutright and B.-m.Z. Newby, "Assessment of antifouling effectiveness of two natural product antifoulants by attachment study with freshwater bacteria". *Environmental Science and Pollution Research*, **2005**. *12*(5): 278-284.

133. Xu, Q., C.A. Barrios, T. Cutright and B.-m.Z. Newby, "Evaluation of toxicity of capsaicin and zosteric acid and their potential application as antifoulants". *Environmental Toxicology*, **2005**. *20*(5): 467-474.

134. Huigens, R.W., J.J. Richards, G. Parise, T.E. Ballard, W. Zeng, R. Deora and C. Melander, "Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation with Bromoageliferin Analogues". *Journal of American Chemical Society*, **2007**. *129*(22): 6966-6967.

135. Richards, J.J., T.E. Ballard, R.W. Huigens and C. Melander, "Synthesis and screening of an oroidin library against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms". *ChemBioChem*, **2008**. *9*(8): 1267-1279.

136. Richards, J.J., S. Reyes, S.D. Stowe, A.T. Tucker, T.E. Ballard, L.D. Mathies, J. Cavanagh and C. Melander, "Amide isosteres of oroidin: assessment of antibiofilm activity and *C. elegans* toxicity". *Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**. *52*(15): 4582-4585.

137. Ballard, T.E., J.J. Richards, A. Aquino, C.S. Reed and C. Melander, "Antibiofilm activity of a diverse oroidin library generated through reductive acylation". *The Journal of Organic Chemistry*, **2009**. *74*(4): 1755-1758.

138. Ballard, T.E., Justin J. Richards, Amanda L. Wolfe and C. Melander, "Synthesis and antibiofilm activity of a second-generation reverse-amide oroidin library: a structure-activity relationship study". *Chemistry - A European Journal*, **2008**. *14*(34): 10745-10761.

139. Richards, J.J., C.S. Reed and C. Melander, "Effects of *N*-pyrrole substitution on the anti-biofilm activities of oroidin derivatives against *Acinetobacter baumannii*". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**. *18*(15): 4325-4327.

140. Kubanek, J., K. Whalen, S. Engel, S. Kelly, T. Henkel, W. Fenical and J. Pawlik, "Multiple defensive roles for triterpene glycosides from two Caribbean sponges". *Oecologia*, **2002**. *131*(1): 125-136.

141. Hentzer, M., K. Riedel, T.B. Rasmussen, A. Heydorn, J.B. Andersen, M.R. Parsek, S.A. Rice, L. Eberl, S. Molin, N. Hoiby, S. Kjelleberg and M. Givskov, "Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound". *Microbiology*, **2002**. *148*(1): 87-102.

142. Maréchal, J.-P., G. Culioli, C. Hellio, H. Thomas-Guyon, M.E. Callow, A.S. Clare and A. Ortalo-Magné, "Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **2004**. *313*(1): 47-62.

143. Ivesa, L., M. Blazina and M. Najdek, "Seasonal variations in fatty acid composition of *Caulerpa taxifolia* (M. Vahl.) C. Ag. in the northern Adriatic Sea (Malinska, Croatia)". *Botanica Marina*, **2004**. *47*: 209-214.

144. El Hattab, M., N. Bouzidi, A. Ortalo-Magné, Y. Daghbouche, M. Richou, S.E. Chitour, B. de Reviers and L. Piovetti, "Eicosapentaenoic acid: Possible precursor of the phloroglucinol derivatives isolated from the brown alga *Zonaria tournefortii* (J.V. Lamouroux) Montagne". *Biochemical Systematics and Ecology*, **2009**. *37*(1): 55-58.

145. Ekiel, I.H., L. Hughes, G. W. Burton, P. A. Jovall, K. U. Ingold, I. C. P. Smith, "Structure and dynamics of .alpha.-tocopherol in model membranes and in solution: a broad-line and high-resolution NMR study". *Biochemistry*, **1988**. *27*: 1432-1440.

146. Witkowski, S., P. Walejko and I. Wawer, "13C CP MAS NMR study of 6-O-([beta]-D-glucopyranosyl)- and 6-O-([beta]-D-mannopyranosyl)-d-[alpha]-tocopherols". *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, **1998**. *10*(3): 123-128.

147. Kobayashi, M., "Marines terpenes and terpenoids. Part 18. First natural α-tocopherol and α-tocopheryl quinone derivatives with an oxygenated side chain, isolated from the soft coral *Sinularia mayi*". *Journal of Chemical Research*, **1994**(12): 494-495.

148. Liebler, D.C., *Tocopherone and epoxytocopherone products of vitamin E oxidation*, in *Methods in enzymology*, P. Lester, Editor. **1994**, Academic Press. p. 310-316.

149. Rosenau, T., E. Kloser, L. Gille, F. Mazzini and T. Netscher, "Vitamin E chemistry. studies into initial oxidation intermediates of α-tocopherol: disproving the involvement of 5a-C-Centered “chromanol methide” radicals". *The Journal of Organic Chemistry*, **2007**. *72*(9): 3268-3281.

150. Matsumoto, A., S. Takahashi, K. Nakano and S. Kijima, "Identification of a new vitamin E in a plant oil". *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, **1995**. *44*: 593–597.

151. Reynolds, W.F., S. McLean, L.L. Tay, M. Yu, R.G. Enriquez, D.M. Estwick and K.O. Pascoe, "Comparison of ^{13}C resolution and sensitivity of HSQC and HMQC sequences and application of HSQC-based sequences to the total ^{1}H and ^{13}C spectral assignment of clionasterol". *Magnetic Resonance in Chemistry*, **1997**. *35*(7): 455-462.

152. Couperus, P.A., A.D.H. Clague and J.P.C.M. Van Dongen, "^{13}C chemical shifts of some model olefins". *Organic Magnetic Resonance*, **1976**. *8*: 426-431.

153. Ohtani, I., T. Kusumi, Y. Kashman and H. Kakisawa, "A new aspect of the high-field NMR application of Mosher's method. The absolute configuration of marine triterpene Sipholenol-A". *Journal of Organic Chemistry*, **1991**. *56*(3): 1296-1298.

154. Finer, J., J. Clardy, W. Fenical, L. Minale, R. Riccio, J. Battaile, M. Kirkup and R.E. Moore, "Structures of Dictyodial and Dictyolactone, unusual marine diterpenoids". *Journal of Organic Chemistry*, **1979**. *44*(12): 2044.

155. Ishitsuka, M., T. Kusumi, H. Kakisawa, Y. Kawakami, Y. Nagai and T. Sato, "Structure and conformation of pachylactone, a new diterpene isolated from the brown alga *Pachydictyon coriaceum*". *Tetrahedron Letters*, **1983**. *24*(46): 5117-5120.

156. Viano, Y., D. Bonhomme, M. Camps, J.-F. Briand, A. Ortalo-Magné, Y. Blache, L. Piovetti and G. Culioli, "Diterpenoids from the mediterranean brown alga *Dictyota* sp. evaluated as antifouling substances against a marine bacterial biofilm". *Journal of Natural Products*, **2009**. *72*(7): 1299-1304.

157. Kusumi, T., D. Muanza-Nkongolo, M. Goya, M. Ishitsuka, T. Iwashita and H. Kakisawa, "Structures of Crenulacetals A, B, C and D. The new diterpenoids from the brown algae of Dictyotaceae". *Journal of Organic Chemistry*, **1986**. *51*(3): 384.

158. Tringali, C., G. Oriente, M. Piattelli, C. Geraci, G. Nicolosi and E. Breitmaier, "Crenuladial, an antimicrobial diterpenoid from the brown alga *Dilophus ligulatus*". *Canadian Journal of Chemistry*, **1988**. *66*: 2779.

159. Sun, H.H. and W. Fenical, "Diterpenoids of the brown seaweed *Glossophora galapagensis*". *Phytochemistry*, **1979**. *18*(2): 340-341.

160. Suzuki, M., H. Yamada and K. Kurata, "Dictyterpenoids A and B, two novel diterpenoids with feeding-deterrent activity from the brown alga *Dilophus okamurae* ". *Journal of Natural Products* **2002**. *65*(2): 122-125.

161. Enoki, N., H. Shirahama, A. Furusaki, K. Suehiro, E. Osawa, R. Ishida and T. Matsumoto, "Absolute configuration and conformational mobility of dilophol and 3-acetoxyacetyldilophol". *Chemistry Letters*, **1984**. *13*(3): 459-462.

162. Ishitsuka, M., T. Kusumi, H. Kakisawa, Y. Kawakami, Y. Nagai and T. Sato, "Structural elucidation and conformational analysis of germacrane-type diterpenoids from the brown alga". *Tetrahedron Letters*, **1986**. *27*(23): 2639-2642.

163. König, G.M., A.D. Wright and O. Sticher, "Diterpenes from the brown alga *Dictyota divaricata*". *Phytochemistry*, **1991**. *30*(11): 3679-3682.

164. Yan, X., Y. Chuda, M. Suzuki and T. Nagata, "Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed". *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **1999**. *63*(3): 605-607.

165. Piattelli, M., C. Tringali, P. Neri and C. Rocco, "Stereochemistry and conformation of dolabellane diterpenes: an NMR and molecular mechanics study". *Journal of Natural Products*, **1995**. *58*(5): 697-704.

166. Chang, H.W., K.H. Jang, D. Lee, H.R. Kang, T.-Y. Kim, B.H. Lee, B.W. Choi, S. Kim and J. Shin, "Monoglycerides from the brown alga *Sargassum sagamianum*: Isolation, synthesis, and biological activity". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**. *18*(12): 3589-3592.

167. Praud, A., R. Valls, L. Piovetti, B. Banaigs and J.-Y. Benaïm, "Meroditerpenes from the brown alga *Cystoseira crinita* off the french mediterranean coast". *Phytochemistry*, **1995**. *40*(2): 495-500.

168. Catalan, C.A.N., W.C.M.C. Kokke, C. Duque and C. Djerassi, "Synthesis of (24*R*)- and (24*S*)-5,28-stigmastadien-3-β-ol and determination of the stereochemistry of their 24-hydroxy analogs, the saringosterols". *Journal of Organic Chemistry*, **1983**. *48*(26): 5207-5214.

169. Ikekawa, N., K. Tsuda and N. Morisaki, "Saringosterol: a new sterol from brown algae". *Chemistry and Industry*, **1966**: 1179-1180.

170. Ayyad, S.N., S.Z.A. Sowellim, M.S. El-Hosini and A. Abo-Atia, "The structural determination of a new steroidal metabolite from the brown alga *Sargassum asperifolium*". *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* **2003**. *53*: 333-336.

171. Sheu, J.H., G.H. Wang, P.J. Sung, Y.H. Chiu and C.Y. Duh, "Cytotoxic sterols from the formosan brown alga *Turbinaria ornata*". *Planta Medica*, **1997**. *63*(6): 571.

172. Shapo, J.L., P.D. Moeller and S.B. Galloway, "Antimicrobial activity in the common seawhip, *Leptogorgia virgulata* (Cnidaria: Gorgonaceae)". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **2007**. *148*(1): 65-73.

173. Slattery, M., M.T. Hamann, J.B. McClintock, T.L. Perry, M.P. Puglisi and W.Y. Yoshida, "Ecological roles for water-borne metabolites from Antarctic soft corals". *Marine Ecology - Progress Series*, **1997**. *161*: 133-144.

174. Targett, N.M., S.S. Bishop, O.J. McConnell and J.A. Yoder, "Antifouling agents against the benthic marine diatom, *Navicula salinicola* Homarine from the gorgonians *Leptogorgia virgulata* and *L. setacea* and analogs". *Journal of Chemical Ecology*, **1983**. *9*(7): 817-829.

175. Beers, J.R., "The species distribution of some naturally-occuring quaternary ammonium compounds". *Comparative Biochemistry and Physiology*, **1967**. *21*: 11-21.

176. Dall, W., "The role of homarine in decapod crustacea". *Comparative Biochemistry and Physiology (Part B: Biochemistry and Molecular Biology)*, **1971**. *39B*: 31-44.

177. Anthoni, U., C. Larsen, P.H. Nielsen, C. Christophersen and G. Lidgren, "Hydrophilic organic nitrogenous metabolites from marine bryozoans". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **1989**. *92*(4): 711-713.

178. Prinsep, M.R., J.W. Blunt and M.H.G. Munro, "New cytotoxic (beta)-carboline alkaloids from the marine bryozoan, *Cribricellina cribraria*". *Journal of Natural Products*, **1991**. *54*(4): 1068-1076.

179. Leroy, C., C. Delbarre-Ladrat, F. Ghillebaert, M.J. Rochet, C. Compère and D. Combes, "A marine bacterial adhesion microplate test using the DAPI fluorescent dye: a new method to screen antifouling agents". *Letters in Applied Microbiology*, **2007**. *44*(4): 372-378.

180. Camps, M., J.-F. Briand, L. Dombrowsky, G. Culioli, A. Bazire and Y. Blache, "A marine antifouling bioassay based on in vitro adhesion: comparison of the response of five pioneer bacteria and reliability". *soumise*.

181. Schmitt, T.M., M.E. Hay and N. Lindquist, "Constraints on chemically mediated coevolution: Multiple functions for seaweed secondary metabolites". *Ecology*, **1995**. *76*(1): 107.

Annexes

Annexe A : Caulerpa taxifolia

Algue fraîche

↓ EtOH (1/1 ; v/v ; 3 × 250 mL)

Extrait brut

↙ Partage $H_2O/EtOH/Et_2O$ ↘

Extrait aqueux — Extrait organique (4,2 g ; R = 8,0%)

↓ Colonne chromatographique (Si60)

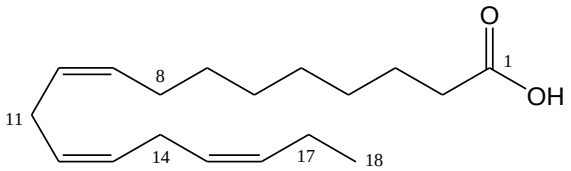
Gradient de polarité croissante

Eluant	Hexane / AcOEt											AcOEt	AcOEt / MeOH	MeOH
Composition	90:10	70:30	60:40		50:50		40:60			30:70	20:80	100		100
N° fractions	1	2 & 3	4	5 & 6	7	8-10	11	12	13 & 14	15-19	20-22	23-25	26-38	39-41
Masse (mg)	63	127	46	149	204	125	102	51	61	137	293	67	841	1 336

Ct1	**Ct2**	**Ct3**

Ct4
1,8 mg

*1. Composé **Ct1** : acide Z,Z,Z-octadéca-9,12,15-triénoïque*

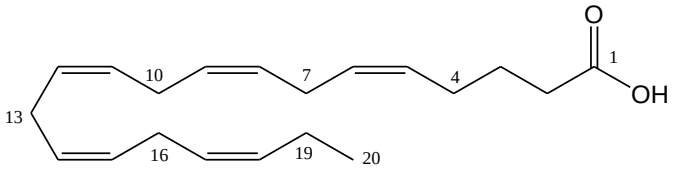


$C_{18}H_{30}O_2$ M = 278 g.mol^{-1}

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC
1	179,1	C		
2	33,9	CH_2	2,35 t (7,5)	C1, C3, C4
3	24,7	CH_2	1,63 br quin (7,5)	C1, C2, C4, C5
4	29,0 [a]	CH_2	1,32 m	C3, C5, C6
5	29,1 [a]	CH_2	1,32 m	C4, C6
6	29,14	CH_2	1,32 m	C4, C5
7	29,6	CH_2	1,32 m	C5, C6
8	27,2	CH_2	2,05 q (6,5)	C7, C10
9	130,2	CH	5,36 m	C8, C11
10	127,7	CH	5,36 m	C11
11	25,6 [b]	CH_2	2,81 t (6,0)	C12, C13, C10, C9
12	128,2 [c]	CH	5,36 m	C14, C11
13	128,3 [c]	CH	5,36 m	C14, C11
14	25,5 [b]	CH_2	2,81 t (6,0)	C16, C15, C12, C13
15	127,1	CH	5,36 m	C14
16	132,0	CH	5,36 m	C17, C14
17	20,6	CH_2	2,08 quin (7,5)	C18, C16, C15
18	14,3	CH_3	0,97 t (7,5)	C17, C16

[a, b, c] : Les signaux indexés par la même lettre peuvent être interchangés

*2. Composé **Ct2** : acide Z,Z,Z,Z,Z-eicosa-5,8,11,14,17-pentaénoïque*



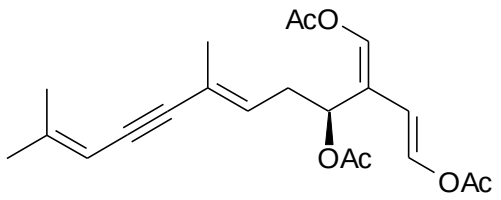
$C_{20}H_{30}O_2$ M = 302 g.mol^{-1}

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H
1	177,9	C			
2	33,1	CH_2	2,37 t (7,5)	C1, C3, C4	H3
3	24,5	CH_2	1,72 quin (7,5)	C1, C2, C4, C5	H2, H4
4	26,5	CH_2	2,13 q (7,5)	C2, C3, C5, C6	H3, H5
5	128,7 [a]	CH	5,38 m	C3, C4	H4
6	128,8 [a]	CH	5,38 m		
7	25,6 [b]	CH_2	2,85 m		
8	129,0 [c]	CH	5,38 m		
9	127,9 [c]	CH	5,38 m		
10	25,6 [b]	CH_2	2,85 m		
11	128,1 [c]	CH	5,38 m		
12	128,2 [c]	CH	5,38 m		
13	25,5 [b]	CH_2	2,85 m		
14	128,3 [c]	CH	5,38 m		
15	128,6 [c]	CH	5,38 m		
16	25,6 [b]	CH_2	2,85 m	C17, C18	
17	127,0	CH	5,38 m		
18	132,1	CH	5,38 m		H19
19	20,6	CH_2	2,08 quin (7,5)	C20, C18, C17	H20, H18
20	14,3	CH_3	0,97 t (7,5)	C19, C18	H19

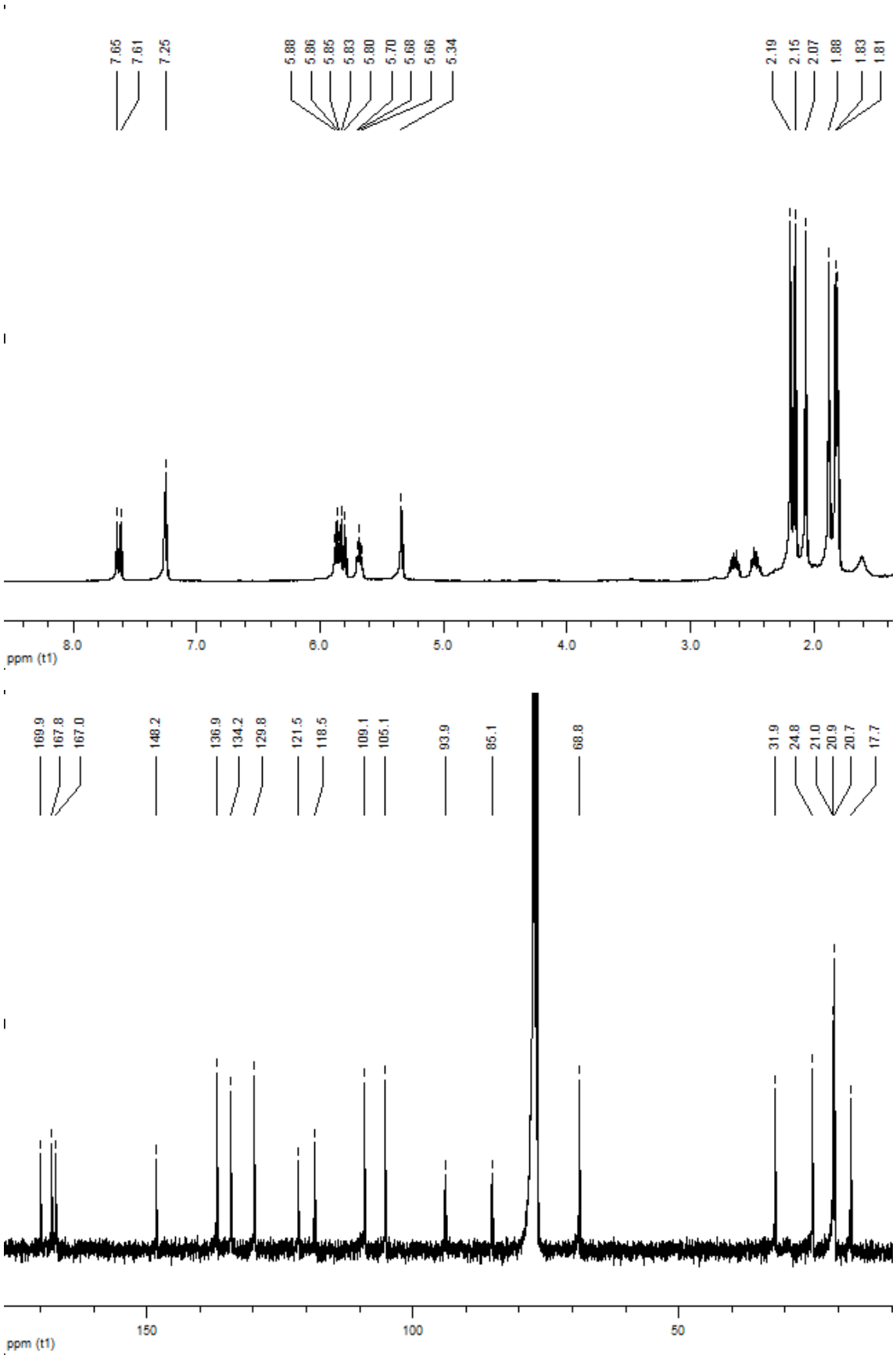
[a, b, c] : Les signaux indexés par la même lettre peuvent être interchangés

*3. Composé **Ct3** : caulerpényne*

$C_{21}H_{26}O_6$ M = 374 g.mol^{-1}

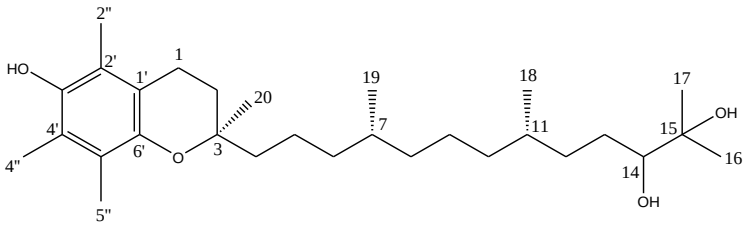


N°	^{13}C (CDCl$_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H (CDCl$_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H
1	136,9	CH	7,63 d (13,0)		H2
2	109,1	CH	5,81 d (13,0)	C1, C13, C4	H1, H13
3	118,5	C			
4	68,8	CH	5,86 t (7,0)	C13, C2, C3, C6, C5	H5a, H5b
5	31,9	CH_2	a: 2,47 ddd (14,5, 7,0, 7,0) b: 2,65 ddd (14,5,7,0, 7,0)	C6, C7, C4 C6, C7, C4, C3	H5b, H4, H6, H14 H5a, H4, H6, H14
6	129,8	CH	5,68 t (7,0)	C8, C14, C5	H5a, H5b, H14
7	121,5	C			
8	94,0	C			
9	85,1	C			
10	105,2	CH	5,34 s		H12, H15
11	148,2	C			
12	24,8	CH_3	1,81 s	C10, C11, C15, C9	H10
13	134,2	CH	7,25 s	C4, C3, C2, C13'	H2
14	17,7	CH_3	1,83 s	C6, C7, C8	H5a, H5b, H6
15	20,9	CH_3	1,88 s	C10, C11, C12, C9	H10
1'	167,8	C			
1''	20,67	CH_3	2,15 s	C1'	
4'	170,0	C			
4''	21,0	CH_3	2,07 s	C4'	
13'	167,1	C			
13''	20,7	CH_3	2,19 s	C13'	



Spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé Ct3

*4. Composé **Ct4** : 14,15-dihydroxy-α-tocophérol*



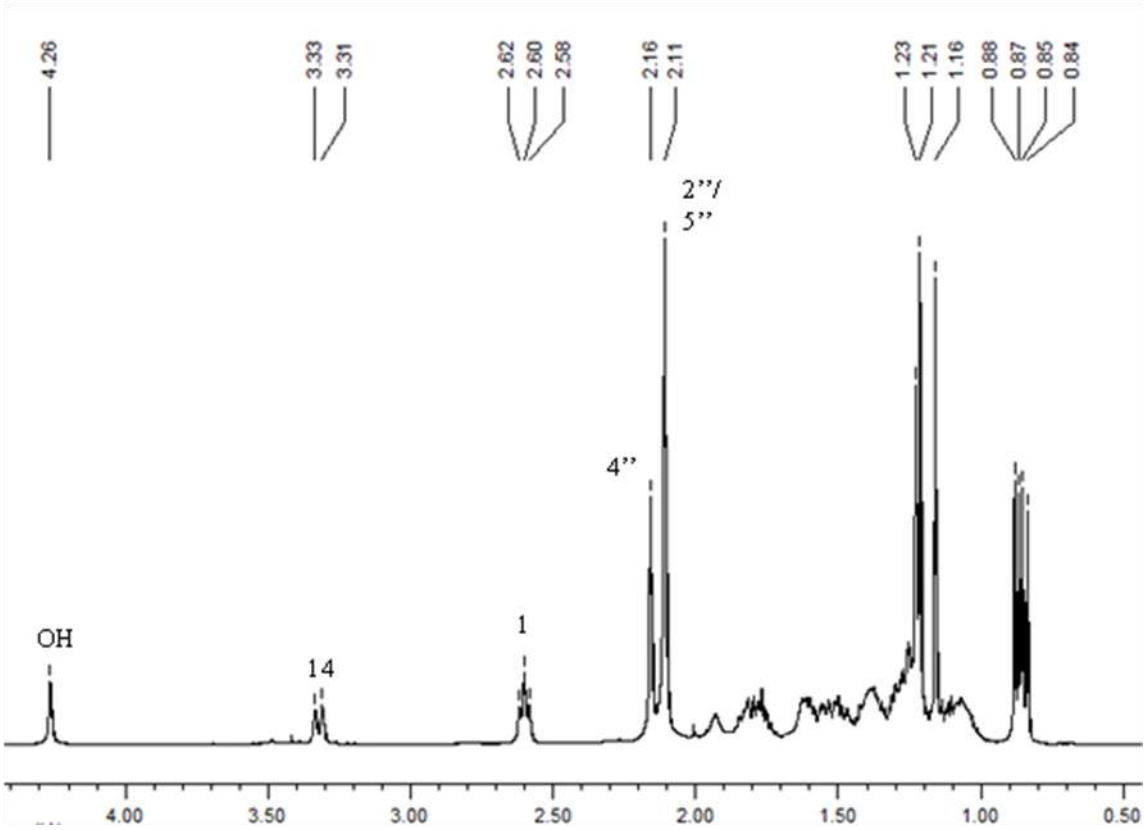
$C_{29}H_{48}O_3$ M = 444 g.mol^{-1}

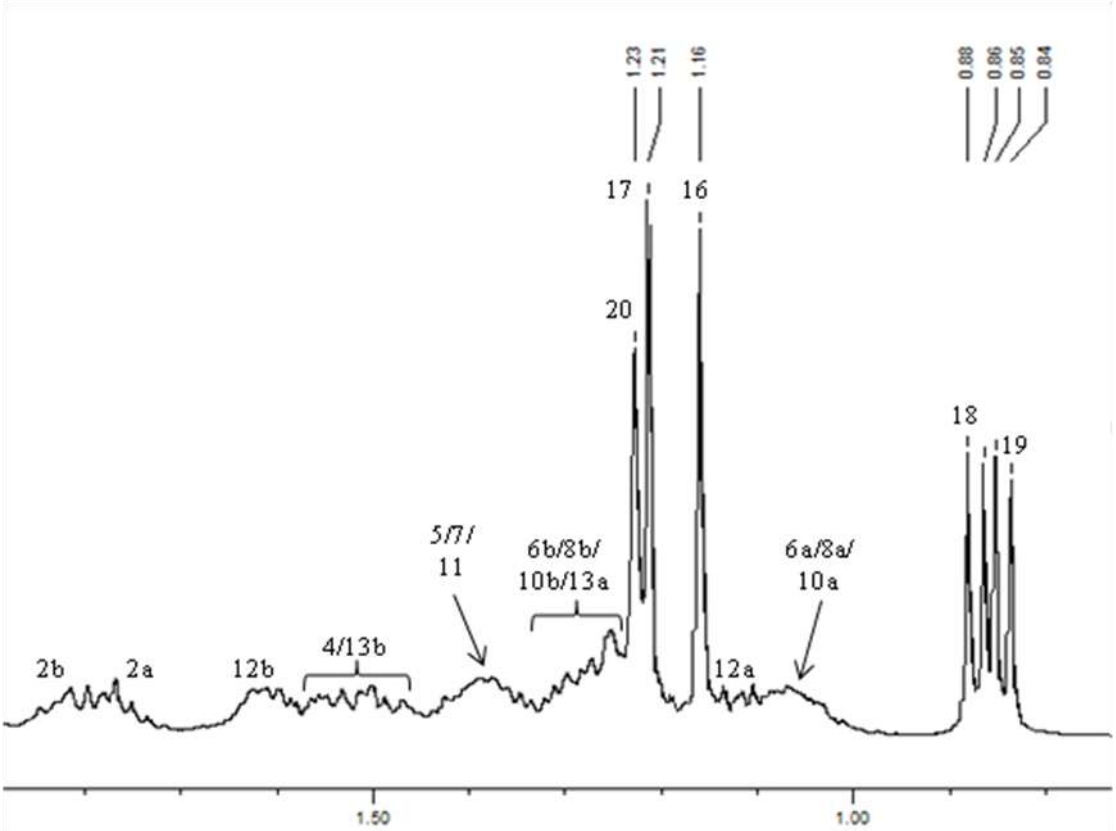
IR : 2926, 2858, 1717, 1457, 1377, 1259, 1160, 1086 cm^{-1}

$[\alpha]_D^{25}$ = - 30° (MeOH, c 0,1)

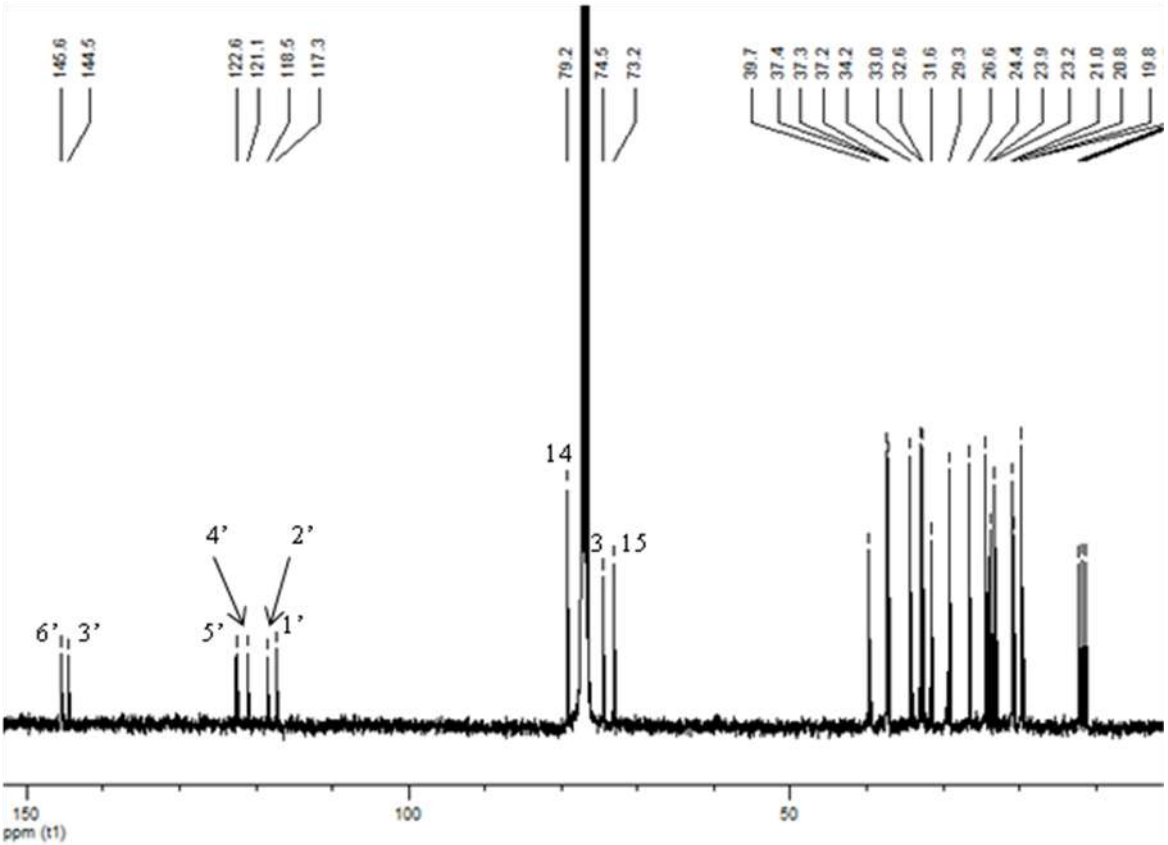
N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H
1	20.8	CH_2	2.60 t (7.0)	C2, C3, C1', C6', C2'	H2, H4", H2"
2	31.6	CH_2	a : 1.76 m b : 1.81 m	C1, C20, C3 C1, C20, C3	H2b, H1, (H20) H2a, H1, (H20)
3	74.5	C			
4	39.7	CH_2	1.52 m		
5	21.0	CH_2	1.38 m		
6	37.3 [a]	CH_2	a : 1.07 m b : 1.27 m		H6b H6a
7	32.6	CH	1.39 m		H19
8	37.4 [a]	CH_2	a : 1.07 m b : 1.27 m		H8b H8a
9	24.4	CH_2	1.28 m		
10	37.2	CH_2	a : 1.07 m b : 1.27 m		H10b H10a
11	33.0	CH	1.39 m		H18
12	34.2	CH_2	a : 1.13 m b : 1.60 m		H12b H12a, H13b
13	29.3	CH_2	a : 1.25 m b : 1.50 m	C12	H13b, H14 H13a, H14, H12b
14	79.2	CH	3.32 d (10.0)		H13a, H13b, H17
15	73.2	C			
16	23.2	CH_3	1.16 s	C17	H17
17	26.6	CH_3	1.21 s	C16	H16, H14
18	19.8	CH_3	0.87 d (6.5)	C10, C11, C12	H11
19	19.7	CH_3	0.85 d (6.5)	C6, C7, C8	H7
20	23.9	CH_3	1.23 s	C2, C4, C3	(H2a, H2b)
1'	117.3	C			
2'	118.6	C			
3'	144.5	C			
4'	121.1	C			
5'	122.6	C			
6'	145.6	C			
2"	11.3	CH_3	2.11 s	C1', C2', C3'	H1
4"	12.2	CH_3	2.16 s	C3', C4', C5', C2', C1'	H1
5"	11.8	CH_3	2.11 s	C4', C5', C6'	H1
OH			4,26 s	C3'	

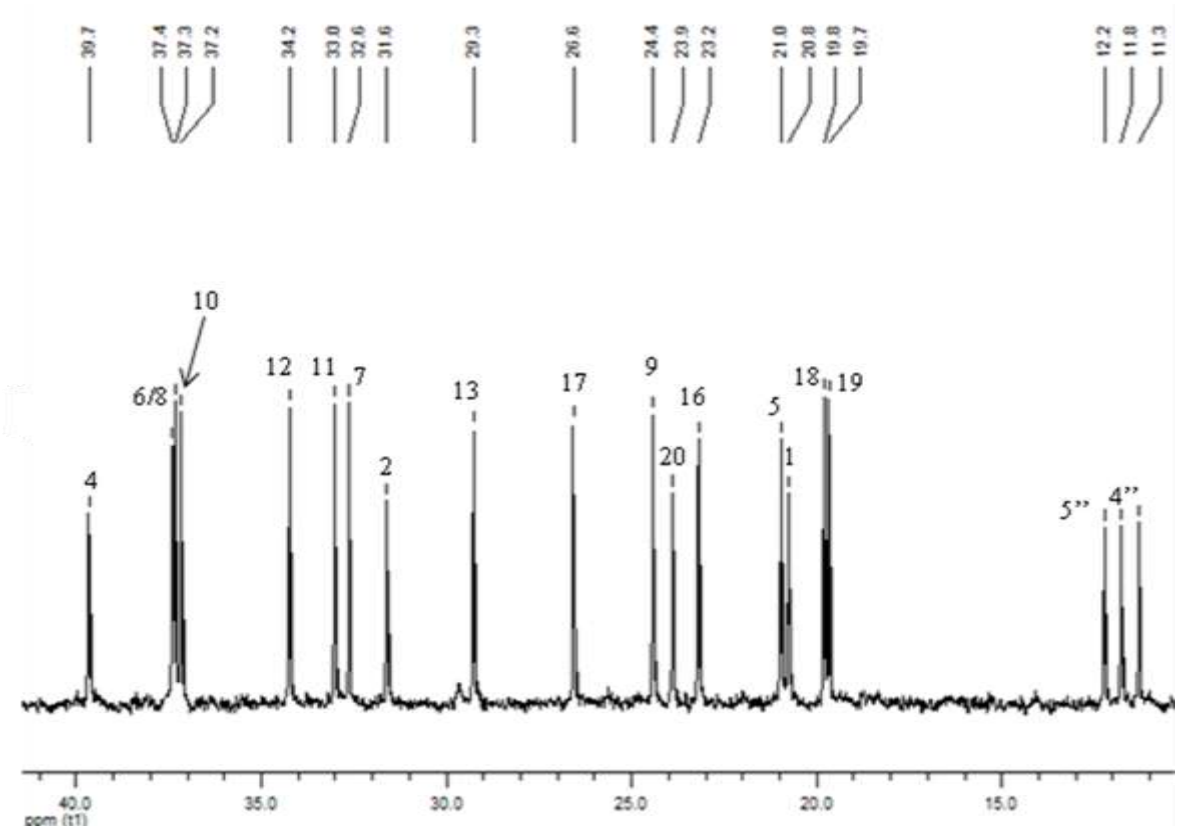
[a] : ces deux signaux peuvent être interchangés



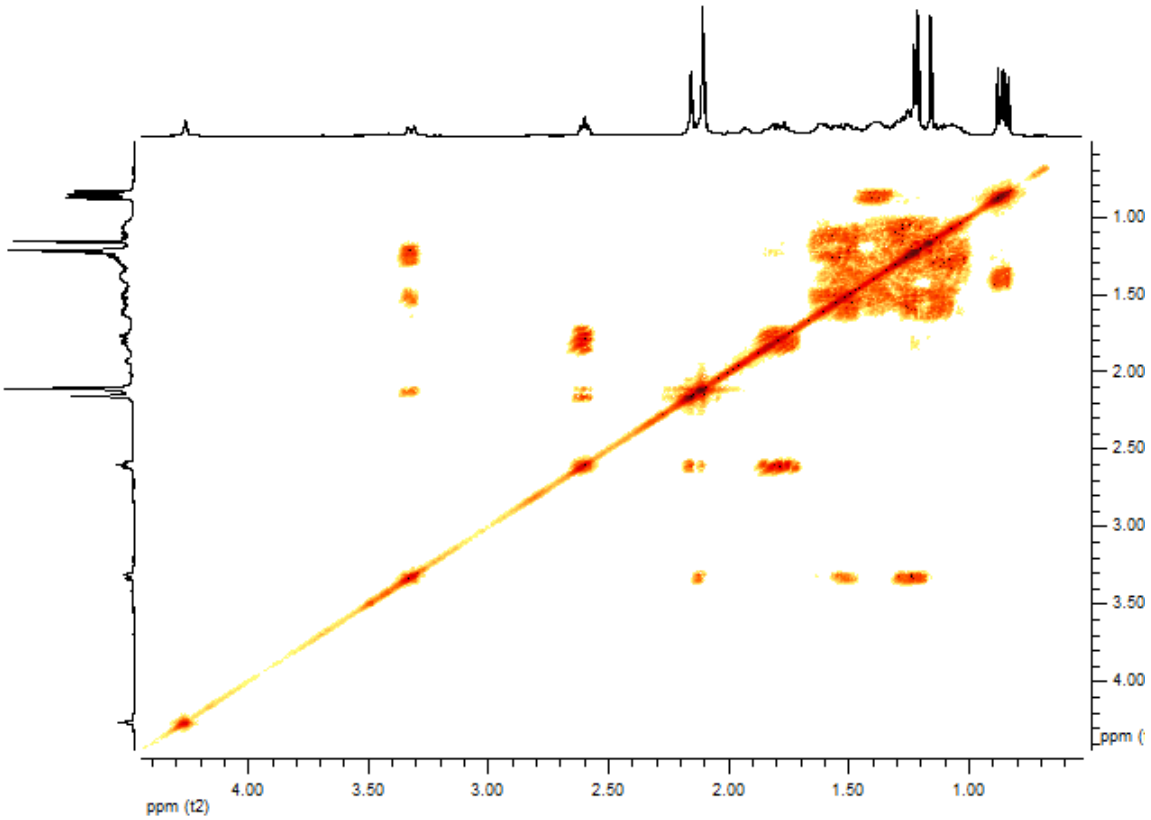


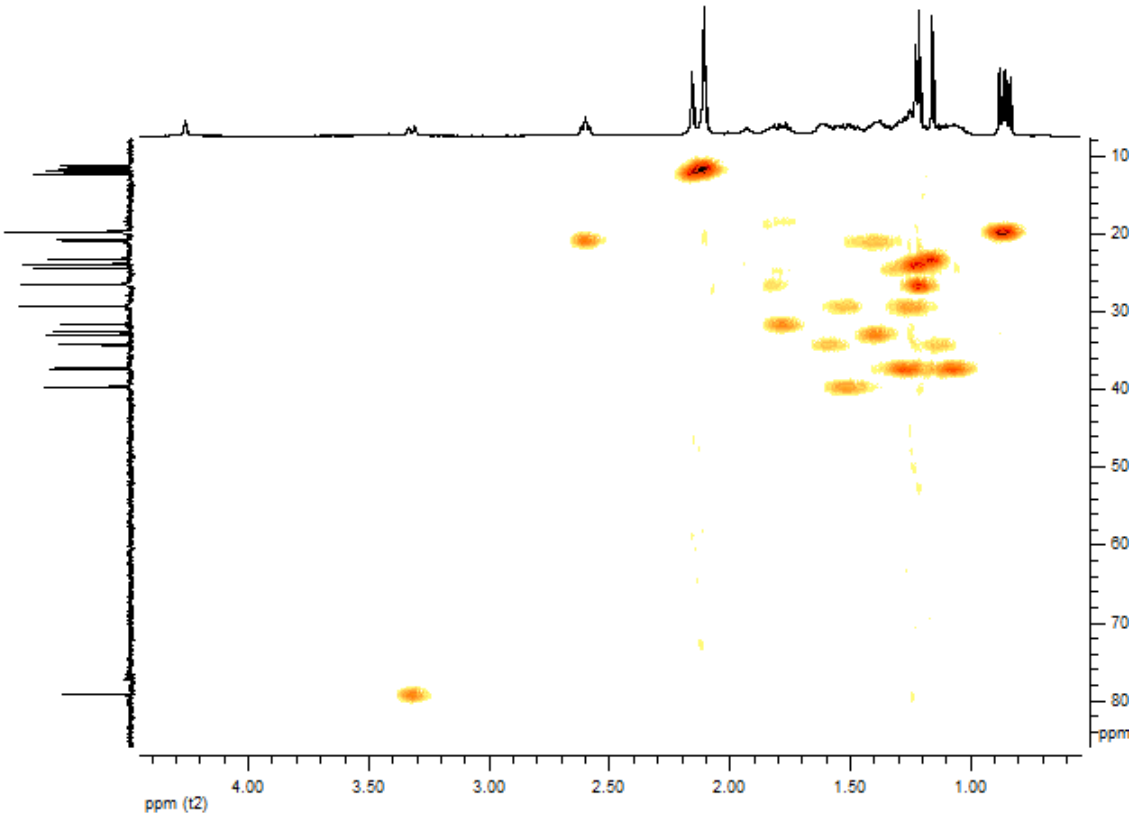
Spectres RMN ^{1}H (intégralité et détail) du composé Ct4



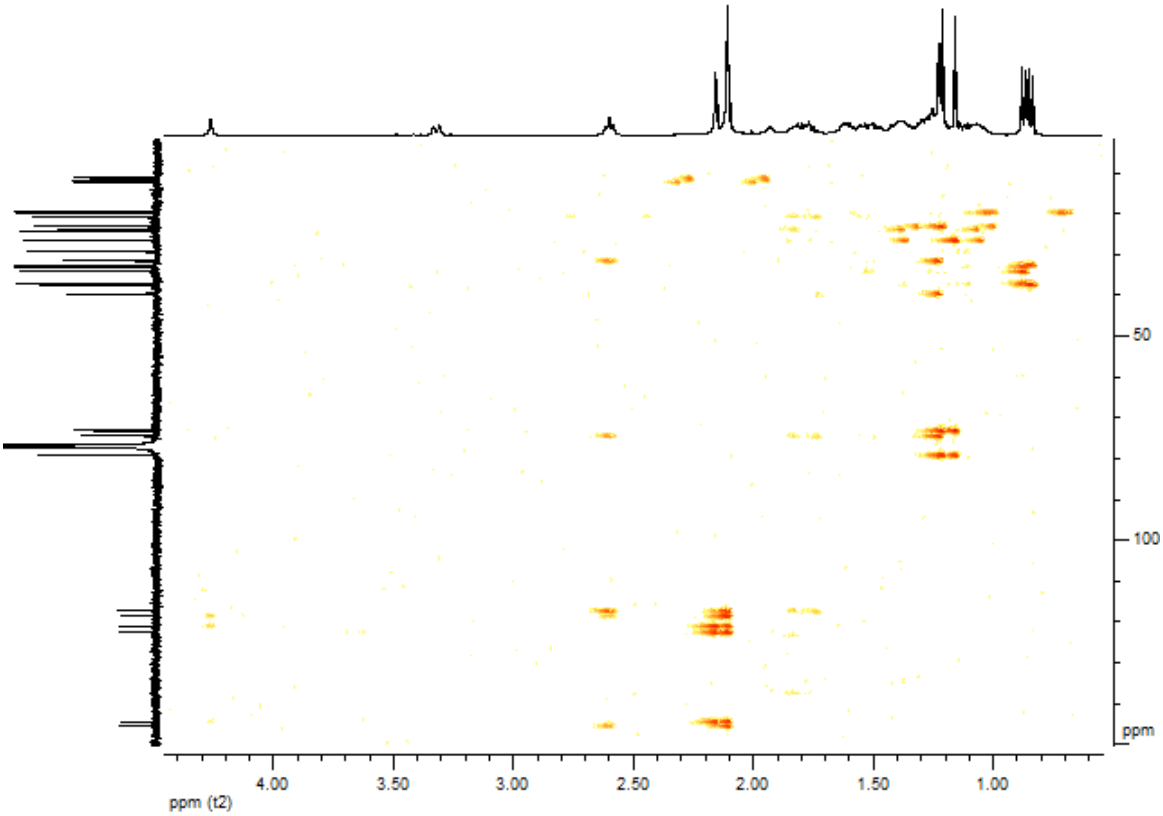


Spectres RMN ^{13}C (intégralité et détail) du composé Ct4





Spectres COSY ^{1}H-^{1}H et HSQC du composé Ct4



Spectre HMBC du composé Ct4

Annexe B : Dictyota sp.

Matériel végétal sec (57 g)

↓ $CHCl_3$/MeOH (1/1 ; v/v ; 3 × 250 mL)

Extrait organique (5,9 g ; R = 10%)

↓ Colonne chromatographique (Si60)

Gradient de polarité croissante

Eluant	Hexane / AcOEt												AcOEt	AcOEt / MeOH	MeOH
Composition	90:10	70:30	60:40		50:50		40:60			30:70		20:80	100		100
N° fractions	1	2-4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14-16	17 & 18	19-27	28 & 29
Masse (mg)	124	86	183	72	132	56	113	82	67	185	78	211	165	1 256	1 345

Ds2	**Ds6**	**Ds7**
1,6 mg	62,0 mg	2,7 mg

Ds9	**Ds10**
25,0 mg	18,2 mg

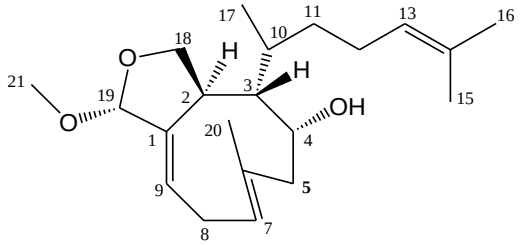
Ds1	**Ds11**
1,4 mg	5,1 mg

Ds4	**Ds8**
2,2 mg	10,1 mg

Ds3	**Ds5**
32,1 mg	3,0 mg

Ds12
25,0 mg

1. Composé ***Ds1***



$C_{21}H_{34}O_3$ M = 334 g.mol^{-1}

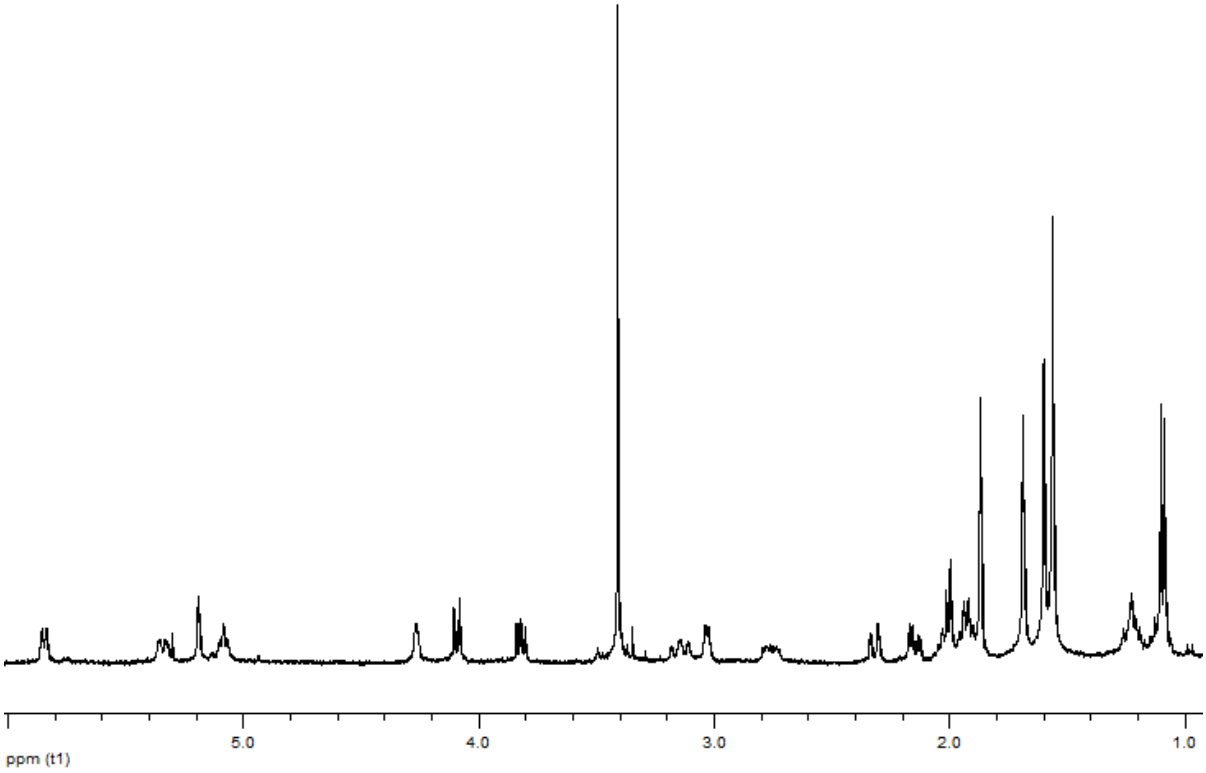
UV : pas de maxima

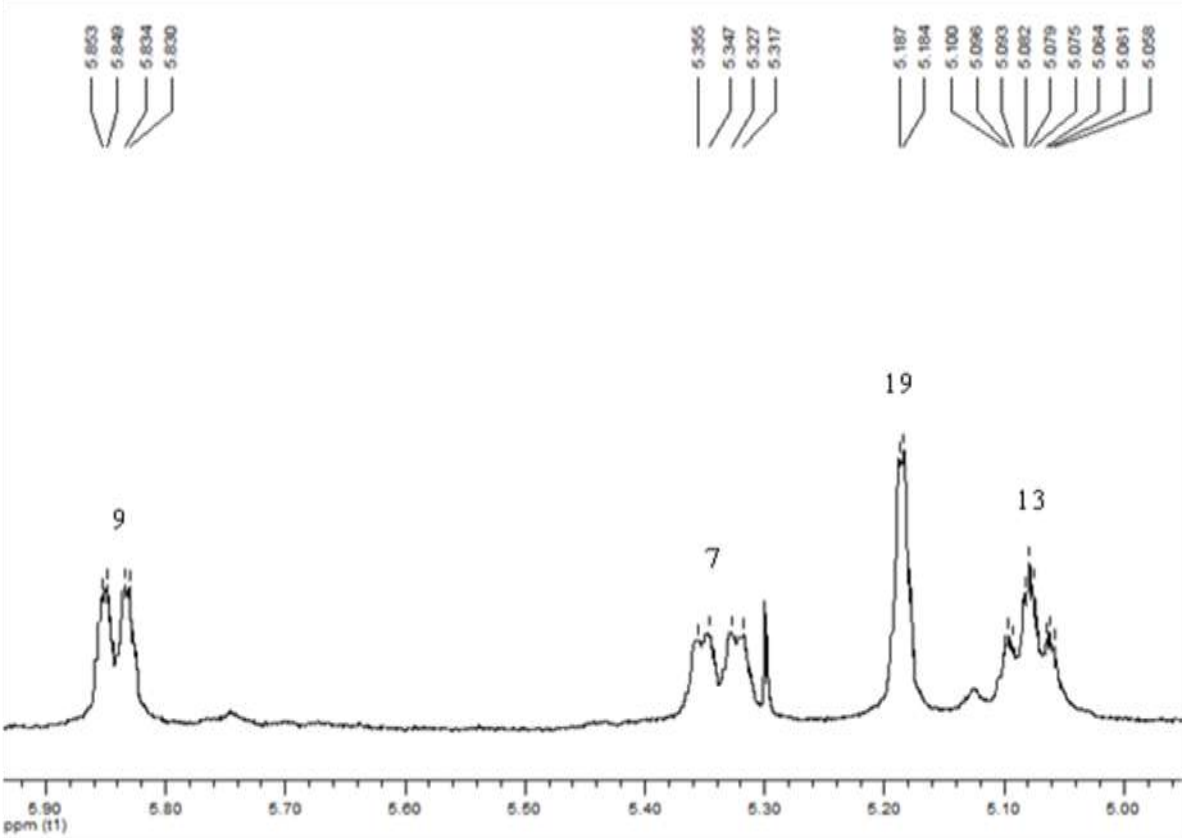
IR : 3472, 2959, 2914, 2854, 1456, 1188, 1112, 1076, 1031, 824 cm^{-1}

$[\alpha]_D^{25}$ = - 172° (MeOH, c 0,1)

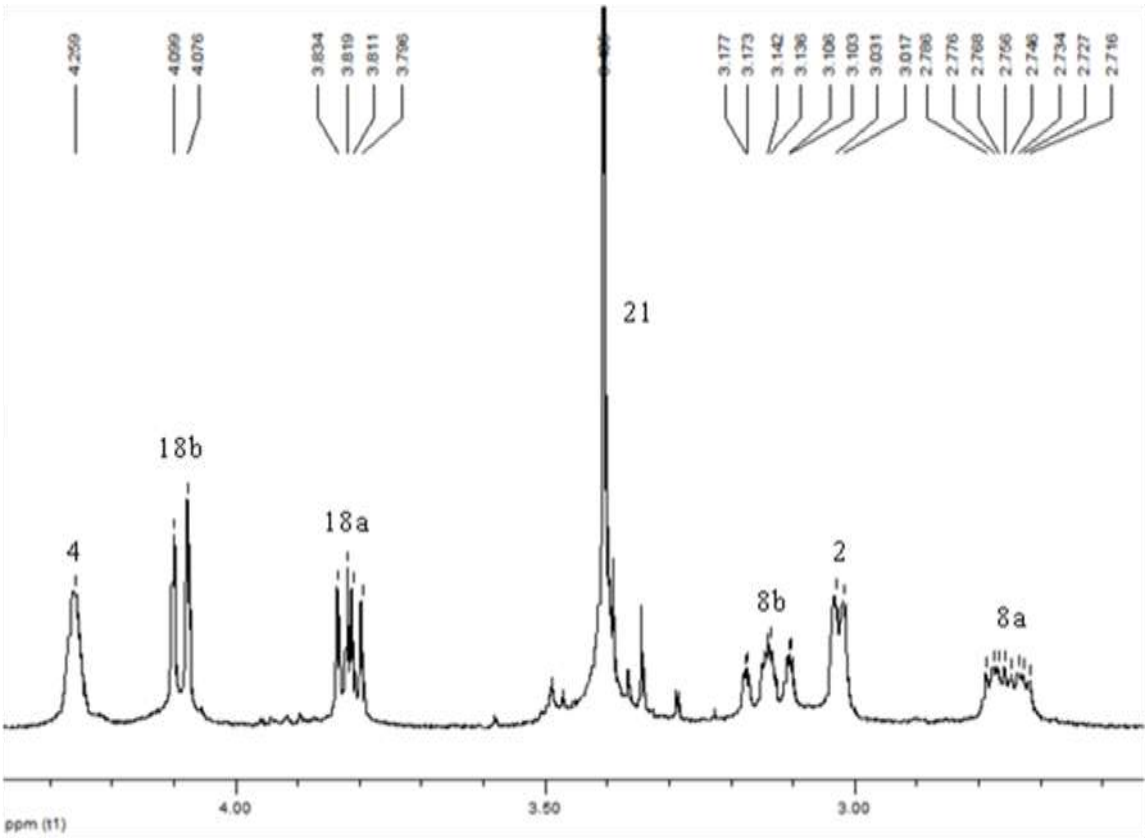
HR-ESI/MS : *m/z* 303,2339 $[M + H - MeOH]^+$
(calculé pour $C_{20}H_{31}O_2$: 303,2324)

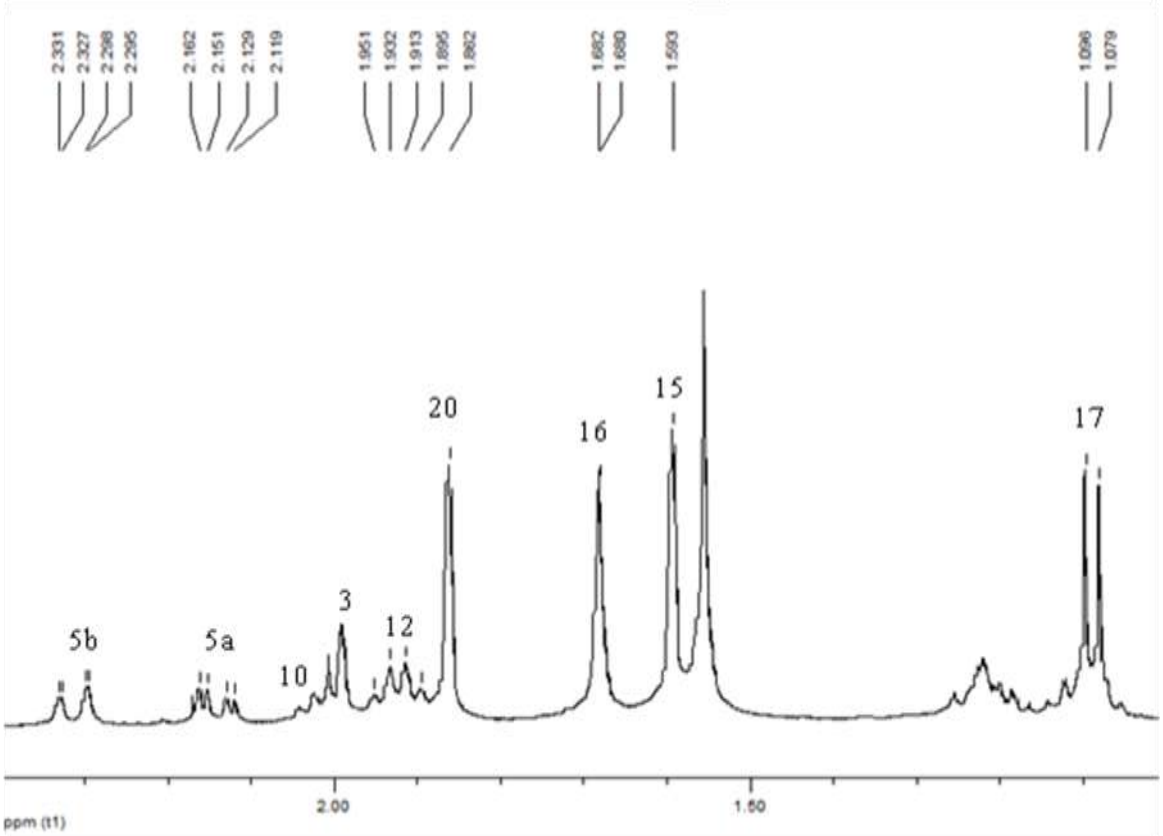
N°	^{13}C (CDCl$_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H (CDCl$_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H	NOESY ^{1}H-^{1}H
1	148,8	C				
2	38,9	CH	3,02 d (6,0)	C3, C1, C19, C10	H18a, H18b, H9, H3	H20, H18a
3	49,7	CH	1,99 m	C17, C1, C18, C5, C4, C11, C10, C2	H17	H7, H5a
4	73,1	CH	4,26 br s		H5a, H5b	H17, H5a
5	49,0	CH$_2$	a: 2,14 dd (13,5, 4,0)	C6, C7, C20	H5b, H4	H5b, H7, H4, H3
			b: 2,31 dd (13,5, 2,0)	C6, C7, C4, C3	H5a, H4	H5a
6	134,8	C				
7	126,7	CH	5,34 dd (11,5, 4,0)		H8b, H20, H8a	H3, H5a
8	29,2	CH$_2$	a: 2,74 ddd (16,0, 7,5, 4,0)		H8b, H9, H7	H8b, H9
			b: 3,14 dd (11,5, 4,0)		H8a, H7, H9, H19	H8a, H20
9	124,9	CH	5,84 dddd (7,5, 1,5, 1,5, 1,5)	C2, C19, C7	H19, H8a, H2, H8b	H8a
10	31,0	CH	2,01 m	C11	H17, H2	
11	38,4	CH$_2$	a:1,09 m	C12, C3, C10, C13	H11b, H12	H11b
			b:1,20 m	C12, C3, C10, (C13)	H11a, H12	H11a
12	26,1	CH$_2$	1,92 q (7,5)	C14, C13, C11, C10	H13, H16, H15, H11a, H11b, H17	
13	124,6	CH	5,08 t hept (7,0, 1,5)	(C15)	H12, H16, H15	H16
14	131,3	C				
15	17,7	CH$_3$	1,59 br s	C14, C13, C16	H13, H12	
16	25,7	CH$_3$	1,68 br s	C14, C13, C15	H13, H12	H13
17	18,6	CH$_3$	1,09 d (7,0)	C3, C10, C11	H10, H12, H3	H4, H18b
18	69,8	CH$_2$	a: 3,81 dd (9,5, 6,0)	C3	H18b, H2	H18b, H2
			b: 4,09 d (9,5)	C19, C1, C3, C2	H18a, H2	H18a, H17
19	105,7	CH	5,19 br dd (1,5, 1,0)	C18, C21	H9, H8b	H21
20	19,9	CH$_3$	1,86 s	C6, C7, C5	H7	H2, H8b
21	55,0	CH$_3$	3,40 s	C19		H17



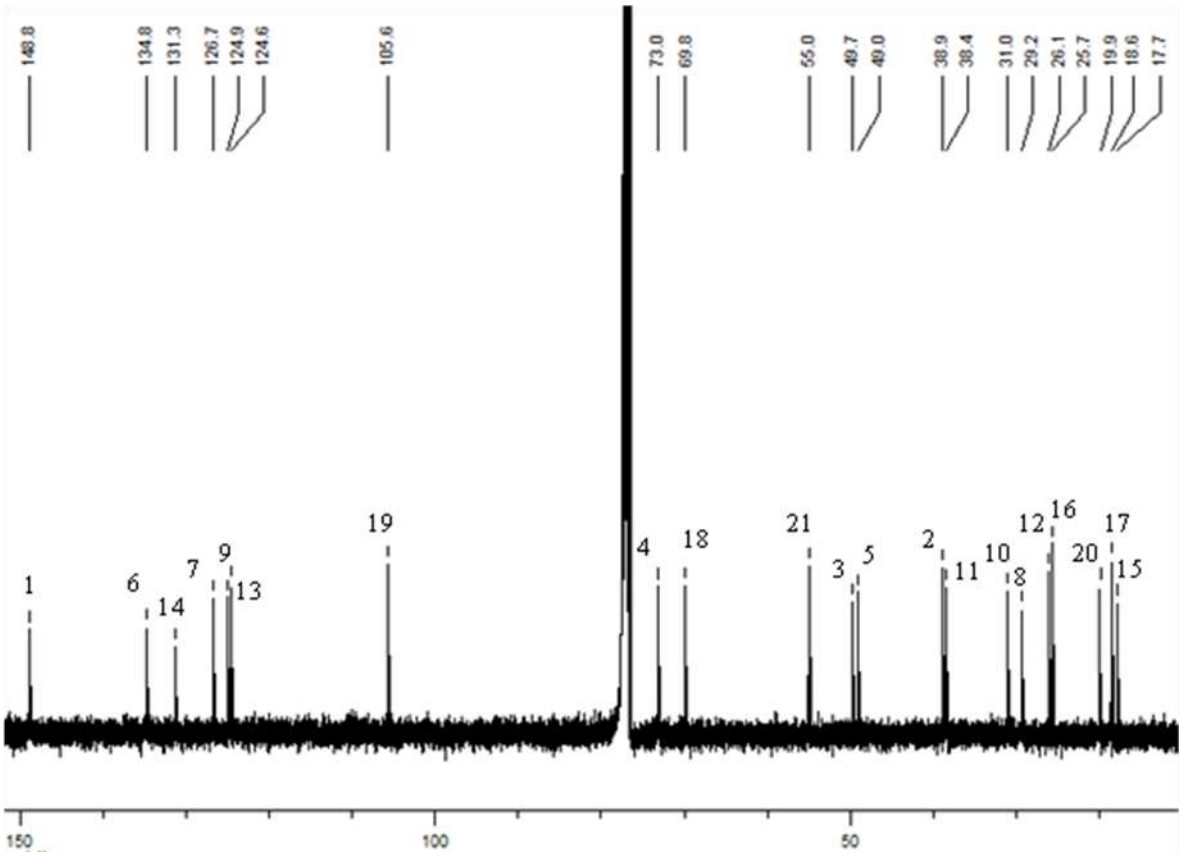


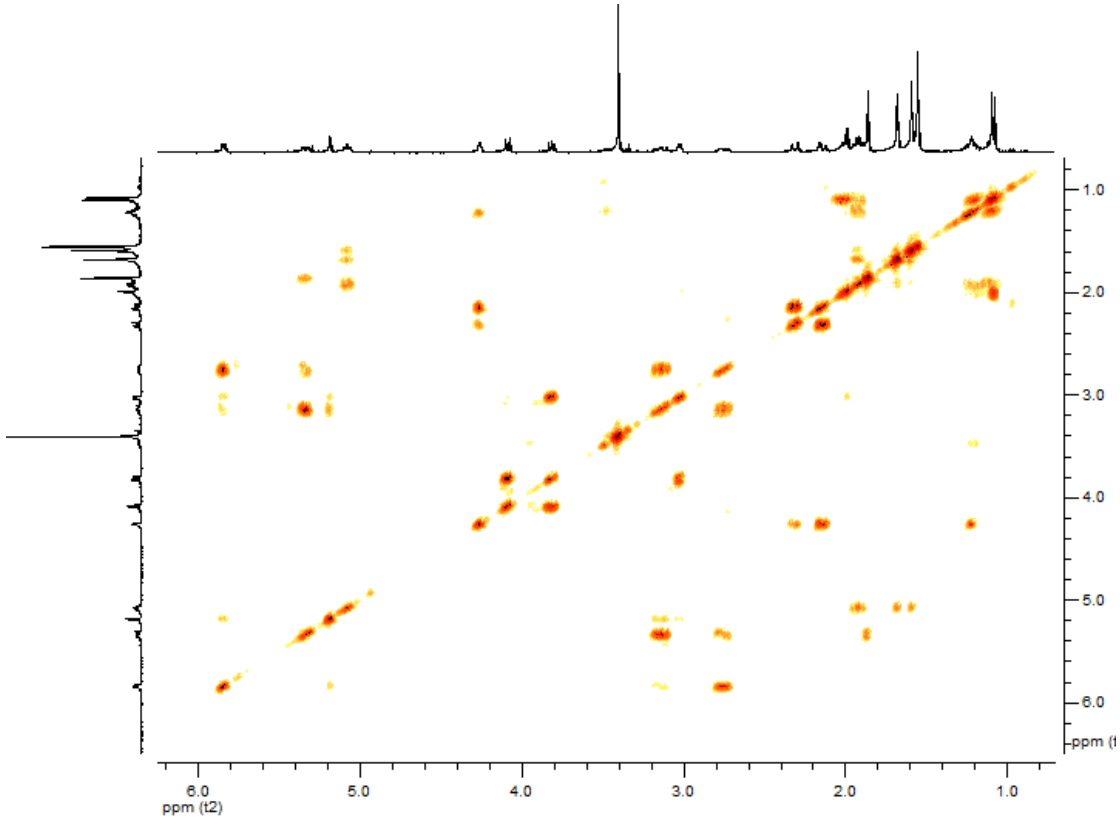
Spectres RMN ^{1}H (intégralité et détail) du composé Ds1



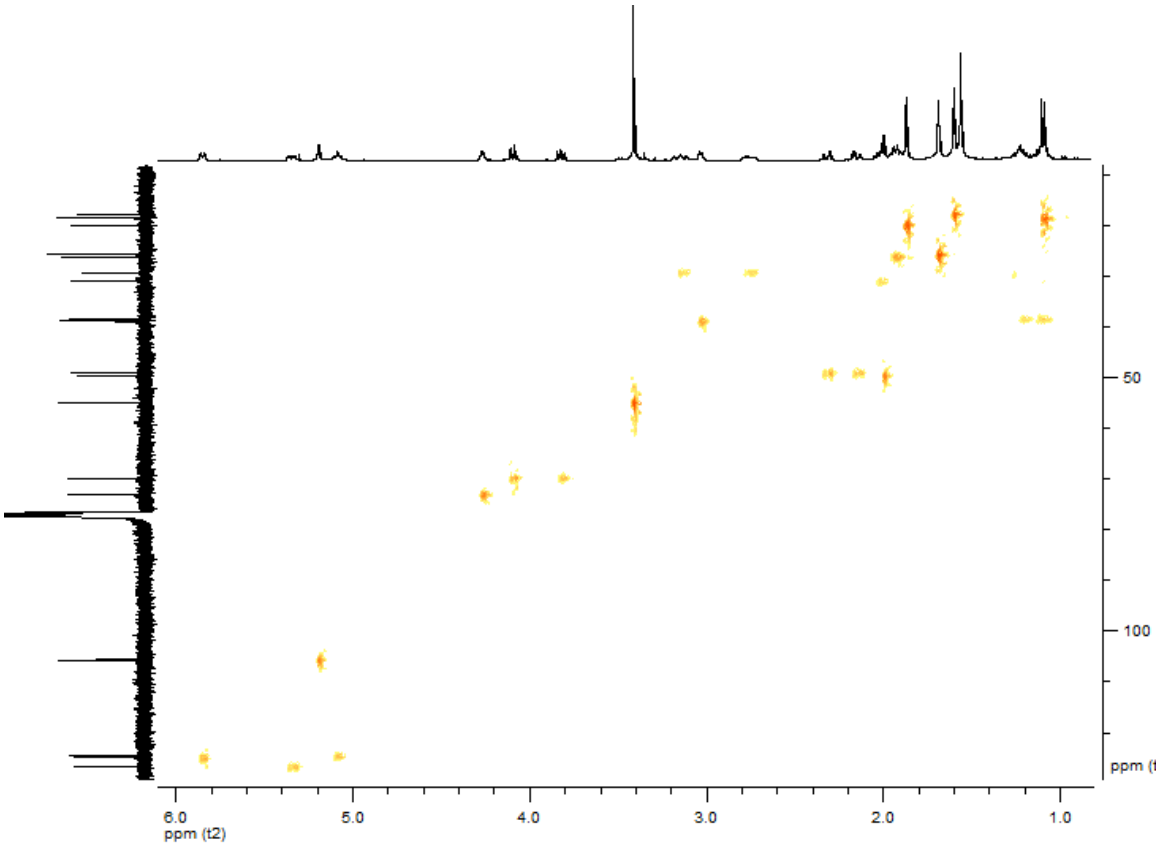


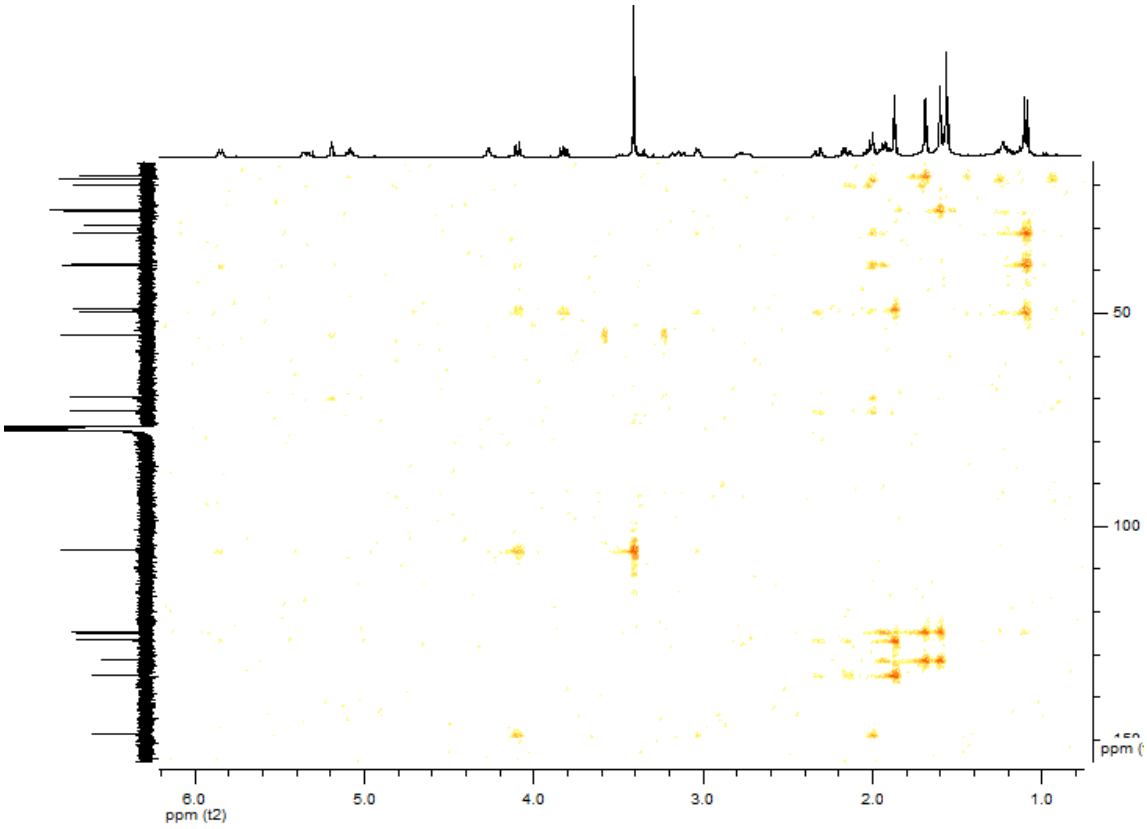
Spectres RMN ^{1}H (détails) du composé Ds1



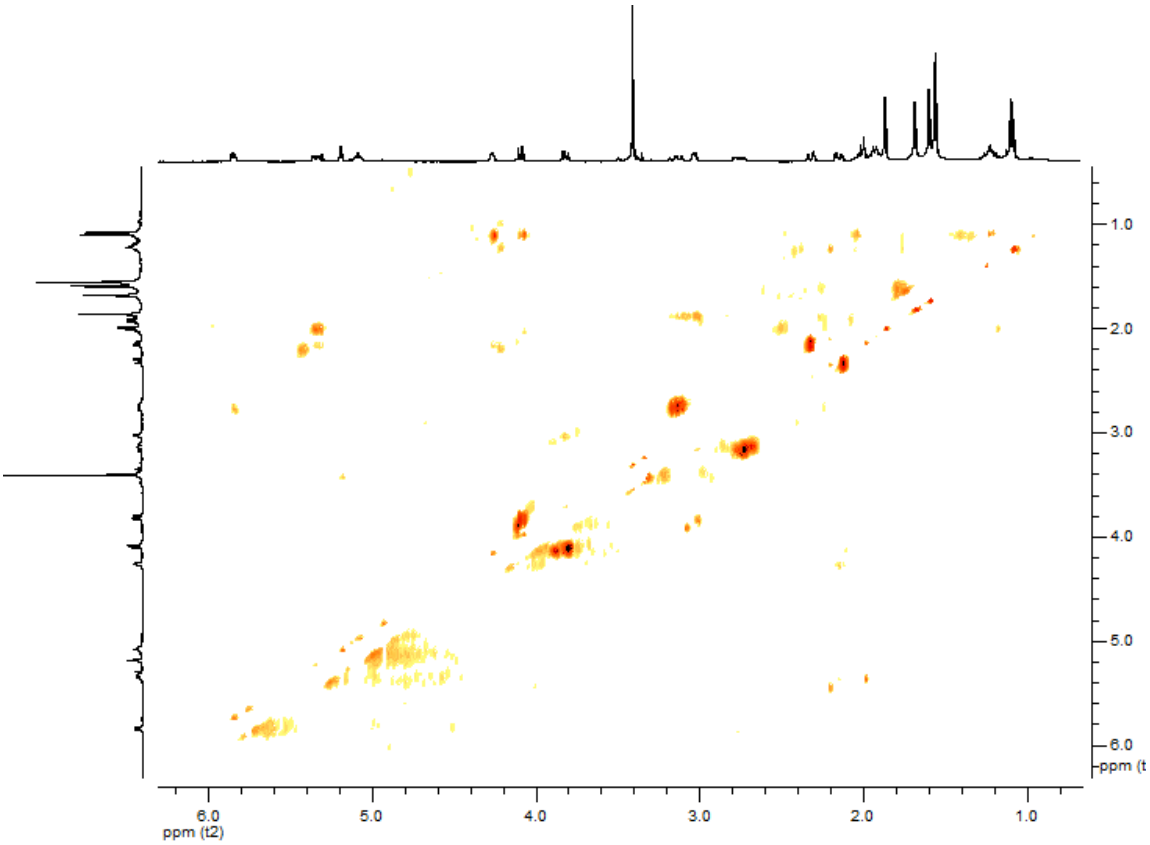


Spectres RMN ^{13}C et COSY ^{1}H-^{1}H du composé Ds1



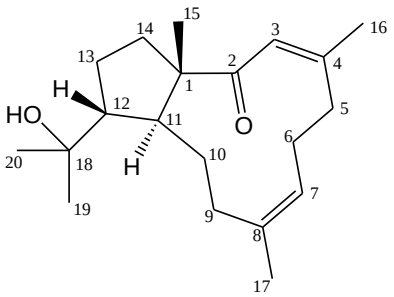


Spectres HSQC et HMBC du composé Ds1



Spectre NOESY ^{1}H-^{1}H du composé Ds1

*2. Composé **Ds2** : 18-hydroxydolabella-3,7-dièn-2-one*



$C_{20}H_{32}O_2$ M = 304 g.mol^{-1}

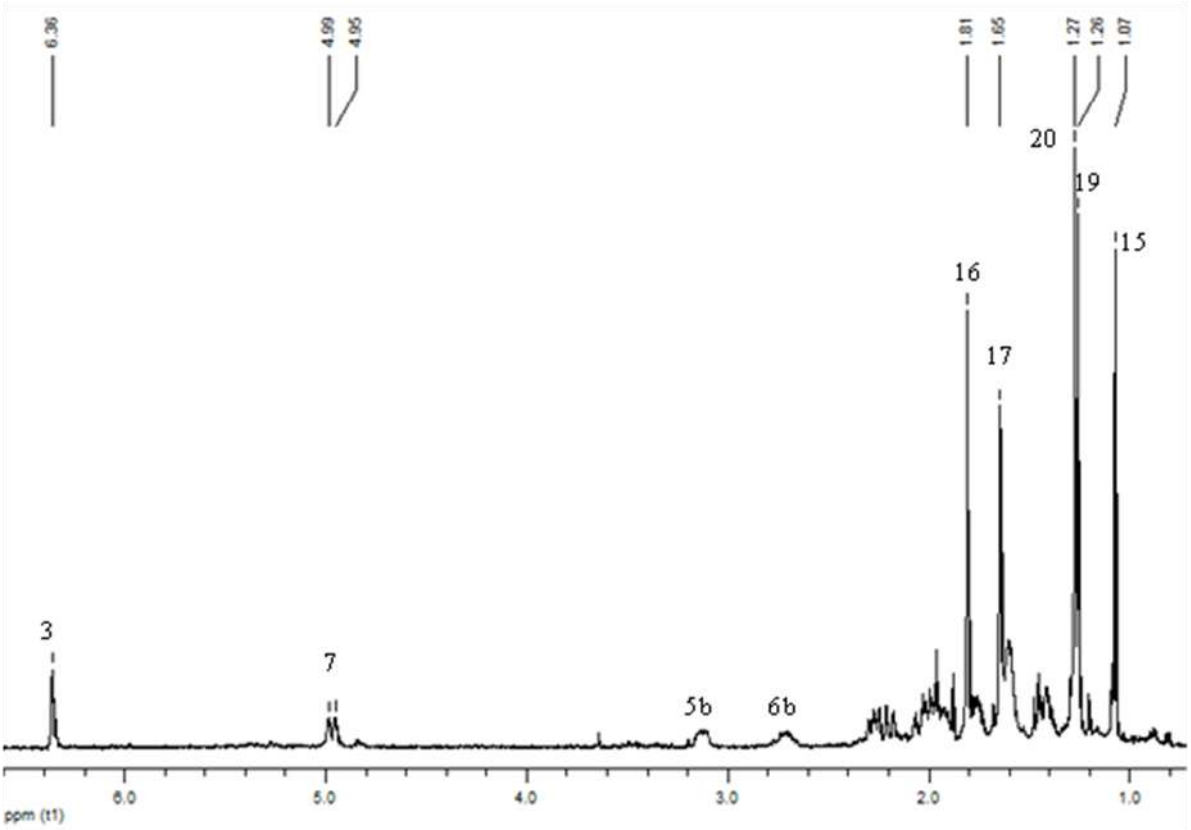
UV : λ_{max} = 242 nm (ε 4060)

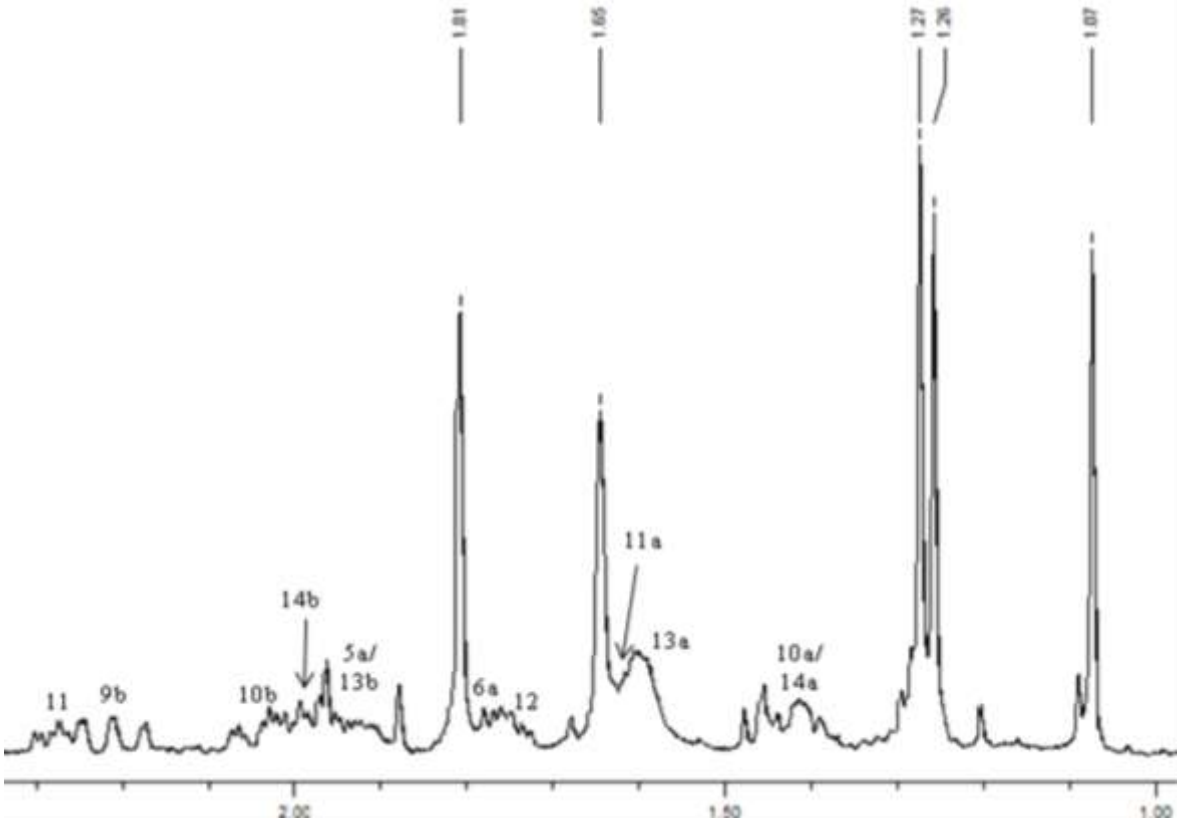
IR : 3483, 2965, 2933, 1671, 1623, 1456, 1376, 1173, 1143, 1112 cm^{-1}

$[\alpha]_D^{25}$ = +4° (MeOH, c 0,1)

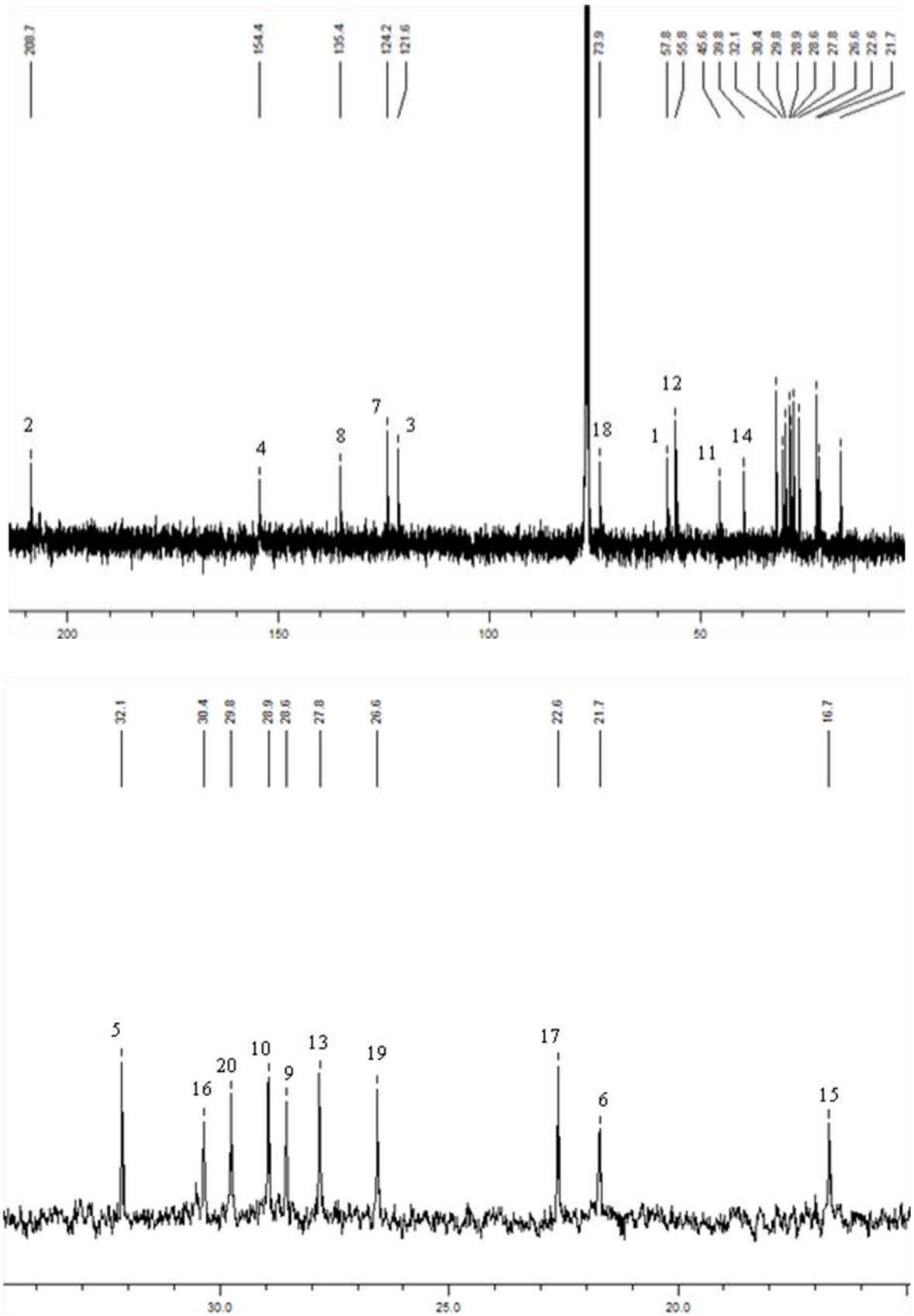
HR-ESI/MS : *m/z* 327,2292 $[M+Na]^+$ (calculé pour $C_{20}H_{32}O_2Na$: 327,2300)

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^1H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^1H-^1H	NOESY ^1H-^1H
1	57,9	C				
2	208,7	C				
3	121,6	CH	6,36 s	C2, C5, C16	H16, H5b	H14b, H16
4	154,4	C				
5	32,2	CH_2	a: 1,96 m b: 3,12 d (11,0)		H5b, H6b H5a, H3	H5b H5a
6	21,7	CH_2	a: 1,78 m b: 2,72 dd (12,5, 6,0)		H6b, H7 H6a, H7, H5a	H6b H6a, H9b
7	124,2	CH	4,97 br d (12,5)		H17, H6b, H6a	H17
8	135,5	C				
9	28,6	CH_2	a: 1,63 m b: 2,21 td (14,5, 2,0)	(C11) C17, C10, (C7, C8)	H9b H9a, H10b, H10a	H9b H6b, H9a
10	29,0	CH_2	a: 1,41 m b: 2,03 m	(C11) C1, C9	H10b, H9b, H11 H10a, H9b	H10b H10a
11	45,6	CH	2,27 ddd (12,0, 8,0, 3,0)	C1	H12, H10a	H19, H20, H14b
12	55,8	CH	1,76 m	C11, C14, C13	H11, H13a, H13b	
13	27,8	CH_2	a: 1,60 m b: 1,97 m	(C18, C11) C14, (C18, C12)	H13b, H12, H14a H13a, H12	
14	39,8	CH_2	a: 1,41 m b: 2,00 m	C12, (C11)	H14b, H13a H14a	H15 H3, H11
15	16,7	CH_3	1,07 s	C2, C1, C11, C14		H14a
16	30,4	CH_3	1,81 s	C5, C3, C4, (C2)	H3	H3
17	22,6	CH_3	1,65 s	C7, C8, C9	H7	H7
18	73,9	C				
19	26,6	CH_3	1,26 s	C20, C12, C18		H11
20	29,8	CH_3	1,27 s	C19, C12, C18		H11

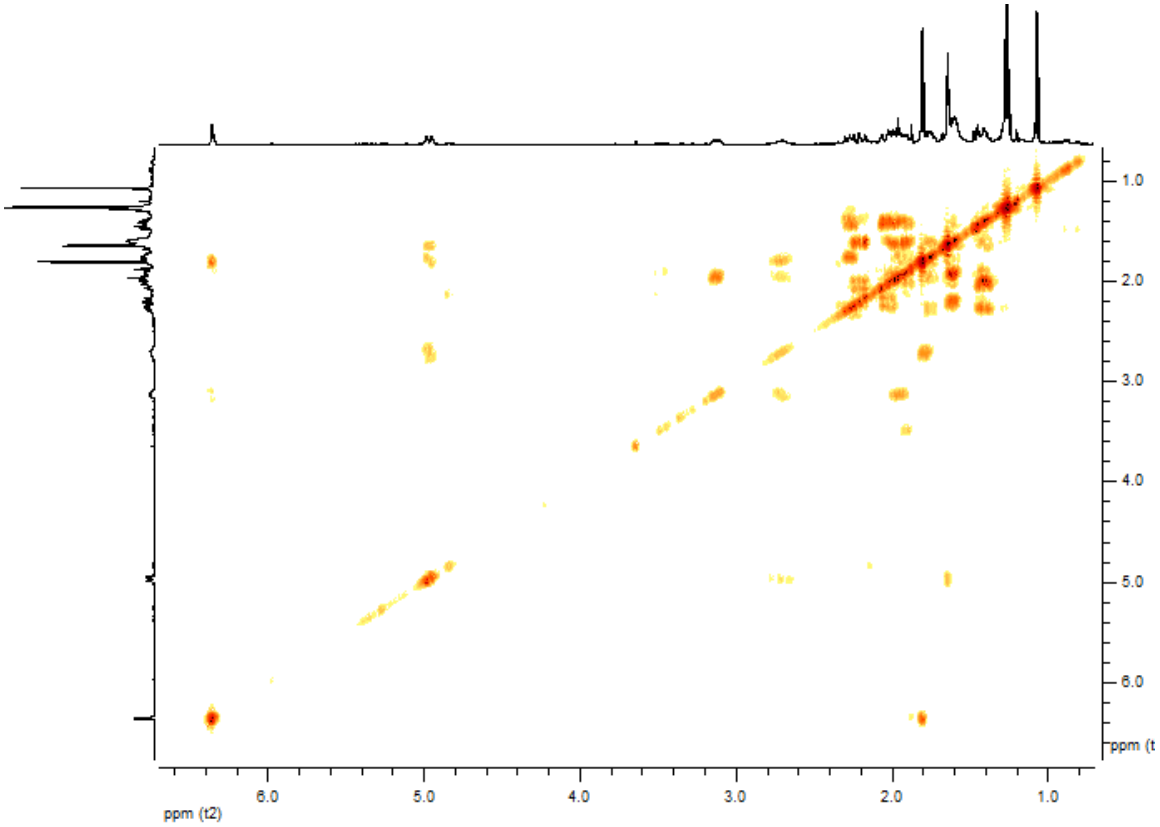


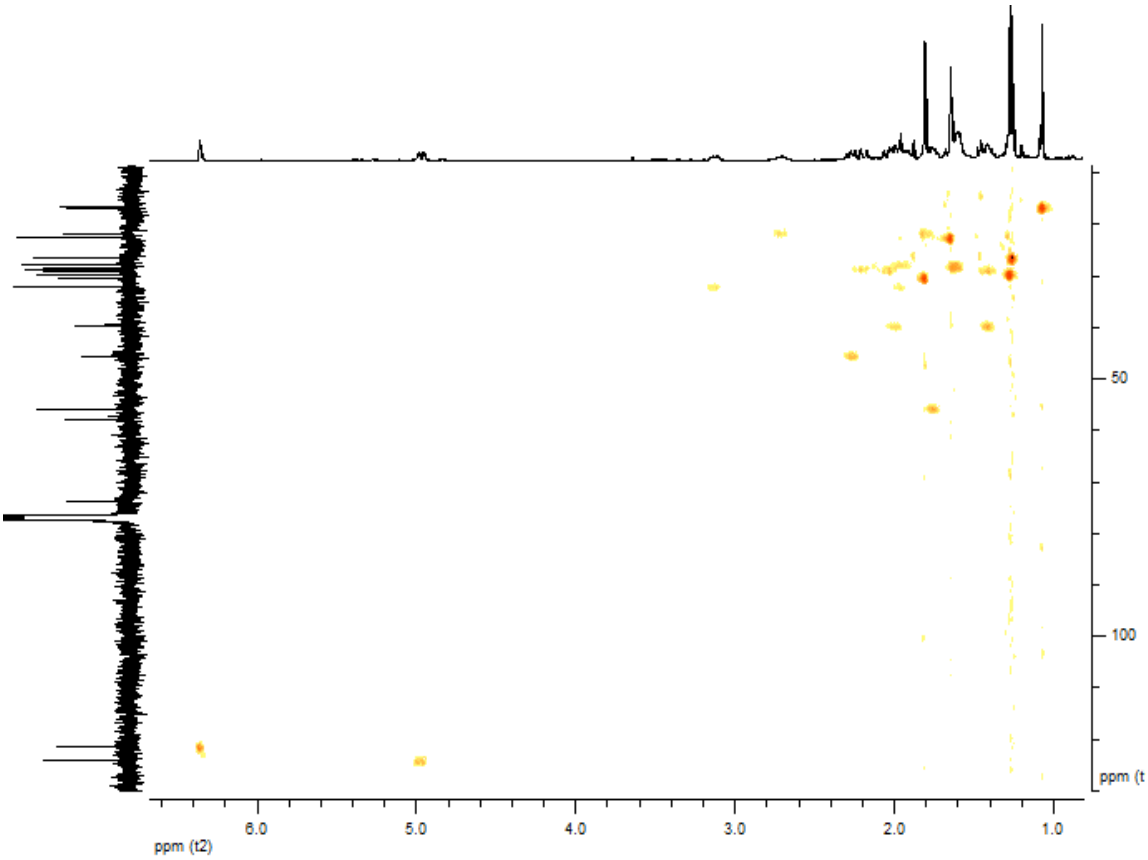


Spectres RMN ^{1}H (intégralité et détail) du composé Ds2

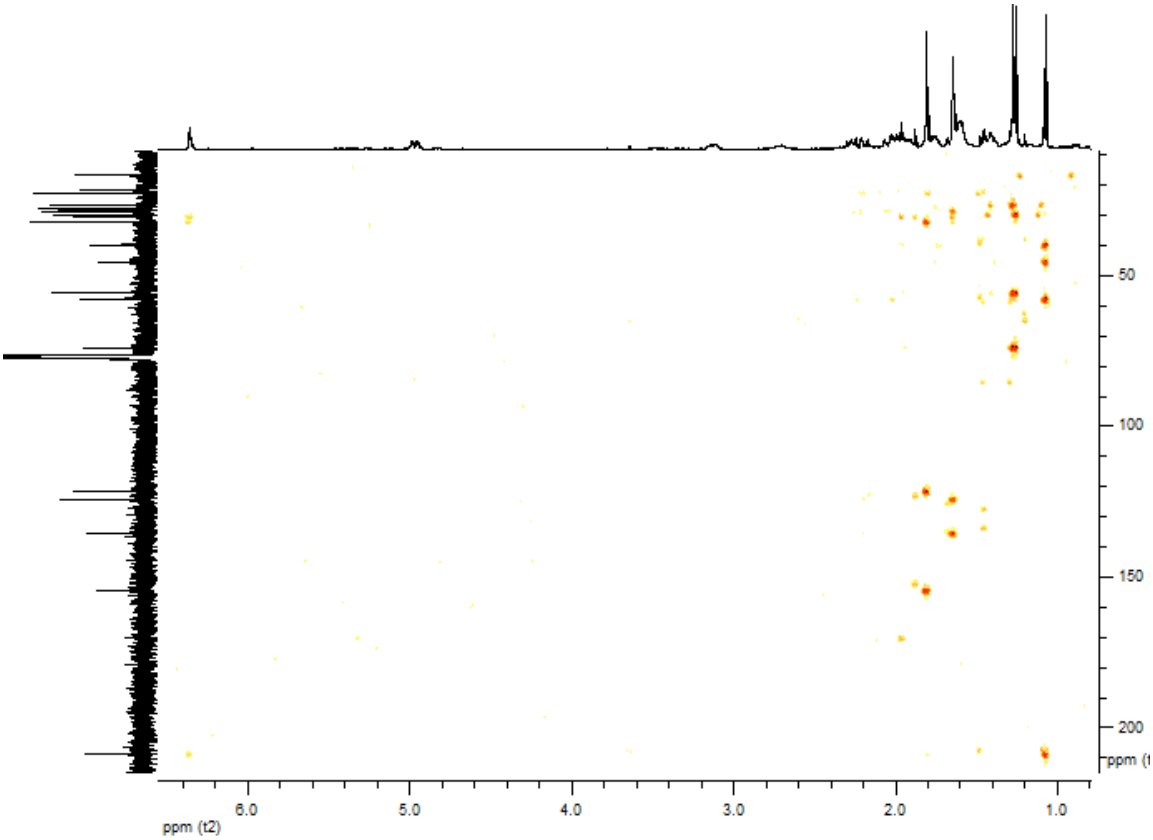


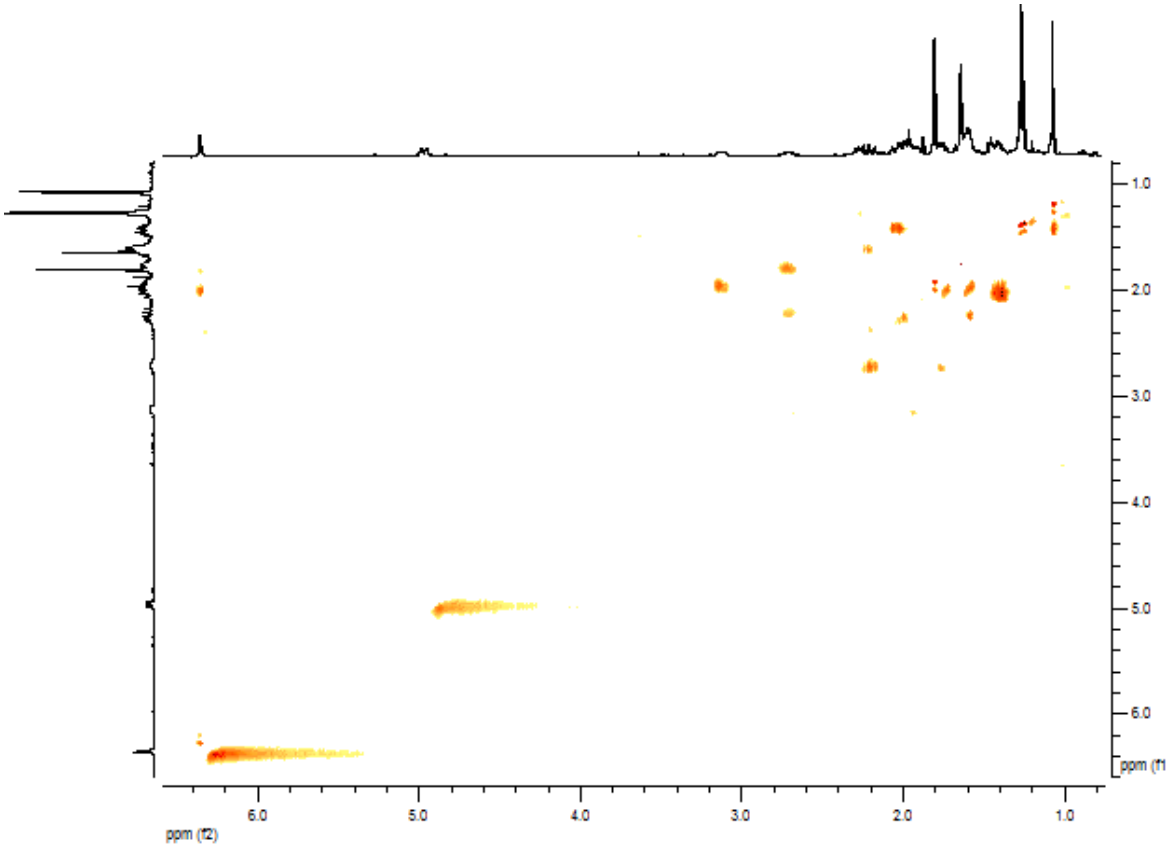
Spectres RMN ^{13}C (intégralité et détail) du composé Ds2





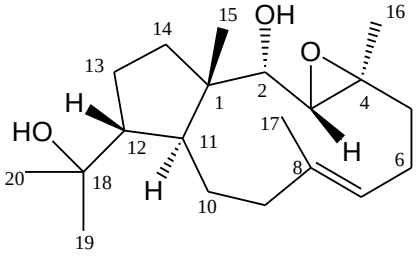
Spectres COSY ^{1}H-^{1}H et HSQC du composé Ds2





Spectres HMBC et NOESY ^{1}H-^{1}H du composé Ds2

*3. Composé **Ds3** : 3,4-epoxy-2,18-dihydroxydolabell-7-ène*



$C_{20}H_{34}O_3$ M = 322 g.mol^{-1}

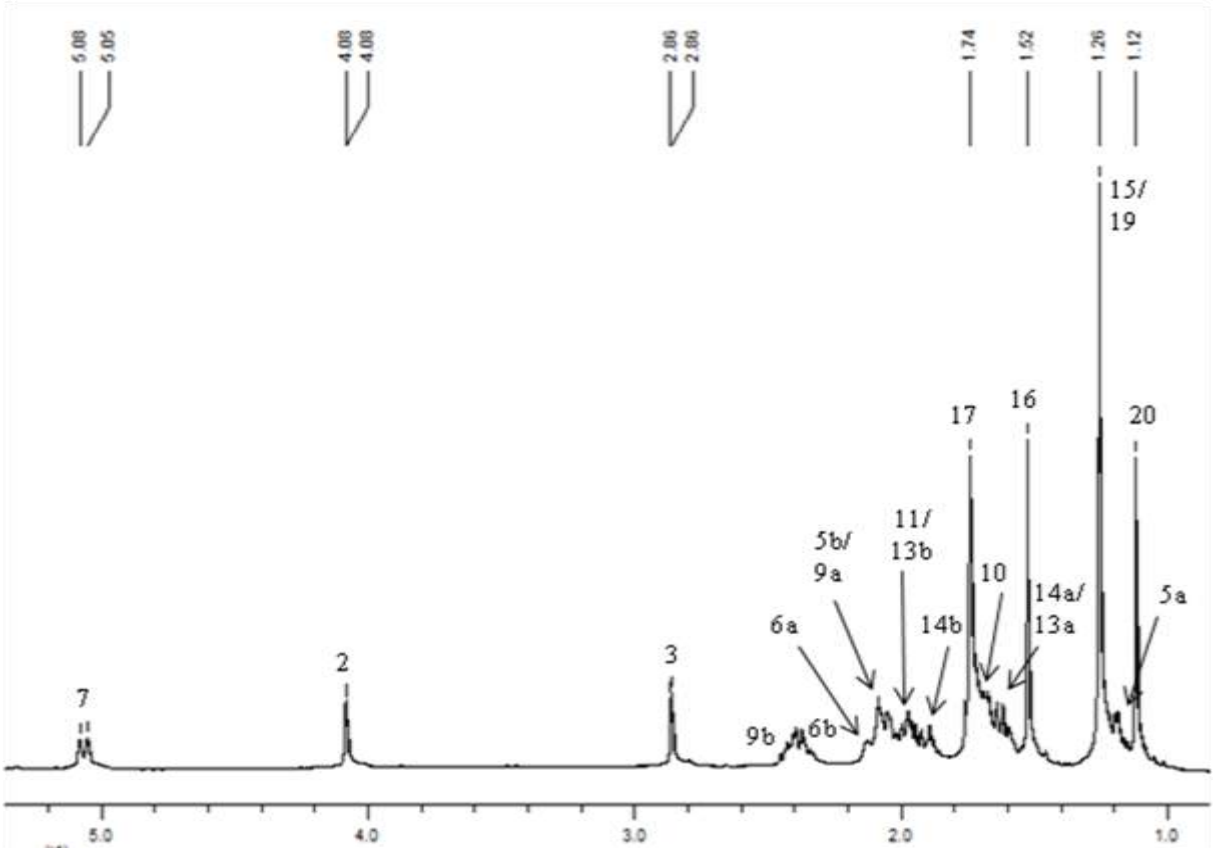
UV : pas de maxima

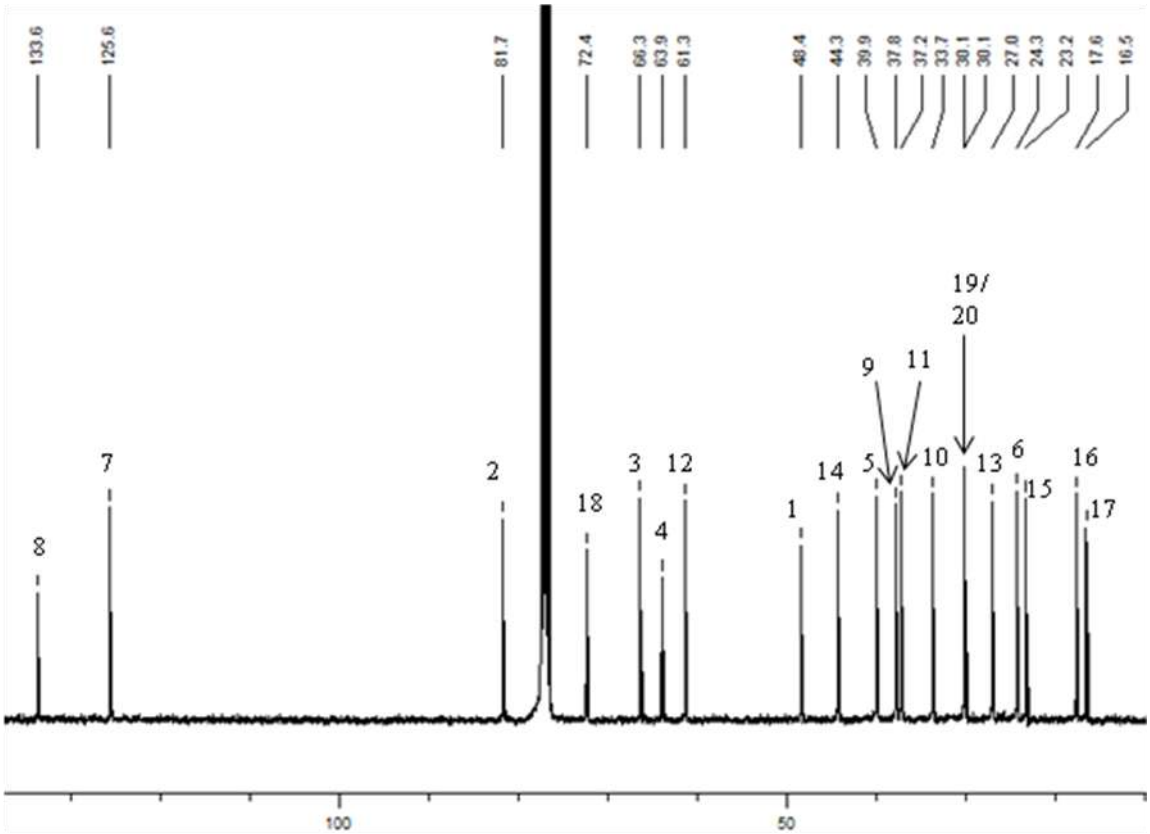
IR : 3313, 2966, 2926, 2853, 1457, 1385cm^{-1}

$[\alpha]_D^{25}$ = + 58 ° (MeOH, c 0,1)

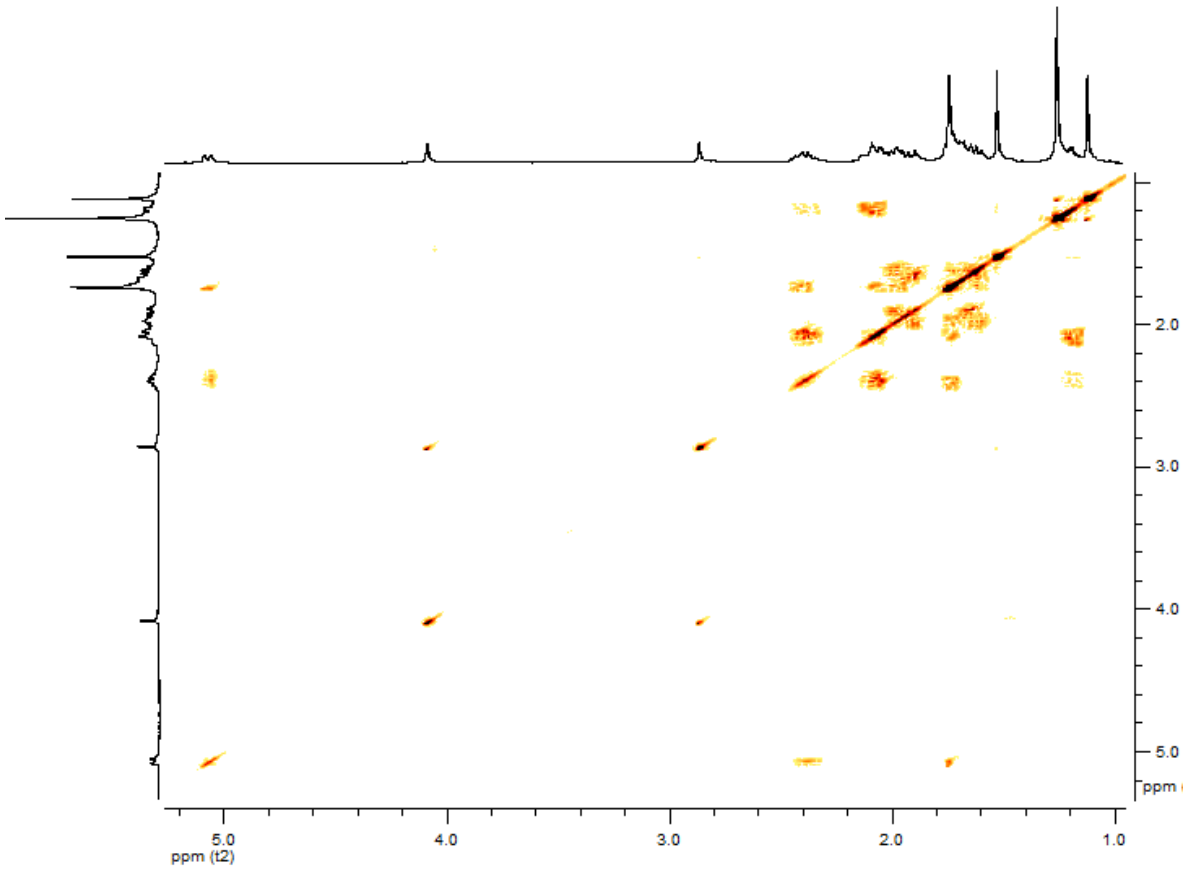
HR-ESI/MS : m/z 345,2404 $[M + Na]^+$ (calculé pour $C_{20}H_{34}O_3Na$: 345,2406)

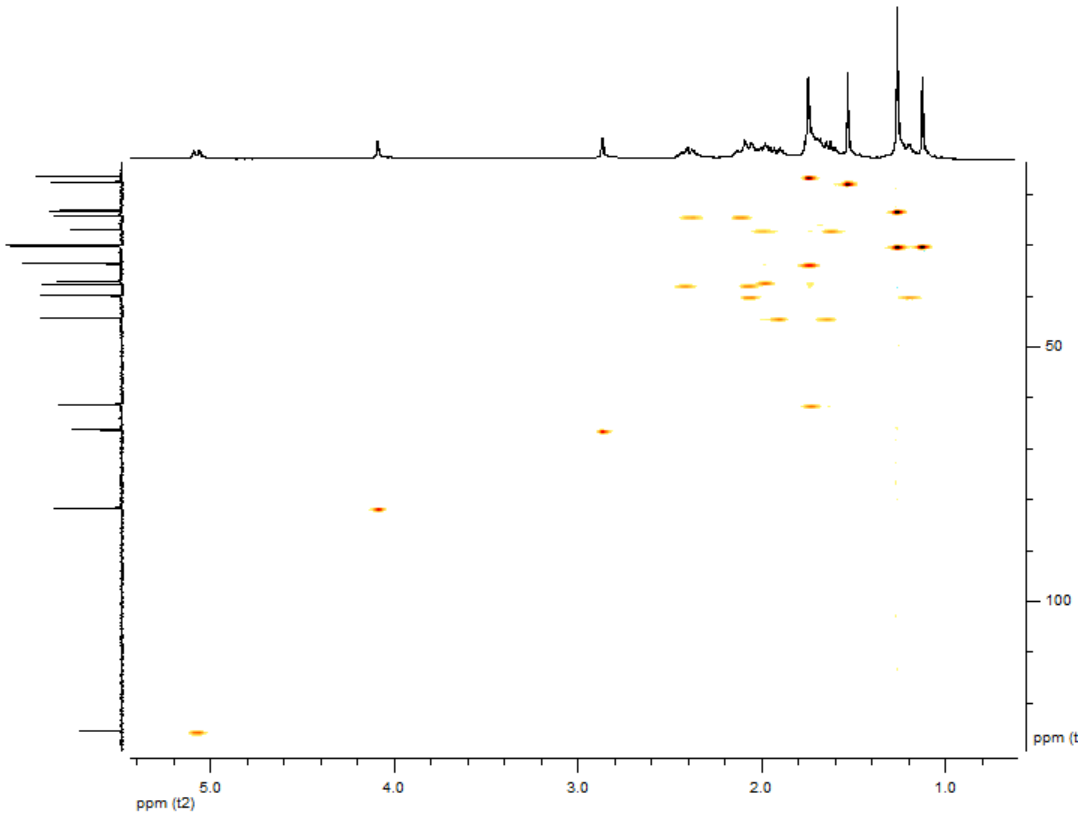
N°	^{13}C (CDCl$_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H (CDCl$_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H	NOESY ^{1}H-^{1}H
1	48,4	C				
2	81,7	CH	4,08, d (2,0)	C1, C3, C4, C11, C14, (C15)	H3	H15, H3, H14b
3	66,3	CH	2,86, d (2,0)	C2, C5, C4	H2, (H16)	H2, H7, H15, H5a
4	63,9	C				
5	39,9	CH$_2$	a: 1,18 m b: 2,05 m	C16, C3, C4, C6, C7 C3, C4, C6, C7, (C16)	H5b, H6b, (H16) H5a	H3, H6a, H5b H5a
6	24,3	CH$_2$	a: 2,11 m b: 2,38 m	C8 C8, C5, C7	H6b H6a, H5a	H5a
7	125,6	CH	5,07, d (12,0)	C9, C17	H17, H9a, (H9b)	H9b, H15/H19, H3
8	133,6	C				
9	37,8	CH$_2$	a: 2,06 m b: 2,41 m	C7, (C8) C7, C8, C10, C17	H9b, H10, H7 H9a, (H7)	H9b H9a, H15/H19, H7, H17
10	33,7	CH$_2$	1,73 m	C9, C12	H9b, H9a	H15/H19
11	37,2	CH	1,97 m	C10, C9, C14, C18, C1, C12		H12, H19
12	61,3	CH	1,72 m	C10, C11, C13, C1, (C18, C20, C19)	H13a	H11
13	27,0	CH$_2$	a: 1,61 m b: 1,98 m	C14, (C12, C11) C12, (C14, C1)	H13b, H12 H13a, H14b	H13b H13a
14	44,3	CH$_2$	a: 1,63 m b: 1,90 m	C15, C13, C12, C11 C13, C12, C11	H14b H14a, H13b	H14b H14a, H2
15	23,2	CH$_3$	1,26 s	C1, C11, C2, C14, C10		H3, H2, (H9b, H7, H10)?
16	17,6	CH$_3$	1,52 s	C5, C4, C3	(H3, H5a)	
17	16,6	CH$_3$	1,74 s	C7, C8, C9, (C5)	H7	H9b
18	73,4	C				
19	30,14	CH$_3$	1,26 s	C20, C19, C12, C13, (C11)	H20	(H9b, H7, H11, H10)?
20	30,06	CH$_3$	1,12 s	C19, C18, C12, (C11)	H16	



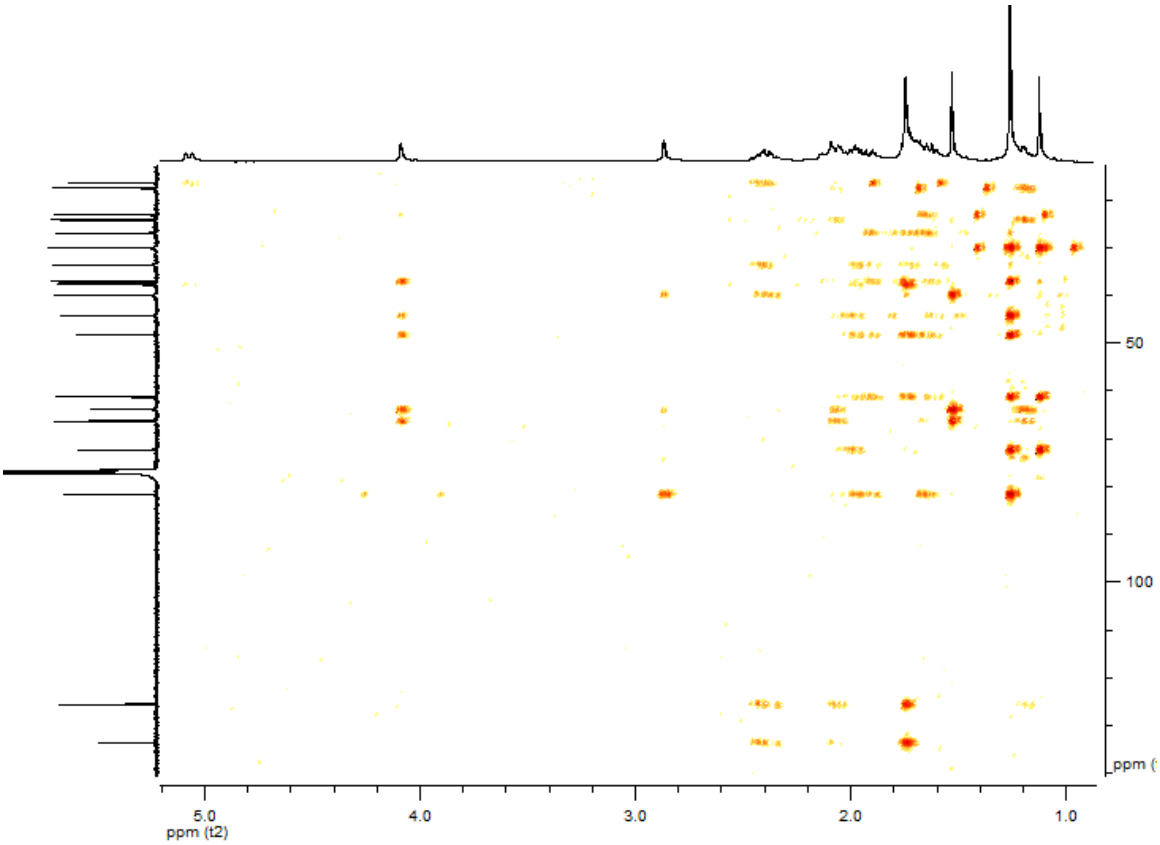


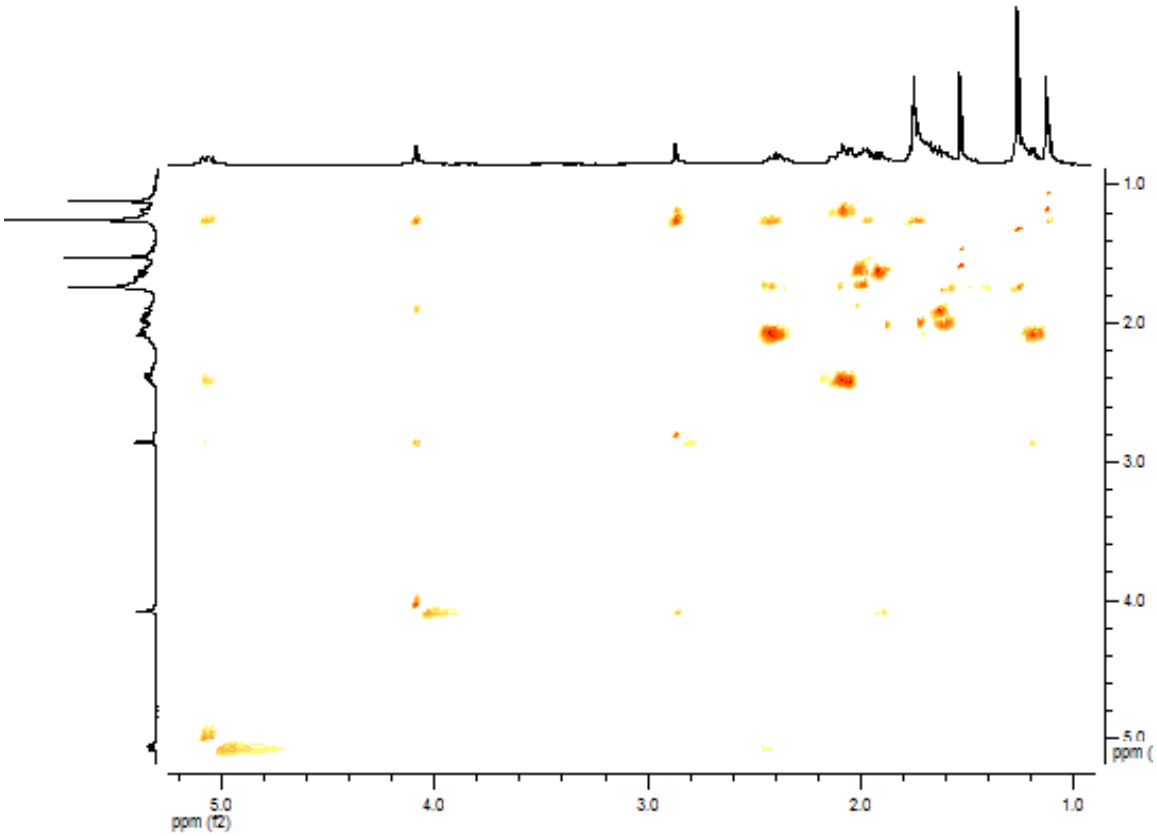
Spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé Ds3





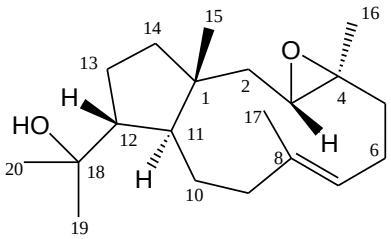
Spectres COSY ^{1}H-^{1}H et HSQC du composé Ds3





Spectres HMBC et NOESY ^{1}H-^{1}H du composé Ds3

*4. Composé **Ds4** : 3,4-epoxy-18-hydroxydolabell-7-ène*

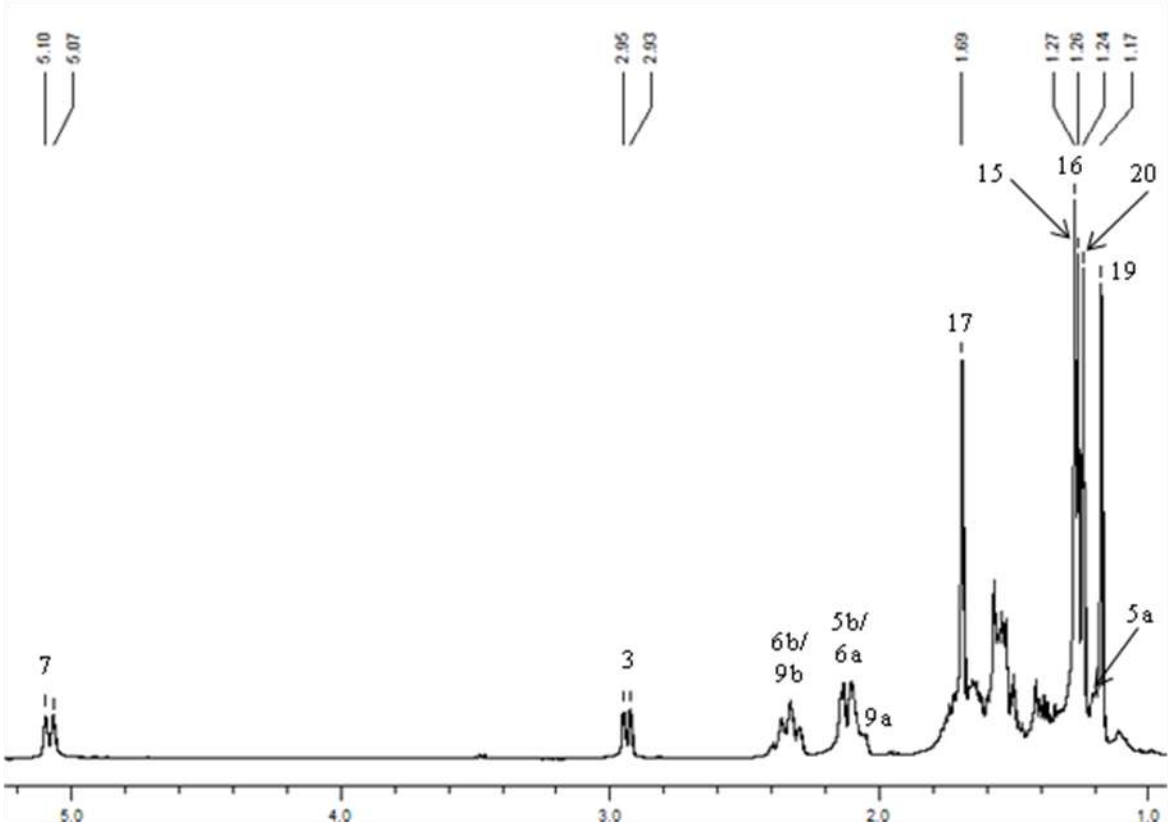


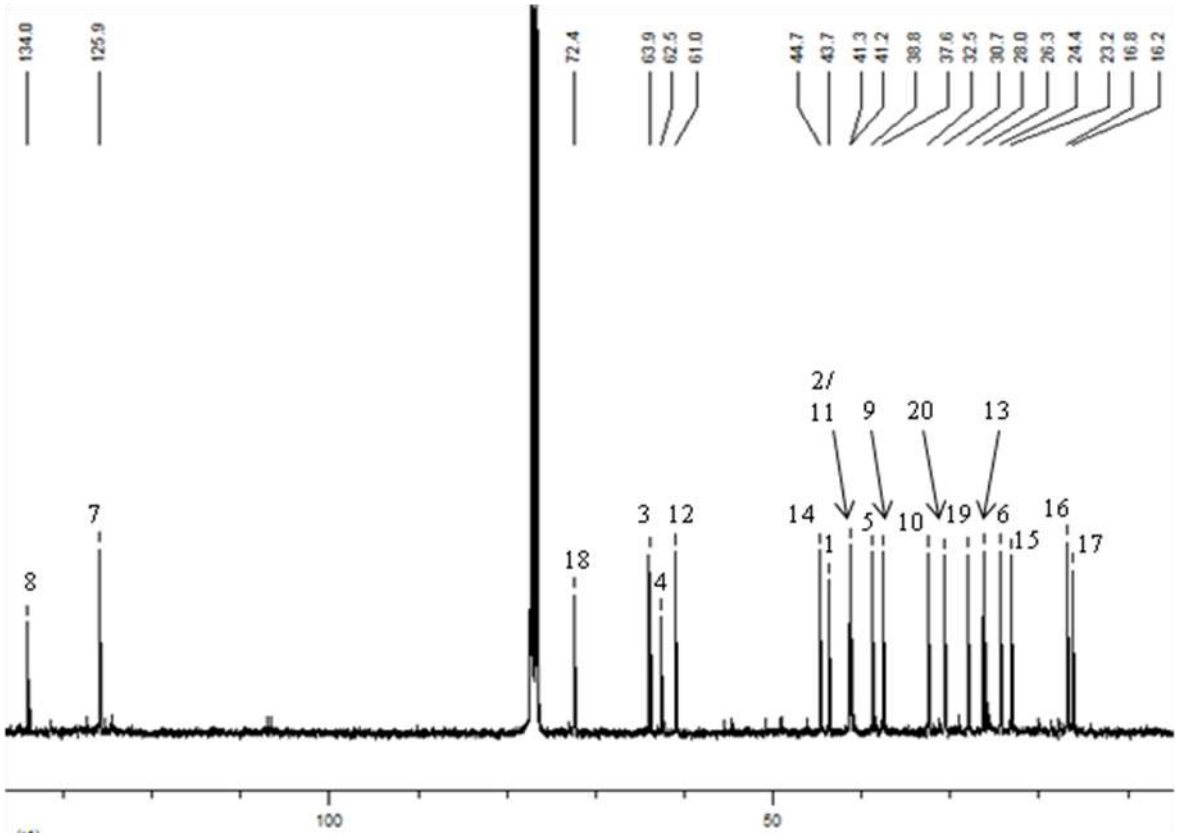
$C_{20}H_{34}O_2$ M = 306 g.mol^{-1}

$[\alpha]_D^{25}$ = + 45 ° (MeOH, c 0,1)

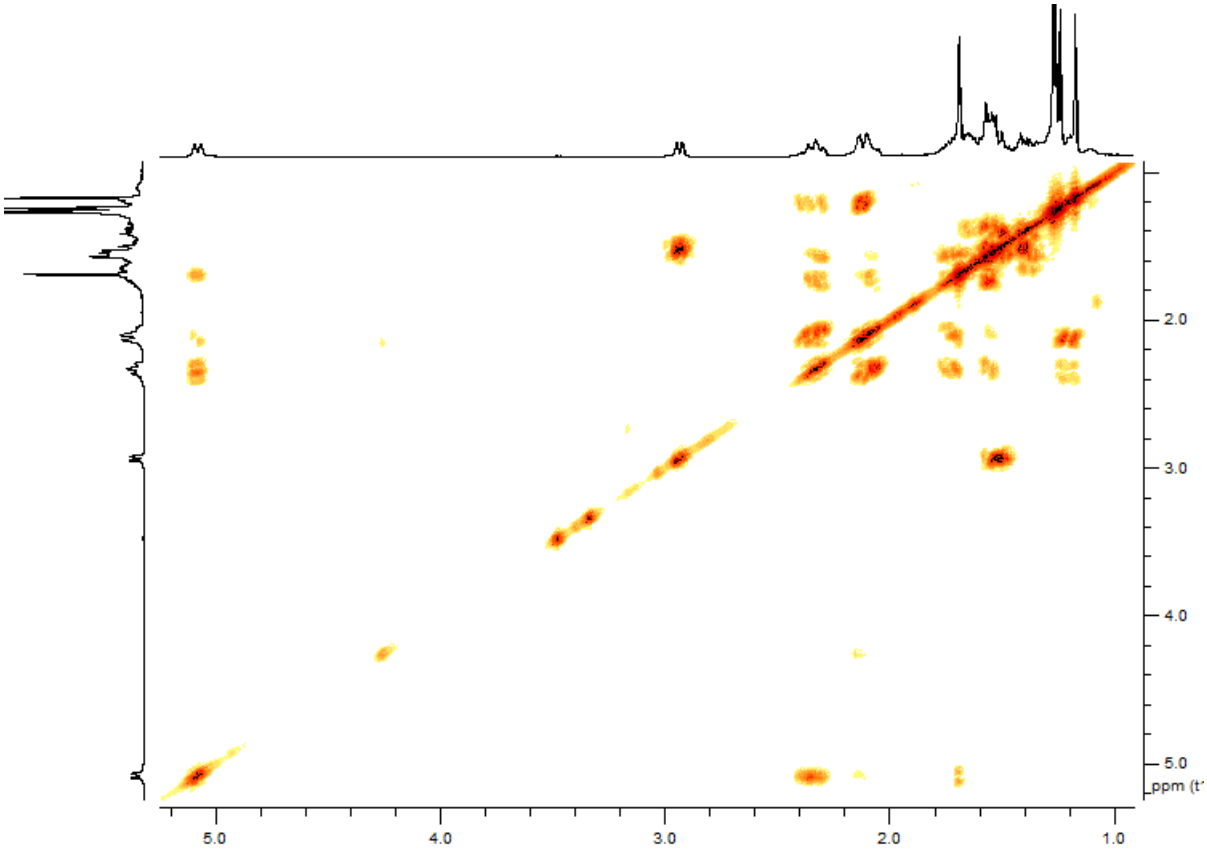
HR-ESI/MS : *m/z* 329,2464 $[M + Na]^+$ (calculé pour $C_{20}H_{34}O_2Na$: 329,2457)

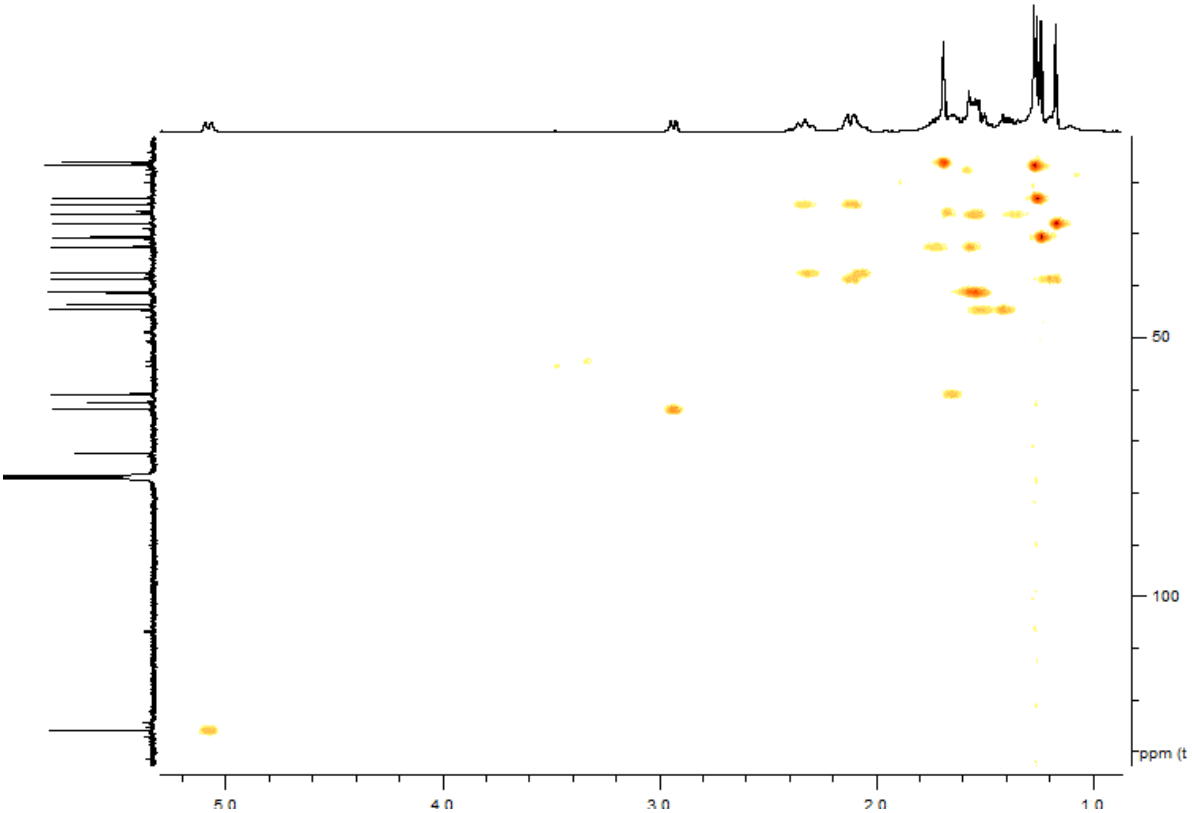
N°	^{13}C (CDCl$_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H (CDCl$_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H	NOESY ^{1}H-^{1}H
1	43,7	C				
2	41,3	CH$_2$	1,54 m	C3, C4, C1, C15, C11	H3	H3
3	64,0	CH	2,93 dd (10,0, 3,0)	C2, C5, (C1, C4)	H2	H15, H2
4	62,5	C				
5	38,8	CH$_2$	a: 1,20 m b: 2,11 m	C7, C16, C6, C4, C3 C3, C4, C6, C7	H6a, H6b H7	H5b H5a
6	24,4	CH$_2$	a: 2,10 m b: 2,33 m	C7, C8 C7, C8, C17, C5	H6b, H5a, H7 H6a, H7, H5a	H6b H6a, H17, H7?
7	125,9	CH	5,08 br d (10,0)	C17, C9, (C6)	H6b, H17, H6a, H5b	H6b /H9b, H15
8	134,0	C				
9	37,6	CH$_2$	a: 2,07 m b: 2,32 m	C7, C8, C11, (C10) C7, C8, C10, C17	H9b, H10b, H10a H9a, H10b, H10a	H9b H9a, H15, H7?
10	32,5	CH$_2$	a: 1,57 m b: 1,73 m	C15, C11 C12, C1, C9, C11	H10b, H9b, H9a H10a, H9b, H9a, H11	
11	41,2	CH	1,54 m	C15, C10, C1, C2	H10b	
12	61,0	CH	1,65 m	C11, C10, C13, C14		
13	26,3	CH$_2$	a: 1,36 m b: 1,55 m	C12, C14 C12, C14	H13b H13a	H13b H13a
14	44,7	CH$_2$	a: 1,41 m b: 1,52 m	C12, C13, C11, C2, C1 C15, C13, C1, C11	H14b H14a	
15	23,2	CH$_3$	1,26 s	C1, C2, C11, C14		H7, H9b, H2
16	16,8	CH$_3$	1,27 s	C3, C4, C5		
17	16,3	CH$_3$	1,69 s	C7, C8, C9	H7	H6b
18	72,4	C				
19	28,0	CH$_3$	1,18 s	C12, C18, C20		
20	30,7	CH$_3$	1,24 s	C12, C18, C19		



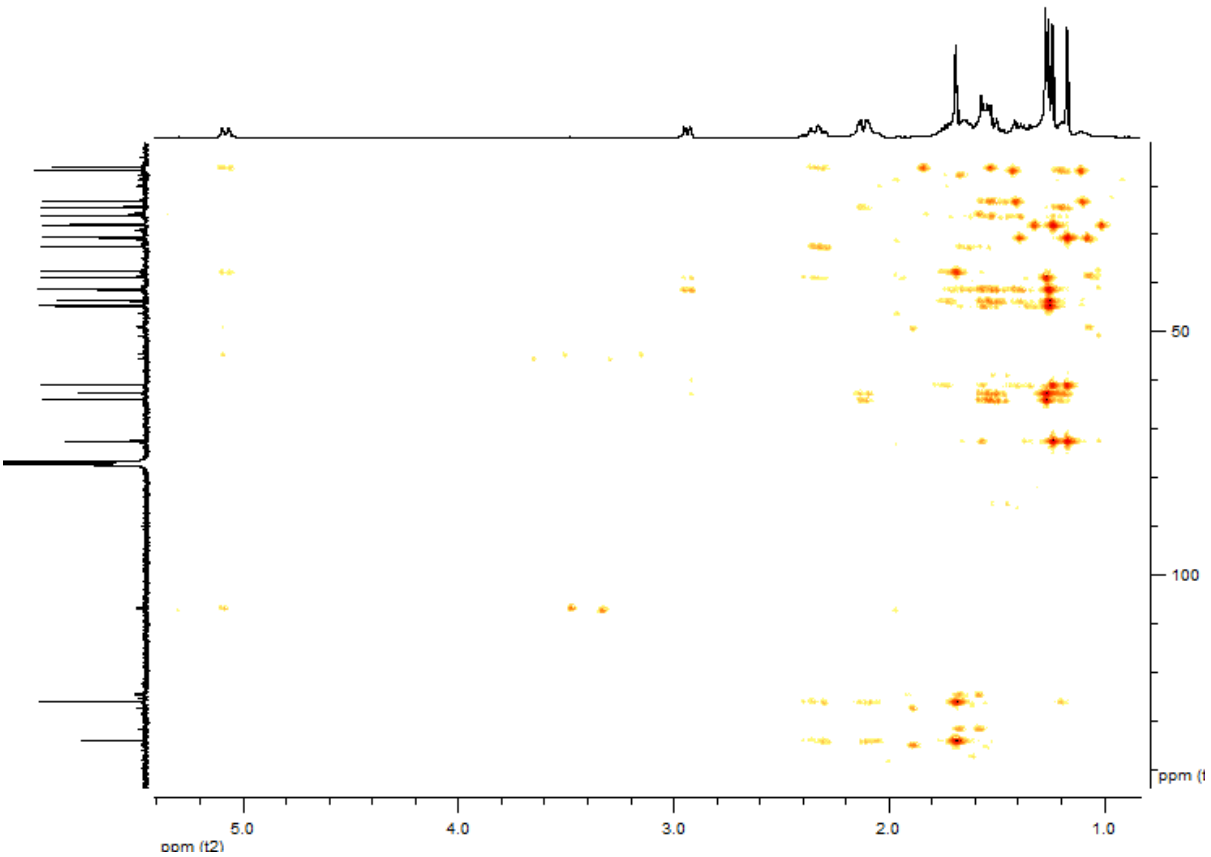


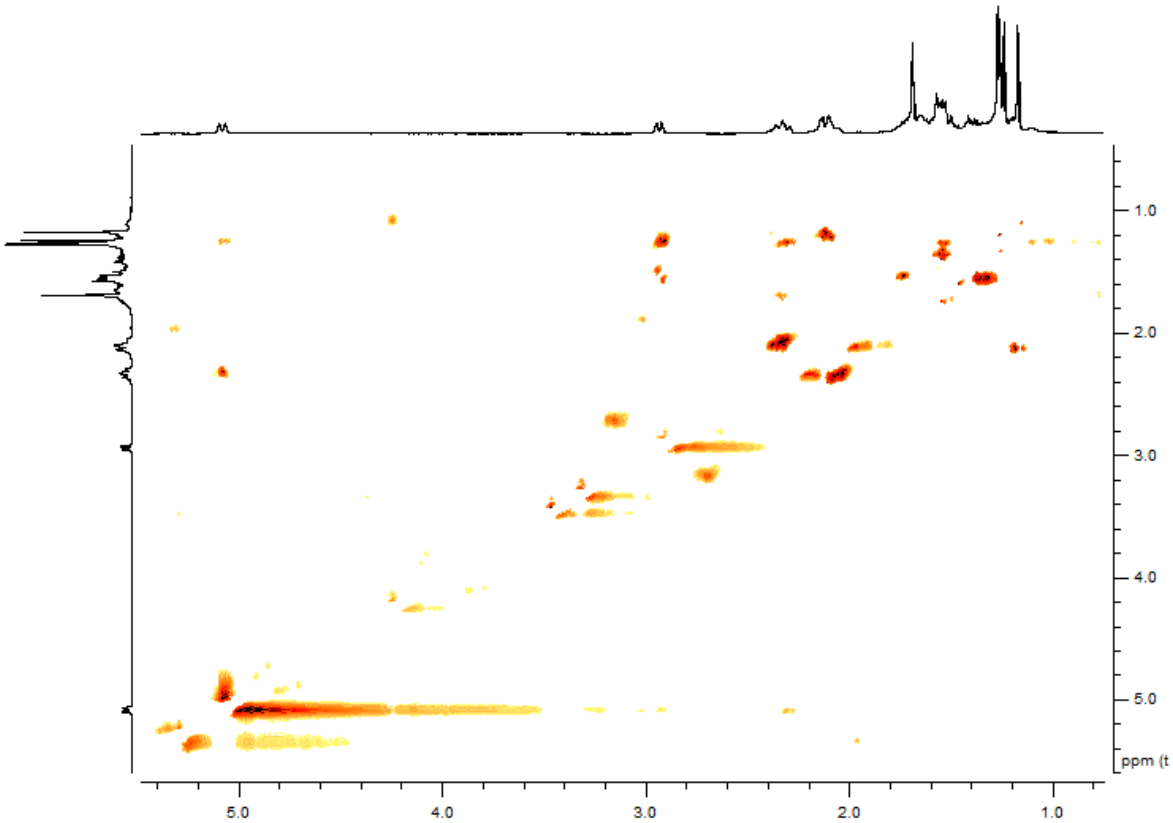
Spectres RMN du ^{1}H et du ^{13}C du composé Ds4





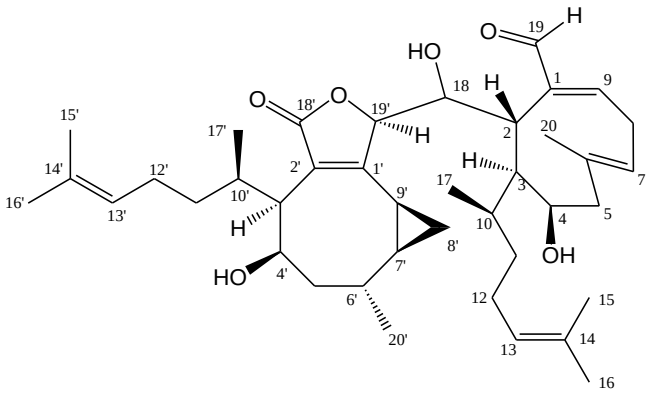
Spectres COSY ^{1}H-^{1}H et HSQC du composé Ds4





Spectres HMBC et NOESY ^{1}H-^{1}H du composé Ds4

*5. Composé **Ds5** : dictyotadimer A*



$C_{40}H_{60}O_6$ M = 636 g.mol^{-1}

UV : λ_{max} = pas de maxima

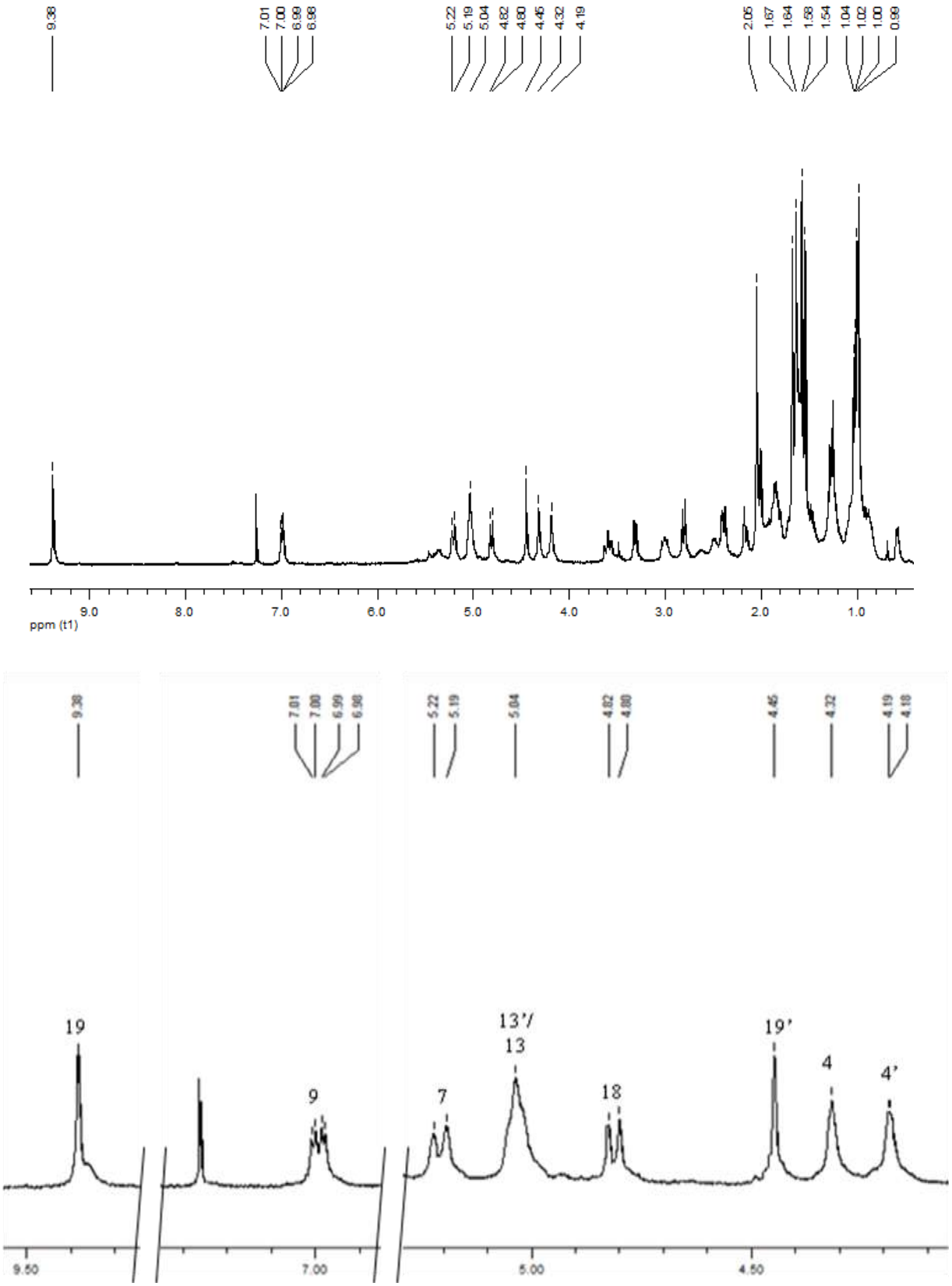
IR : 3283, 2958, 2925, 1732, 1683, 1455, 1376, 1299 cm^{-1}, massif entre 1000 et 1100 cm^{-1}

$[\alpha]_D^{25}$ = - 12 ° (MeOH, c 0,1)

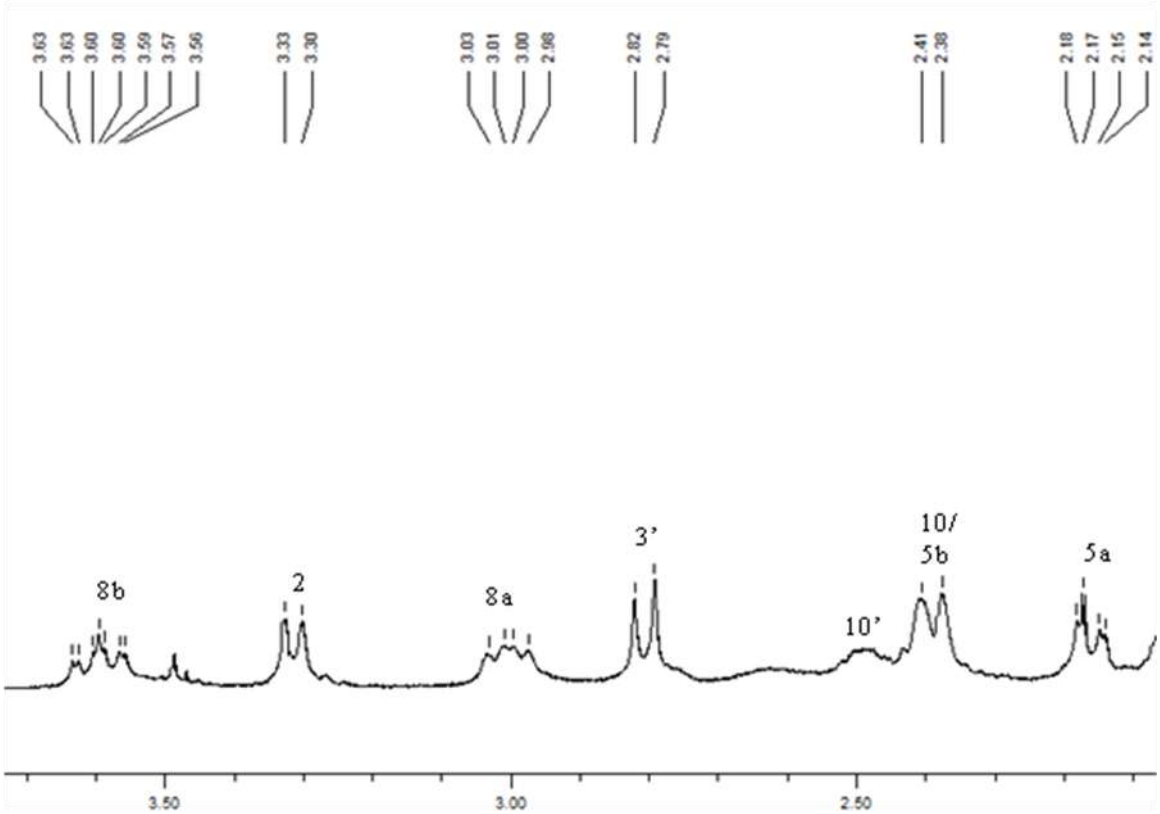
HR-ESI/MS : *m/z* 637,4464 $[M + H]^+$ (calculé pour $C_{40}H_{61}O_6$: 637,4468)

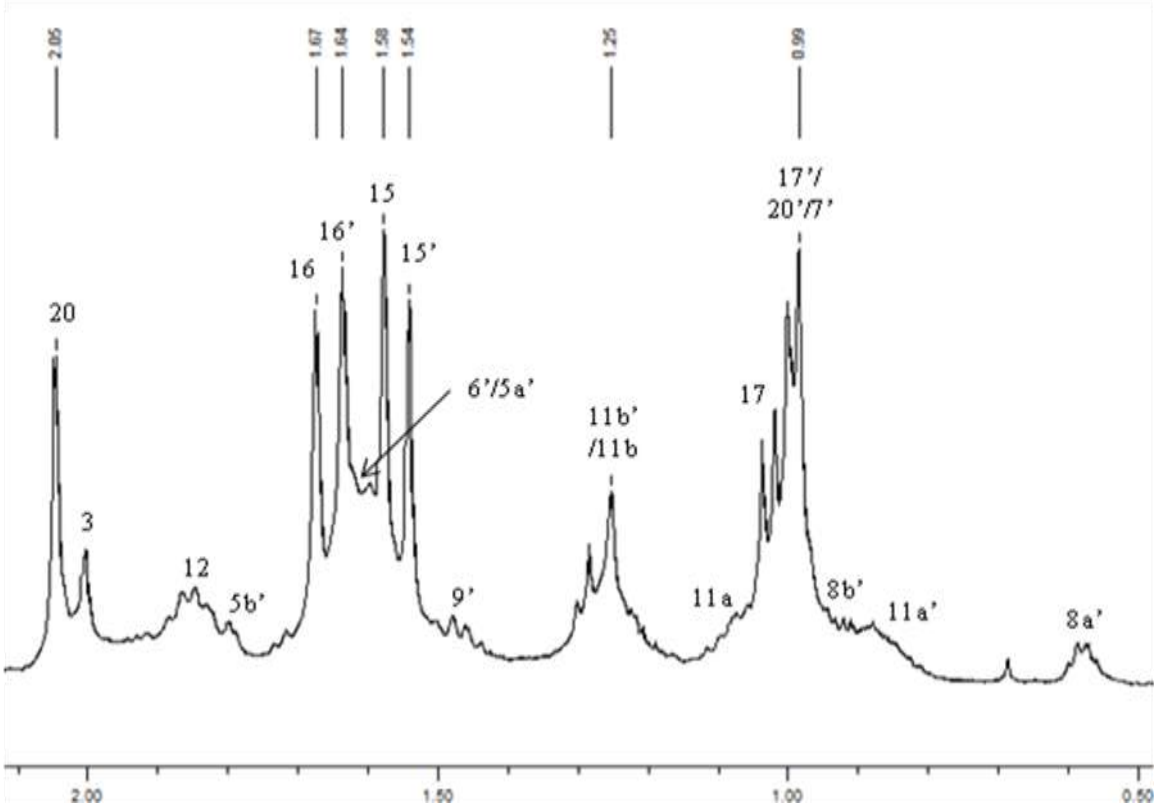
N°	^{13}C (CDCl$_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H (CDCl$_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H	NOESY ^{1}H-^{1}H
1	151,1	C				
2	41,8	CH	3,31 d (9,5)	C19, C1, C18, C3, C4, C10	H18, H19	H20, H3, H18, H8b, (H19')
3	50,4	CH	2,00 br s	C1, C2, C18, C10, C17, C11, C4		H7, H4, H2, H10, H5a, H11a, H12
4	75,1	CH	4,32 br s	C6, C2	H5a, H5b	H17, H5a, H5b, H3, H15, H11a, H11b
5	49,8	CH$_2$	a: 2,16 dd (13,0, 3,5) b: 2,39 m	C7, C6, C4	H5b, H4 H5a, H4	H5b, H7, H4, H3 H5a, H4, H20
6	138,6	C				
7	125,1	CH	5,21 d (12,0)	C20	H8b, H20, H8a	H3, H5a, H8a, (H8b)
8	29,5	CH$_2$	a: 3,00 br dd (13,0, 3,5) b: 3,60 ddd (15,0, 12,0, 3,5)	C9, C1, C6, C7	H8b, H9, (H7) H8a, H7, H9	H8b, H9, H7, H8a, H20, H2, (H9, H7)
9	159,8	CH	6,99 dd (9,0, 3,5)	C19, C2, C1	H8a, H8b, H10	H19, H8a, (H8b)
10	32,3	CH	2,39 m	C4, C5, C11, C12	H17, H9	H17, H11b, H18, H12, H3
11	38,5	CH$_2$	a: 1,08 m b: 1,24 m	C12, C6	H11b, H12 H11a, H12	H4, H3, H12, H11b H4, H10, H3, H17, H11a, H12
12	26,1	CH$_2$	1,86 m	C13, C14	H11a, H11b, H13	H17, H3, H13, H10, H11a, H11b
13	124,7	CH	5,04 m	C16, C15	H12	H16, H12
14	131,3	C				
15	17,7	CH$_3$	1,58 s	C13, C14, C16		H4
16	25,6	CH$_3$	1,67 s	C13, C14, C15		H13
17	16,5	CH$_3$	1,03 d (7,0)	C3, C10, C11	H12	H18, H4, H10, H11b, H8'a?
18	65,5	CH	4,81 d (9,5)	C2, C19'	H2, H19'	H8'a, H17, H10, H19', H2
19	197,3	CH	9,38 s	C1, C2	H2	H9
20	20,2	CH$_3$	2,05 s	C7, C6, C5, C9	H7	H2, H8b, H5b

1'	164,2	C				
2'	132,3	C				
3'	47,8	CH	2,81 d (11,5)	C18', C1', C10', C2', C4'	H10'	H4', H17/H20', H16', H9', H11'a, H10'
4'	70,6	CH	4,19 br s		H5'b, H5'a	H17'/H20', H5'a, H5'b, H3', H10'
5'	46,8	CH_2	a: 1,61 m	C6'	H5'b, H4', H20'/H7'	H5'b, H4'
			b: 1,81 m		H5'a, H4', H20'/H7'	H5'a, H4', H20', H6'?
6'	27,9	CH	1,60 m		H20', H7'	H5'b?
7'	26,5	CH	1,00 m	C6'	H9', H6'	H8'b
8'	7,3	CH_2	a: 0,58 ddd (5,0, 5,0, 5,0)		H8'b, H9'	H8'b, H18, H9', H7'/H17
			b: 0,93 m		H8'a, H9'	H8'a, H9'
9'	14,1	CH	1,48 m	C8'	H8'a, H8'b, H7'	H3', H8'b, H8'a, H17'/H20', H19'
10'	30,6	CH	2,49 m		H3', H17'	H17', H4', H3'
11'	35,7	CH_2	a: 0,86 m		H11'b, H12'	H11'b, H3', H12'
			b: 1,26 m	C11'	H11'a, H12'	H11'a
12'	24,8	CH_2	1,93 m	C13'	H11'b, H11'a	H17', H11'a
13'	124,9	CH	5,04 m	C15', C16'	H11'	
14'	131,0	C				
15'	17,6	CH_3	1,54 s	C13', C14', C16'		
16'	25,6	CH_3	1,64 s	C13', C14', C15'		H13'
17'	18,1	CH_3	0,99 d (6,5)	C3', C10', C11'	H10'	H10', H12', H4'?, H3'?, H9'?
18'	174,9	C				
19'	84,6	CH	4,45 s	C2', C1', C18'	H18	H18, H9', (H2)
20'	23,8	CH_3	0,99 d (6,5)	C7', C6', C5'	H6'	H5'b, H4'?, H3'? H9'

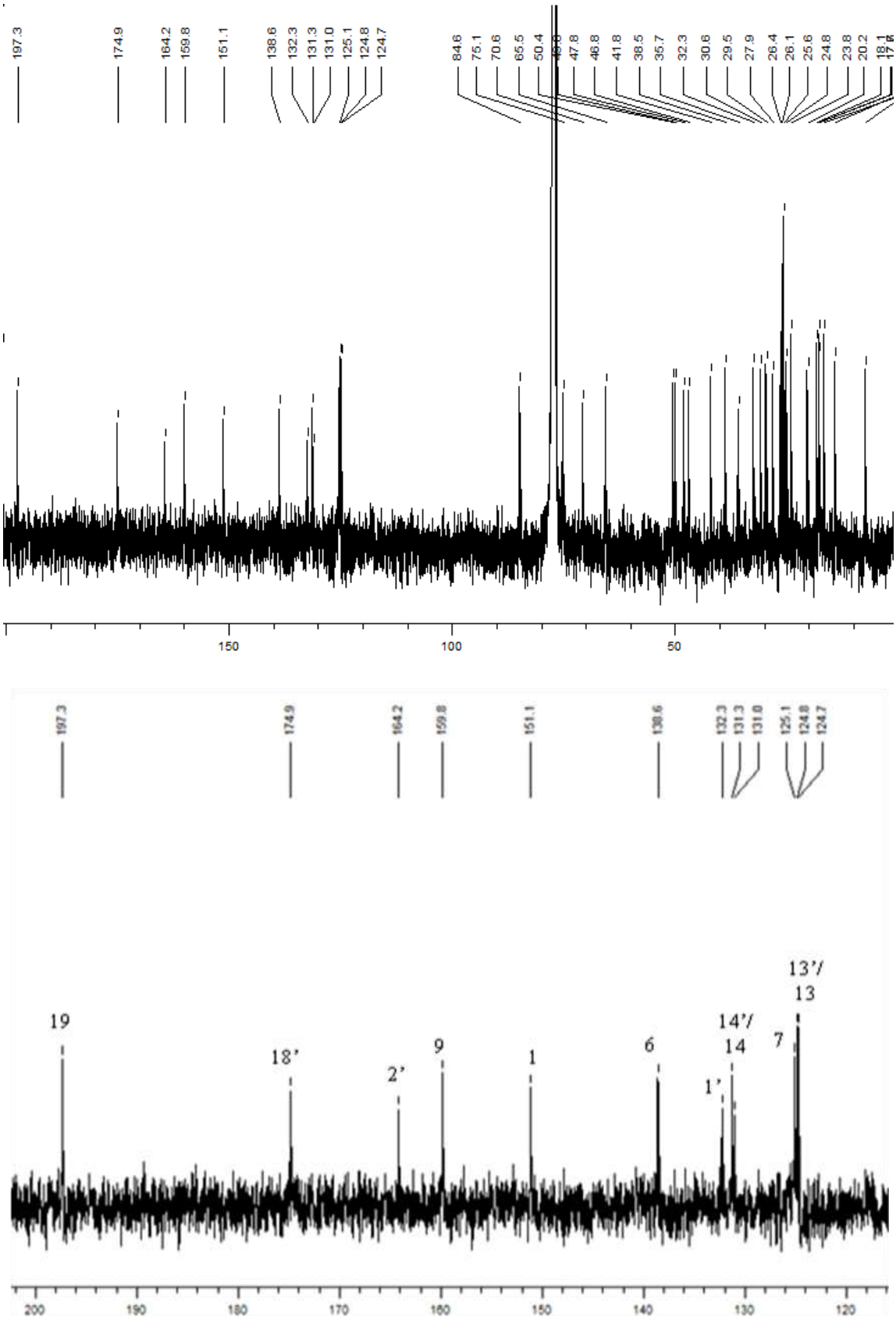


Spectres RMN ^{1}H (intégralité et détail) du composé Ds5

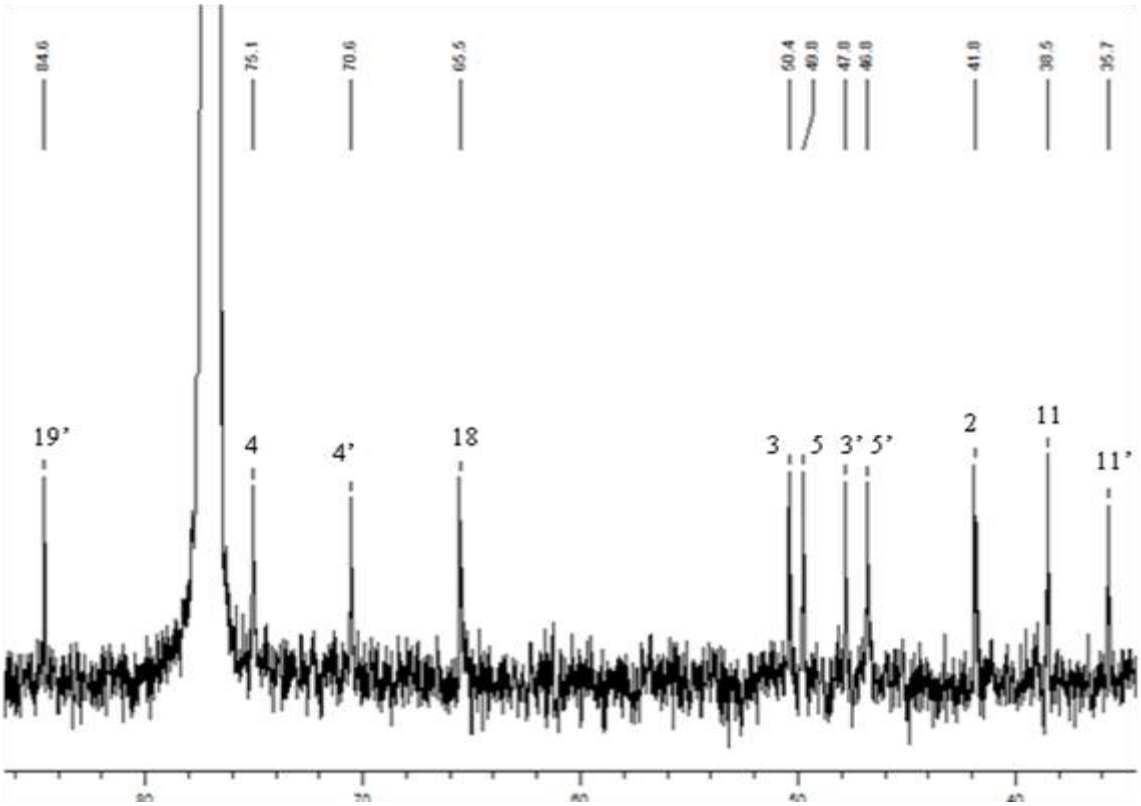


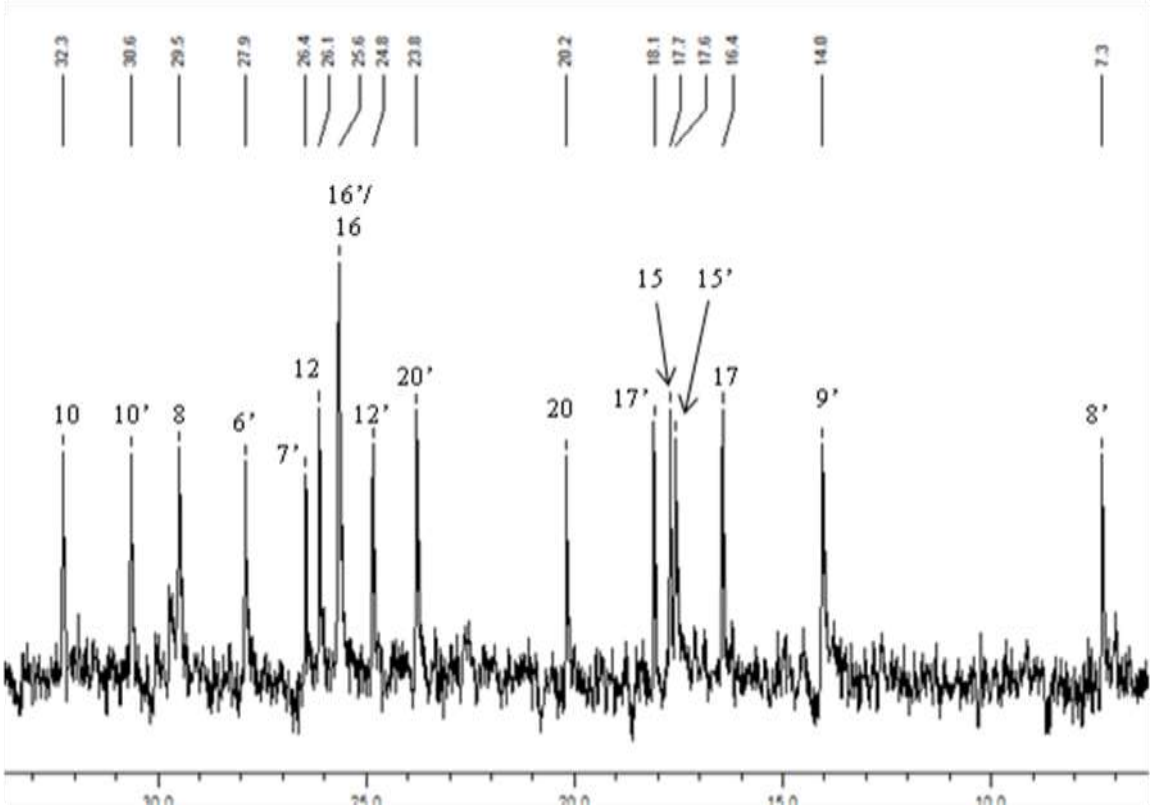


Spectres RMN ^{1}H (détails) du composé Ds5

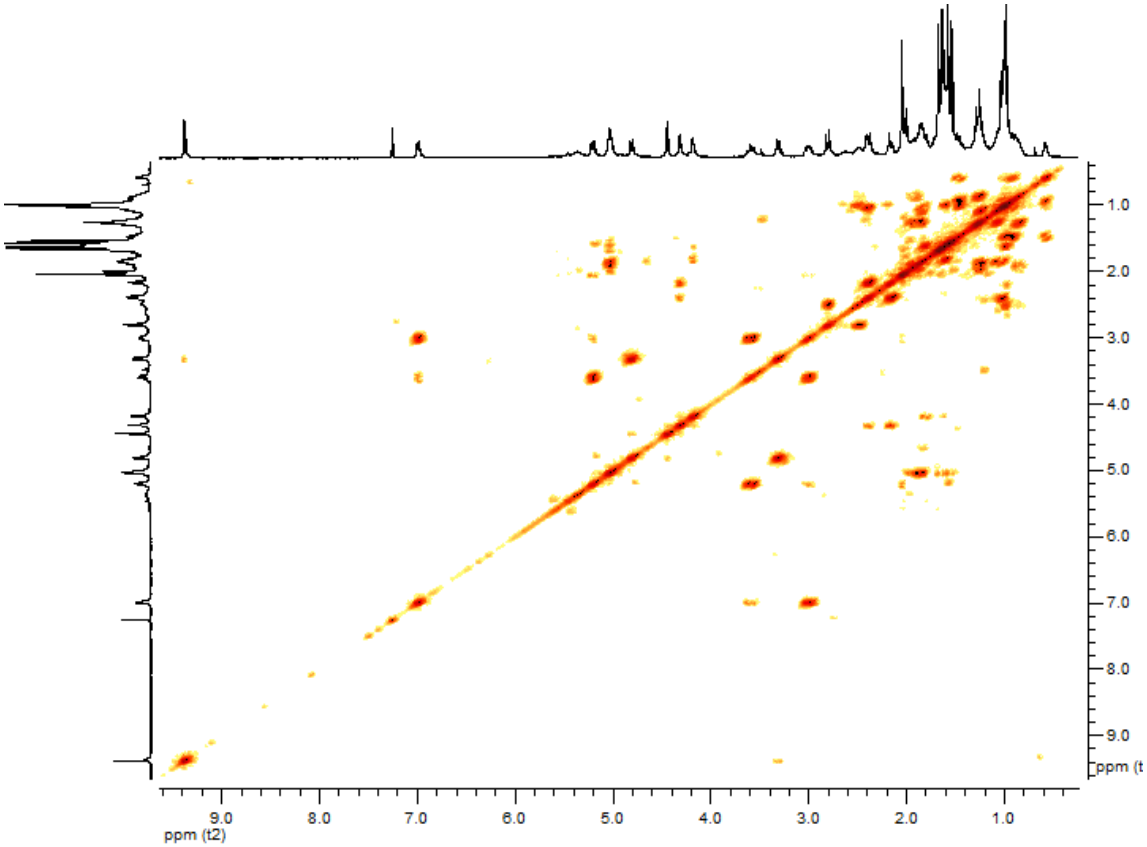


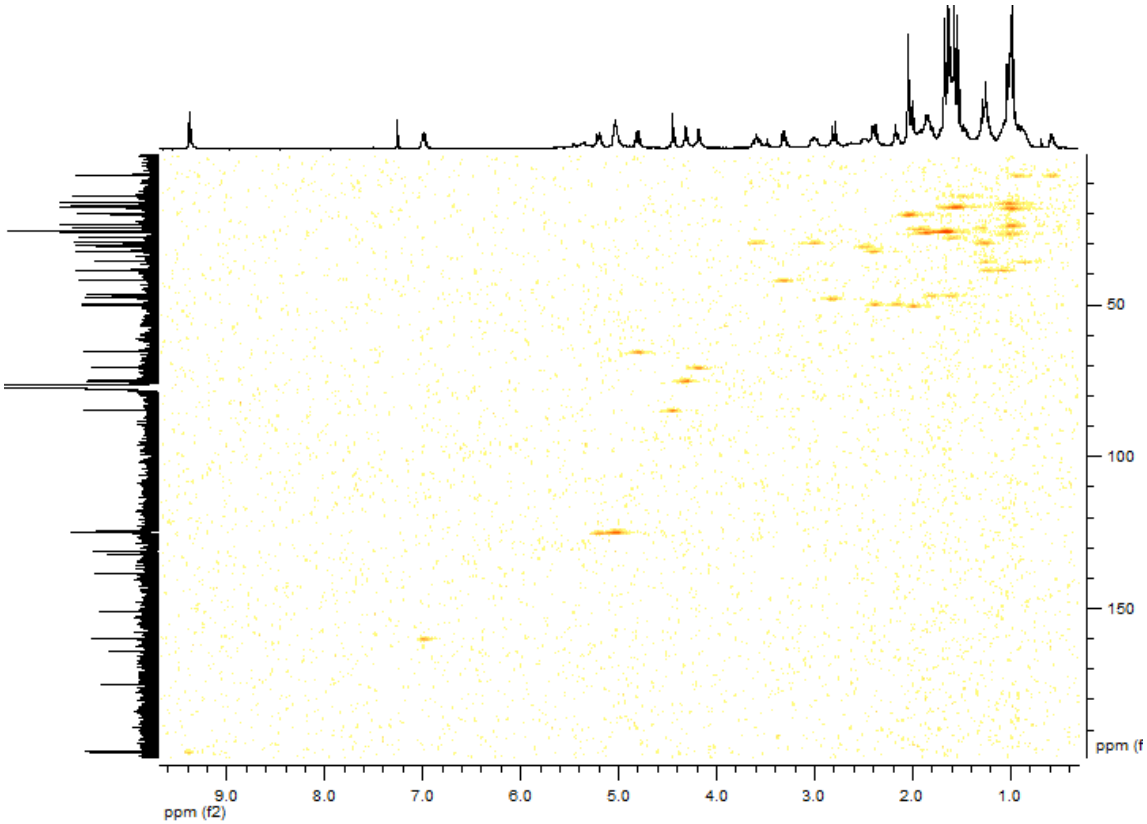
Spectres RMN ^{13}C (intégralité et détail) du composé Ds5



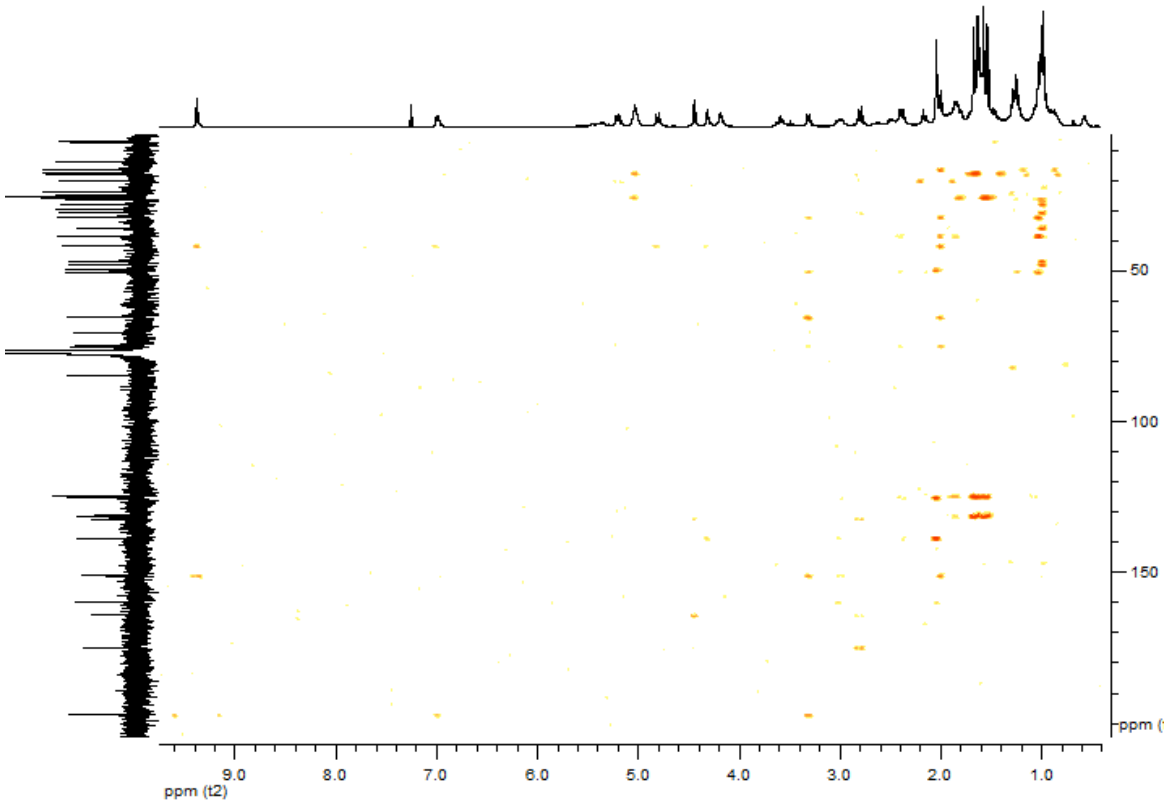


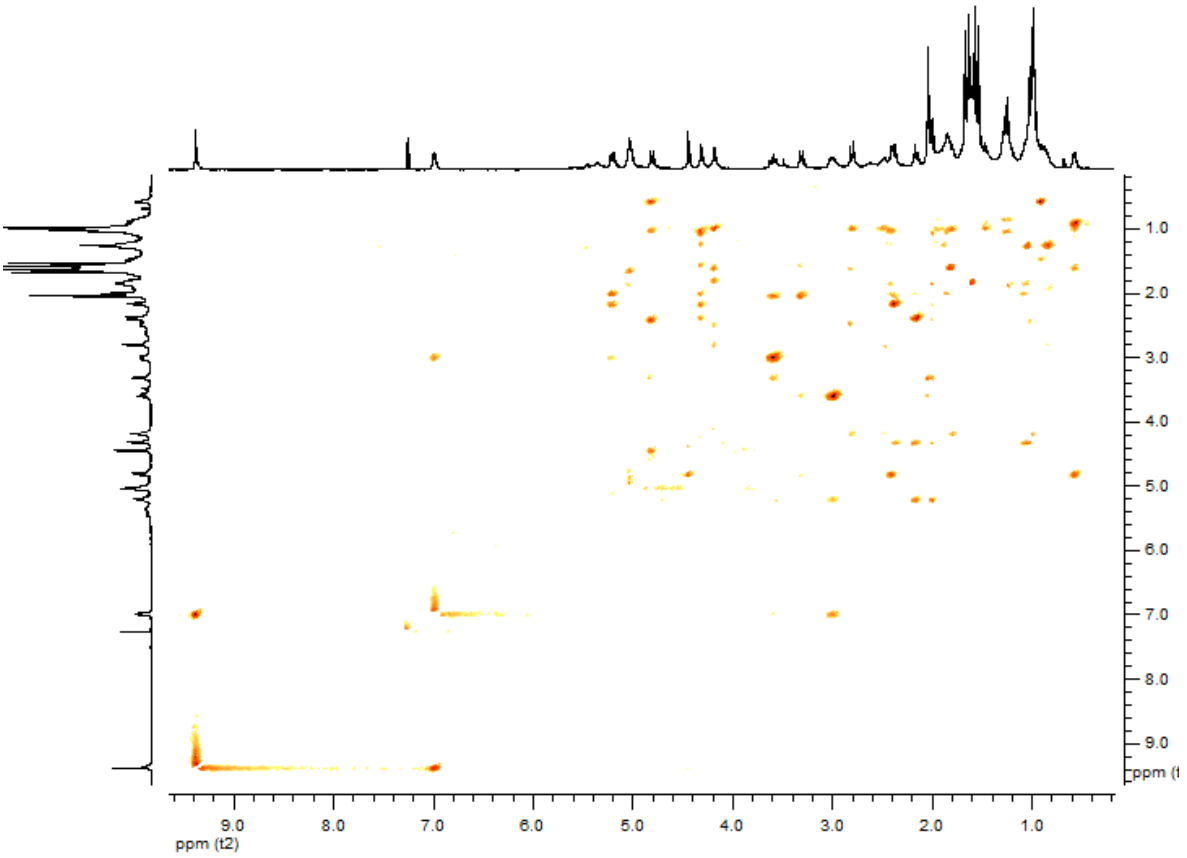
Spectres RMN du ^{13}C (détails) du composé Ds5





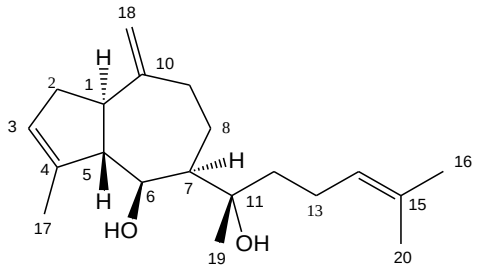
Spectres COSY ^{1}H-^{1}H et HSQC du composé Ds5





Spectres HMBC et NOESY ^{1}H-^{1}H du composé Ds5

*6. Composé **Ds6** : dictyol E*



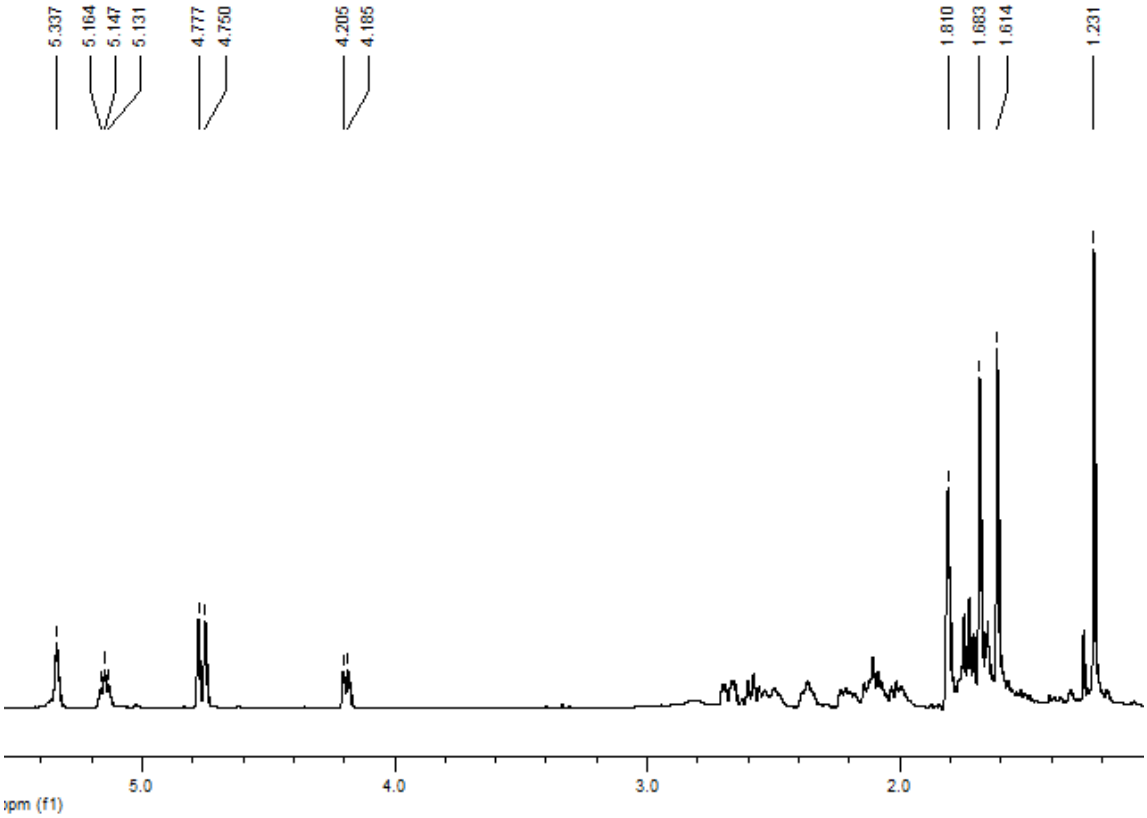
$C_{20}H_{32}O_2$ M = 304 g.mol^{-1}

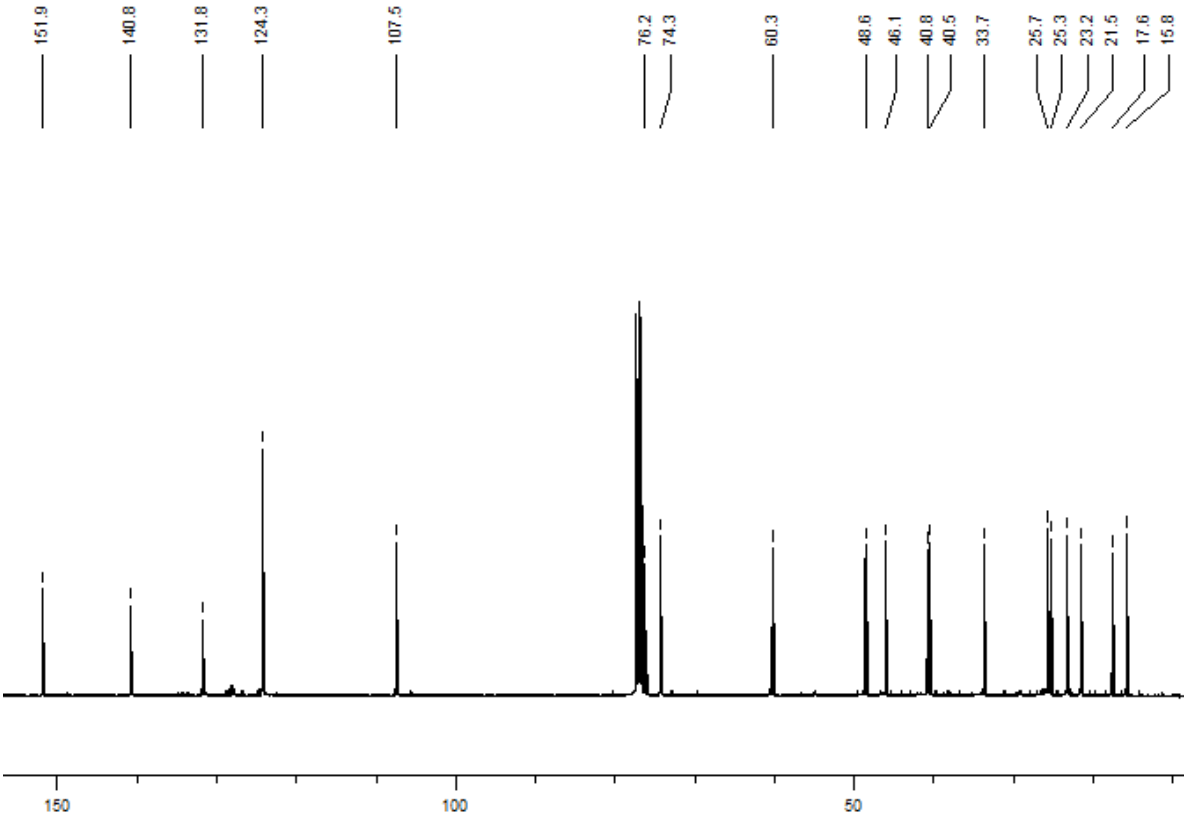
UV : pas de maxima

IR : 3365, 2963, 2924, 2858, 1447, 1375, 972, 887, 799 cm^{-1}

$[\alpha]_D^{25}$ = +28° (MeOH, c 0,1)

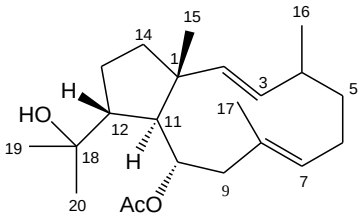
N°	^{13}C (CDCl$_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H (CDCl$_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H	NOESY ^{1}H-^{1}H
1	46,1	CH	2,58 br q (9,0)	C5	H5, H2b, H2a	H2a, H7
2	33,7	CH$_2$	a: 2,20 dd (15,0, 8,0) b: 2,50 ddq (15,0, 9,0, 2,5)		H2b, H3, H1, H17 H2a, H1, H17	H2b, H1 H2a, H18a
3	124,3	CH	5,33 s		H17, H5, H2a	H17
4	140,8	C				
5	60,3	CH	2,37 br t (8,5)		H6, H3, H1, H17	H7
6	74,3	CH	4,19 dd (8,0, 2,5)	C4, C8	H5, H7	H12
7	48,8	CH	1,65 m		H6	H18, H1, H9a, H5
8	21,5	CH$_2$	a: 1,68 m b: 1,76 m	 C8	H9b H9b	 H18, H9b
9	40,5	CH$_2$	a: 2,11 dd (14,5, 7,5) b: 2,68 ddd (14,5, 5,0, 2,5)	 C7, C1	H8b H9a, H8b, H8a	H8b, H10 H9a, H18b, H8b
10	151,9	C				
11	76,2	C				
12	40,8	CH$_2$	1,72 m	C11, C19, C13, C7	H13b, H13a	H6, H18
13	23,2	CH$_2$	a: 2,01 dd (15,0, 7,5) b: 2,10 dd (15,0, 6,0)	C14, C15, C12 C14, C15	H13b, H12, H14 H13a, H12, H14, H16	H19, H16 H19
14	124,3	CH	5,14 dd (7,0, 5,5)	C20, C16	H13a, H13b, H16, H20	H16
15	131,8	C				
16	25,7	CH$_3$	1,68 s	C14, C15, C20	H14, H13b	H14, H13a
17	15,8	CH$_3$	1,81 br s	C3, C4, C5	H3, H2b, H5, H2a	H3
18	107,5	CH$_2$	a: 4,75 br s b: 4,77 br s	C9, C1 C9, C1		H2b H9b
19	25,3	CH$_3$	1,23 s	C7, C11, C12		H8b, H7, H12, H13a, H13b
20	17,6	CH$_3$	1,61 s	C14, C15, C16	H14	





Spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé Ds6

*7. Composé **Ds7** : 10-acetoxy-18-hydroxydolabella-2,7-diène*



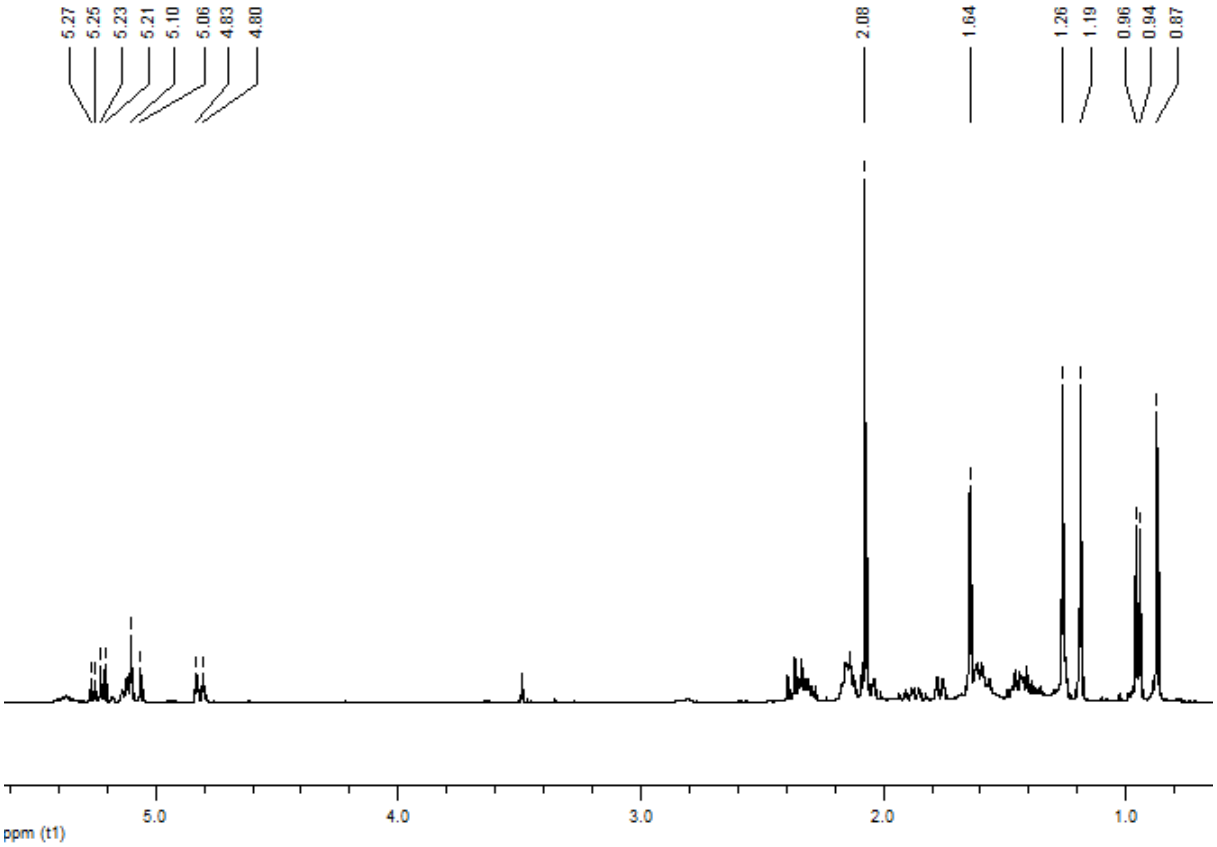
$C_{22}H_{36}O_3$ M = 348 g.mol^{-1}

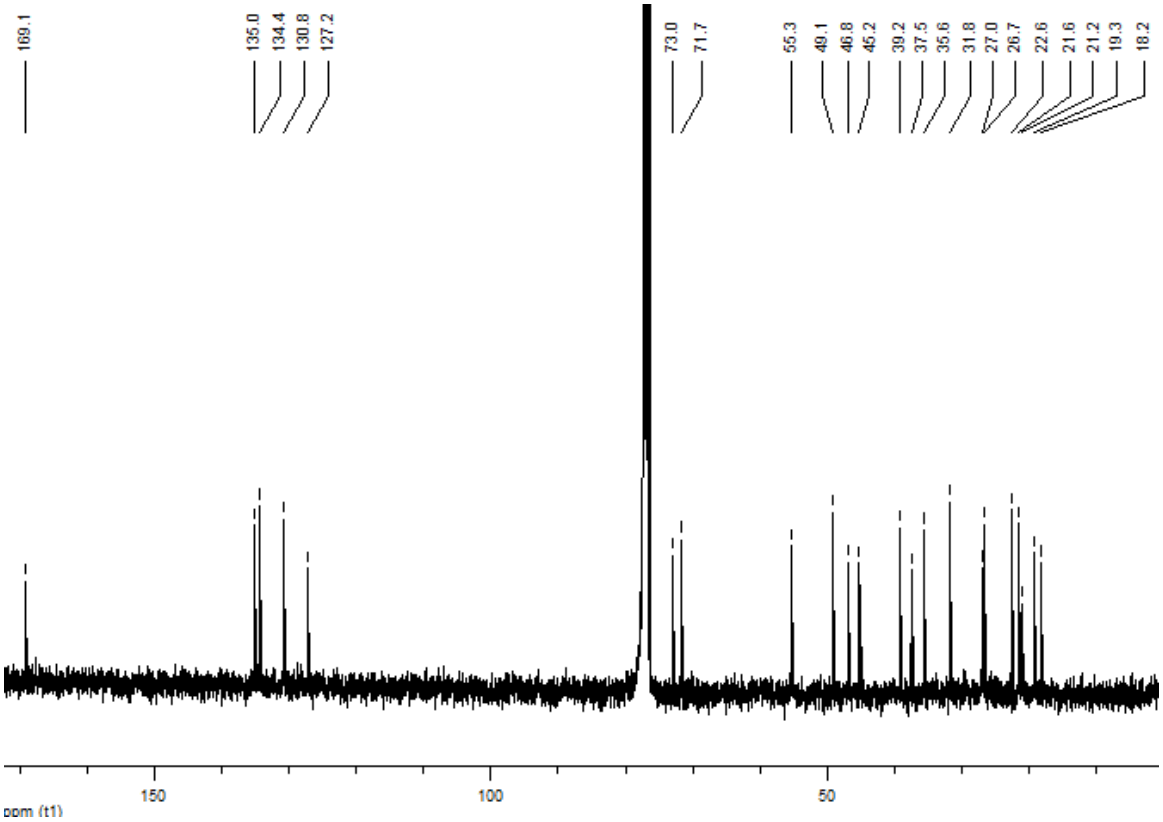
UV : λ_{max} = 206 nm (ε 3980)

IR : 2958, 2927, 2868, 1734, 1457, 1373, 1242, 1021 cm^{-1}

$[\alpha]_D^{25}$ = -8° (MeOH, c 0,1)

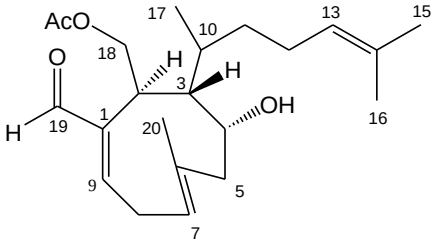
N°	^{13}C (CDCl$_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H (CDCl$_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H	NOESY ^{1}H-^{1}H
1	46,8	C				
2	134,4	CH	5,08 d (16,0)	C3, C15, C1, C14, C4, (C11)	H3	H15, H16
3	135,0	CH	5,24 dd (16,0, 7,5)	C2, C1, C16, C4, C5	H2, H4	H15, (H16)
4	37,6	CH	2,15 m	C5	H3, H16, H5ab	H5a
5	35,7	CH$_2$	a : 1,45 m b : 1,65 m		H4, H6 H4, H6	H5b, H4 H5a, H6
6	27,0	CH$_2$	2,15 m	C7, C8, C5, C4	H17, H7, H5ab	H5b, H7, H17
7	130,8	CH	5,12 br t (7,5)		H6, H17, H9a	H6, (H9b)
8	127,2	C				
9	45,2	CH$_2$	a:2,06 m b:2,36 t (12,0)	C7, C8, C17, C10, C11	H9b, H7, H10, H17 H9a, H10	H9b, H10 H9a, (H11, H7)
10	71,7	CH	4,82 dt (11,0, 2,5)	C11	H9b, H9a, H11	H15, H9b, H9a
11	55,3	CH	1,77 dd (10,0, 2,5)	C15, C12	H10, H12, (H15)	H19, (H9b)
12	49,1	CH	2,32 td (11,0, 4,5)	C13, C19, C20, C11, C18, C10	H11, H13a, H13b	H15
13	26,7	CH$_2$	a:1,39 m b:1,88 m	C18	H13b, H12 H13a, H12, H14b	H13b H13a, H15
14	39,2	CH$_2$	a:1,44 m b:1,61 m	C11, C12, C1, C13, C15	H14b H14a, H15, H13b	H14b, H15 H14a
15	19,3	CH$_3$	0,87 s	C2, C14, C11, C1	H14b, (H11)	H10, H3, H2, H13b, H12, H14a
16	21,2	CH$_3$	0,95 d (7,0)	C3, C4, C5	H4	H2, (H3)
17	18,2	CH$_3$	1,64 s	C7, C8, C9	H6, H7, H9a	H6
18	73,0	C				
19	22,6	CH$_3$	1,19 s	C18, C12, C20		H11
20	31,8	CH$_3$	1,26 s	C18, C12, C19		
21	169,1	C				
22	21,6	CH$_3$	2,08 s	C21, C10		





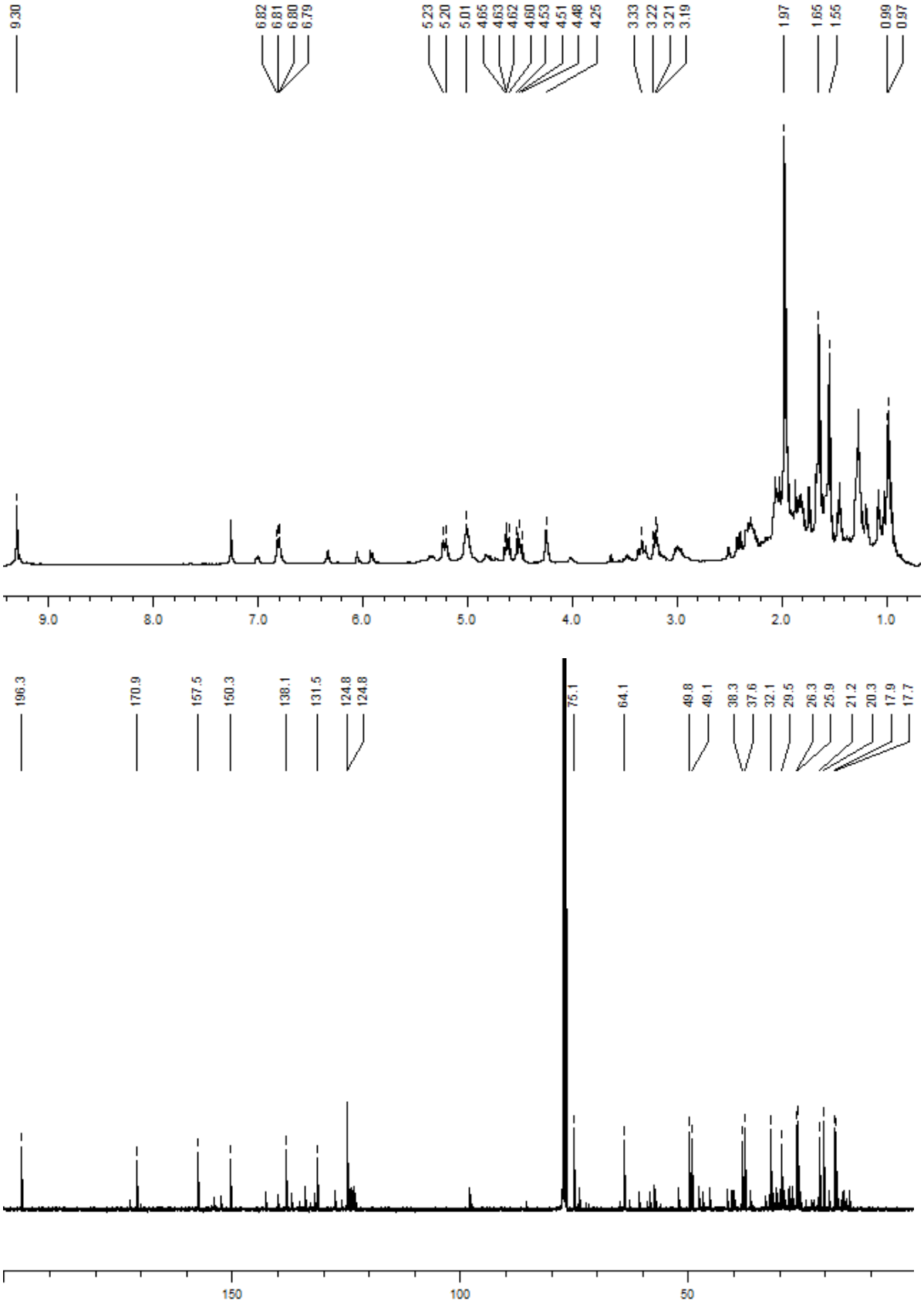
Spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé Ds7

*8. Composé **Ds8** : hydroxyacetyldictyolal*



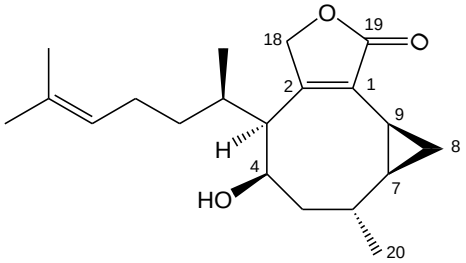
$C_{22}H_{34}O_4$ M = 362 g.mol^{-1}

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H	NOESY ^{1}H-^{1}H
1	150,3	C				
2	37,6	CH	3,21 t (7,5)	C18, C10, C3, C4, C1, C9, C20	H18a, H18b, H19	H20/H22
3	49,8	CH	1,95 m	C11, C2, C17, C10, C1, C18	H10	H7, H4
4	75,1	CH	4,25 s	C6, C2, C10	H5a, H5b	H17, H5a, H11a, H3, H5b, H11b
5	49,1	CH_2	a: 2,07 m b: 2,41 d (12,5)	C6, C7, C4, C20 C6, C7, C4, C3, C20	H5b, H4 H5a, H4	H4, H7 H4, H20/H22
6	138,2	C				
7	124,8	CH	5,22 d (11,5)	C20, C7, C8	H9b, H20, H9a	H3, H5a, H8a, H8b
8	29,5	CH_2	a: 2,99 br dd (15,0, 8,5) b: 3,33 ddd (15,0, 12,0, 3,0)	C1, C9, C8, C7, C2 C1, C9, C8, C7, C2, C3, C20	H8b, H9, H20 H8a, H9	H8a, H9, H7 H8a, H20/H22, H7, H18a, H18b
9	157,5	CH	6,81 dd (8,3, 3,0)	C19, C8, C7, C1	H8a, H8b	H19, H8a
10	32,1	CH	2,30 m	C4, C3, C11, C17, C2, C12	H17, H13, H3	H18a, H18b, H20/H22
11	38,3	CH_2	a: 1,07 m b: 1,20 m	C13, C3, C10, C17, C12 C13, C3, C10, C17, C12	H11b, H12 H11a, H12	H4 H4
12	26,3	CH_2	1,85 m	C14, C13, C11, C10	H13, H11b, H11a	H13
13	124,8	CH	5,01 t (6,5)	C15, C16, C12, C11	H12, H15, H16, H10	H16, H12
14	131,5	C				
15	17,9	CH_3	1,55 s	C16, C14, C13, C12	H13	
16	25,9	CH_3	1,65 s	C15, C14, C13	H13	H13
17	17,7	CH_3	0,98 d (7,0)	C11, C3, C10	H10	H4, H18b, H18a
18	64,1	CH_2	a: 4,51 dd (10,5, 9,0) b: 4,63 dd (10,5, 7,0)	C21, C2, C3, C1 C21, C1, C3, C2	H2 H2	H18b, H10, H8b, H17 H18a, H17, H10, H8b
19	196,3	CH	9,30 br s	C1, C2, C9	H2	H9
20	20,3	CH_3	1,98 s	C6, C7, C5, C4, C9	H8a	(H2, H8b, H5b, H10)?
21	170,9	C				
22	21,3	CH_3	1,98 s	C21		(H2, H8b, H5b, H10)?



Spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé Ds8

*9. Composé **Ds9** : hydroxycrénulide*



$C_{20}H_{32}O_3$ M = 320 g.mol^{-1}

UV : λ_{max} = 230 nm (ε 2250)

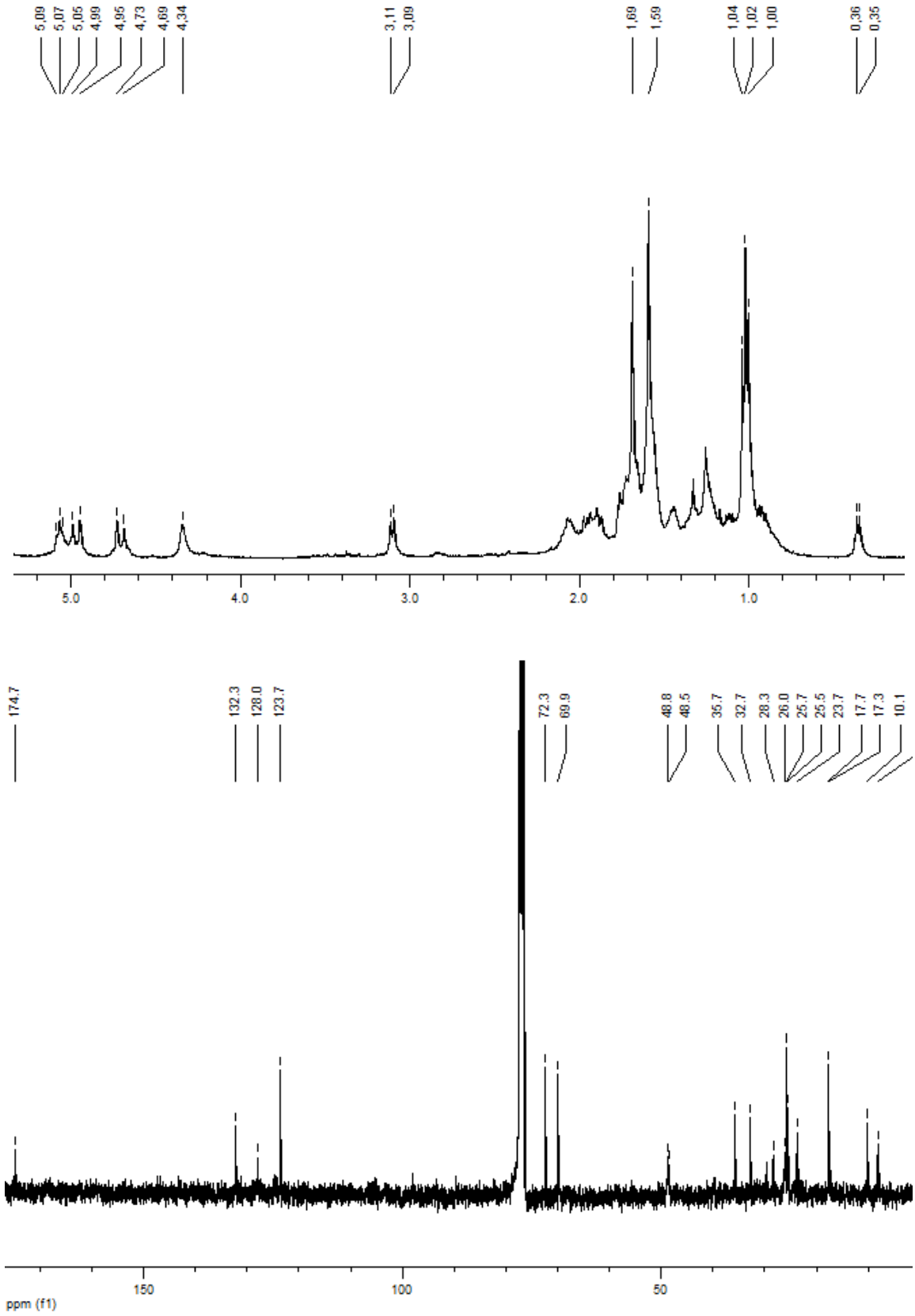
IR : 3459, 2962, 2924, 2871, 1734, 1451, 1027 cm^{-1}

$[\alpha]_D^{25}$ = 0° (MeOH, c 0,1)

HR-ESI/MS : *m/z* 319,22699 $[M + H]^+$ (calculé pour $C_{20}H_{33}O_3Na$: 319,22732)

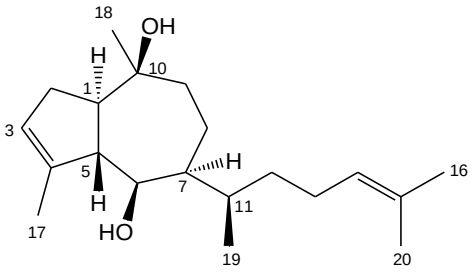
N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H
1	128,0	C			
2	[a]	C			
3	48,8	CH	3,10 d (8,0)		H10, H18b
4	69,9	CH	4,34 br s		H5a, H5b
5	48,5	CH_2	a: 1,76 m b: 1,90 m	C9, C6	H5b H5a, H6
6	28,3	CH	1,23 m		H20, H5b
7	26,0	CH	0,92 m		H8a, H8b, H9
8	8,1	CH_2	a: 0,35 dd (10,5, 5,0) b: 1,00 m	C1, C6, C9	H8b, H9, H7 H8a, H7, H9
9	10,1	CH	1,45 m		H8a, H7, H18a, H18b, H8b
10	32,7	CH	1,72 m		H3, H17
11	35,7	CH_2	a: 1,11 b: 1,34 m		H11b, H12b, H12a H11a, H12b, H12a
12	25,7	CH_2	a: 1,95 m b: 2,07 m		H12b, H13, H11a, H11b, H16, H15 H12a, H13, H11a, H11b, H16
13	123,7	CH	5,07 t (7,0)		H15, H16, H12a, H12b
14	132,3	C			
15	17,7	CH_3	1,59 s	C13, C14, C16	H13, H12a, H12b
16	25,5	CH_3	1,69 s	C13, C14, C15	H13
17	17,3	CH_3	1,03 d (7,0)	C3, C10, C11	H10
18	72,3	CH_2	a: 4,71 dd (9,0, 3,0) b: 4,97 dd (9,0, 1,5)		H18b, H9 H18a, H9, H3
19	174,8	C			
20	23,7	CH_3	1,01 d (7,0)	C5, C6, C7	H6

[a] : ce signal quaternaire, d'intensité trop faible, n'a pas été détecté



Spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé Ds9

*10. Composé **Ds10** : dictyol C*



$C_{20}H_{34}O_2$ M = 306 g.mol^{-1}

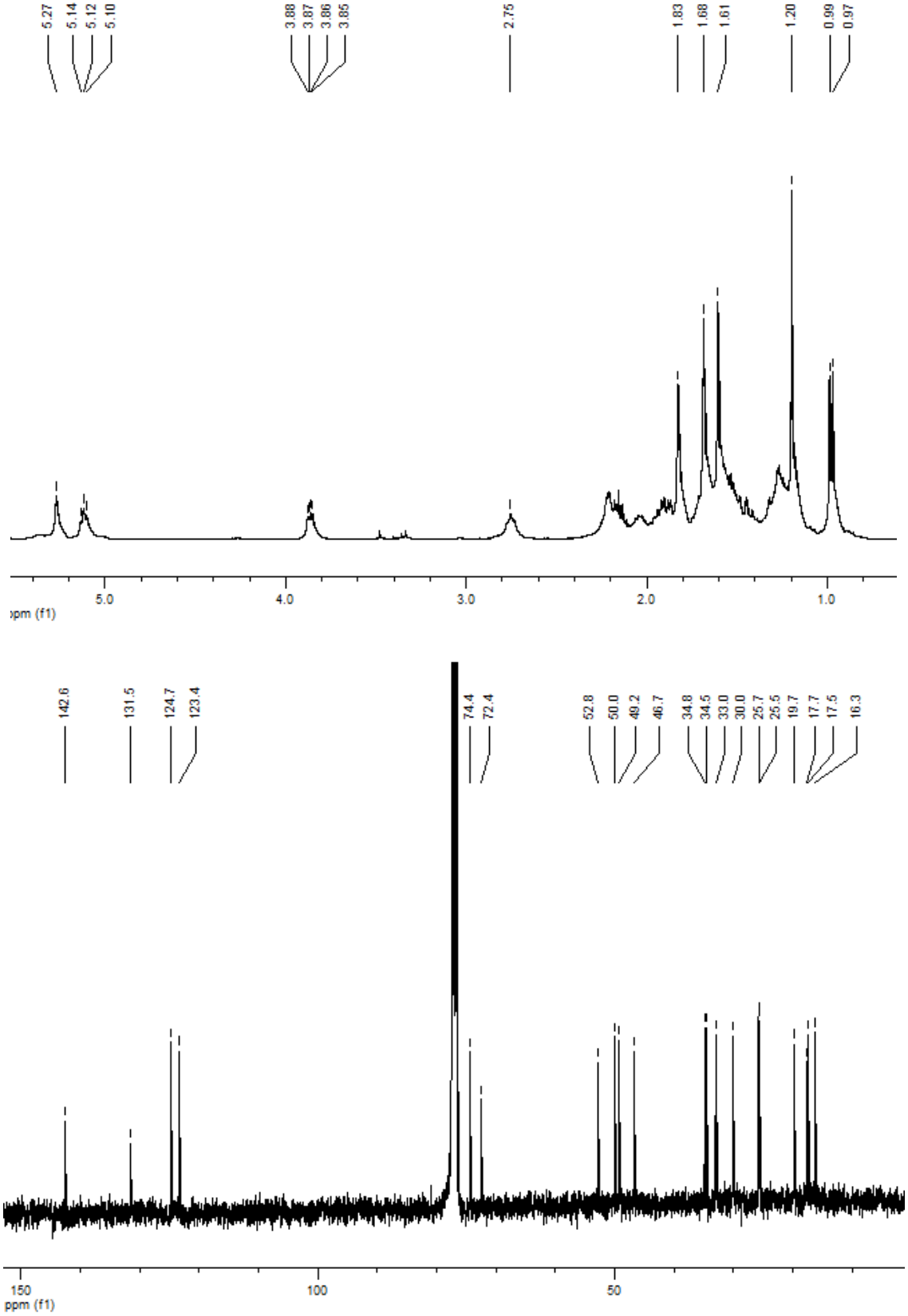
UV : pas de maxima

IR : 3420, 2964, 2916, 1448, 1376, 1112, 905 cm^{-1}

$[\alpha]_D^{25}$ = + 2° (MeOH, c 0,1)

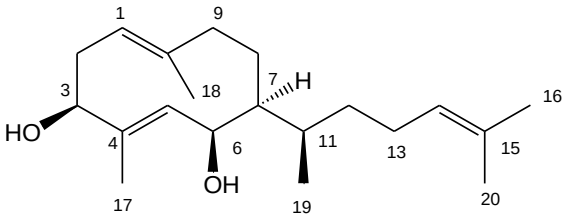
HR-ESI/MS : *m/z* 319,22699 $[M + H]^+$ (calculé pour $C_{20}H_{35}O_2$: 319,22732)

N°	^{13}C (CDCl$_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H (CDCl$_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H
1	50,0	CH	2,16 m	C2, C5, C6	H5, H2
2	33,0	CH_2	2,22 m		H3, H1, H17
3	123,4	CH	5,27 br s		H17, H5, H2
4	142,6	C			
5	52,8	CH	2,76 br t (8,0)		H6, H17, H1, H3
6	74,4	CH	3,86 dd (8,0, 3,5)		H5, H7
7	49,2	CH	1,27 m		H6
8	19,7	CH_2	a: 1,26 m b: 1,69 m	 C9	H8b, H9b, H9a H8a, H9a
9	46,7	CH_2	a: 1,45 m b: 1,89 ddd (14,5, 5,5, 1,5)	C8 C10, C8, C1	H9b, H8b, H8a H9a, H8a
10	72,4	C			
11	34,5	CH	1,54 m	C8	H19, H13b, H13a, H12
12	34,8	CH_2	1,17 m	C11, C13, C14, C16, C20	H13b, H13a, H11
13	25,5	CH_2	a: 1,94 m b: 2,05 m		H13b, H14, H11, H12 H13a, H14, H11, H12
14	124,8	CH	5,12 br t (7,0)		H20, H16, H13a, H13b
15	131,5	C			
16	25,7	CH_3	1,69 s	C14, C15, C20	H14
17	16,3	CH_3	1,82 br s	C3, C4, C5	H3, H5, H2
18	30,0	CH_3	1,20 s	C1, C5, C8, C9, C10	
19	17,5	CH_3	0,98 d (6,5)	C11, C12	H11
20	17,7	CH_3	1,61 s	C14, C15, C16	H14



Spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé Ds10

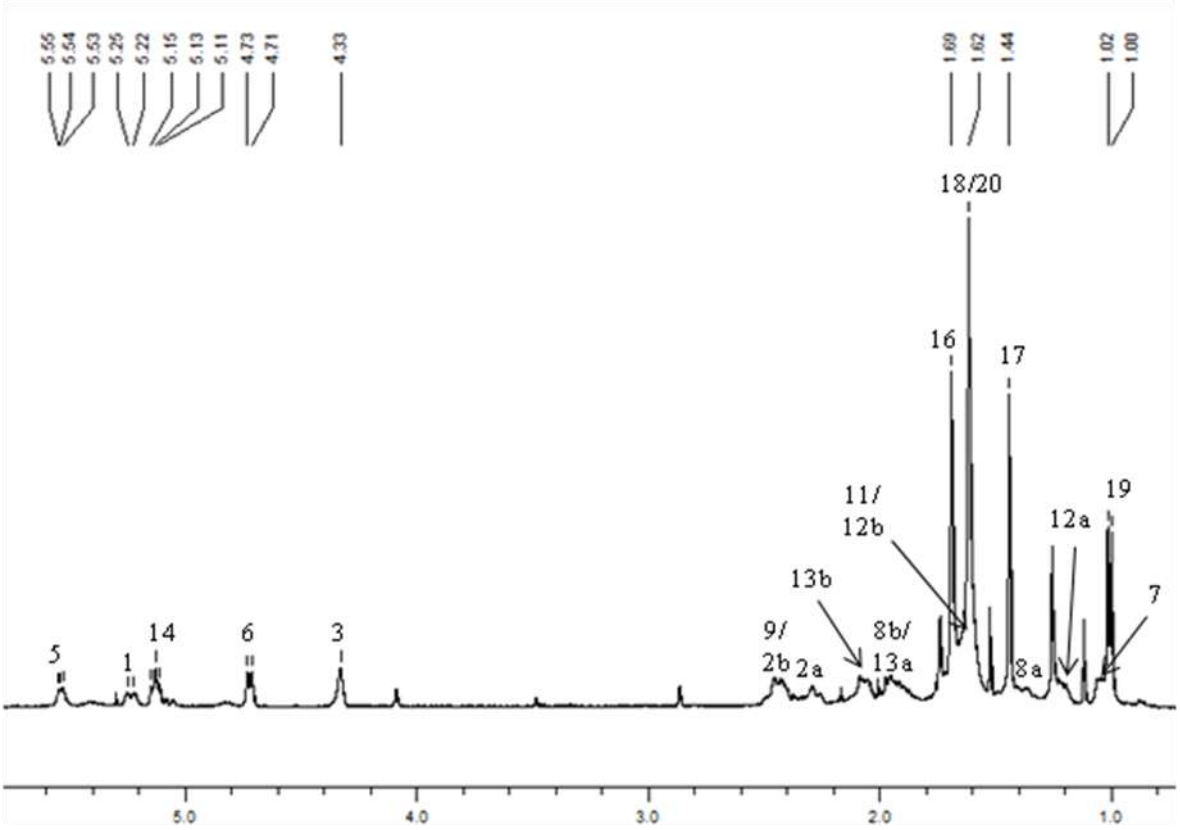
*11. Composé **Ds11** : 3-hydroxydilophol*

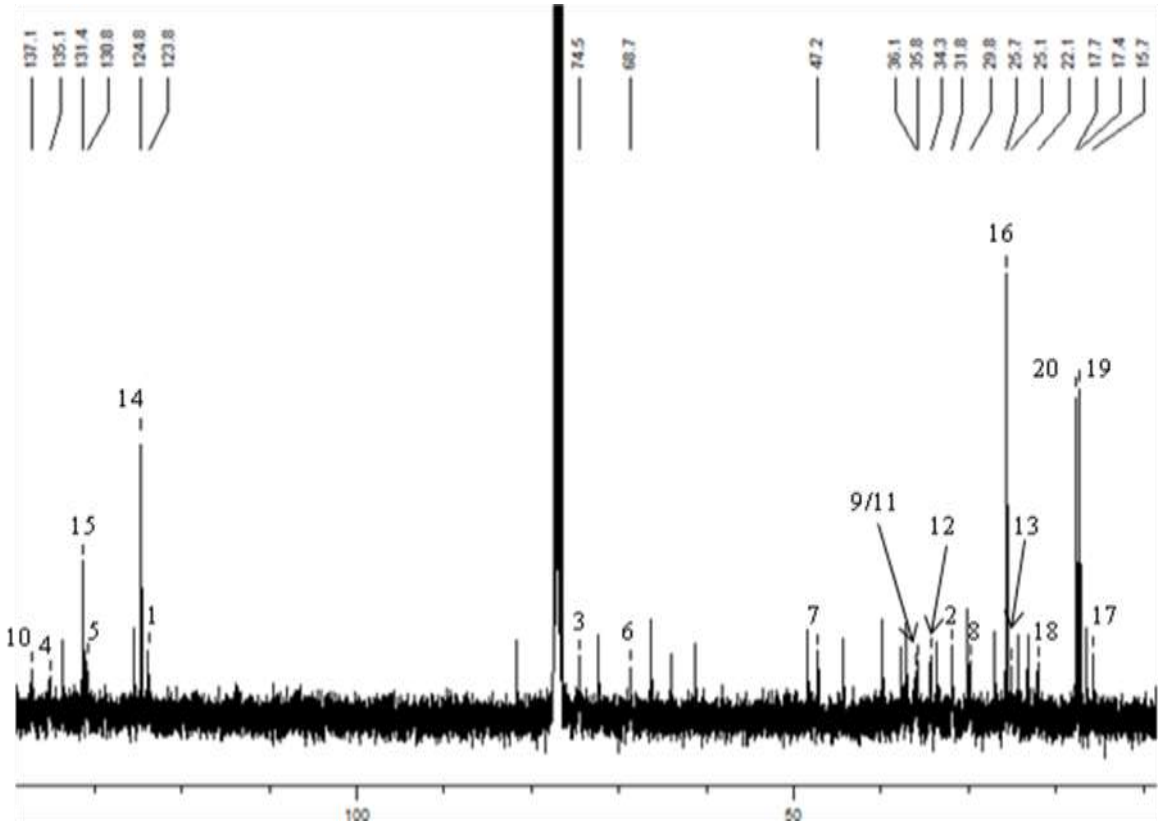


$C_{20}H_{34}O_2$ M = 306 g.mol^{-1}

Mélange avec le composé **Ds3**

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H
1	123,8	CH	5,23 d (11,0)		H9, H2b, H2a, H18
2	31,8	CH_2	a: 2,30 m b: 2,45 m		H2b, H1, H3 H2a, H3, H1
3	74,5	CH	4,33 s	C2	H2b, H2a, H17
4	135,1	C			
5	130,8	CH	5,54 d (6,5)		H6, H17
6	68,7	CH	4,72 d (6,5)	C8	H5, H17, H7
7	47,2	CH	1,06 m		H6, H8a
8	29,9	CH_2	a: 1,39 m b: 1,92 m		H8b, H7 H8a
9	35,8	CH_2	2,44 m		H1
10	137,1	C			
11	36,1	CH	1,62 m		H19
12	34,3	CH_2	a: 1,24 m b: 1,63 m		H12b, H13b, H13a H12a, H19
13	25,1	CH_2	a: 1,96 m b: 2,08 m		H13b, H14, H12a H13a, H14, H12a
14	124,8	CH	5,13 t (7,0)		H13a, H13b, H16, H20
15	131,4	C			
16	25,8	CH_3	1,69 s	C14, C15, C20	H14
17	15,7	CH_3	1,44 s	C3, C4, C5	H5, H6, H3
18	22,1	CH_3	1,62 s		H1
19	17,4	CH_3	1,01 d (6,5)	C7, C11, C12	H11, H12b
20	17,7	CH_3	1,62 s	C14, C15, C16	H14

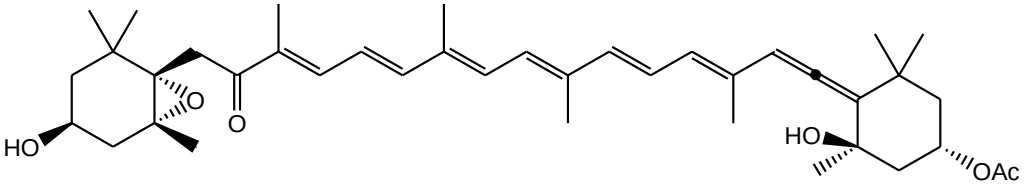


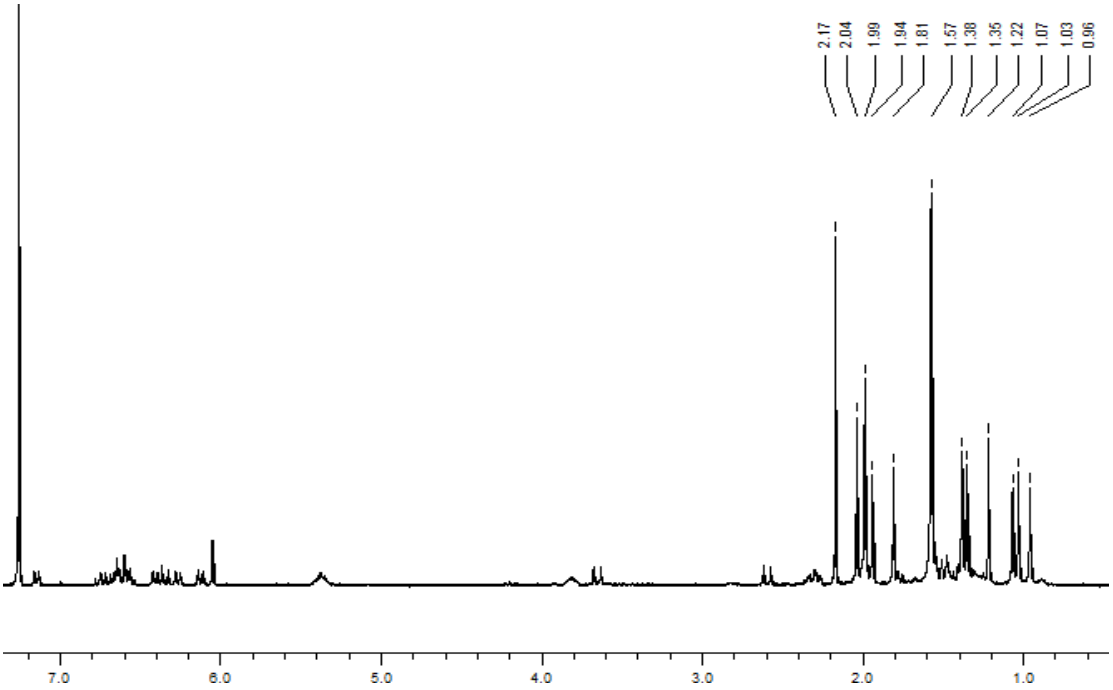


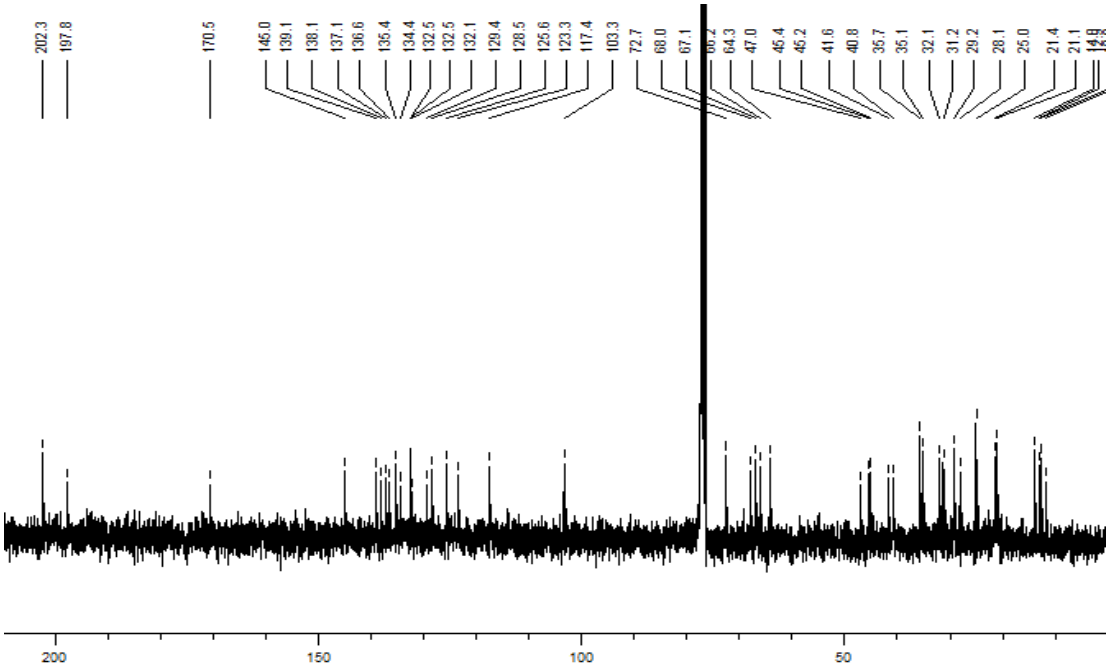
Spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du mélange Ds11/Ds3

*12. Composé **Ds12** : fucoxanthine*

$C_{42}H_{60}O_6$ M = 660 g.mol^{-1}







Spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé Ds12

Annexe C : Dictyota dichotoma

Matériel végétal sec (290 g)

↓ $CHCl_3$/MeOH (1/1 ; v/v ; 3 × 750 mL)

Extrait organique (26 g ; R = 9%)

↓ Fractionnement de 11,0 g d'extrait par colonne chromatographique (Si60)

Gradient de polarité croissante

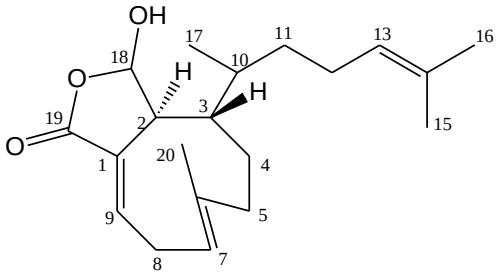
Eluant	Hexane / AcOEt											AcOEt	AcOEt / MeOH	MeOH
Composition	90:10	80:20	70:30	60:40			50:50	40:60	30:70		20:80	100		100
N° fractions	1 & 2	3 & 4	5 & 6	7 & 8	9	10	11-13	14-16	17	18 & 19	20-22	23-25	26-39	40-42
Masse (mg)	369	114	126	339	176	216	472	621	161	332	473	508	1 797	2 336

Dd1
1,3 mg

Dd2	**Dd3**
3,1 mg	2,1 mg

Dd4
1,3 mg

1. Composé ***Dd1***



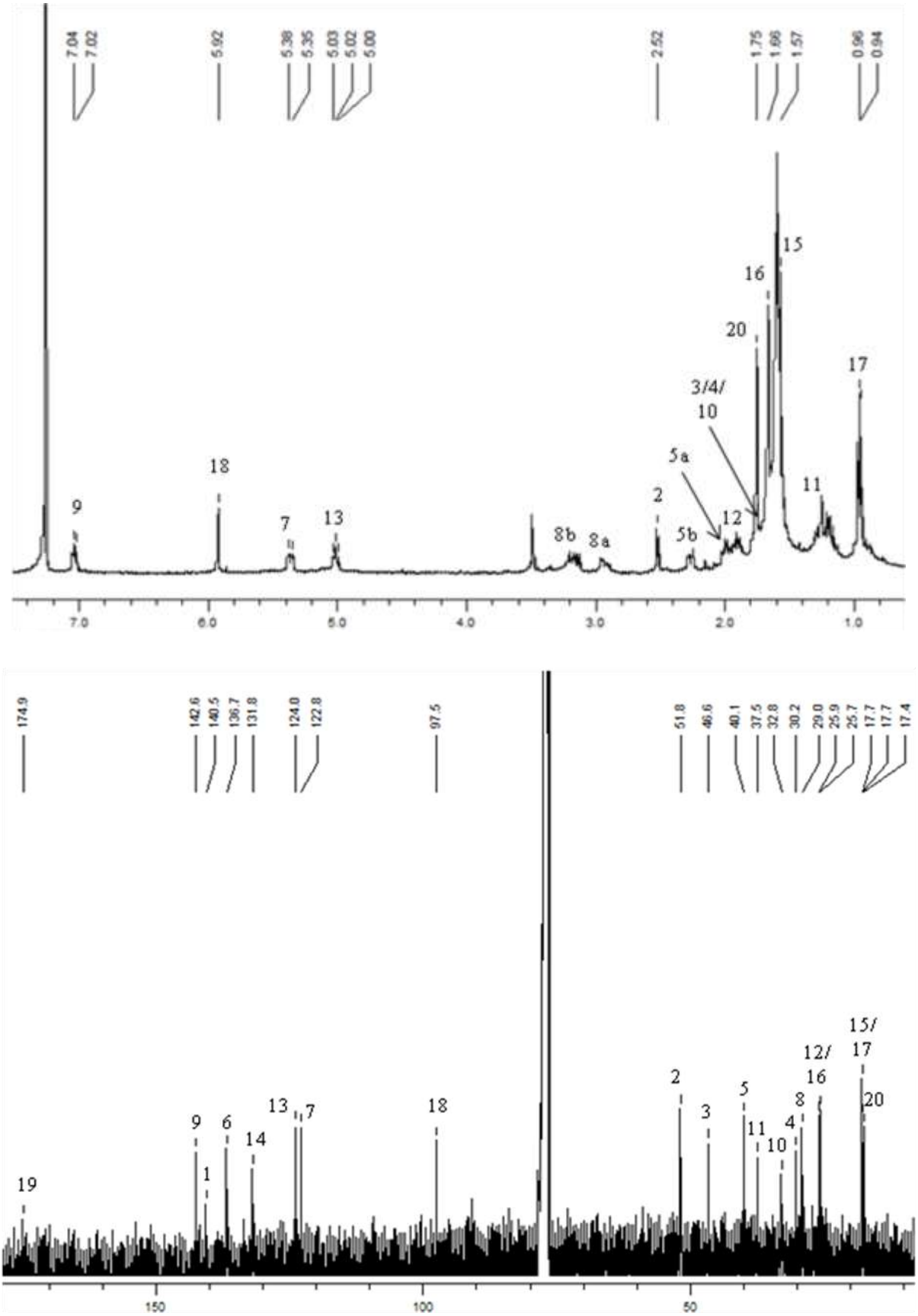
$C_{20}H_{30}O_3$ M = 318 g.mol^{-1}

UV : pas de maxima

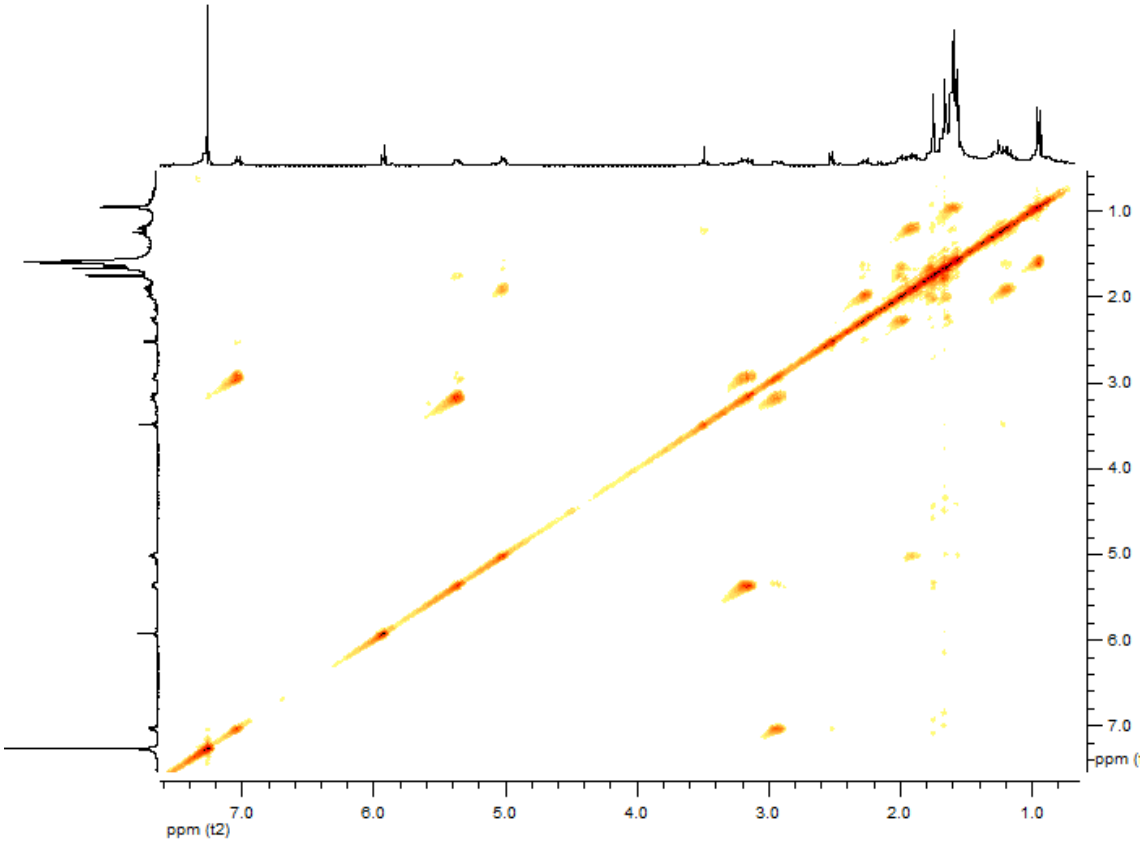
$[\alpha]_D^{25}$ = -22° (MeOH, c 0,1)

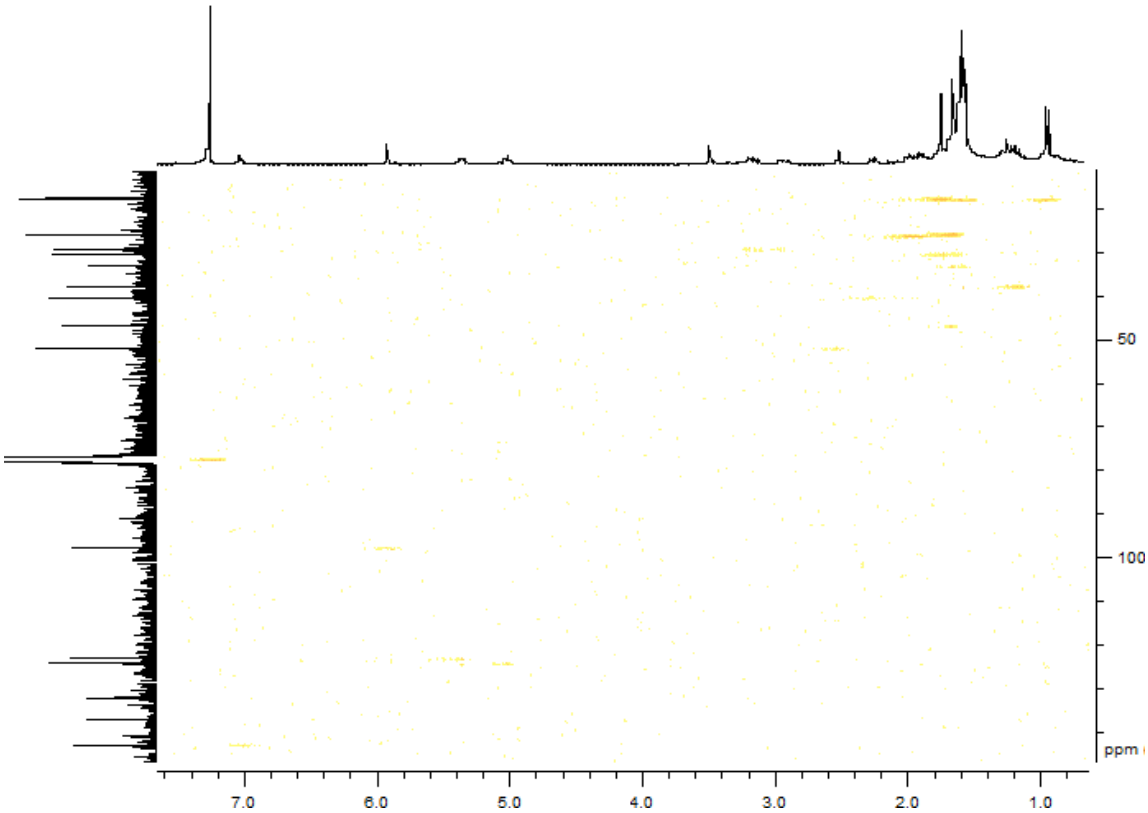
ESI/MS : *m/z* 341,3 $[M + Na]^+$

N°	^{13}C (CDCl$_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H (CDCl$_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H	NOESY ^{1}H-^{1}H
1	140,5	C				
2	51,8	CH	2,52 s		H9, H8b	H20, H3/H4a?
3	46,6	CH	1,68 m			H2?, H7?
4	30,2	CH_2	a: 1,66 m b: 1,76 m		H4b, H5b, H5a H4a, H5b, H5a	H2?, H7?
5	40,1	CH_2	a: 1,97 m b: 2,27 br d (11,5)		H5b, H4a, H4b H5a, H4a, H20, H4b	H5b, H7 H5a, H20
6	136,7	C				
7	122,8	CH	5,36 dd (11,5, 3,5)		H8b, H20, H8a	H3/H4a?, H5a, (H8b)
8	29,0	CH_2	a: 2,93 ddd (17,5, 7,5, 4,5) b: 3,16 dddd (17,5, 11,5, 2,0, 2,0)		H8b, H9, H7 H8a, H7, H9, H2	H8b, (H9) H8a, (H7)
9	142,6	CH	7,03 dt (7,5, 2,0)		H8a, H8b, H2	(H8a)
10	32,8	CH	1,61 m		H17, H11	
11	37,5	CH_2	1,21 m		H12, H10	
12	25,9	CH_2	1,91 m		H11, H13	
13	124,0	CH	5,02 br t (7,0)		H12, H15, H16	
14	131,8	C				
15	17,7	CH_3	1,57 s	C13, C14, C16	H13	H18
16	25,7	CH_3	1,66 s	C13, C14, C15	H13	
17	17,7	CH_3	0,95 d (6,5)	C10, C3, C11	H10	H18
18	97,5	CH	5,92 s			H17, H15?
19	174,9	C				
20	17,4	CH_3	1,75 s	C5, C6, C7	H7, H5b	H2, H5b

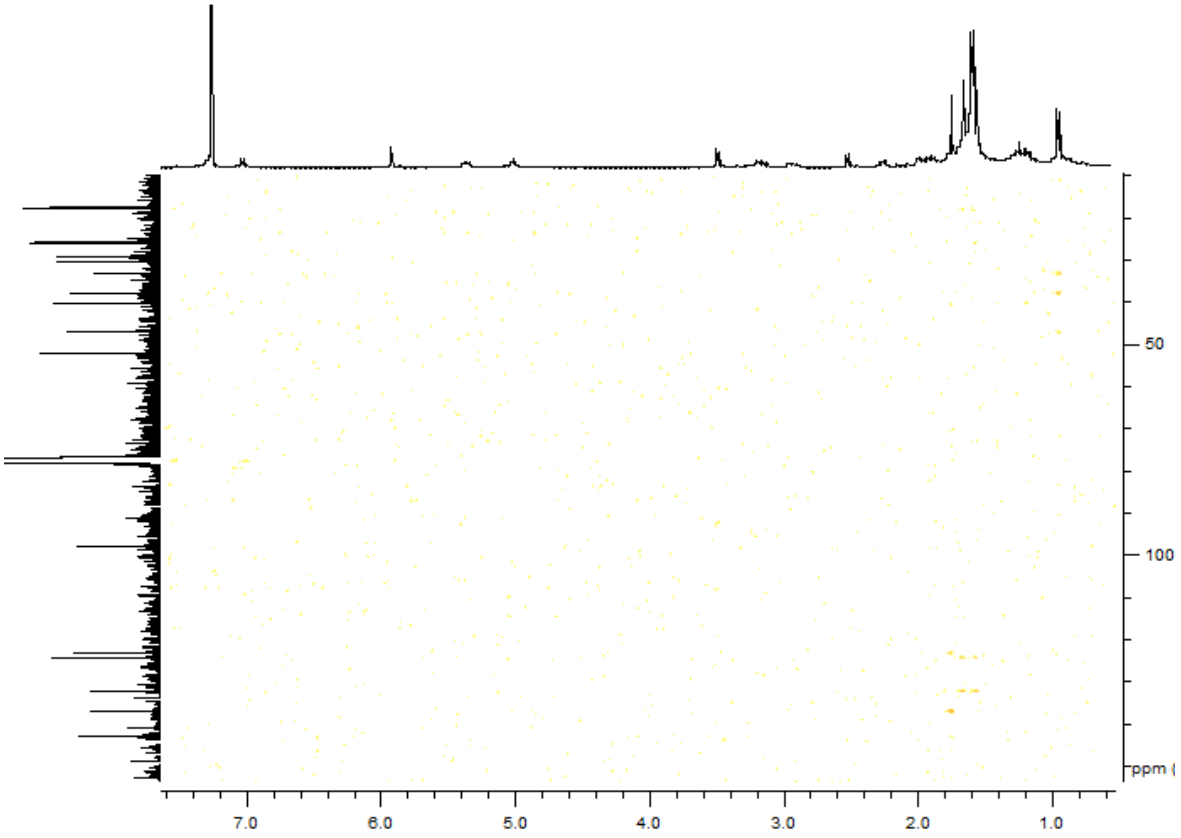


Spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé Dd1



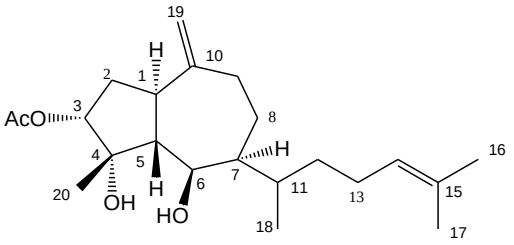


Spectres COSY ^{1}H-^{1}H et HSQC du composé Dd1



Spectre HMBC du composé Dd1

2. Composé ***Dd2***

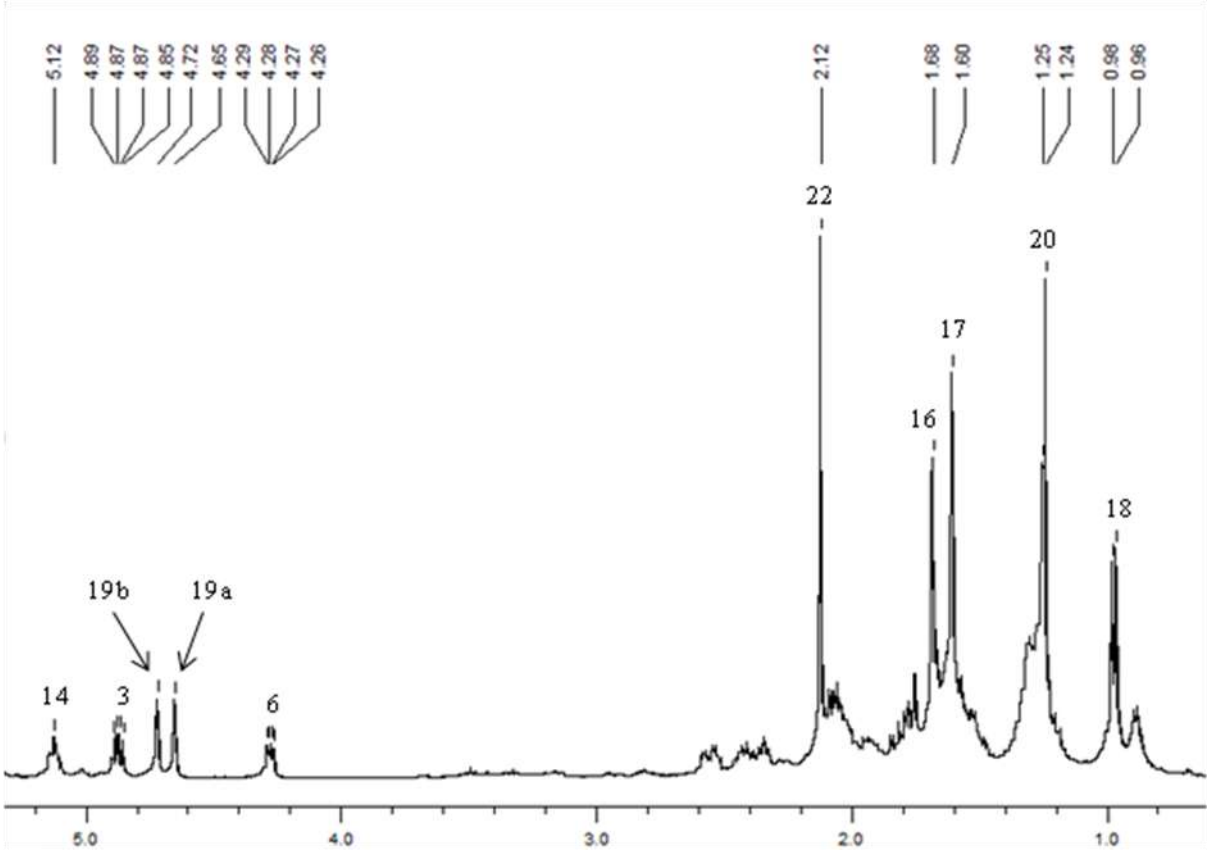


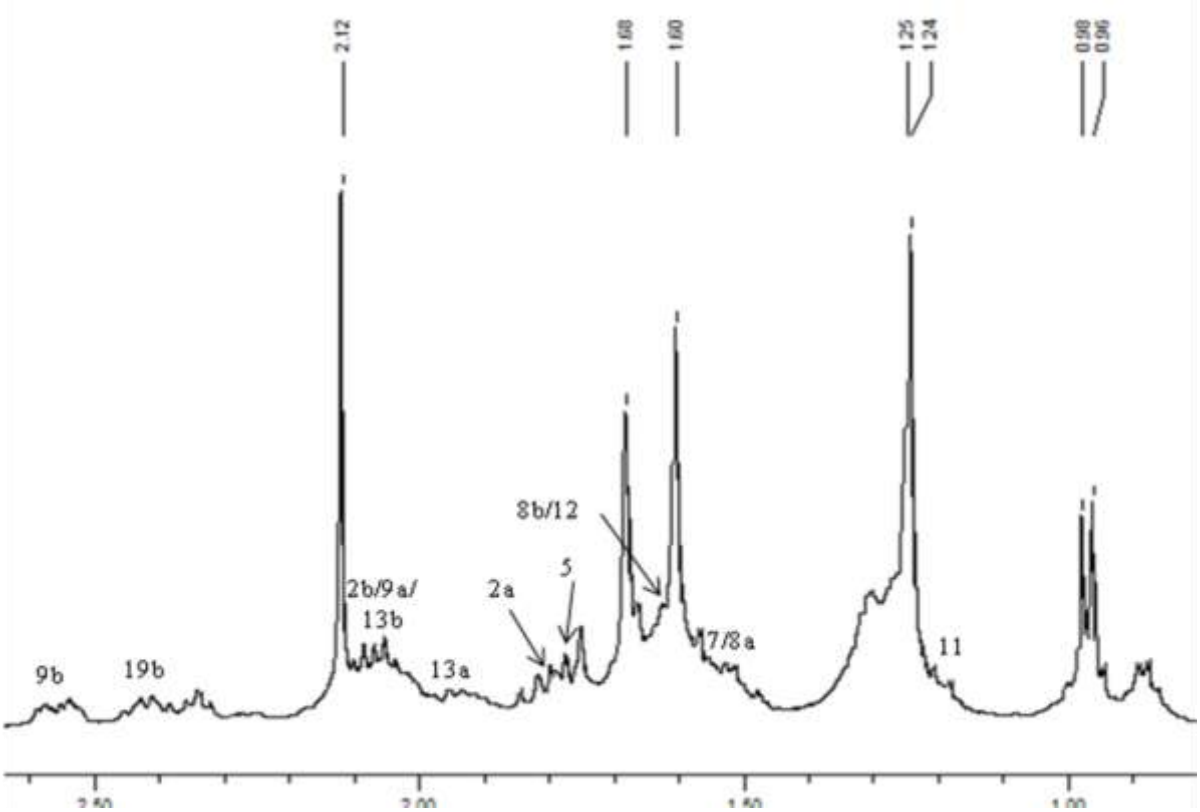
$C_{22}H_{36}O_4$ M = 364 g.mol^{-1}

UV : pas de maxima

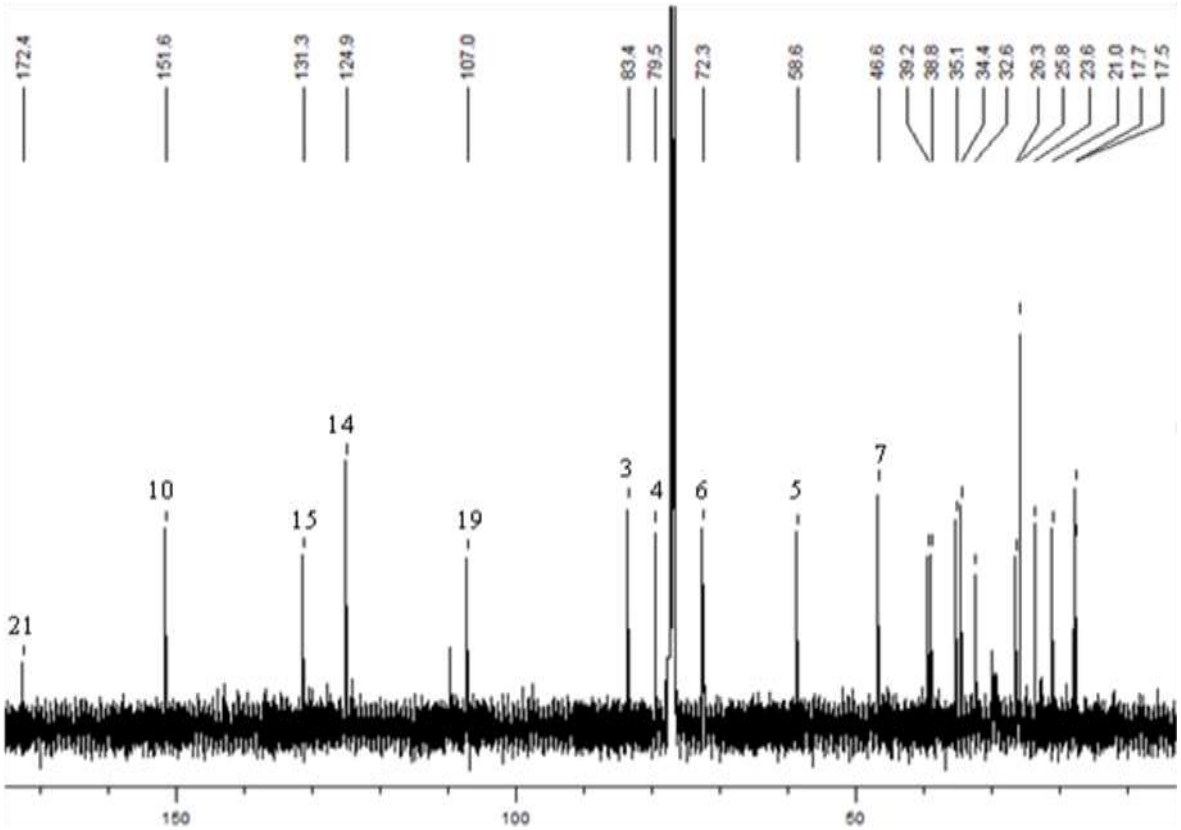
$[\alpha]_D^{25}$ = +3° (MeOH, c 0,1)

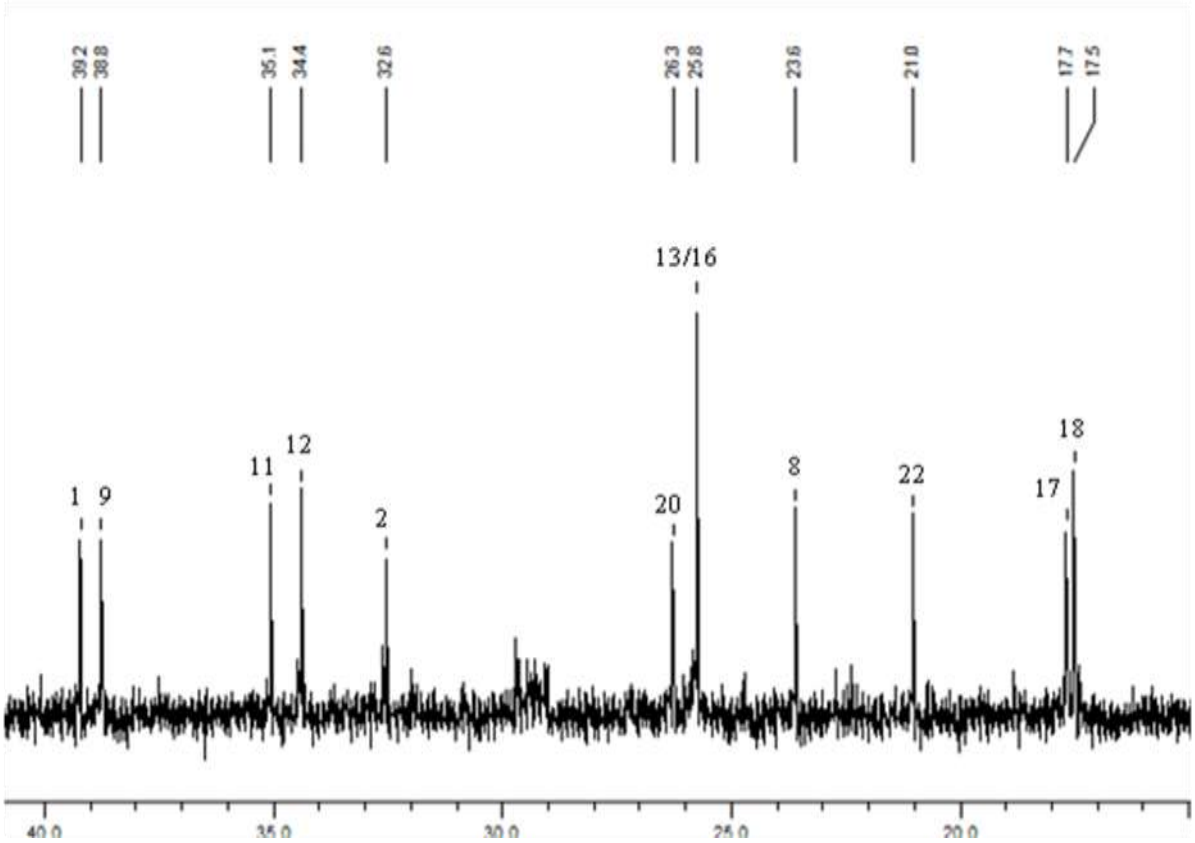
N°	^{13}C (CDCl$_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H (CDCl$_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H	NOESY ^{1}H-^{1}H
1	39,2	CH	2,41 td (10,5, 7,0)	C6, C10, C2, C5	H2b, H5, H2a	H22
2	32,5	CH$_2$	a: 1,81 m b: 2,08 m	C3 C3, C4, C5, C1	H2b, H3, H1 H2a, H1, H3	H2b, H19a H2a, H3
3	83,4	CH	4,87 dd (10,0, 6,0)	C4, C2, C20, C21	H2a, H2b, H5	H2b, H5, H22
4	79,5	C				
5	58,6	CH	1,78 dd (10,5, 9,0)	C1, C6, C20, C10, C3, C4	H3, H1, H6	H3, H20
6	72,3	CH	4,28 dd (9,0, 4,0)	C5, C8, C4	H5, H7	H7
7	46,6	CH	1,53 m	C12	H6	H6
8	23,6	CH$_2$	a: 1,52 m b: 1,62 m	C10, C6, C9	H8b, H9b, H9a H8a, H9a	
9	38,8	CH$_2$	a: 2,09 m b: 2,56 ddd (14,5, 5,5, 3,5)	 C8, C10	H9b, H8b, H8a, H19a, H19b H9a, H8a	H9b H9a, H19b
10	151,6	C				
11	35,1	CH	1,23 m	C13	H12	
12	34,4	CH$_2$	1,62 m		H18, H11	
13	25,7	CH$_2$	a: 1,92 m b: 2,04 m	C14, C15, C11	H13b, H14 H13a, H14	
14	124,9	CH	5,12 tt (7,0, 1,0)	C13, C17	H16, H17, H13a, H13b	
15	131,3	C				
16	25,7	CH$_3$	1,68 s	C17, C15, C14	H14	
17	17,7	CH$_3$	1,60 s	C16, C15, C14	H14	
18	17,5	CH$_3$	0,97 d (6,5)	C7, C11, C12	H12	
19	107,0	CH$_2$	a: 4,65 s b: 4,72 s	C1	H19b, H9a H19a, H9a	H19b, H2a H19a, H9b
20	26,3	CH$_3$	1,24 s	C3, C4, C5		H5
21	172,4	C				
22	21,0	CH$_3$	2,12 s	C21		H3, H1



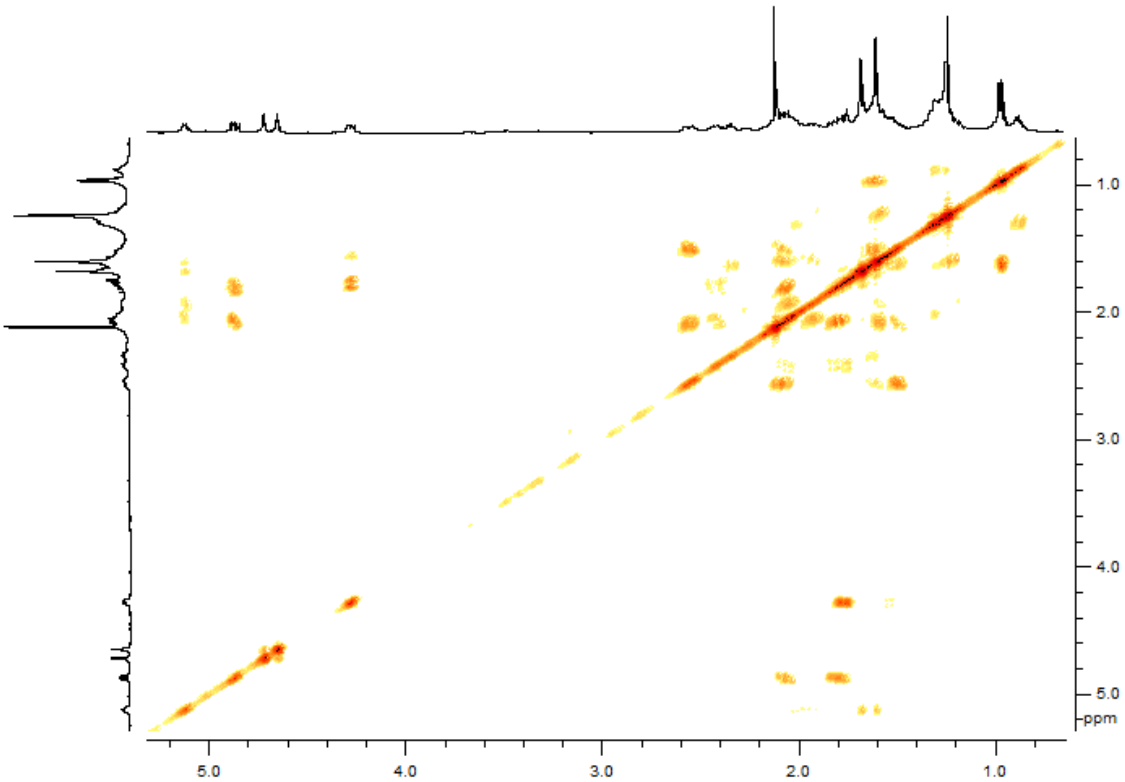


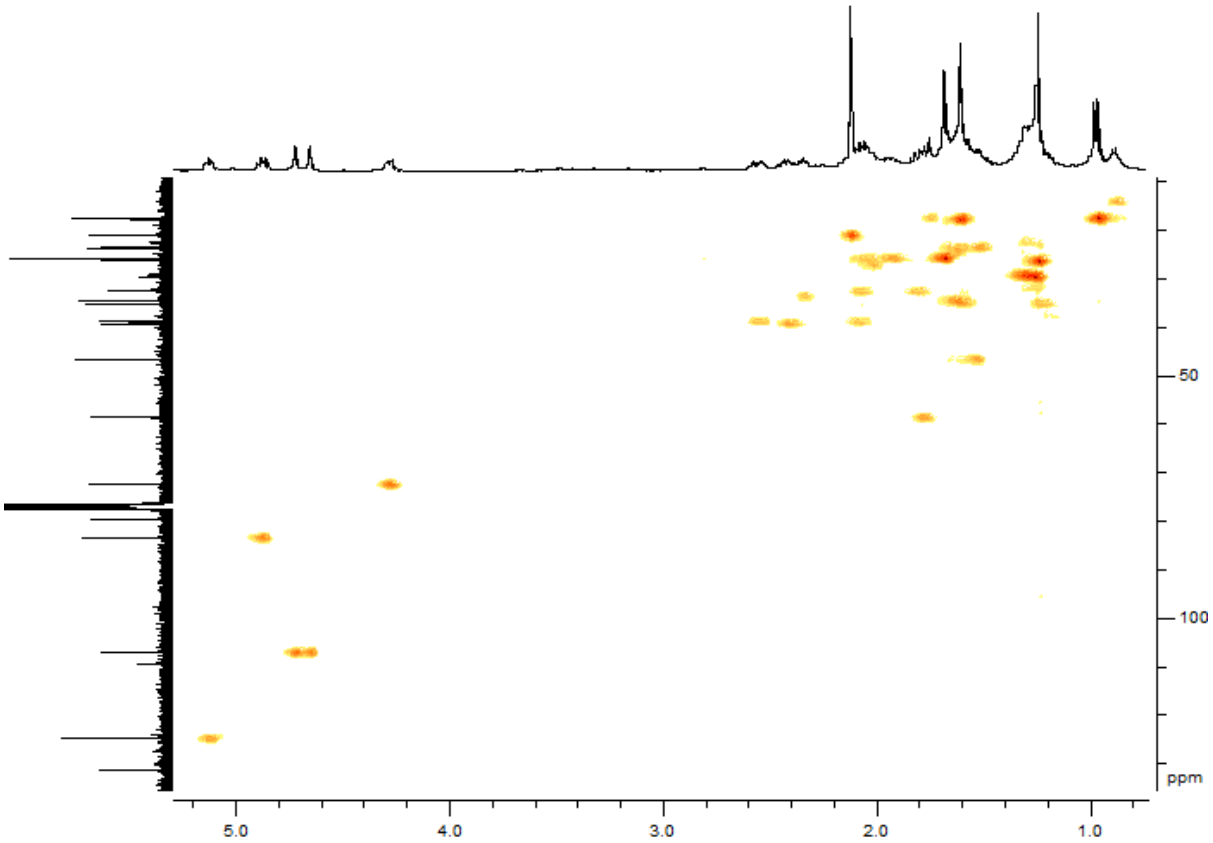
Spectres RMN ^{1}H (intégralité et détail) du composé Dd2



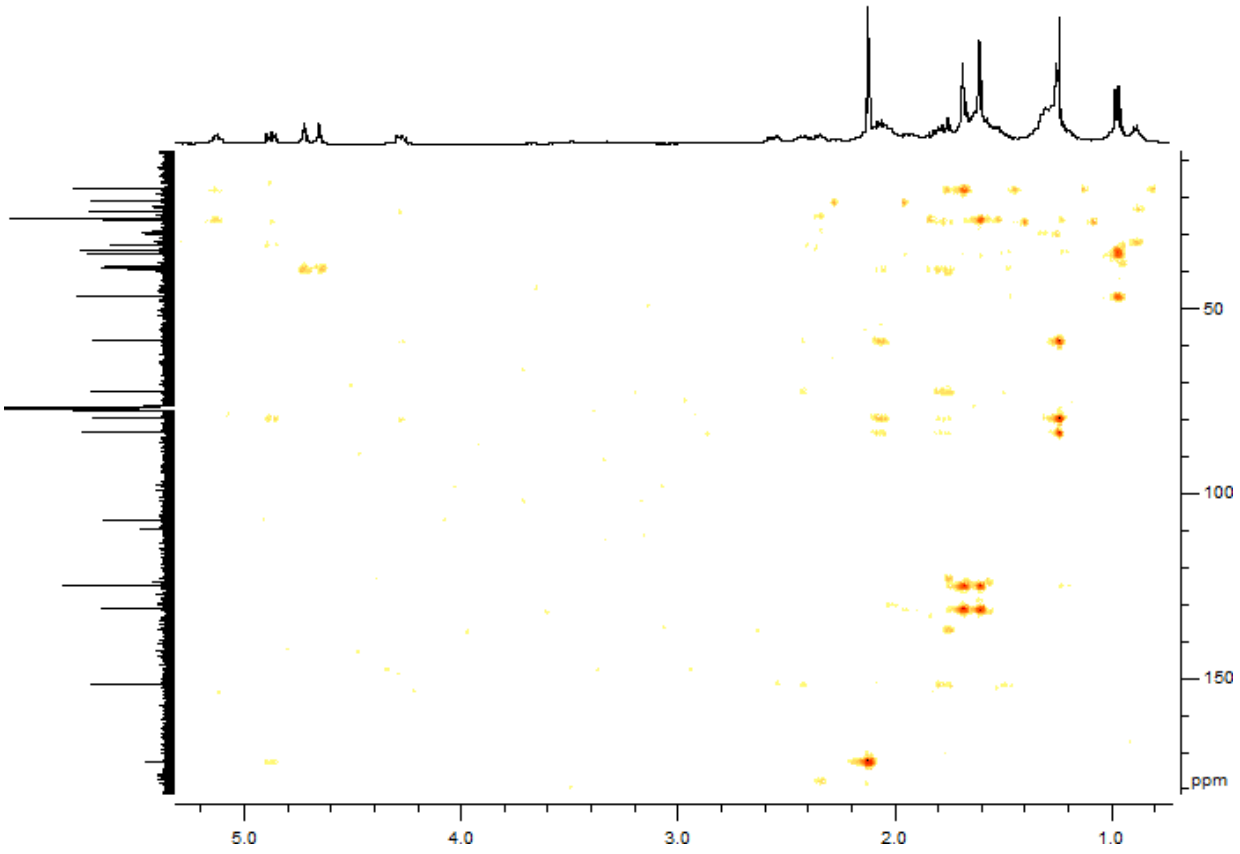


Spectres RMN ^{13}C (intégralité et détail) du composé Dd2



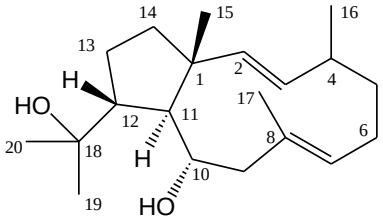


Spectres COSY ^{1}H-^{1}H et HSQC du composé Dd2



Spectre HMBC du composé Dd2

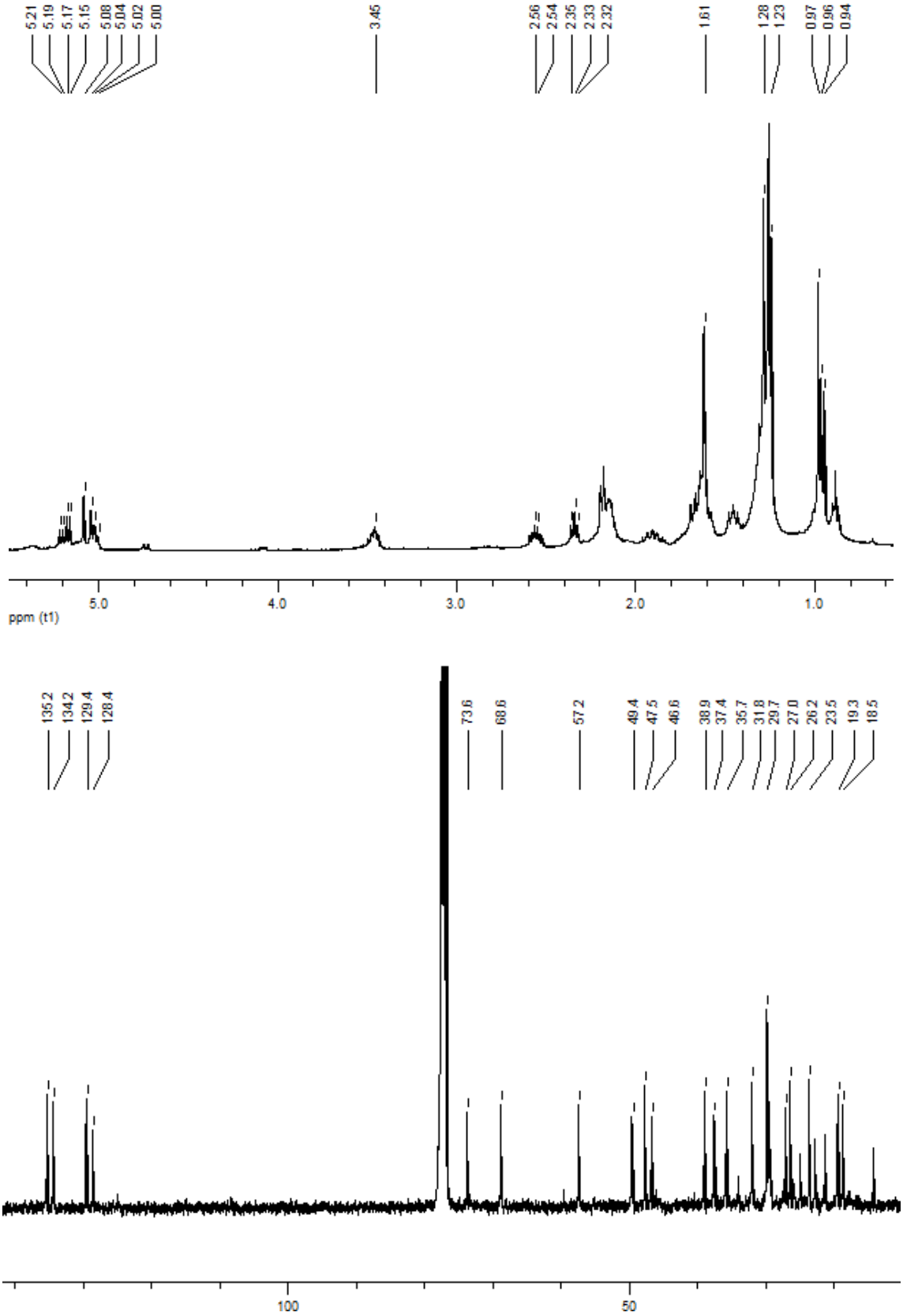
*3. Composé **Dd3** : 10,18-dihydroxydolabella-2,7-diène*



$C_{20}H_{34}O_2$ M = 306 g.mol^{-1}

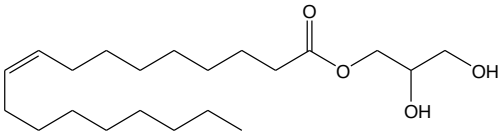
UV : pas de maxima

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H
1	46,6	C			
2	135,2	CH	5,06 d (16,0)	C3, C4, C1, C15, C14	H3
3	134,2	CH	5,18 dd (16,0, 7,5)	C2, C1, C4, C16	H2, H4
4	37,4	CH	2,13 m	C5	H16, H3, H5a, H5b
5	35,6	CH_2	a: 1,45 m b: 1,59 m		H5b, H4, H6 H5a, H4, H6
6	27,0	CH_2	2,14 m	C5	H7, H5a, H5b
7	129,4	CH	5,02 br t (7,5)	C17, C9	H6, H17
8	128,4	C			
9	49,4	CH_2	2,18 m	C7, C8, C10, C11, C17	H10
10	68,6	CH	3,45 ddd (6,0, 5,5, 2,5)	C1	H9
11	57,2	CH	1,66 dd (11,0, 8,5)	C9, C12, C18, (C15)	H12
12	47,5	CH	2,54 ddd (11,0, 11,0, 6,0)	C18, C11, C13, C19	H13a, H11, H13
13	26,2	CH_2	a: 1,28 m b: 1,90 dtd (13,5, 11,0, 8,5)		H13b, H12 H13a, H14a, H14b, H12
14	38,9	CH_2	a: 1,46 m b: 1,62 m	C12, C11	H13b H13b, H15
15	19,3	CH_3	0,97 s	C1, C2, C11, C14	H14b
16	21,2	CH_3	0,95 d (7,0)	C3, C4, C5	H4
17	18,5	CH_3	1,61 s	C7, C8, C9	H7
18	73,6	C			
19	23,5	CH_3	1,24 s	C20, C18, C12	
20	31,8	CH_3	1,29 s	C19, C18, C12	



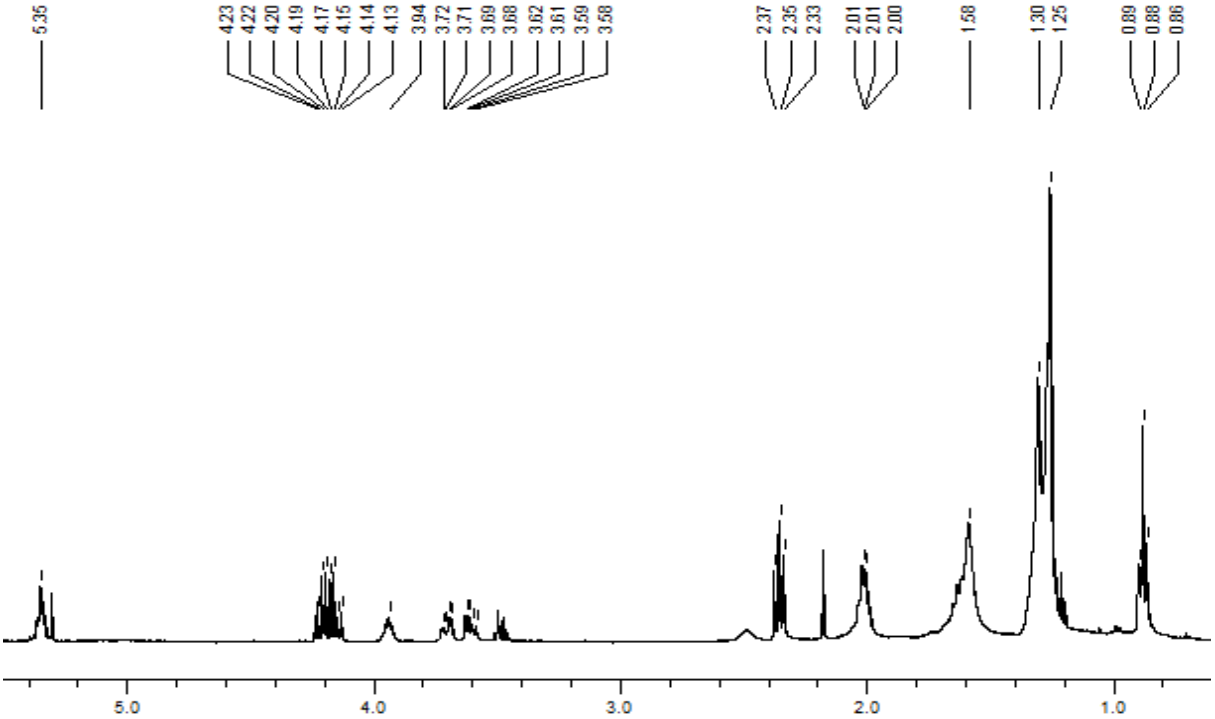
Spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé Dd3

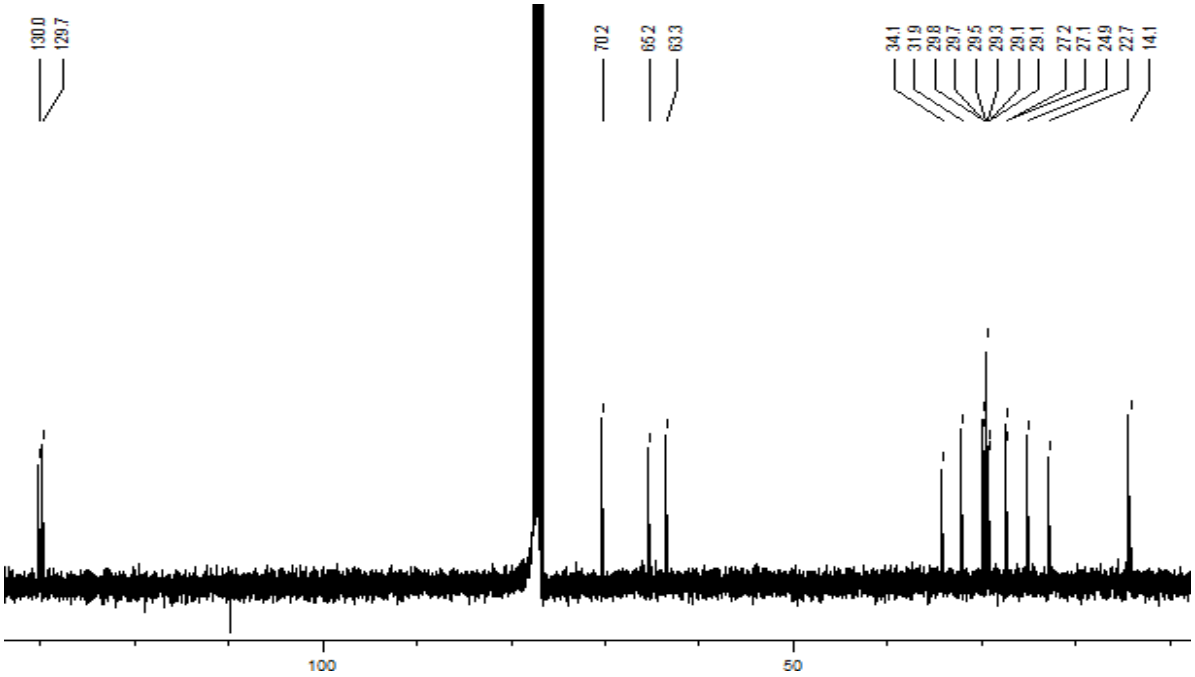
*4. Composé **Dd4***



$C_{21}H_{40}O_4$ M = 356 g.mol^{-1}

ESI/MS : *m/z* 379,3 $[M + Na]^+$



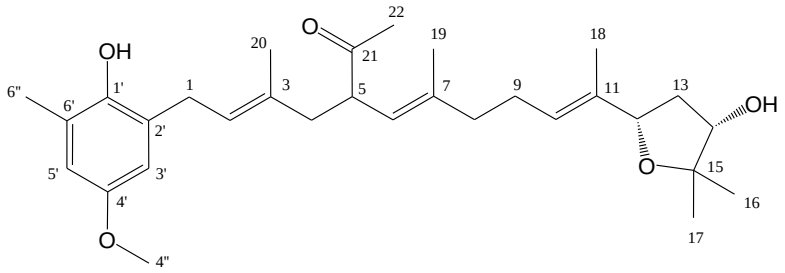


Spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé Dd4

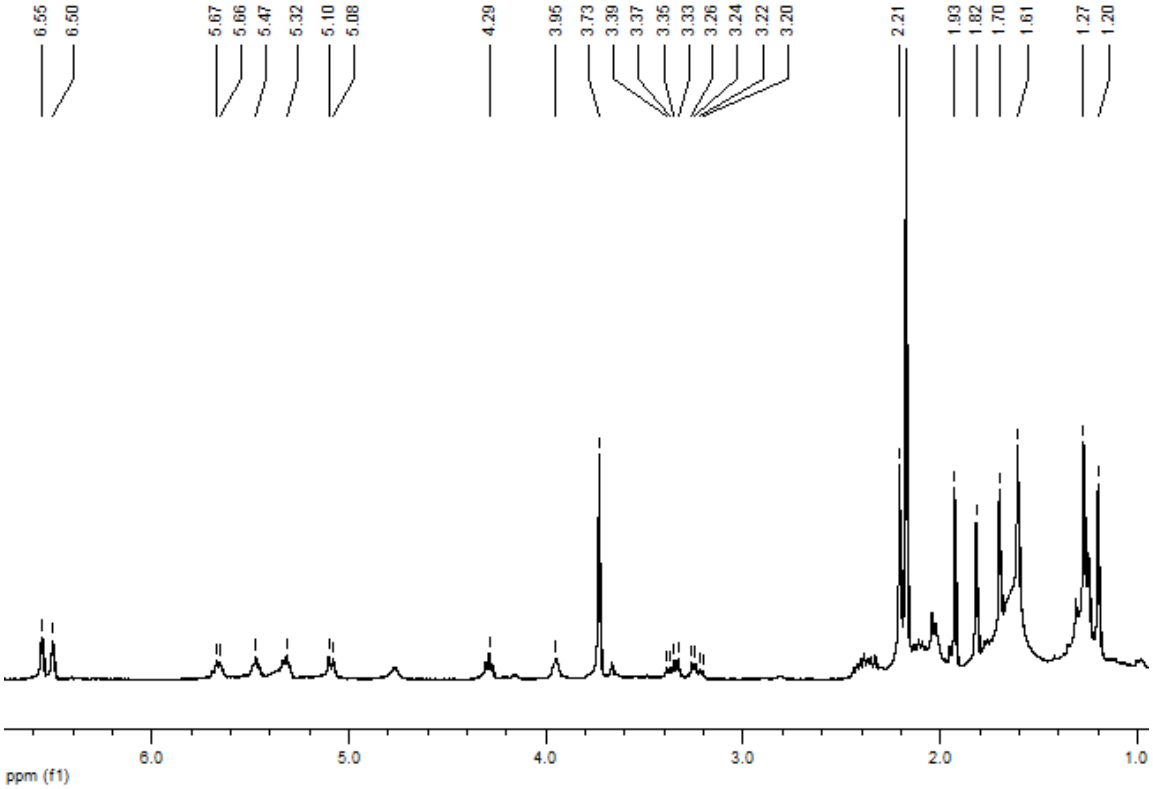
Annexe D : Cystoseira foeniculacea

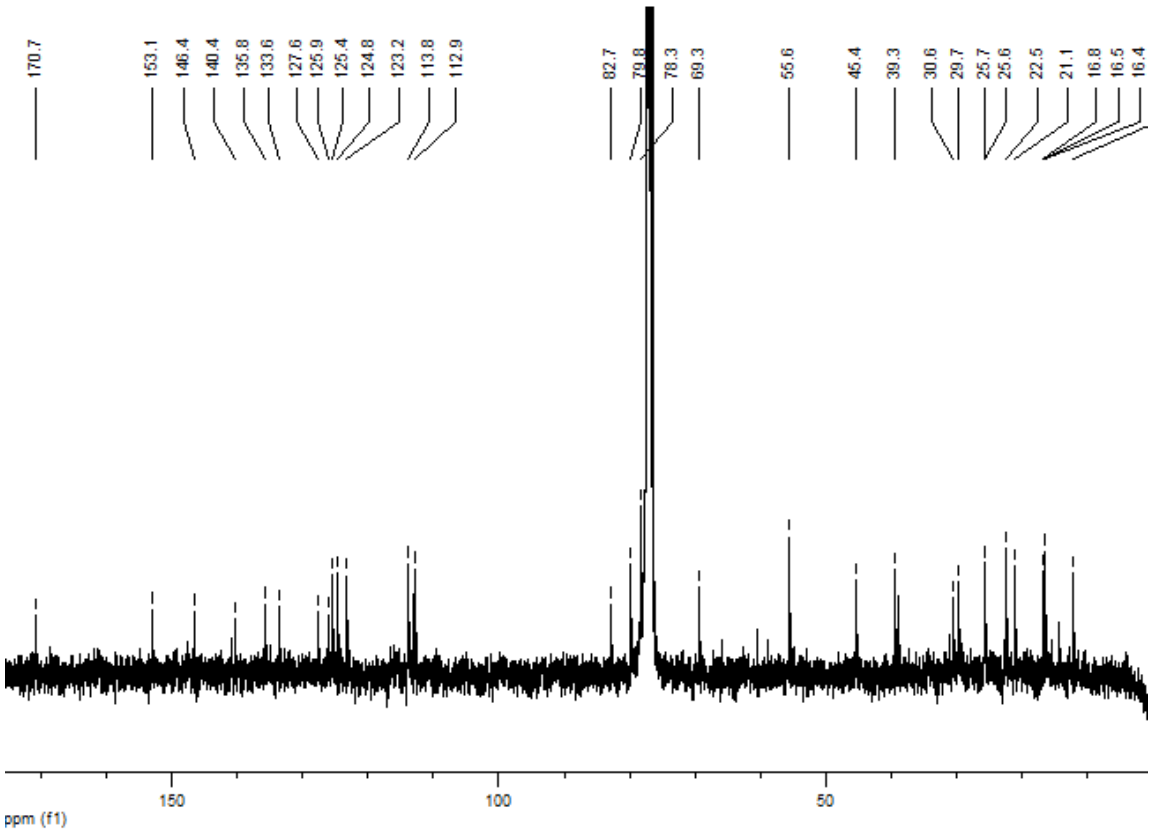
*1. Composé **Cf1***

$C_{30}H_{44}O_5$ M = 484 g.mol^{-1}



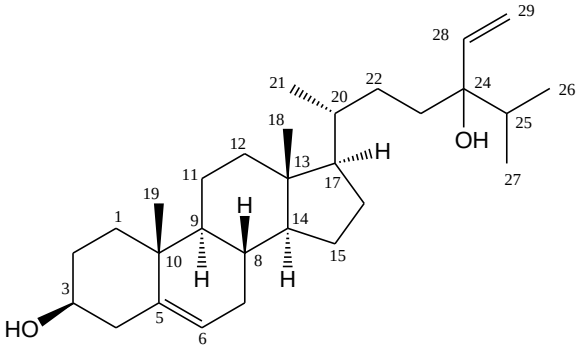
N°	^{13}C (CDCL$_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H (CDCl$_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H	NOESY ^{1}H-^{1}H
1	30,8	CH_2	a: 3,36 dd (15,5, 7,5) b: 3,23 dd (15,5, 7,0)		H1b, H2, H20, H4a H1a, H2, H20	H1b, H2, H20, H3' H1a, H2, H20, H3'
2	125,6	CH	5,32 t (7,0)		H1ab, H20, H4b	H1a, H1b, H4a, H4b
3	133,8	C				
4	45,6	CH_2	a: 2,38 m b: 2,20 m		H4b, H5, H1b H4a, H5, H2	H4b, H2 H4a, (H2)
5	69,5	CH	5,66 td (9,0, 6,0)		H4a, H4b,H6	H6, H18, H20
6	123,4	CH	5,09 d (9,0)		H5, H19, H8	H8, H5
7	140,6	C				
8	39,0	CH_2	2,03 m		H9, H10, H6, H19	H10, H9, H6, H19
9	25,8	CH_2	2,11 m		H8, H10, H18	H8, H18
10	125,0	CH	5,47 t (7,5)		H9, H18, H8, H12	H8, H12
11	136,0	C				
12	80,0	CH	4,29 t (7,0)		H13a, H13b, H18, H12	H13a, H13b, H14, H16, H10
13	39,5	CH_2	a: 1,78 m b: 2,40 m		H13b, H14, H12 H13a, H14, H12	H13b, H14, H12, H18, H17 H13a, H14, H12, H16
14	78,5	CH	3,95 br t (5,0)		H13a, H13b	H13a, H13b, H12, H16
15	82,9	C				
16	25,9	CH_3	1,20 s	C15, C17, C14		H12, H14, H13a, H13b
17	22,6	CH_3	1,27 s	C15, C16, C14		
18	12,3	CH_3	1,61 s	C11, C10, C12	H10, H9, H12	H12, H9
19	17,0	CH_3	1,70 s	C7, C6, C8	H6, H8	H5, H8
20	16,6	CH_3	1,82 s	C3, C2, C4	H1a, H1b, H2	H1a, H1b, H5
1'	146,6	C				
2'	127,8	C				
3'	113,1	CH	6,50 d (3,0)		H6", H5'	H4", H5', H1a, H1b
4'	153,3	C				
5'	114,0	CH	6,56 d (3,0)		H6", H3'	H4", H6", H3'
6'	126,1	C				
6"	16,5	CH_3	2,21 s	C1', C5', C6'	H5', H3'	H5'
4"	55,7	CH_3	3,73 s	C4'		H3', H5'
21	170,7	C				
22	21,1	CH_3	1,93 s	C21		





Spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé Cf1

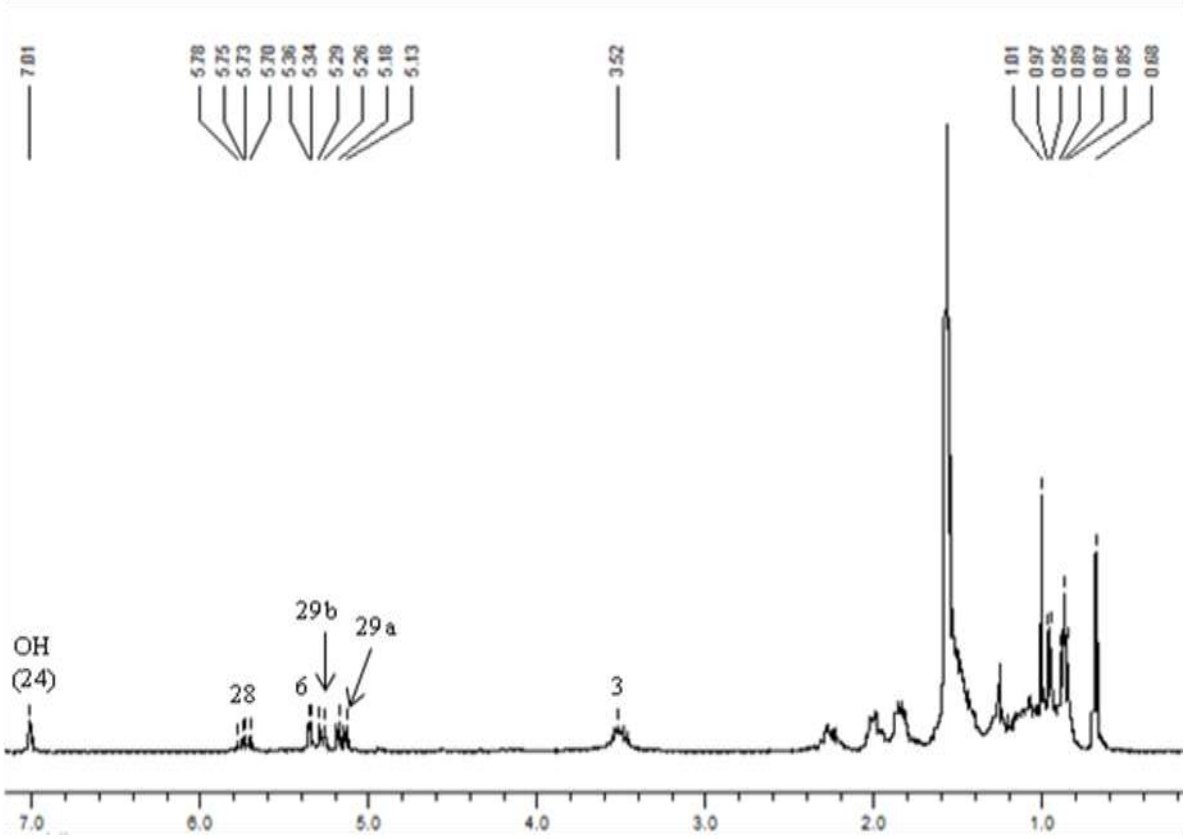
*2. Composé **Cf2** : saringostérol*

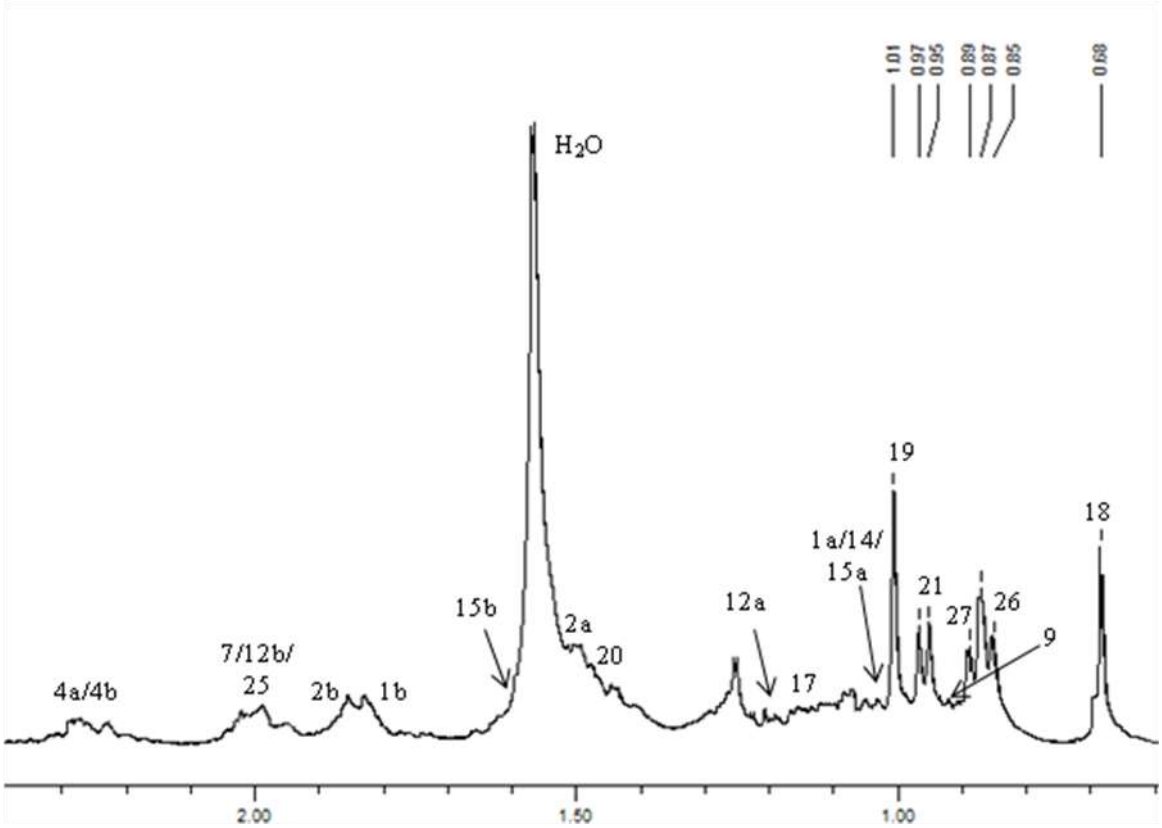


$C_{29}H_{48}O_2$ M = 428 g.mol^{-1}

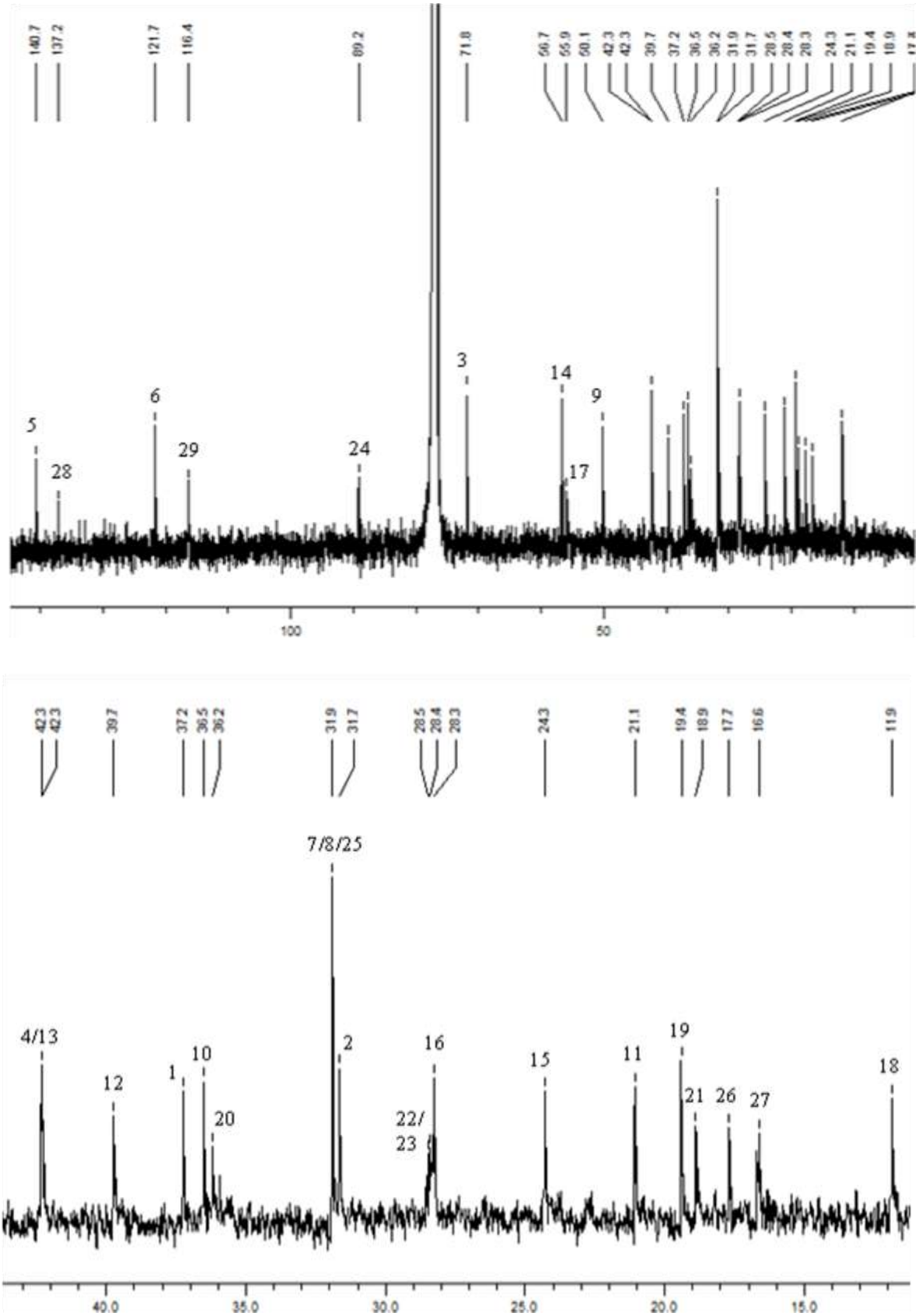
N°	^{13}C (CDCl$_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H (CDCl$_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H
1	37,3	CH_2	a: 1,05 m b : 1,85 m		H1b H1a
2	31,7	CH_2	a : 1,50 m b : 1,84 m		H2b, H4a, H3 H2a, H3, H4b
3	71,8	CH	3,53 m		H2b, H4a, H4b, H2a
4	42,3	CH_2	a : 2,23 m b : 2,25 m	C3, C5, C6, C2	H4b, H3, H2a, H6 H4a, H3, H6, H2b
5	140,7	C			
6	121,7	CH	5,35 br s		H7, H4a, H4b
7	31,9	CH_2	a : 1,50 m [a] b : 2,0 m [a]		H6
8	31,9	CH	1,50 m [a]		
9	50,1	CH	0,94 m		
10	36,5	C			
11	21,1	CH_2	1,45 m		
12	39,7	CH_2	a : 1,20 m b : 2,00 m		H1b H12a
13	42,3	C			
14	56,7	CH	1,00 m		
15	24,3	CH_2	a : 1,05 m b : 1,58 m		H15b H15a
16	28,3	CH_2	a : 1,11 m [b] b : 1,53 m [b]		
17	55,9 (*2)	CH	1,15 m		
18	11,9	CH_3	0,68 s	C13, C12, C14, C17	
19	19,4	CH_3	1,01 s	C10, C5, C9, C1	
20	36,0 (*2)	CH	1,45 m		
21	18,9	CH_3	0,96 d (6,5)	C20, C17, C22	
22	28,5 (*2)	CH_2	a : 1,29 m [b] b : 1,88 m [b]		
23	28,5 (*2)	CH_2	a : 1,53 m [b] b : 1,88 m [b]		
24	89,1 (*2)	C			
25	31,9	CH	2,0 m	C26, C27, C24, C28	H26, H27
26	17,7	CH_3	0,86 d (7,0)	C24, C25, C27	H25
27	16,6 (*2)	CH_3	0,88 d (6,5)	C24, C25, C26	H25
28	137,2 (*2)	CH	5,74 ddd (18,0, 11,5, 2,0)	C24	H29a, H29b
29	116,4 (*2)	CH_2	a: 5,15 dd (18,0, 1,0) b: 5,28 dt (11,5, 1,0)	C24 C24	H28, H29b H28, H29a

[a, b] : les signaux indexés par la même lettre peuvent être échangés



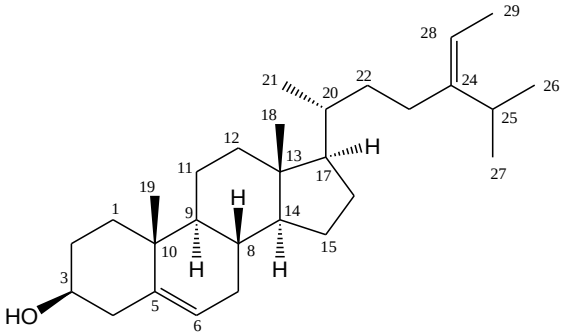


Spectres RMN ^{1}H (intégralité et détail) du composé Cf2



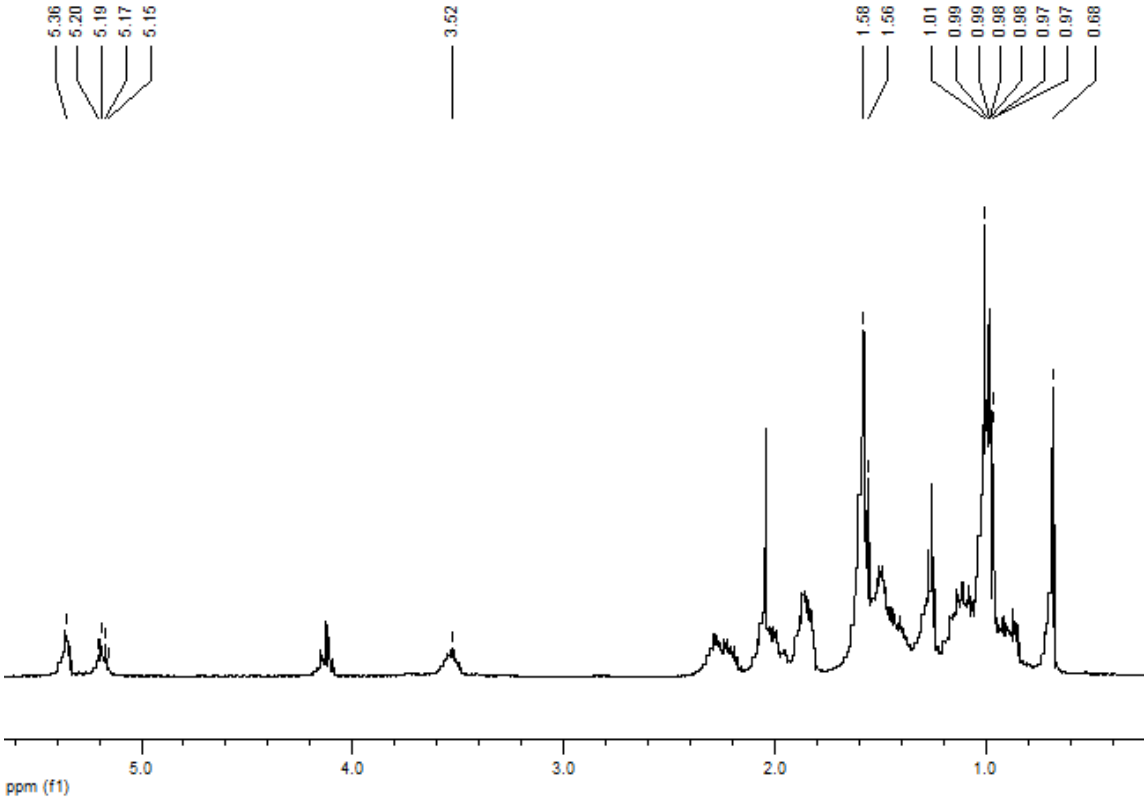
Spectres RMN ^{13}C (intégralité et détail) du composé Cf2

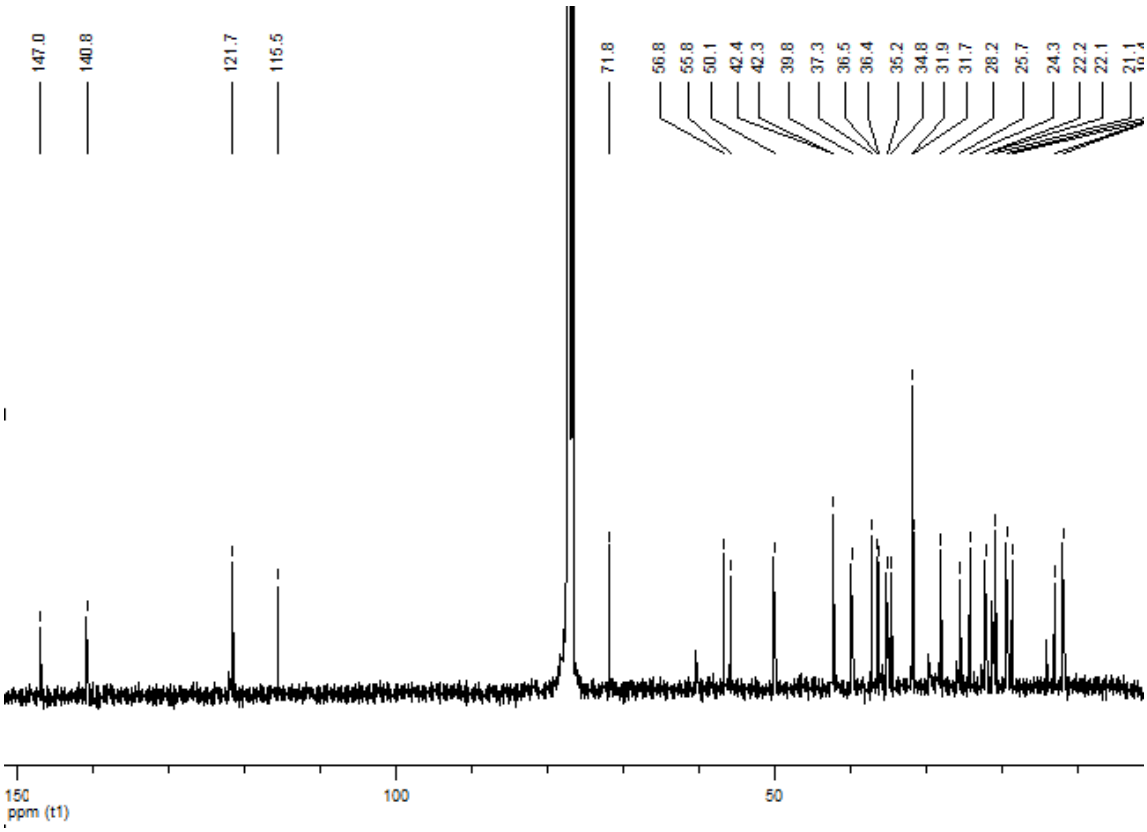
*3. Composé **Cf3** : fucostérol*



$C_{29}H_{48}O$ M = 428 g.mol^{-1}

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélations HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H
1	37,3	CH_2	a: 1,09 m b: 1,87 m	C2	H1b, H2b H1a, H19
2	31,7	CH_2	a: 1,52 m b: 1,86 m		H2b, H3 H2a, H3, H1a
3	71,8	CH	3,53 m		H4, H2
4	42,3	CH_2	2,28 m	C2, C3, C6, C10	H3, H6
5	140,8	C			
6	121,7	CH	5,36 br s	C7, C4, C10	H4, H7, H8
7	31,9	CH_2	a : 1,53 m b : 1,99 m	C6, C9	H7b H7a, H6, H8
8	31,9	CH	1,53 m		H6, H7, H9
9	50,1	CH	0,94 m	C8, C10, C11, C19	H8, H11
10	36,4	C			
11	21,1	CH_2	1,51 m	C9	H9
12	39,8	CH_2	a: 1,16 m b: 2,02 m		H11, H12b H11, H12a
13	42,3	C			
14	56,8	CH	1,01 m	C8, C13, C15, C16, C18	H15
15	24,3	CH_2	a : 1,09 m b : 1,60 m		H15b H15a, H14
16	28,2	CH_2	a : 1,29 b : 1,88		H16b H16a
17	55,8	CH	1,12 m	C13, C18, C20	
18	11,8	CH_3	0,66 s	C12, C13, C14, C17	
19	19,4	CH_3	1,01 s	C1, C5, C9, C10	
20	36,5	CH	1,41 m		H21
21	18,8	CH_3	0,99 d (6,5)	C17, C20, C22	H20
22	35,2	CH_2	a: 1,11 m b: 1,43 m		H22b, H23a, H23b H22a, H23a, H23b
23	25,7	CH_2	a: 1,88 m b: 2,07 m	C22	H23b, H22a, H22b H23a, H22a, H22b
24	147,0	C			
25	34,8	CH	2,21 m	C26, C27, C28, C29	H26, H27, H29
26	22,2	CH_3	0,98 d (6,5)	C25, C27	H25
27	22,1	CH_3	0,98 d (6,5)	C25, C26	H25
28	115,5	CH	5,18 q (6,5)	C23, C25, C29	H29
29	13,2	CH_3	1,57 d (6,5)	C25, C26, C27, C28	H28, H25





Spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé Cf3

Annexe E : les bryozoaires

Le matériel biologique est lyophilisé et réduit en poudre, puis, pour chaque échantillon, 2 g sont prélevés, extraits avec un mélange CH_2Cl_2/MeOH (1/1 ; v/v ; 3 x 20mL, ultrasons 3 x 10 min), filtrés sur coton et évaporés en présence de silice C18 (environ 1 g pour effectuer un dépôt solide). Parallèlement, une cartouche SPE (Phenomenex Strata C18-E, v = 12 mL, 2 g de silice) est conditionnée avec 10 mL d'un mélange CH_2Cl_2/MeOH 1/2 (lavage et activation) et 10 mL d'H_2O. L'extrait solide est alors déposé en tête de colonne, puis est lavé avec 10 mL d'eau afin d'éliminer les sels. La cartouche est ensuite laissée 45 min environ sous vide pour éliminer l'eau résiduelle. Le dépôt est alors élué par 9 mL de mélange CH_2Cl_2/MeOH (1/1 ; v/v), et complété à 10 mL dans une fiole jaugée. A partir de cet extrait organique, 1 mL est prélevé dans un vial afin d'effectuer l'analyse chromatographique, le reste est évaporé afin d'être utilisé pour différents tests biologiques.

L'extrait organique ainsi obtenu est ensuite analysé par HPLC/DAD/DEDL sur colonne Phenomenex Gemini C6-Phenyl (250 x 3 mm, 5 μm, d = 0,5 mL.min^{-1}) - conditions d'analyse MeCN/H_2O + 1‰ acide formique. L'injection de 20 μL est réalisée à 30°C à l'aide du gradient d'élution suivant :

t = 0 min : MeCN/H2O 1/9 ; v/v

t = 5 min : MeCN/H2O 1/9 ; v/v

t = 35 min : 100% MeCN

t = 50 min : 100% MeCN

La liste des échantillons de bryozoaires étudiés est reportée dans le tableau. Le nom des échantillons, par exemple 080616Co4-16, est formé de la manière suivante : 080616 correspond à la date de prélèvement (aammjj), Co4 renseigne le site de prélèvement (cf tableau) et le dernier nombre (16) indique le numéro de l'échantillon.

Famille	Smittinidae	Bitectiporidae		Myriaporidae	Phidoloporidae	Lepraliellidae	Celloporidae		Celleporidae	Adeonellidae
Genre	*Smittina*	*Pentapora*		*Myriapora*	*Reteporella*	*Dentiporella*	*Turbicellepora*	*Omalosecosa*	*Celleporina*	*Adeonella*
Espèce	*cervicornis*	*fascialis*	sp.	*truncata*	sp.	*sardonica*	*avicularis*	*ramulosa*	*caminata*	*calveti*
Echantillon	080616Co4-16	070717Ma4-25	070630Ce1-06	080530Gr5-05	070717Ma4-23	080623Ma4-31	070716Ma2-24	070630Ce1-11	080626Ma8-28	070717Ma4-28
	080623Ma4-26	080612Co1-07	070630Ce2-03	080613Co2-17	070718Ma5-30		070717Ma4-27			070630Ce2-07
	080625Ma3-17	080613Co2-35	080614Co1-10	080615Co3-07	080529Gr4-07		070718Ma5-26			080529Gr4-03
	080626Ma8-18	080614Co1-04		080615Co3-30	080615Co3-02		080623Ma4-27			080615Co3-01
		080623Ma4-33		080626Ma8-19	080623Ma4-23					080624Ma5-34
		080624Ma5-12			080625Ma3-37					080625Ma3-18
		080624Ma5-40								
		080625Ma3-04								

Tableau : Liste des échantillons de bryozoaires étudiés

Zone d'étude	Marseille	Ceuta	Corse	Grèce
Site de prélèvement	Ma2 : Plane, Grotte à Roro Ma3 : Riou, Impérial de Terre Ma4 : Plane, Grotte Pérès Ma5 : Jarre, Grottes Mysid & Arc en Ciel Ma8 : Grotte du Chinois_Niolon	Ce1 : Ciclon de fuera Ce2 : Ciclon de tierra	Co1 : Pointe de la Revellata Co2 : La Bibliothèque Co3 : Golf de Porto, Calanque de Piana Co4 : Punta Bianca	Gr4 : Plakias (Crète) Gr5 : Agia Pelagia mononafti (Crète)

Tableau : Liste des sites de prélèvements sur les différentes zones d'étude

Résumé

Alors que les premières formes de vie sont apparues dans les océans il y a près de 4 milliards d'années, les premières espèces terrestres remontent seulement à 400 millions d'années. Malgré cela, les substances naturelles d'origine marine ne représentent que 10% de l'ensemble des molécules isolées à ce jour à partir d'organismes vivants. Ces composés chimiques sont pourtant très spécifiques du fait des particularités du Monde Marin. Au sein des organismes qui les biosynthétisent, ils peuvent notamment intervenir dans la défense chimique contre les parasites et les autres compétiteurs. Ces molécules apparaissent donc comme des alternatives potentielles aux oxydes du tributylétain (TBTO) présents dans les revêtements antifouling et interdits depuis 2008 en raison de leur toxicité.

Dans ce contexte et dans le cadre d'un partenariat avec le Parc national de Port-Cros, l'étude de la composition chimique de plusieurs organismes marins méditerranéens, des algues vertes (*Caulerpa taxifolia*) et brunes (*Dictyota* sp., *Dictyota dichotoma*, *Cystoseira foeniculacea*) ainsi que des bryozoaires, a été entreprise. Ces travaux ont permis l'isolement et la caractérisation structurale d'une vingtaine de métabolites secondaires (dérivés terpéniques et lipidiques, stérols), parmi lesquels huit sont originaux. L'identification de l'ensemble de ces molécules a été réalisée par le biais de l'utilisation de différentes méthodes spectroscopiques (RMN 1D et 2D, SM-HR) et la stéréochimie de certaines d'entre-elles a été établie par RMN (expérience NOESY ^{1}H-^{1}H) et modélisation moléculaire. Des corrections de données spectrales ont été également proposées pour cinq composés connus.

Par ailleurs, l'activité anti-adhésion de plusieurs métabolites issus d'algues a été évaluée vis-à-vis d'un biofilm bactérien marin (*Pseudoalteromonas* sp.) afin de déterminer leur potentiel en tant qu'agents antifouling : plusieurs de ces composés présente une activité intéressante (CE_{50} = 30 μM), certes inférieure à celle du TBTO (CE_{50} = 10 μM), mais largement supérieure à celles de co-biocides utilisés actuellement.

Parallèlement à ces travaux, l'analyse des variations temporelles et spatiales de l'expression métabolique de certaines des espèces étudiées a été réalisée à des fins écologiques. D'une part, les extraits mensuels de *C. taxifolia* présentent généralement une activité anti-adhésion importante quand le taux de caulerpényne dans l'extrait est élevé. D'autre part, d'importantes fluctuations ont notamment été observées dans la composition chimique des bryozoaires *Myriapora truncata* et *Pentapora fascialis* en fonction de leur lieu de récolte.

Mots-clés : Chlorophycées ; Phéophycées ; *Caulerpa taxifolia* ; *Dictyota dichotoma* ; *Cystoseira* ; diterpènes cycliques ; activité antifouling, anti-adhésion ; biofilm ; parc national.