Médiation chimique entre l'algue brune méditerranéenne Taonia atomaria et la communauté bactérienne associée à sa surface

Ahlem Othmani

▶ **To cite this version:**

Ahlem Othmani. Médiation chimique entre l'algue brune méditerranéenne Taonia atomaria et la communauté bactérienne associée à sa surface. Chimie organique. Université de Toulon, 2014. Français. NNT : 2014TOUL0001 . tel-01017437

HAL Id: tel-01017437

https://theses.hal.science/tel-01017437

Submitted on 2 Jul 2014

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 DE TOULON

ÉCOLE DOCTORALE n° 548 « Mer et Sciences »

Laboratoire Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin

THÈSE présentée par :

Ahlem OTHMANI

soutenue le : **20 janvier 2014**

pour obtenir le grade de Docteur

Spécialité : Ecologie Chimique Marine

Médiation chimique entre l'algue brune méditerranéenne *Taonia atomaria* et la communauté bactérienne associée à sa surface

THÈSE dirigée par :	**Dr Gérald CULIOLI**
Responsables scientifiques :	**Dr Jean-François BRIAND**

JURY :

Mme. Sophie TOMASI	**Professeur / Université de Rennes 1**	**Rapporteur**
M. Olivier THOMAS	**Professeur / Université de Nice**	**Rapporteur**
M. Philippe POTIN	**Directeur de recherche CNRS / Université Pierre et Marie Curie**	**Examinateur**
M. Jean-Charles MARTIN	**Chargé de recherche INRA / Aix-Marseille Université**	**Examinateur**
M. Yves BLACHE	**Professeur / Université de Toulon**	**Examinateur**
M. Gérald CULIOLI	**Maitre de conférences / Université de Toulon**	**Directeur de thèse**
M. Jean-François BRIAND	**Maitre de conférences / Université de Toulon**	**Co-encadrant de thèse**

UNIVERSITÉ DE TOULON

ÉCOLE DOCTORALE n° 548 « Mer et Sciences »

Laboratoire Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin

THÈSE présentée par :

Ahlem OTHMANI

soutenue le : **20 janvier 2014**

pour obtenir le grade de Docteur

Spécialité : Ecologie Chimique Marine

Médiation chimique entre l'algue brune méditerranéenne *Taonia atomaria* et la communauté bactérienne associée à sa surface

THÈSE dirigée par :	**Dr Gérald CULIOLI**
Responsables scientifiques :	**Dr Jean-François BRIAND**

JURY :

Mme. Sophie TOMASI	**Professeur / Université de Rennes 1**	**Rapporteur**
M. Olivier THOMAS	**Professeur / Université de Nice**	**Rapporteur**
M. Philippe POTIN	**Directeur de recherche CNRS / Université Pierre et Marie Curie**	**Examinateur**
M. Jean-Charles MARTIN	**Chargé de recherche INRA / Aix-Marseille Université**	**Examinateur**
M. Yves BLACHE	**Professeur / Université de Toulon**	**Examinateur**
M. Gérald CULIOLI	**Maitre de conférences / Université de Toulon**	**Directeur de thèse**
M. Jean-François BRIAND	**Maitre de conférences / Université de Toulon**	**Co-encadrant de thèse**

Remerciements

En premier lieu, je souhaiterais remercier le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique de Tunisie pour le financement de ces trois années de thèse.

Merci à Messieurs André MARGAILLAN pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein du laboratoire MAPIEM et Yves BLACHE pour m'avoir accueillie au sein de son équipe « Biofouling et Substances naturelles marines ».

Je tiens particulièrement à remercier Madame Sophie TOMASI (Professeur à l'Université de Rennes 1) et Monsieur Olivier THOMAS (Professeur à l'Université de Nice), rapporteurs, pour le temps accordé à la lecture attentive de ce manuscrit et pour leurs commentaires avisés. Je remercie également Messieurs Philippe POTIN (Directeur de recherche CNRS de la Station Biologique de Roscoff), Jean-Charles MARTIN (Chargé de recherche INRA à l'Université d'Aix Marseille), Yves BLACHE (Professeur à l'Université de Toulon), Gérald CULIOLI (Maitre de conférence à l'Université de Toulon) et Jean-François BRIAND (Maitre de conférence à l'Université de Toulon) qui m'ont fait l'honneur de participer à mon Jury et de juger ce travail.

J'exprime toute ma gratitude aux Dr. Gérald CULIOLI et Jean-François BRIAND de m'avoir confié ce sujet, de m'avoir encadrée et dirigée durant ce travail de thèse. Gérald, je voudrais te remercier pour m'avoir initiée aux techniques chromatographiques et spectrales avec beaucoup de rigueur et de patience, et toi Jean-François je te remercie pour ta grande disponibilité et tes explications pertinentes pour les bio-essais anti-adhésion et les analyses statistiques et multivariées. Merci à vous deux pour votre éclairage scientifique, pour votre enthousiasme, pour vos nombreux conseils, pour votre confiance et pour votre soutien indéfectible.

Je remercie chaleureusement Madame Luisa MANGIALAJO (Maitre de conférences à l'Université de Nice Sophia-Antipolis) et Monsieur Marc BALLY (Chargé de recherche à l'Université d'Aix Marseille) pour avoir participé à mon comité de thèse, pour les discussions très constructives, les remarques et les précieux conseils.

J'adresse un grand merci à Madame Valérie STIGER-POUVREAU (Maitre de conférences à l'Université de Bretagne Occidentale) pour sa gentillesse et son avis très favorable auprès de mon directeur de thèse lors de mon recrutement.

Merci à tous les membres du laboratoire MAPIEM pour leurs conseils scientifiques et les discussions enrichissantes, et plus particulièrement Maëlle MOLMERET pour le temps qu'elle m'a accordé pour l'optimisation du protocole de microscopie (métabolome de surface), Annick ORTALO-MAGNE pour m'avoir aidée à la mise au point du protocole d'extraction des produits bruts des bactéries, Bernard FACHE pour les observations réalisées au MEB, Ahmad FAHS pour les observations effectuées grâce à l'AFM et Jean-Michel ROBERT

pour son aide continu concernant l'appareillage (RMN, GC-MS, IR), sans oublier Dominique BONHOMME pour son assistance technique lors de l'isolement et la purification des produits à partir des des échantillons de Dictyota spp. d'Algérie.

Je remercie également Mohamed EL HATTAB de l'Université de Blida (Algérie) pour la récolte du lot de Dictyota spp. d'Algérie, Halima SERIDI de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (Algérie) pour l'identification des échantillons de Dictyota spp. d'Algérie et Olivier DE CLERCK de l'Université de Gand (Belgique) pour l'identification taxinomique du matériel algal collecté à Carqueiranne (France).
Je tiens à remercier très sincèrement Chantal COMPERE de l'IFREMER de Brest et Dominique HARAS de l'Université de Bretagne Sud (LBCM) pour nous avoir fournis les souches bactériennes D41 et 4M6. Je tiens également à remercier Brigitte LE BERRE et Agnès BOUCHES de l'INRA de Thonon-les-Bains pour la réalisation, l'interprétation et leur aide dans la compréhension de l'analyse DGGE.

Mes remerciements s'adressent également à Mohamed TRIGUI et Imen ZOUARI qui m'ont chaleureusement accueillie au sein du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS, Tunisie) et encadrée avec beaucoup de soin pendant un mois.

Je tiens aussi à remercier Soraya Didane, Benoit Beganton, Elodie Cellé, Madaline Meert et Amorine Duvaleix pour les travaux qu'ils ont effectués dans le cadre de leurs stages.

Un big merci aux filles de mon bureau, Perrine, Floflo, Cynthia et Mireille qui sont toujours là tant dans les moments joyeux que les moments difficiles et jusqu'au bout. Merci pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble (petites soirées, sorties, plage, dégustations culinaires, anniversaires, fous rires,…), pour votre soutien, pour votre bonne humeur et pour les discussions et les échanges enrichissants tout au long de ces trois années partagées, sans oublier Denis. Je vous adore.

Bien sur je n'oublie pas tous les jeunes du laboratoire avec lesquels j'ai eu beaucoup d'échanges : Marlène, Aurore, Madeleine, Dutduan, Sandra, Tania, The Anh, Son, Nicolas, Amina, Laurie…et les moins jeunes aussi : Annie, Olivier, Brigitte, Nadia…

J'adresse mes remerciements aussi aux amis que j'ai côtoyés depuis trois ans à Toulon : Amel, Hanane, Safa, Rabii,…pour la bonne ambiance et les bons moments qu'on a partagés ensemble.

Je ne saurais terminer sans remercier mon chéri Sofyane qui m'a toujours soutenue et encouragée. Merci pour ton amour et pour les bonnes conditions que tu m'as offertes durant la rédaction de la thèse.

Enfin, je conclue ces remerciements en m'adressant à ma famille : mes chers parents pour avoir toujours cru en moi depuis l'enfance, pour votre confiance sans faille et pour vos encouragements continus. Un grand merci à mes chères sœurs Asma, Nada, Hanen et

Dhekra et mon cher frère Nejib pour l'amour infini, pour votre humour et vos blagues qui me tuent de rire. C'est grâce à vous que je supporte la distance.
Je vous aime beaucoup ♥ ♥ ♥

A toutes les personnes citées et les autres que j'aurais pu oublier et qui, de proche ou de loin, m'ont aidée à la réalisation de ce travail : MERCI !!!

Production scientifique

Publication

Othmani A, Bouzidi N, Viano Y, Alliche Z, Seridi H, Blache Y, Hattab M, Briand J-F and Culioli G (2013). Anti-microfouling properties of compounds isolated from several Mediterranean *Dictyota* spp. *Journal of Applied Phycology*: DOI 10.1007/s10811-10013-10185-10812

Communications orales

Othmani A., Molmeret M., Ortalo-Magné A., Blache Y., Briand J.F., Culioli G. « Interactions chimiques entre l'algue brune méditerranéenne *Taonia atomaria* et sa communauté bactérienne épiphyte». *5èmes Journées de l'assemblée générale annuelle du GDR BIOCHIMAR*, Lorient, Novembre 2013

Othmani A., Molmeret M., Blache Y., Briand J.F., Culioli G. « Interactions between macro-algae and associated bacteria: biofilm control by surface secondary metabolites in the Mediterranean brown seaweed *Taonia atomaria* ». *40th CIESM Congress*, Marseille, Octobre 2013

Othmani A., Molmeret M., Bouchez A., Blache Y., Briand J.F., Culioli G. « Médiation chimique entre l'algue brune méditerranéenne *Taonia atomaria* et la communauté bactérienne associée à la surface ». *6ème Colloque de l'AFEM « Microbiologie environnementale : du gène à l'écosystème »*, Clermont, Octobre 2013

Othmani A., Molmeret M., Ortalo-Magné A., Blache Y., Briand J. F., Culioli G. « Médiation chimique entre l'algue brune méditerranéenne *Taonia atomaria* et la communauté bactérienne associée à la surface » *1ère Rencontre Nationale des Jeunes Chercheurs en Écologie Chimique*, Montpellier, Juin 2013

Othmani A., Molmeret M., Blache Y., Briand J. F., Culioli G. « Rôles des métabolites de surface dans le contrôle du biofilm chez une algue brune méditerranéenne *Taonia atomaria* ». *Workshop Biofouling & antifouling -7èmes Journées Scientifiques de l'USTV,* Toulon, Avril 2013.

Othmani A., Briand J. F., Molmeret M., Blache Y., Culioli G. « Rôle des métabolites secondaires dans l'anti-adhésion bactérienne chez des espèces d'algues brunes méditerranéennes ». *4èmes Doctoriades euro-méditerranéennes*, Toulon, Novembre 2012.

Othmani A., Briand J. F., Blache Y., Culioli G. « Anti-adhesion properties of secondary metabolites isolated from a Mediterranean brown seaweed *Dictyota* spp. ». *5ème Edition des Graines d'Adhésion,* La Garde, Juillet 2012.

Othmani A., Briand J. F., Blache Y., Culioli G. « Characterization and comparison of secondary metabolites isolated from total crude and the surface extracts from the brown alga *Dictyota dichotoma* ». *Mediterranean Conference on Natural Products (MCNP'2011*), Blida (Algérie), Octobre 2011.

Communications par affiche

Othmani A., Molmeret M., Ortalo-Magné A., Blache Y., Briand J. F., Culioli G. « What about the ability of the Mediterranean brown seaweed *Taonia atomaria* to control foulers but also to select surface-associated bacteria?» *14th International Symposium on Marine Natural Products and 8th European Congress on Marine Natural Products 2013*, Island of La Toja (Espagne), Septembre 2013

Othmani A., Meert M., Molmeret M., Blache Y., Briand J. F., Culioli G. « Analyse du métabolome de surface de l'algue brune *Taonia atomaria* et étude de son implication dans le contrôle du biofilm bactérien associé ». *23ème Journée de la Chimie SCF-PACA*, Nice, Avril 2013.

Othmani A., Briand J. F., Molmeret M., Blache Y., Culioli G. « Role of surface secondary metabolites in the biofilm control in the Mediterranean brown seaweed *Taonia atomaria* ». *Biofilms 5*, Paris, Décembre 2012.

Othmani A., Briand J. F., Blache Y., Culioli G. « Cyclic diterpenoids isolated from surface and whole-cell extracts of a Mediterranean brown seaweed *Dictyota* spp.» *6èmes journées Franco-Italiennes de Chimie* Marseille, Avril 2012.

Othmani A., Briand J. F., Blache Y., Culioli G. « Les métabolites secondaires à activité antifouling isolés à partir des algues brunes du genre *Dictyota*» *Workshop Biofouling & antifouling - 6èmes Journées Scientifiques de l'USTV,* Toulon, Avril 2012.

Othmani A., Briand J. F., Blache Y., Culioli G. « Roles of secondary metabolites in biofilm control by the brown alga *Dictyota dichotoma* » *7th European Conference on Marine Natural Products*, Strömstad (Suède), Août 2011.

Othmani A., Briand J. F., El Hattab M. Blache Y., Culioli G. « Implication des métabolites secondaires dans le contrôle du biofilm bactérien chez l'algue brune *Dictyota dichotoma* » *22ème Journée de la Chimie SCF-PACA*, Toulon, Mars 2011.

Sommaire

Introduction générale 1

Chapitre I : Etude bibliographique

I. Biofouling et applications antifouling 10
I.1. Définitions du biofouling / biofilm 10
I.1.1. Biofilm : Définition et historique 10
I.1.2. Formation et écologie du biofilm primaire 11
I.2. Problèmes économiques et écologiques liés au biofouling marin 13
I.2.1. Problèmes économiques 14
I.2.2. Problèmes écologiques 15
I.3. Moyens de lutte contre le biofouling marin 15
I.3.1. Revêtements antifouling 15
I.3.2. Une possibilité d'alternatives aux biocides antifouling actuels : les substances naturelles marines 16
I.3.3. Bio-essais antifouling 24

II. Modèles biologiques de l'étude 27
II.1. Présentation générale des algues brunes 27
II.2. Présentation des espèces étudiées 29
II.2.1. Position systématique 29
II.2.2. Métabolites secondaires des Dictyotaceae 29
II.2.3. Présentation des espèces de *Dictyota* étudiées 31
II.2.3.1. Description morphologique 31
II.2.3.2. Eléments biologiques et écologiques 31
II.2.3.3. Métabolites secondaires des espèces appartenant au genre *Dictyota* 32
II.2.4. Présentation de *Taonia atomaria* 34
II.2.4.1. Description morphologique 34
II.2.4.2. Eléments biologiques et écologiques 35
II.2.4.3. Métabolites secondaires de *Taonia atomaria* 36

III. Interactions algues-biofilms 40
III.1. Biofilms sur surfaces biotiques 40
III.1.1. Biofilms sur les macro-algues 40
III.1.1.1. Composition et densité des biofilms 41
III.1.1.2. Facteurs influençant la formation et le maintien d'un biofilm à la surface des macro-algues 45
III.1.2. Compositions et densités d'épibiontes sur des surfaces vivantes 46
III.2. Types d'interactions algues / biofilms 48
III.2.1. Interactions bénéfiques 49
III.2.1.1. Relations trophiques 49
III.2.1.2. Intercations écologiques 51
III.2.2. Interactions préjudiciables 52
III.3. Approche métabolomique pour l'analyse des molécules produites à la surface des macro-algues 55
III.3.1. Intérêt de l'étude des métabolites de surface 55
III.3.2. Intérêt d'une approche métabolomique de surface 58
III.3.3. Protocoles d'extraction et de quantification des métabolites à la surface de macro-algues 59

Chapitre II : Matériels & Méthodes

I. Matériel algal 69
I.1. Collectes 69
I.2. Obtention du métabolome total des algues 70
I.2.1. Extraction 70
I.2.2. Fractionnement de l'extrait brut 70
I.2.3. Purification de composés à partir des fractions obtenues 71
I.2.4. Caractérisation structurale des produits purs 71
I.3. Développement d'un protocole expérimental pour l'analyse du métabolome de surface de *Taonia atomaria* 73
I.3.1. Protocoles d'extraction des métabolites de surface 73
I.3.1.1. Protocoles d'extraction 73

I.3.1.2. Vérification de l'intégrité membranaire pour la méthode de trempage dans les solvants organiques 74
I.3.2. Identification des métabolites de surface 76
I.3.3. Variation saisonnière des métabolites de surface....78

II. Matériel bactérien 79
II.1. Milieux de culture 79
II.1.1. Väätänen Nine Salt Solution (VNSS) / VNSS Agar....79
II.1.2. ZoBell-agar 79
II.2. Souches bactériennes marines de référence....80
II.3. Souches bactériennes marines isolées de *T. atomaria*....81
II.3.1. Isolement et culture des bactéries associées à la surface 81
II.3.1.1. Observation de la surface de l'algue 81
II.3.1.2. Isolement des bactéries associées à la surface 82
II.3.1.3. Conditions de culture 83
II.3.1.4. Cryoconservation des souches bactériennes 83
II.3.2. Caractérisation des souches bactériennes associées à la surface de *T. atomaria*....83
II.3.2.1. Morphologie....84
II.3.2.2. Culture et croissance 84
II.3.2.3. Coloration de Gram....84
II.3.2.4. Observation au MEB....85
II.3.3. Etude du métabolome des souches cultivables de *T. atomaria* 85
II.3.3.1. Obtention des extraits bruts bactériens 85
II.4. Activités biologiques 87
II.4.1. Biocides commerciaux 87
II.4.2. Fluorochromes....87
II.4.3. Bio-essais anti-adhésion 88
II.4.3.1. Description du protocole....88
II.4.3.2. Choix des souches marines de référence....91
II.4.3.3. Choix des souches isolées de *T. atomaria* 92
II.4.3.4. Optimisation des paramètres d'adhésion des bactéries de *T. atomaria*en microplaque : Cinétique d'adhésion et densité d'ensemencement 92
II.4.4. Test d'inhibition de croissance / toxicité 93
II.4.4.1. Inhibition de croissance 93
II.4.4.2. Viabilité....94
II.5. Etude de la variation saisonnière des communautés microbiennes de surface……. 95
II.5.1. Extraction de l'ADN bactérien 95

II.5.2. Analyses par DGGE 95
II.6. Analyses statistiques 96

Chapitre III : Analyse des méatbolites secondaires des espèces étudiées

---

I. Etude de *Dictyota* sp. 103
I.1. Caractérisation des métabolites issus des extraits totaux 103
I.1.1. Obtention des métabolites 103
I.1.2. Caractérisation structurale des métabolites 107
I.1.2.1. Analyse structurale du composé **Ds1** 107
I.1.2.2. Analyse structurale du composé **Ds2** 110
I.1.2.3. Analyse structurale du composé **Ds3** 112
I.1.2.4. Analyse structurale du composé **Ds4** 114
I.1.2.5. Analyse structurale du composé **Ds5** 119
I.2. Activité anti-adhésion 122
I.3. Problèmes liés à d'identification des espèces à niveau du genre *Dictyota* 127

II. Etude de *Taonia atomaria* 127
II.1. Caractérisation des métabolites issus des extraits totaux 127
II.1.1. Obtention des métabolites 127
II.1.2. Caractérisation structurale des métabolites 132
II.1.2.1. Analyse structurale du composé **Ta1** 132
II.1.2.2. Analyse structurale du composé **Ta2** 135
II.1.2.3. Analyse structurale du composé **Ta3** 138
II.1.2.4. Analyse structurale du composé **Ta4** 143
II.1.2.5. Analyse structurale du composé **Ta5** 145
II.1.2.6. Analyse structurale du composé **Ta6** 150
II.1.2.7. Analyse structurale du composé **Ta7** 155
II.1.2.8. Analyse structurale du composé **Ta8** 157
II.2. Activité anti-adhésion 157

Chapitre IV : Interactions algues / bactéries

I. Observation des biofilms à la surface de *T. atomaria* 165
II. Métabolome de surface 169
II.1. Optimisation du protocole d'extraction des molécules de surface 169
II.2. Identification des métabolites de surface 174
II.3. Développement méthodologique des analyses métabolomiques 178
II.3.1. Optimisation de la méthode d'analyse chromatographique 178
II.3.2. Extraction et pré-traitement des données 178
II.3.3. Analyses statistique des données 180
III. Variabilité saisonnière du métabolome de surface et des communautés bactériennes associées à la surface de *T. atomaria* 185
III.1. Du métabolome de surface 185
III.2. Evolution des communautés bactériennes associées à la surface 188
IV. Bactéries associées à la surface 195
IV.1. Isolement des bactéries associées à la surface 195
IV.1.2. Isolement, mise en cultures et obtention du souchier bactérien 195
IV.1.2. Sélection des souches pour l'étude 196
IV.1.3. Optimisation des paramètres d'adhésion en microplaque pour les cinq souches sélectionnées pour les bio-essais 200
IV.2. Caractérisation et identification d'une sélection de souches isolées à la surface de *T.atomaria* 203
IV.2.1. Caractérisation morphologique 203
IV.3. Caractérisation des extraits bruts des souches sélectionnées 206
IV.3.1. Obtention des extraits bruts 206
IV.3.2. Analyses chromatographiques et spectrales des extraits bactériens 207
V. Contrôle du biofilm bactérien chez *T. atomaria* 212
V.1. Rôle écologique des molécules de surface *vs* molécules de l'extrait brut total 212
V.2. Rôle écologique des molécules des extraits bactériens isolés des souches associées à la surface de l'algue 214

Conclusion 223
Perspectives 231

Références bibliographiques 239
Annexes 273

Liste des figures

Figure 1 : Exemples d'algues épiphytées et d'autres non épiphytées dans le milieu marin ..... ……9
Figure 2 : Etapes de formation d'un biofilm bactérien sur une surface immergée.....13
Figure 3 : Bio-salissures présentes sur des structures marines 14
Figure 4 : Description des différentes étapes nécessaires à la réalisation du bio-essai anti-adhésion en microplaques 96 puits.....26
Figure 5 : Arbre phylogénétique de la famille des Dictyotaceae 28
Figure 6 : Description des différentes classes de terpènes et de leurs précurseurs.....30
Figure 7 : Des espèces d'algues brunes appartenant au genre *Dictyota* 31
Figure 8 : Principaux groupes de diterpènes cycliques biosynthétisés par les différentes espèces de *Dictyota* 33
Figure 9 : Exemples de diterpènes appartenant au groupe **I** 33
Figure 10 : Exemples de dolabellanes appartenant au groupe **IIA**.....33
Figure 11 : Exemples de dolastanes appartenant au groupe **IIB** 34
Figure 12 : Exemples de 'xenianes et des dichotomanes appartenant au groupe **III** 34
Figure 13: L'algue brune *Taonia atomaria* 35
Figure 14 : Quelques exemples de méroditerpènes isolés de *T. atomaria* 37
Figure 15 : Quelques exemples de sesquiterpènes et d'autres types de composés terpéniques isolés de *T. atomaria* 39
Figure 16 : Surfaces de différentes espèces d'algues recouvertes par des épibiontes 40
Figure 17 : Pourcentage des phyla bactériens rencontrés à la surface des macro-algues 42
Figure 18: Représentation schématique des facteurs susceptibles d'influencer la formation d'un biofilm à la surface des macro-algues 45
Figure 19 : Surfaces d'organismes marins recouvertes par des épibiontes 46
Figure 20 : Vue d'ensemble des interactions bénéfiques (en vert) et préjudiciables (en rouge) entre les macro-algues et les bactéries 48
Figure 21 : Exemples de structures de furanones halogénés 57
Figure 22 : Observation au microscope à épifluorescence de la surface de *D. pulchra*.....61
Figure 23 : Localisation de deux sites de collecte des algues…….69
Figure 24 : Schéma explicatif du protocole d'extraction des métabolites de surface par la méthode de trempage. 74
Figure 25 : Schéma de la disposition des échantillons d'algues dans une plaque 24 puits pour le marquage de viabilité cellulaire 76
Figure 26 : Schéma explicatif du protocole d'extraction des extraits bruts bactériens 86
Figure 27 : Spectres d'excitation et d'émission des trois fluorochromes utilisés.....88
Figure 28 : Schéma d'ensemencement des microplaques pour le bio-essai anti-adhésion 90
Figure 29 : Variété morphologique des espèces de *Dictyota* collectées à Carqueiranne 104
Figure 30 : Etapes d'obtention du composé **Ds1** à partir de *Dictyota* sp. (échantillon A) 105
Figure 31 : Chromatogramme CLHP de la fraction **17** de *Dictyota* sp. (échantillon A).....105
Figure 32 : Etapes d'obtention des composés **Ds2-Ds5** à partir de *Dictyota* sp. (échantillon B).....106
Figure 33 : Chromatogramme CLHP de la fraction **7** de *Dictyota* spp. (échantillon B) 107
Figure 34 : Structure chimique du composé **Ds1**. 108
Figure 35 : Structure chimique du composé **Ds2** 110
Figure 36 : Structure chimique du composé **Ds3** 112

Figure 37 : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ds4** ($CDCl_3$, 400MHz) 116
Figure 38 : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ds4** ($CDCl_3$, 100MHz) 117
Figure 39 : Principales corrélations RMNobservées pour le composé **Ds4** 115
Figure 40 : Structure chimique du composé **Ds4** 115
Figure 41 : Structure chimique du composé **Ds5** 120
Figure 42 : Capacités en anti-adhésion (CE_{50}) des composés **Ds1**-**Ds3** et **Ds5** contre trois souches bactériennes marines (D41, 4M6 et TC5) 123
Figure 43 : Variété morphologique de *T. atomaria* collectée à Carqueiranne 128
Figure 44 : Etapes d'obtention des composés purs à partir de *T. atomaria* (échantillon C).....129
Figure 45 : Chromatogramme CLHP CLHP de la fraction 7 de *T. atomaria* (échantillon C) 129
Figure 46 : Chromatogramme CLHP de la fraction 8 de *T. atomaria* (échantillon C).....130
Figure 47 : Chromatogramme CLHP de la fraction 9 de *T. atomaria* (échantillon C).....130
Figure 48 : Etapes d'obtention des composés purs à partir de *T. atomaria* (échantillon D) 131
Figure 49 : Chromatogramme CLHP de la fraction 14 de *T. atomaria* (échantillon D) 131
Figure 50 : Chromatogramme CLHPde la fraction 15 de *T. atomaria* (échantillon D) 132
Figure 51 : Chromatogramme CLHP de la fraction 16 de *T. atomaria* (échantillon D) 132
Figure 52 : Structure chimique du composé **Ta1** 133
Figure 53 : Structure chimique du composé **Ta2** 136
Figure 54 : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ta3** ($CDCl_3$, 400MHz) 140
Figure 55 : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ta3** ($CDCl_3$, 100MHz) 141
Figure 56 : Principales corrélations observées en RMN 2D pour le composé **Ta3**.....139
Figure 57 : Structure chimique du composé **Ta3** 139
Figure 58 : Structure chimique du composé **Ta4** 143
Figure 59 : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ta5** ($CDCl_3$, 400MHz) 146
Figure 60 : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ta5** ($CDCl_3$, 100MHz) 147
Figure 61 : Principales corrélations observées en RMN 2D pour le composé **Ta5**.....148
Figure 62 : Structure chimique du composé **Ta5** 148
Figure 63 : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ta6** ($CDCl_3$, 400MHz) 151
Figure 64 : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ta6** ($CDCl_3$, 100MHz) 152
Figure 65 : Principales corrélations observées en RMN 2D pour le composé **Ta6**.....153
Figure 66 : Structure chimique du composé **Ta6** 153
Figure 67 : Structure chimique du composé **Ta7** 155
Figure 68 : Capacités en anti-adhésion (CE_{50}) de biocides de référence et des composés Ta2, Ta4-Ta6 et Ta8 vis-à-vis de cinq souches bactériennes marines 158
Figure 69 : Observation du biofilm associé à la surface de *T. atomaria* par MEB 167
Figure 70 : Observation du biofilm associé à la surface de *T. atomaria* par AFM 168
Figure 71 : Observation du biofilm associé à la surface de *T. atomaria* en microscopie à épifluorescence.....169
Figure 72 : Cellules vivantes (témoin négatif) et cellules mortes (témoin positif) marquées au DAPI (60 µM) et visualisées à l'aide d'un microscope à épifluorescence.....171
Figure 73 : Progression de la lyse cellulaire de surface en fonction du temps d'exposition des morceaux de thalles de *T. atomaria* au méthanol (MeOH).....172
Figure 74 : Visualisation par microscope à épifluorescence de la lyse cellulaire au niveau des échantillons d'algues exposées au méthanol à différents temps.....172
Figure 75 : Progression de la lyse cellulaire de surface en fonction du temps d'exposition des morceaux de thalles de *T. atomaria* au mélange méthanol/dichlorométhane.....173

Figure 76 : Analyse par CLHP (détection DEDL : zoom de la zone allant de 25 à 47 min) des extraits surfaciques aux différents temps d'extraction (chromatogrammes du bas) et de l'extrait brut total de *T. atomaria* 175
Figure 77 : Identification du composé majoritaire de surface, par comparaison des chromatogrammes GC-MS de l'extrait brut (**A**) des extraits surfaciques (**B** et **C**) à ceux des produits purs de *T. atomaria* (**D**) 176
Figure 78 : Exsudation du composé majoritaire de surface par l'algue incubée pendant 12h (**C**) et 24 (**D**) : comparaison de leurs spectres de masse (EIC, m/z 205) avec celui de l'un extrait de surface dichlométhanolique (**A**) et l'eau de mer, témoin (**B**) 177
Figure 79 : Chromatogrammes obtenus par CLHP-SM en mode (+)-ESI pour l'extrait brut de *T. atomaria* ainsi que pour ses extraits méthanoliques de surface aux cinq temps d'exposition.....179
Figure 80 : Analyse par ACP des signatures chimiques obtenues à partir d'échantillons de *T. atomaria* prélevés en juillet 2013.....182
Figure 81 : Représentation par ACP correspondant à (**A**) la discrimination entre l'extrait brut et les extraits surfaciques MeOH/CH_2Cl_2 et à (**B**) à la différenciation entre ces extraits surfaciques aux différents temps d'extraction (exemple : juin 2013). 183
Figure 82 : Analyse par ACP correspondant aux signatures chimiques des extraits surfaciques méthanoliques (15s). (**A**) Vue général montrant la discrimination du mois de février et (**B**) agrandissement montrant la distinction entre les échantillons prélevés les autres mois 186
Figure 83 : Variation saisonnière de la signature de l'extrait surfacique méthanolique 15s 188
Figure 85 : quantités mensuelles d'ADN total présent à la surface de *T. atomaria* 189
Figure 83 : Gel DGGE des produits de PCR des biofilms présents à la surface de *T. atomaria* de tous les mois étudiés 191
Figure 86 : Représentation par MDS des variations intra-(1,2 et 3), inter-thalles (A,B et C) et mensuelles (février F, avril A et juillet J) des communautés bactériennes de surface de *T. atomaria*prélevée à Carqueiranne.....192
Figure 87 : Représentation par MDS de la matrice de dissimilarité correspondant aux communautés bactériennes présentes à la surface de *T. atomaria* des six mois (février-juillet 2013).....193
Figure 88 : Isolement de souches bactériennes issues de la surface de *T. atomaria* et mise en culture sur milieux gélosés 196
Figure 89 : Capacité d'adhésion au polystyrène des souches de *T. atomaria* 197
Figure 90 : Courbes de croissance des dix souches isolées à partir de la surface de *T. atomaria* et sélectionnées pour ces travaux de thèse 199
Figure 91 : Détermination de l'intensité de fluorescence (IF) en fonction de la densité d'ensemencement (DO_{600nm}) pour les cinq souches choisies pour les bio-essais en anti-adhésion.....201
Figure 92 : Détermination des critères morphologiques macroscopiques (Boîtes de Pétri) des dix souches sélectionnées pour l'étude.....204
Figure 93 : Détermination des critères morphologiques microscopiques (MEB) des dix souches sélectionnées pour l'étude 205
Figure 94 : Rendements d'extraction pour les dix souches de bactéries isolées à la surface de *T. atomaria* 206
Figure 95 : Analyse par ACP correspondant aux extraits bactériens de dix souches isolées de la surface de *T. atomaria* (PO : phase organique et C : culot) en présence du milieu de culture (VNSS)209
Figure 96: Chromatogrammes obtenus par CLHP-SM en mode (+)-ESI pour le VNSS (A), les surnageants (PO) deTC48 (B) et TC50 (C).....210
Figure 97: Chromatogrammes obtenus par CLHP-SM en mode (+)-ESI pour les surnageants (PO) de TC32 (A) et TC55 (B).....210

Figure 98 : Chromatogrammes obtenus par CLHP-SM en mode (+)-ESI pour les culots (C) de TC48 (A) et TC50 (B). 211
Figure 99: Chromatogrammes obtenus par CLHP-SM en mode (+)-ESI pour les les culots (C) de TC32 (A) et TC55 (B). 211
Figure 100 : Activité anti-adhésion (CE_{50}) de biocides de référence (TBTO et Zineb) et de composés de *T. atomaria* vis-à-vis deux groupes de souches bactériennes marines 214
Figure 101 : Capacités anti-adhésion (CE_{50}) d'extraits (C : culot et PO surnageant) de dix souches bactériennes isolées à partir de la surface de *T. atomaria* vis-à-vis trois bactéries marines de référence 216

Liste des tableaux

Tableau 1: Produits naturels à effet antifouling et anti-biofilm isolés à partir d'algues et de bactéries marines 18
Tableau 2 : Phyla bactériens associés à la surface des macro-algues marines 43
Tableau 3 : Protocoles utilisés pour l'extraction des métabolites de surface 60
Tableau 4 : Données relatives aux différents marqueurs vitaux utilisés 75
Tableau 5 : Données relatives aux cinq souches bactériennes marines de référence 81
Tableau 6 : Programme PCR.....96
Tableau 7 : Comparaison des données RMN du composé **Ds1** avec celles de la littérature 109
Tableau 8 : Comparaison des données RMN du composé **Ds2** avec celles issues de la littérature.....111
Tableau 9 : Comparaison des données RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **Ds3** avec celles issues de la littérature 113
Tableau 10 : Données RMN 1D et 2D du composé **Ds4** 118
Tableau 11 : Comparaison des données RMN du composé **Ds5** avec celles de la littérature 121
Tableau 12 : Activité anti-adhésion (CE_{50}), inhibition de croissance (CI_{50}) et mortalité (CL_{50}) des composés Ds1-Ds3 et Ds5 et de quatre biocides standards vis-à-vis de trois souches bactériennes marines (D41, 4M6 et TC5) 126
Tableau 13 : Comparaison des données RMN du composé **Ta1** avec celles issues de la littérature ..134
Tableau 14: Comparaison des données RMN du composé **Ta2** avec celles issues de la littérature ..137
Tableau 15 : Données RMN 1D et 2D du composé **Ta3** 142
Tableau 16: Comparaison des données RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **Ta4** avec celles issues de la littérature 144
Tableau 17 : Données RMN 1D et 2D du composé **Ta5** 149
Tableau 18 : Données RMN 1D et 2D du composé **Ta6** 154
Tableau 19 : Comparaison des données RMN du composé **Ta7** avec celles issues de la littérature .156
Tableau 20 : Activité anti-adhésion (CE_{50}), inhibition de croissance (CI_{50}) et mortalité (CL_{50}) des composés Ta2, Ds4, Ds5 et Ds6 et de deux biocides standards contre cinq souches bactériennes marines 160
Tableau 21 : Illustration d'une matrice issue du pré-traitement d'analyses par CLHP-SM d'une série d'échantillons *T. atomaria* 180
Tableau 22 : Résultats des tests de Mantel portant sur la corrélation entre les matrices de dissimilarité des métabolomes de surface réduit ou non.....184
Tableau 23 : Suivi de l'intégrité membranaire (échantllions traités au MeOH) de mars à avril par comptage au microscope à épifluorescence 187
Tableau 24: Richesse spécifique (nombre d'OTU ± écart-type) sur les thalles de *T. atomaria* de février à juillet 2013 à Carqueiranne.....193
Tableau 25 : Détermination des paramètres de croissance des souches isolées à partir de la surface de *T. atomaria* (n=3) 200

Liste des abbréviations

AcOEt	Acétate d'éthyle
AF	Acide formique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr 16S	ADN ribosomal 16S
ANOVA	ANalysis Of Variance
APS	Ammonium PerSulfate
ASW	Artificial Sea Water
AFM	Atomic Force Microscopy
$CDCl_3$	Chloroforme deutéré
CE_{50}	Concentration effective d'inhibition à 50%
$CHCl_3$	Chloroforme
CH_2Cl_2	Dichlorométhane
CI_{50}	Concentration inhibitrice à 50%
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CL_{50}	Concentration létale qui provoque 50% de mortalité de la population considérée
COSY	*COrrelated SpectroscopY*
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CuPT	Pyrithione de Cuivre
DAPI	4'6'-diamidino-2-phénylindole
DEDL	Détecteur Evaporatif à Diffusion de la Lumière
DEPT	*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*
DGGE	*Denaturating Gradient Gel Electrophoresis* (Electrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité Optique
EDTA	Ethylène Diamine TétraAcétique
EI	*Electronic Impact* (Impact éléctronique)
ESI	*ElectroSpray Ionization* (ionisation par électronébulisation)
ESI-MS	*ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometry* (Spectrométrie de masse à ionisation par électronébulisation)
EPS	*ExoPolymeric Substances*
FDA	Fluorescein DiAcetate
GBL	Gamma ButyroLactone
GC-MS	*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HR/ESI-MS	*High Resolution Electro Spray Ionization-Mass Spectrometry* (Spectrométrie de masse à haute résolution avec ionisation par électronébulisation)
HSQC	*Heteronuclear Single Quantum Correlation*
H_2O	Eau
IF	Intensité de Fluorescence
IMO	*International Maritime Organisation* (Organisation Maritime Internationale)
IT	*Ion Trap* (trappe à ions)

LC-MS	*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*
MCBL	Microscopie Confocale à Balayage Laser
MDS	*Multi Dimentional Scale*
MeCN	Acétonitrile
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MeOH	Méthanol
NOESY	*Nuclear Overhauser SpectroscopY*
NaCl	Chlorure de sodium
NSS	Nine-Salt Solution
OTU	*Operational Taxonomic Units* (Unités taxinomiques opérationnelles)
PBS	*Phosphate Buffered Saline* (Tampon phosphate)
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (Réaction en chaine par polymérase)
PFA	Paraformaldéhyde
ppm	Partie par million
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SPE	*Solid Phase Extraction* (Extraction en phase solide)
TAE	Tris, Acétate, EDTA
TBTO	*TriButylTin Oxide* (Oxyde de tributylétain)
TBT	Tributylétain
TC	*Toulon Collection* (collection de Toulon)
t_R	Temps de Rétention
VNSS	*Väätänen Nine Salt Solution*
Zineb	Zinc éthylène-*bis*-dithiocarbamate
ZnPT	Pyrithione de Zinc

Introduction générale

Les micro-organismes marins témoignent de modes de vie très contrastés ; on distingue, par exemple, des organismes planctoniques qui se déplacent librement dans la colonne d'eau et d'autres organismes sessiles vivant en associations complexes. Ces associations appelées biofilms correspondent à la colonisation de surfaces immergées inertes ou vivantes, et sont caractérisées par la production d'une matrice exopolymérique. Les biofilms sont reconnus depuis de nombreuses années comme le mode de développement prépondérant des bactéries dans les environnements aquatiques. Lorsqu'à ce phénomène se superpose la colonisation par des macro-organismes (spores de macro-algues, larves d'invertébrés,…etc), on parle alors d'un processus global naturel appelé biofouling.

Le biofouling constitue un véritable problème par rapport aux activités humaines car générant des surcoûts économiques importants et présentant un impact environnemental non négligeable. Il engendre, par exemple, de nombreux dommages aux structures artificielles immergées, parmi lesquels la dégradation des matériaux liée à un risque de corrosion accru, l'augmentation de la consommation en carburant des bateaux, la diminution des échanges thermiques dans les circuits de refroidissement,…etc. L'effet global de ce phénomène conduit à une baisse des performances industrielles et à une diminution du temps de vie des matériaux. Ainsi des procédures de nettoyage et de prévention vis-à-vis dela formation du biofouling sont mises en place mais elles nécessitent des coûts d'exploitation élevés (Yebra et al., 2004). Les procédés de lutte antifouling développés par le passé, s'ils ont témoigné d'une certaine efficacité, se sont avérés nocifs pour des organismes non-ciblés de l'environnement marin. Les dommages écologiques en résultant ont ainsi conduit les autorités compétentes à interdire définitivement l'utilisation des produits toxiques les plus efficaces en antifouling, notamment les dérivés organométalliques tels que l'oxyde de tributylétain (TBTO). La recherche et le développement de solutions alternatives « éco-respectueuses » permettant de remédier à cette problématique constituent donc un enjeu majeur aussi bien d'un point de vue scientifique que sur les plans écologique et économique.

Parmi les voies envisagées à cet effet, l'approche biomimétique constitue un domaine de recherche qui allie à la fois un aspect fondamental conduisant à une meilleure compréhension des mécanismes de défense chimique développés par certains organismes marins, peu colonisés dans leur milieu naturel, pour se défendre vis-à-vis du biofouling et un aspect plus appliqué visant à proposer de nouveaux agents antifouling non-toxiques et plus sélectifs basés sur des architectures moléculaires inspirées de la nature.

Ainsi, les macro-algues connues à la fois pour produire un grand nombre de métabolites secondaires présentant un large spectre d'activités biologiques, et dans certains cas, pour leur faible colonisation de surface, constituent des cibles de choix pour développer une telle approche. Les premiers travaux portant sur la recherche de substances naturelles actives en antifouling issues de macro-algues ont été menés principalement sur des extraits bruts ou des fractions. Cependant, au cours de ces dernières années, une attention plus particulière a été accordée à la caractérisation de composés purs (Bhadury & Wright, 2004 ; Fusetani, 2004, 2011) car les mélanges peuvent rendre complexes de telles études du fait de l'existence de possibles effets antagonistes ou synergiques. Au sein des macro-algues, les algues brunes, et plus particulièrement celles appartenant à la famille des Dictyotacées, font partie des espèces dont la composition chimique été la plus étudiée pour la description d'activités biologiques des molécules isolées, mais également pour la détermination de leurs fonctions écologiques, et en particulier de leur rôle antifouling.

La famille des Dictyotacées renferment en effet des espèces particulièrement riches en terpènes bioactifs, certains d'entre eux présentant des propriétés antifouling vis-à-vis d'un large éventail d'organismes marins (Schmitt et al., 1995 ; Schmitt et al., 1998 ; Kim et al., 2006 ; Barbosa et al., 2007 ; Viano et al., 2009). Néanmoins, la plupart de ces composés n'ont pas été démontrés comme pertinents écologiquement car il manque souvent une description de leur localisation (à la surface ou au sein des cellules) et de leur quantification (concentration naturelle suffisante ou non pour éliminer les organismes colonisateurs) au niveau des thalles. Ainsi, plusieurs équipes ont initié récemment des travaux portant sur l'analyse et la compréhension du rôle écologique de molécules de surface, tentant ainsi de donner une interprétation convaincante de ce qui se passe réellement dans les écosystèmes marins à l'interface algue/biofilm associé (de Nys et al., 1998 ; Dworjanyn et al., 1999 ; Steinberg & de Nys, 2002 ; Dworjanyn et al., 2006 ; Brock et al., 2007 ; Nylund et al., 2007 ; Lachnit et al., 2010 ; Saha et al., 2011 ; Thabard et al., 2011).

Objectifs

L'enjeu principal de ces travaux de thèse vise à mieux appréhender les mécanismes de médiation chimique entre des organismes-modèles, des macro-algues méditerranéennes de la famille des Dictyotacées (*Dictyota* spp. et *Taonia atomaria*), et les communautés de bactéries associées à leurs surfaces.

Les travaux réalisés durant cette thèse sont décrits au travers de quatre chapitres.

Le premier chapitre consiste en une synthèse bibliographique présentant le phénomène de biofouling et les deux modèles d'algues sélectionnés, ainsi que les différents types d'interactions qui peuvent exister entre les macro-algues et leurs biofilms associés.

Le second chapitre expose les différents matériels et méthodes développés pour mener à bien les travaux décrits par la suite.

Les deux derniers chapitres présentent les résultats obtenus et s'articulent en deux volets principaux :

i) Le premier décrit l'isolement et la caractérisation structurale des principaux phytoconstituants des deux espèces d'algues étudiées (*Dictyota* spp. et *Taonia atomaria*) et des propriétés en anti-adhésion des composés décrits vis-à-vis de bactéries marines isolées de biofilms sur surfaces artificielles (et dites de « référence » dans la suite du manuscrit).

ii) Le deuxième volet correspond, dans un premier temps, à la mise en place de méthodologies dédiées à l'analyse du métabolome de surface de l'algue *T. atomaria*. Dans un second temps, un suivi saisonnier, portant à la fois sur la composition chimique de surface ainsi que sur les communautés bactériennes associées à cette même algue, est présenté. L'isolement et la caractérisation d'une sélection de souches de bactéries associées à la surface de *T. atomaria* et une première évaluation de leur production chimique constitue la troisième partie de ce chapitre. Enfin, la dernière partie traite du contrôle du biofilm bactérien par *T. atomaria* via l'étude des propriétés en anti-adhésion de ses métabolites (métabolome de surface *vs* métabolome total) vis-à-vis de deux panels de bactéries (bactéries associées *vs* bactéries de référence), mais aussi de l'activité des extraits des bactéries de surface vis-à vis de l'anti-adhésion des souches de référence.

Chapitre I

Etude bibliographique

Comme la majorité des organismes marins, les macro-algues sont sujettes au phénomène de biofouling. Cependant quelques taxons sont capables de conserver leur surface peu épiphytée à l'échelle macroscopique. En même temps elles interagissent de diverses façons avec les bactéries qui tentent d'adhérer à leur surface. Ces interactions sont contrôlées par différents types de mécanismes et de stratégies implicant des facteurs variés (biologiques, chimiques, physiques, écologiques, …).

Pour cette revue bibliographique, nous commencerons, dans une première partie, par décrire le phénomène de biofouling dans le milieu marin, en exposant les problèmes économiques et écologiques qui y sont liés et les solutions proposées. La deuxième partie sera dédiée à l'étude des interactions entre les macro-algues marines et leurs bactéries épiphytes. Tout d'abord, un aperçu général sur les biofilms associés aux organismes marins sera décrit, puis les différents types de médiations entre les macro-algues et les bactéries associées à leur surface seront détaillés. Enfin, une attention particulière sera accordée à la description de l'approche métabolomique qui servira pour une large part à ces travaux de thèse. La dernière partie sera consacrée à la présentation des espèces d'algues modèles et à un bilan de leur chimiodiversité.

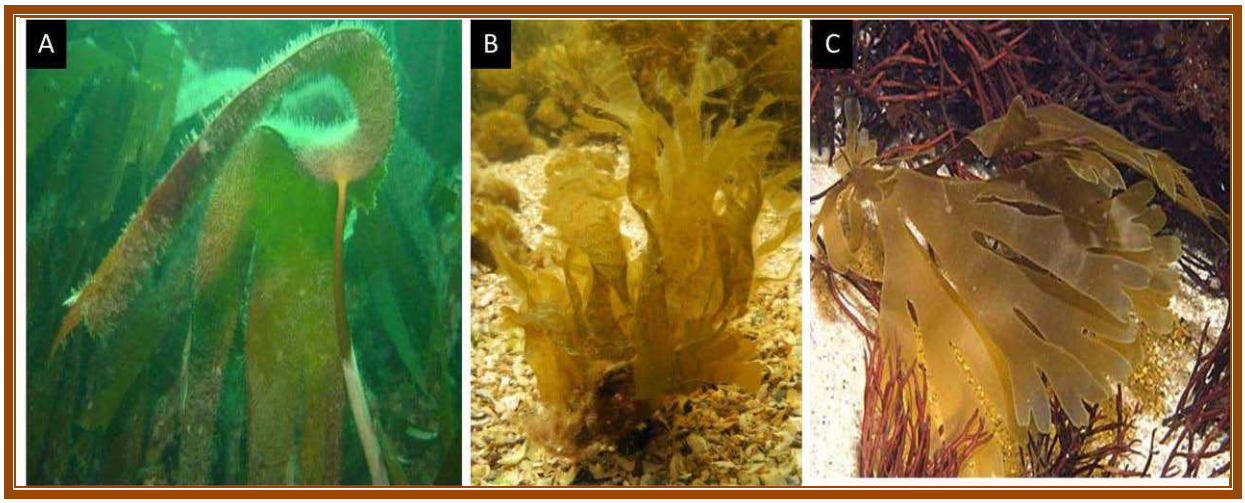


Figure 1 : Exemples d'algues épiphytées (**A** : *Laminaria hyperborea* : algue épiphytée à l'échelle macroscopique) et d'autres non épiphytées en milieu marin [**B** : *Taonia atomaria* : algue non épiphytée à l'échelle macroscopique (source : http://www.seaweed.ie/descriptions/*Taoniaatomaria*.php) et **C** : *Dictyota dichotoma* : algue non épiphytée à l'échelle macroscopique (source : http://www.habitas.org.uk/marinelife/species.asp? item=ZR4570)].

I. Biofouling et applications antifouling

I.1. Description du phénomène de biofouling : Notion de biofilm

Le phénomène de biofouling correspond à la colonisation de toute surface immergée dans un environnement aquatique (eaux douces ou salées) par des communautés vivantes structurées allant des micro- aux macro-organismes (Wahl, 1989 ; Watnick & Kolter, 2000 ; Kolter & Greenberg, 2006). Les ensembles de micro-organismes incluent des procaryotes (archées et bactéries marines) et des eucaryotes unicellulaires (protozoaires, champignons, micro-algues,…etc). Ces communautés complexes sont insérées dans une matrice polymérique extracellulaire protectrice, produite par les bactéries et les diatomées (Ballard et al., 2008), et composée majoritairement d'exopolysaccharides et de protéines. Les macro-colonisateurs les plus communément observés sont des végétaux, tels que des macro-algues et des phanérogames marines, et des animaux, tels que des éponges, des bryozoaires, des petits crustacés, des vers marins, des mollusques, des arthropodes et des cnidaires.

I.1.1. Biofilm : Définition et historique

La découverte des biofilms a été attribuée à Van Leeuwenhoek (1632-1723), qui a observé vers 1683 avec son microscope primitif des communautés de micro-organismes à la surface des dents (Donlan, 2002). Dans les années 30, des observations réelles de biofilms ont été réalisées par Zobell, dont les travaux ont abouti à l'élaboration du concept d'adhésion bactérienne (Zobell & Allen, 1933 ; Zobell & Allen, 1935). Plus tard, Zobell a également remarqué que le nombre de bactéries sur les surfaces immergées était nettement plus élevé que dans l'eau de mer environnante (Zobell, 1943). La notion de biofilm a été proposée pour la première fois par Costerton et al. (1978). Depuis, il est devenu clairement établi que la majeure partie des micro-organismes existait sous forme d'agrégation sessile dans de nombreux écosystèmes (Costerton et al., 1995 ; Costerton, 2007 ; Ballard et al., 2008). Avec le temps et avec l'évolution des moyens de recherche, la définition d'un biofilm n'a cessé d'évoluer et de varier d'un auteur à un autre. Characklis & Cooksey (1983) l'ont défini comme une collection de cellules et de leurs produits adhérés sur une surface. Puis, Van der Wende et al. (1989) l'ont décrit comme des associations de micro-organismes enrobées dans une matrice d'exopolymères. Bourion et al. (1996) le définissent comme une communauté microbienne inclue dans une matrice fibreuse de polymères extracellulaires et immobilisée sur une surface.

La définition de Flemming (1998) décrit les biofilms comme des agglomérats complexes de micro-organismes. Selon Donlan & Costerton (2002), un biofilm est une communauté microbienne sessile qui existe sous forme de cellules attachées de manière irréversible à un substrat ou à une interface et conditionnées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires. D'après Ghannoum & O'Toole (2004), les biofilms sont des accumulations multi-espèces sur des surfaces et sont habituellement enfermés dans une matrice extracellulaire. Ils évoluent d'une structure de monocouches de cellules dispersées à une structure sous forme de mucus épais. Les biofilms aujourd'hui sont vus comme un ensemble de micro-colonies entourées d'une matrice hautement hydratée, anionique et constituée d'exopolymères (EPS, *ExoPolymeric Substances*) (Lahaye, 2006).

Au cours de ces dernières décennies, d'importants progrès ont été réalisés dans la compréhension des biofilms, en particulier dans des contextes industriels et écologiques. La microscopie confocale à balayage laser (MCBL) (Caldwell et al., 1992 ; de Beer et al., 1997) et la microscopie électronique à balayage (MEB) (Steinberg et al., 1997 ; Donlan, 2002 ; Salaün et al., 2012) ont permis l'observation in *situ* de la structure tridimensionnelle complexe des cellules formant un biofilm. Des précisions supplémentaires ont été apportées suite à la découverte de nouvelles techniques moléculaires et d'imagerie, notamment l'étude de la phylogénie des micro-organismes par séquençage de l'ADNr 16S, le clonage-séquençage de l'ADN des communautés de bactéries, et l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) qui ont rendu possible la caractérisation des organismes formant un biofilm (Costerton et al., 1995 ; Allison et al., 2000 ; Wimpenny et al., 2000 ; Doyle, 2001 ; Stoodley et al., 2002 ; Almeida et al., 2007 ; Dige et al., 2007 ; Almeida et al., 2011).

I.1.2. Formation et écologie du biofilm primaire

Pour les bactéries, le processus de passage d'un mode de vie planctonique libre à un mode sessile est complexe. La description de ce phénomène nécessite l'intervention conjointe de plusieurs disciplines notamment la microbiologie, la biologie cellulaire, la génétique, l'écologie chimique et la physico-chimie.

Lors de ce processus global, les bactéries passent par cinq étapes essentielles : la formation du film conditionnant, l'adhésion dite réversible, l'adhésion irréversible, la maturation et le détachement (Wahl, 1989 ; Abarzua & Jakubowski, 1995 ; Filloux & Vallet, 2003) (Figure 2).

Le film conditionnant, dit aussi film primaire, constitue l'étape initiale de la formation d'un biofilm mature. Il consiste en l'adsorption spontanée, quelques secondes après l'immersion du support, de molécules organiques et d'ions, favorisant ainsi l'attachement bactérien. Les propriétés physico-chimiques de surface jouent un rôle déterminant dans cette première étape en termes de sélection des bactéries pionnières et de leur cinétique d'adhésion. L'étape suivante concerne l'adhésion bactérienne proprement dite. Une fois le support conditionné, les bactéries peuvent s'en approcher de deux façons. La première, dite passive, correspond à la rencontre aléatoire des bactéries planctoniques avec le support. Le deuxième processus, dit actif, est basé sur des stratégies développées par les bactéries elles-mêmes pour s'approcher de la surface, telles que le chimiotactisme et l'utilisation d'appendices de locomotion tels que les flagelles et les pili (O'Toole & Kolter, 1998 ; Harshey, 2003 ; Klausen et al., 2003 ; Verstraeten et al., 2008). Suite au recrutement des bactéries sur le support, une première adhésion bactérienne appelée adhésion réversible est mise en place. Ce phénomène est dû à des interactions de faible énergie (forces de Van der Waals, forces acide-base de Lewis, interactions hydrophobes et forces électrostatiques) et fait intervenir des macromolécules de surface, regroupées sous le terme d'adhésines (flagelles, pili, fimbriae, protéines, polysaccharides, lipopolysaccharides) (O'Toole & Kolter, 1998). De nombreux facteurs environnementaux (pH, osmolarité du milieu, température, disponibilité en nutriments, viscosité, charges ioniques, courant d'eau, sédimentation, …) vont également influer sur cette étape. Cette phase initiale d'adhésion réversible est suivie d'une seconde dite irréversible qui met en jeu des interactions de plus forte énergie (liaisons hydrogènes, liaisons covalentes ou interactions hydrophobes fortes). L'adhésion est rapidement suivie par une phase de croissance bactérienne accompagnée d'une production d'EPS. Ces substances vont renforcer l'adhésion des bactéries, les protéger de l'action d'agents antimicrobiens ou du broutage de prédateurs et faciliter le piégeage des éléments nutritifs indispensables pour leur croissance. Ainsi, des micro-colonies vont se former (Costerton et al., 1999) et seront suivies par l'élaboration d'un biofilm plus ou moins complexe selon les conditions hydrodynamiques, chimiques et la composition en micro-organismes du milieu (Romeo et al., 2008 ; Dobretsov, 2010 ; Wahl et al., 2012). Dans un premier temps, le phénotype des organismes adhérents subit de grands changements dus aux importantes régulations de gènes (Stewart & Franklin, 2008). Dans un second temps, des synthèses protéiques massives vont avoir lieu et le biofilm va entrer en phase de maturation. Cette étape est caractérisée par la formation de grosses colonies appelées agrégats, le biofilm atteignant ainsi son maximum d'épaisseur. Le cycle de vie d'un biofilm finit par un retour des cellules à la phase planctonique et à leur dispersion dans le milieu pour

coloniser de nouvelles niches (Stoodley et al., 1999 ; Hall-Stoodley & Stoodley, 2005 ; Kaplan, 2010). L'intervention d'agents chimiques, tels que des molécules tensio-actives, des enzymes, des dérivés chlorés, des chélateurs ou encore des modificateurs du pH, peut participer au détachement des bactéries ou même à leur mort cellulaire (Haras, 2005).

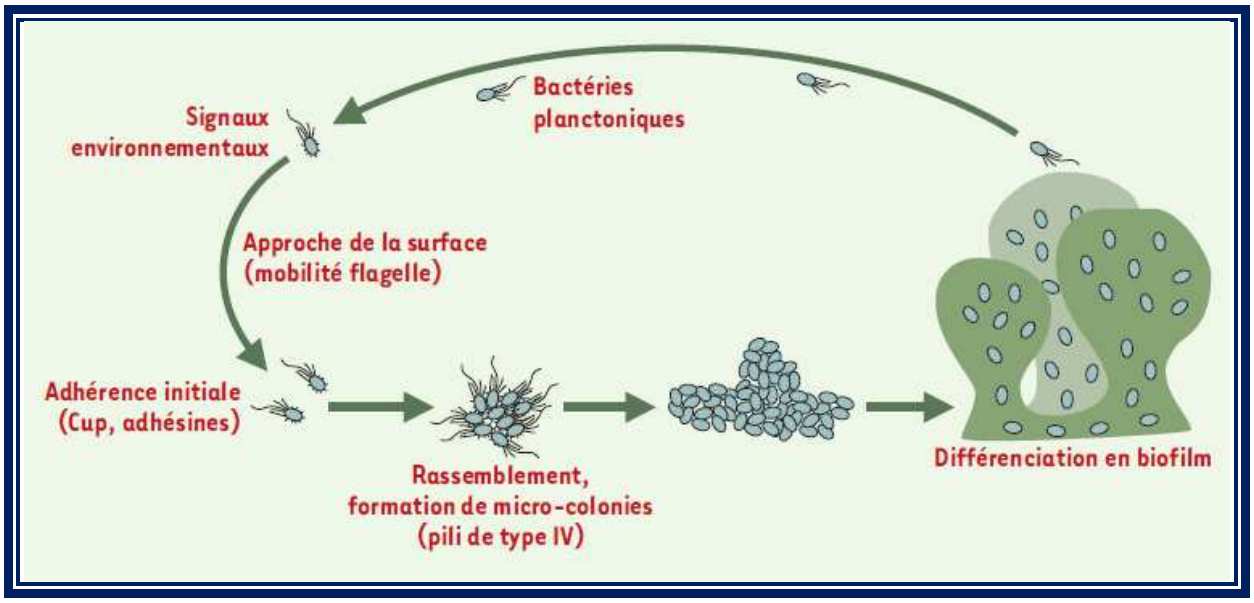


Figure 2 : Etapes de formation d'un biofilm bactérien sur une surface immergée (Filloux & Vallet, 2003)

I.2. Problèmes économiques et écologiques liés au biofouling marin

Toutes les structures « humides », qu'elles soient terrestres ou aquatiques, sont susceptibles d'être colonisées par des micro-organismes sous forme de biofilms puis de macrofouling.

Les structures et les équipements marins sont plus sujets au biofouling que les équipements terrestres, étant donné que les environnements aquatiques sont plus riches en éléments nutritifs que l'air et donc plus propices à la colonisation de surface (Wahl, 1989). Les biofilms marins apparaissent sur des surfaces aussi variées que celles fournies par les coques de bateaux, les plates-formes pétrolières, les pipelines, les pylônes, les structures aquacoles, les structures portuaires … (Figure 3).

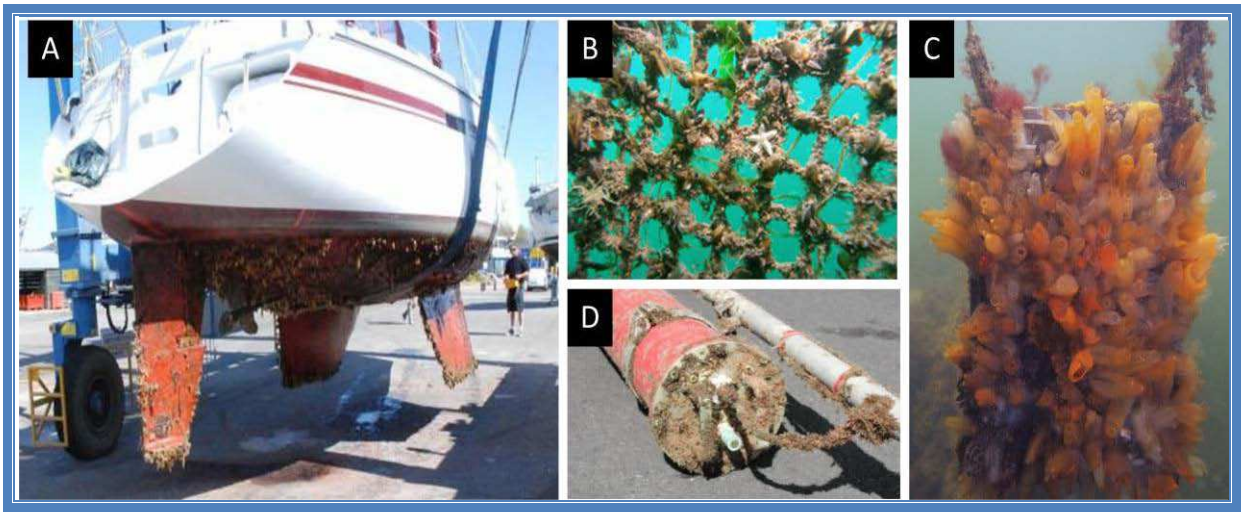


Figure 3 : Bio-salissures présentes sur des structures marines :

(A) Coque de bateau colonisée (source : http://service.vivastreet.com/annonces-service+nice-ouest-06200/nettoyage-de-coque-de-bateau/49107943,
(B) Filet expérimental envahi par des organismes colonisateurs (source : http://www.dfo-mpo.gc.ca/aquaculture/rd2009/rdmisc-divers_11-fra.htm),
(C) Structure expérimentale colonisée par des tuniciers (source : http://www.dfo-mpo.gc.ca/science/enviro/ aquaculture/rd2013/misc-fra.html),
(D) Bouée avec des capteurs colonisés (source : http://www.dt.insu.cnrs.fr/pco2/adaptation_marel.php)

Le biofouling marin peut ainsi avoir des conséquences préjudiciables et coûteuses tant sur le plan économique qu'écologique.

I.2.1. Problèmes économiques

Dans le cas des navires, les salissures entraînent une augmentation de la rugosité de la coque et une résistance à l'avancement lors du déplacement dans l'eau, induisant aussi une surcharge due à la biomasse (Yebra et al., 2004). Pour éviter une perte de vitesse significative des navires, une sur-consommation en carburant est nécessaire, augmentant ainsi les coûts du transport maritime mais aussi sur l'émission de gaz à effet de serre (Characklis & Cooksey, 1983 ; Schultz et al., 2011). Par exemple, un biofilm de 100 µm d'épaisseur entraîne une augmentation de 5 à 15% de la résistance de friction (Characklis & Marshall, 1990). Un biofilm de 1 mm d'épaisseur entraîne une diminution de la vitesse du navire de 15% (Callow, 1986). Les salissures marines peuvent aussi altérer les propriétés des matériaux colonisés par le biais du phénomène de biocorrosion dû à une activité perforante intense de certains types de bactéries telles que les bactéries sulfato-réductrices et les bactéries méthanogènes (Beech & Sunner, 2004 ; La Barre & Haras, 2007 ; Dobretsov et al., 2013). Le biofouling affecte

également d'autres structures marines, en particulier les bouées, les équipements flottants, les pontons,…etc, qui subissent ainsi une surcharge pondérale considérable (Characklis & Cooksey, 1983). Il affecte aussi les instruments de mesure optique immergés qui sont alors affectés par une des dérive de mesures (Kerr et al., 1998).

I.2.2. Problèmes écologiques

Les eaux de ballast sont toujours riches en différentes formes de virus, de bactéries, de planctons, de végétaux et d'animaux, mais aussi de sédiments eux-mêmes colonisés par des biofilms. Lors des différentes étapes du voyage d'un navire, ces eaux sont libérées dans la mer, le long des côtes et dans les différents ports. En conséquence, un mélange diversifié d'organismes est transporté et diffusé dans le monde entier. Plus de 3000 espèces marines voyagent ainsi quotidiennement à travers le monde dans l'eau de ballast des navires (Piola et al., 2009).

En plus des espèces introduites de cette manière, d'autres organismes attachés aux coques des bateaux (micro-organismes, balanes, moules, éponges, algues, ascidies, …) sont également transportés à travers les eaux mondiales et introduits dans de nouveaux écosystèmes (Reise et al., 1999). Le biofouling contribue donc à la modification à l'échelle planétaire des biotopes et des écosystèmes par le biais de l'introduction d'espèces invasives.

I.3. Moyens de lutte contre le biofouling marin

La recherche de solutions alternatives pour enrayer le phénomène de biofouling est un domaine en plein essor ces dernières années. Ainsi, l'approche biomimétique consistant à utiliser des substances naturelles isolées d'organismes marins en tant qu'agents antifouling et le développement des bio-essais en antifouling constituent des thèmes de recherche engendrant une littérature scientifique de plus en plus abondante.

I.3.1. Revêtements antifouling

Les revêtements antifouling ou antisalissures sont les premières solutions appliquées pour protéger les coques des bateaux contre le biofouling. L'efficacité d'un revêtement et sa durabilité sont les critères principaux sur lesquels se base son élaboration.

La plupart de ces revêtements incorporent des biocides qui sont toxiques pour l'environnement et les espèces non-ciblées. L'oxyde de tributylétain (TBTO), par exemple,

s'est avéré efficace dans la prévention du biofouling mais malheureusement son utilisation engendre des problèmes sérieux pour l'environnement à cause de son accumulation importante dans les sédiments et au niveau de certains organismes marins, induisant une forte toxicité (malformations de coquille d'huîtres et phénomène d'imposex chez les gastéropodes en particulier). Cela a conduit à mettre en place une directive pour limiter l'utilisation du TBTO en 2003 (interdiction pour les bateaux de longueur supérieure à 25 m dans la plupart des pays industrialisés), puis son banissement définitif par l'Organisation Maritime Internationale (IMO, *International Marine Organisation*) en 2008. Des revêtements antifouling employant du cuivre et/ou des co-biocides (tels que l'Irgarol 1051, la pyrithione de zinc ou le Sea Nine 211) ont été utilisés comme solutions alternatives au TBTO. Mais ces derniers ont aussi manifesté des effets négatifs sur l'environnement marin (Thomas & Brooks, 2010). En parallèle, de nouvelles approches ont donc été développées. Dans une approche dite « répulsive », basée sur les propriétés physico-chimiques des revêtements, il s'agit d'incorporer des polymères ayant l'avantage d'être plus érodables et/ou biodégradables, de faciliter l'incorporation de biocides, de diminuer la toxicité des revêtements et de contrôler l'érosion de surface et la libération des biocides (Haras, 2005). Dans d'aures cas, la matrice polymère, à base de silice ou de fluor, est capable de minimiser l'énergie de surface des revêtements, favorisant ainsi la désinstallation des espèces colonisatrices. L'approche dite « biomimétique » s'oriente vers la reproduction de texturations de surface bio-inspirées ou vers l'exploitation de produits naturels issus de différents organismes marins.

I.3.2. Une possibilité d'alternatives aux biocides antifouling actuels : les substances naturelles marines

De nombreux chercheurs et industriels se penchent sur la recherche de solutions alternatives qui pourraient se substituer aux actuels revêtements antifouling afin qu'ils soient plus efficaces tout en restant conformes aux critères exigés par l'OMI (large spectre d'activité, faible toxicité pour les mammifères, faible solubilité dans l'eau, absence de bioaccumulation dans le réseau trophique et de persistance dans l'environnement, compatibilité avec les matrices des revêtements et rapport qualité/prix favorable). Parallèlement, ces dernières années, de nombreuses études en écologie chimique ont permis de constater que, dans le milieu naturel, il existe un certain nombre d'organismes marins dont les surfaces sont exemptes de biofouling, au moins à l'échelle macroscopique (Clare, 1996). Ces organismes sont capables de synthétiser un large panel de molécules qui leurs permettent d'éviter l'action des colonisateurs. Ces molécules

ont fait l'ojet de nombreuses études et revues (Fusetani, 2004 ; Qian et al., 2010 ; Fusetani, 2011 ; Dobretsov et al., 2013 ; Egan et al., 2013), surtout durant cette dernière décennie. Des activités antifouling ou antibiofilm ont été démontrées chez de nombreux organismes marins microscopiques (bactéries, champignons) et macroscopiques (algues, éponges, coraux, gorgones,...etc). Ces activités ont été évaluées vis-à-vis de différents genres et espèces d'organismes marins (procaryotes et eucaroytes, unicellulaires et multicellaires, animaux et végétaux) servant d'organismes cibles (Briand, 2009). Le récapitulatif des composés à effets antifouling ou antibiofilm est donné dans le Tableau 1 pour les algues et les bactéries ; les deux types d'organismes en liaison avec notre travail.

Les substances naturelles sont supposées être plus facilement biodégradables que les biocides utilisés actuellement et leur utilisation en tant qu'agents antifouling ne constituerait a priori moins de risques pour l'environnement (Clare, 1998 ; Armstrong et al., 2000). Cependant, à ce jour, il existe très peu de travaux réalisés pour tester leur biodégradabilité ou leur toxicité. Récemment, il a été démontré que la capsaïcine (un alcaloïde terrestre issu des plantes du genre *Capsicum*) est facilement biodégradable avec un faible potentiel d'accumulation dans les sédiments et au niveau des organismes marins. Ce composé présente en outre une faible toxicité vis-à-vis du poisson zèbre *Brachydanio rerio* (Wang et al., 2013). Dans le cas où ces composés se révèlent non toxiques, leur incorporation dans des peintures antifouling pourrait également induire une perte d'activité du fait d'interaction avec la matrice polymérique. Cependant, l'inconvénient majeur de l'utilisation des molécules naturelles est que leur extraction ne peut fournir que de faibles quantités (Qian et al., 2010). Il faut donc envisager en parallèle de leur évaluation pour leur effet antifouling des approches permettant de les synthétiser ou de les produire à échelle industrielle afin de pouvoir les mettre sur le marché à un coût abordable.

Tableau 1: Produits naturels à effet antifouling et anti-biofilm isolés à partir d'algues et de bactéries marines

Organisme	Embranchement	espèce	Composé	Cible	Activité testée	Référence
Algues						
	Chlorophytes					
		Caulerpa flexilis	Flexiline (sesquiterpène)	Bactéries marines et champignons	Inhibition de croissance	(Paul & Fenical, 1986)
		Caulerpa sp.	Caulerpényne (sesquiterpène)	*Hydroides elegans* (polychète)	Anti-adhésion	(Dobretsov et al., 2006a)
				Bactéries marines et champignons	Inhibition de croissance	
				Balanus amphitrite (balane)	Anti-adhésion	
		Ulvaria obscura	Dopamine (acide aminé)	*Strongylocentrotus droebachiensis* (oursin), *Littorina sitkana* (gastéropode) *Idotea wosnesenskii* (isopode)	Activité anti-appétante	(Van Alstyne et al., 2006)
	Phaeophytes					
		Bifurcaria bifurcata	Eleganolone (diterpène) Eleganediol (diterpène)	*Balanus amphitrite* (balane)	Anti-adhésion	(Hellio et al., 2001) (Geraci et al., 2001)
		Canistrocarpus cervicornis	Diterpènes	*Perna perna* (moule africaine)	Anti-adhésion	(Bianco et al., 2009)
		Cystoseira baccata	Meroditerpènes	*Exanthemachrysis gayraliae*, *Cylindrotheca closterium*et *Pleurochrysisroscoffensis*(micro-algues) *Exanthemachrysis gayraliae* (haptophyte) *Sargassum muticum* et *Ulva intestinalis* (macro-algues)	Inhibition de croissance	(Mokrini et al., 2008)
				Echinus esculentus (oursin) et *Crassostrea gigas* (huitre)	Anti-adhésion	
		Dictyota ciliolata	Diterpènes	*Candida albicans* (champignon) *Escherichia coli* et *Staphylococcus*		(Manzo et al., 2009)

		aureus (bactéries)		
Dictyota dichotoma	Diterpènes	Phytoplancton	Activité algicide	(Kim et al., 2006)
Dictyota menstrualis	Dictyol E (diterpène)			(Mokrini et al., 2008)
Dictyota pfaffii	Diterpène	*Perna perna* (moule brune)	Anti-adhésion	(Barbosa et al., 2007)
Dictyota spp.	Dictyol E (diterpène) Pachydictyol A (diterpène) Dictyodial (diterpènes)	*Bugula neritina* (bryozoaire)	Inhibition de la croissance Développement anormal	(Schmitt et al., 1995) (Schmitt et al., 1998)
	Dictyol E (diterpène) Dictyol C (diterpène) Fucoxanthine (caroténoïde)	*Pseudoalteromonas* sp. (bactérie)	Anti-adhésion	(Viano et al., 2009)
Dilophus okamurai	Diterpène	*Haliotis discus hannai* (ormeau)	Inhibition de la métamorphose Anti-adhésion Inhibition de la croissance	(Taniguchi et al., 1989)
Fucus vesiculosus	Fucoxanthine(caroténoïde)	Bactéries	Anti-adhésion	(Saha et al., 2011)
Halidrys siliquosa	Méroditerpènes	*Balanus amphitrite* (balane)	Anti-adhésion	(Culioli et al., 2008)
Ishige okamurae	Acide *L*-pyroglutamique (PGA) Phthalate de di-*n*-octyle (DNOP) Citrate de triéthyle (TEC)	*Mytilus edulis* (moule bleue)	Anti-adhésion	(Cho et al., 2005)
		Ulva prolifera (macro-algue)	Inhibition de l'adhésion des spores	
Lobophora variegata	Lobophorolide (lactone cyclique)	*Dendryphiella salina, Lindra thalassiae* (champignons)	Activité antifongique	(Kubanek et al., 2003)
Sargassum confusum	Phtalate de dibutyle Phtalate de dioctyle Phtalate de diisononyle Phtalate de dicyclohexyle Hexadécane Eicosane 1-Eicosanol 1-Pentadécanol	*Ulva pertusa* (macro-algue)	Inhibition de l'adhésion des spores	(Ganti et al., 2006)
Sargassum muticum	Phtalate de dioctyle Acide palmitique	Bactéries *Cylindritheca closterium* (diatomée)	Inhibition de croissance	(Bazes et al., 2009)

		Mélange d'acides gras	*Ulva latuca* (macro-algue)	Inhibition de la germination des spores	
	Sargassum horneri	Méroditerpènes	*Mytilus edulis* (moule bleue)	Anti-adhésion des larves	(Cho, 2013)
			Ulva pertusa (macro-algue)	Anti-adhésion des spores	
			Navicula annexa (diatomé), *Pseudomonas aeruginosa* et *Alteromonas*sp. (bactéries)	Anti-adhésion	
	Stypopodium zonale	Epitaondiol (méroditerpène)	*Perna perna* (moule brune)	Adhésion des moules	(Soares et al., 2008)
	Undaria pinnatifida	Galactosyl Sulfoquinovosyldiacylglycérols	*Mytilus edulis* (moule bleue) *Mytilus galloprovincialis* (moule méditerranéenne)	Stimulation du pied	(Katsuoka et al., 1990)
	Zonaria diesingiana	Phloroglucinol	*Chaetoceros gracilis* (diatomée) Bactéries	Inhibition de croissance	(Wisespongpand & Kuniyoshi, 2003)
Rhodophytes					
	Asparagopsis armata	Bromoforme Acide dibromoacétique	Bactéries marines	Effet antibactérien	(Paul et al., 2006)
	Bonnemaisonia hamifera	1,1,3,3-Tétrabromo-2-heptanone	*Hyphomonas neptunicum*, *Planococcus* sp. et *Photobacterium angustum* (bactéries)	Inhibition de croissance	(Nylund et al., 2008)
	Callophycus serratus	Bromophycolides (macrolides)	*Lindra thalassiae* (champignons)	Activité antifongique	(Lane et al., 2009)
	Delisea pulchra	Furanones halogénées (fimbrolides)	Bactéries marines	Inhibition de croissance	(de Nys et al., 1995) (Maximilien et al., 1998) (Dworjanyn et al., 1999)
			Balanus amphitrite (balane)	Anti-adhésion	(de Nys et al., 1995)
			Ulva lactuca (macro-algue)	Inhibition de l'adhésion et de la germination	
	Grateloupia turuturu	Floridoside	*Balanus amphitrite* (balane)	anti-barnacle activity	(Hellio et al., 2004)
	Laurencia obtusa	5-β-Hydroxyaplysistatine	*Ulva lactuca* (macro-algue)	Anti-adhésion	(Steinberg et al., 1998)

	(sesquiterpène) Palisol (sesquiterpène)	*Bugula neritina* (bryozoaire)		
Laurencia rigida	Elatol (sesquiterpène) Deschloroélatol (sesquiterpène)	*Ulva lactuca* (macro-algue)	Anti-adhésion	(König & Wright, 1997) (Steinberg et al., 1998)
		Bugula neritina (bryozoaire)	Anti-adhésion	
		Champignons, bactéries et algues *Balanus amphitrite* (balane)	Inhibition de croissance	
Laurencia sp.	Elatol (sesquiterpène)	*Balanus amphitrite* (balane)	Antifouling	(de Nys et al., 1996)
	Dictyodial (diterpène)	*Eudendrium carneum*	Anti-adhésion des larves	
Lithophyllum spp.	Substance non polaire	*Laminaria religiosa* (macro-algue)	Anti-adhésion des zoospores	(Suzuki et al., 1998)
Plocamium costatum	Monoterpènes halogénés 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* (balane)	Anti-adhésion des larves	(König et al., 1999)

Bactéries

Bactéries diverses

Acinetobacter sp.	6-Bromoindole-3-carbaldehyde	*Balanus amphitrite* (balane)	Anti-adhésion des larves	(Olguin-Uribe et al., 1997)
Alteromonas sp.	EPS	Zoospores d'*Ulva lactuca* (macro-algue) Diatomées benthiques	Anti-adhésion	(Silva-Aciares & Riquelme, 2007)
Bactéries associées à *Laminaria saccharina*	Composés indéfinis	*Bacillus subtilis, Staphylococcus lentus* (bactéries Gram+)	Activité anti-bactérienne	(Wiese et al., 2009)
Phaeobacter sp.	Composés indéfinis	Bactéries marines, champignons, gamètes d'*Ulva australis* (macro-algue) Larves de *Bugula neritina* (bryozoaire)	Anti-adhésion	(Rao et al., 2007)

Pseudoalteromonas issachenkonii	Protéase (enzyme)	*Bugula neritina* (bryozoaire)	Anti-adhésion des larves	(Dobretsov et al., 2007)
Pseudoalteromonas sp.	Composés indéfinis	Bactéries marines et terrestres Champignons	Inhibition de croissance	(Holmström et al., 2002)
		Ulva lactuca (macro-algue)	Anti-adhésion des spores	(Holmström et al., 2002) (Egan et al., 2000) (Egan et al., 2001)
	Extraits aqueux	*Bugula neritina* (bryozoaire) *Hydroides elegans* (polychète)	Anti-adhésion des larves	(Dobretsov, 2005)
Pseudoalteromonas tunicata	Composés indéfinis	Bactéries marines, champignons, gamètes d'*Ulva australis* (macro-algue) Larves de *Bugula neritina* (bryozoaire)	Anti-adhésion	(Rao et al., 2007)
Pseudomonas sp.	Acide pyolipique	*Balanus amphitrite* (balane)	Anti-adhésion des larves	(Burgess et al., 2003)
	Extraits	*Staphylococcus aureus* (bactérie)	Activité anti-microbienne	(Chelossi et al., 2004)
		Autres bactéries Gram-		
		Ulva lactuca (macro-algue)	Anti-adhésion des spores, Inhibition de croissance	(Burgess et al., 2003)
Rhodococcus sp.	Extraits	*Staphylococcus aureus* (bactérie) Autres bactéries Gram-	Activité anti-microbienne	(Chelossi et al., 2004)
Shwanella oneidensis	Acide hydroxymyristique, Acide oléïque	*Ulva pertusa* (macro-algue)	Inhibition de germination	(Bhattarai et al., 2007)
		Alteromonas marina, Bacillus atrophaeus (bactéries)	Inhibition de croissance	
Bactéries associées au saumon	Tyrosol	*Lagenidium callinectes* (champignon)	Inhibition de croissance	(Gil-Turnes & Fenical, 1992)
Streptomyces fungicidicus	cyclo(L-Trp-L-Pro) (dikétopipérazine)	*Balanus amphitrite* (balane)	Anti-adhésion des larves	(Li et al., 2006)
Streptomyces sp.	Acide méthylmyristique	*Hydroides elegans* (polychète)	Anti-adhésion des larves	(Xu et al., 2009) (Xu et al., 2010)
Vibrio sp.	Extraits aqueux	*Bugula neritina* (bryozoaire) *Hydroides elegans* (polychète)	Anti-adhésion des larves	(Dobretsov, 2005)

	Winogradskyella poriferorum	Extraits	*Vibrio halioticoli* et *Loktanella hongkongensis* (bactéries) *Balanus amphitrite* (Balane) *Hydroides elegans* (polychète)	Anti-adhésion Anti-adhésion des larves	(Dash et al., 2009)
Cyanobactéries					
	Kyrtuthrix maculans	Maculalactone A	*Chlorostoma argyrostoma* (gastéropode) *Tetraclita japonica, Balanus amphitrite, Ibla cumingii* (balanes)	Activité anti-appétante Anti-adhésion des larves	(Brown et al., 2004)
	Nodularia harveyana	Norharmane	Bactéries et cynaobactéries marines Champignons	Activité antibactérienne Activité antifongique	(Volk & Furkert, 2006)
	Nostoc insulare	Norharmane	Bactéries et cynaobactéries marines Champignons	Activité antibactérienne Activité antifongique	
	Nostoc sp.	Nostocarboline	*Microcystis aeruginosa, Synechococcus sp., Kirchneriella contorta* (cyanobacétries)	Inhibition de croissance	(Blom et al., 2006)
	Oscillatoria perornata	2-Méthylisobornéol	Phytoplancton	Activité algicide Toxicité	(Purcaro et al., 2009)

I.3.3. Bio-essais en antifouling

Tous les travaux exposés dans le tableau ont été effectués suite au développement de différents bio-essais en laboratoire. Ces derniers permettent d'étudier certains aspects en écologie chimique ou de cribler de nouveaux composés capables d'inhiber l'attachement ou l'adhésion des micro- et des macro-colonisateurs. Parmi les bio-essais développés, les plus courants sont les bio-essais antibactériens ou antimicrobiens, généralement basés sur l'inhibition de la croissance, ainsi que les bio-essais anti-adhésion (Briand, 2009). Nous nous intéresserons particulièrement à ces derniers qui s'inscrivent dans le cadre de ces travaux de thèse.

Un des premiers essais visant l'adhésion bactérienne est basé sur l'incorporation d'extraits organiques d'organismes marins dans des matrices de gélose déposés sur des lames de microscope en verre. Les lames sont ensuite positionnées verticalement au sein de la suspension bactérienne (Wahl et al., 1994). Dans d'autres études, des lames de microscope ou des coupons enrobés dans le produit à tester sont immergés dans une culture contenant l'organisme colonisateur choisi pour l'essai. Ces techniques sont utilisées afin d'évaluer l'efficacité des produits naturels ou des biocides ainsi que dans le cas de revêtements antifouling formulés. Le nombre d'organismes adhérés est évalué par comptage direct au microscope (après coloration des bactéries) ou par analyse d'image (Burgess et al., 2003 ; Barrios et al., 2005 ; Xu et al., 2005).

Un autre type de test d'adhésion est réalisé soit directement sur des tubes à essais, soit sur des supports (en verre ou dans un autre matériau) introduits dans le tube à essais. Concernant le premier cas, il s'agit d'incuber des bactéries cultivées dans un milieu en présence du biocide à tester. Ensuite, le milieu est éliminé laissant uniquement les organismes adhérés aux parois des tubes. Les cellules adhérées sont marquées avec un colorant tel que la safranine. La présence d'organismes adhérés est révélée par la formation d'une couche colorée sur les parois de verre. Plus la coloration est importante, plus il y a de bactéries adhérées. Cette méthode est facile à mettre en place et à réaliser, mais elle a l'inconvénient d'être fastidieuse et d'engendrer d'importantes erreurs d'interprétations d'un observateur à un autre lors de la lecture (Stepanovic et al., 2000). Pour le deuxième cas, les coupons sont laissés à tremper dans les tubes contenant le composé à tester à différentes concentrations, et ce jusqu'à la formation d'un biofilm. Ensuite, les coupons sont retirés et rincés à l'eau

distillée. Le biofilm est alors récupéré par grattage et l'efficacité du biocide est déterminée par comptage par dilution en série (Bhosale et al., 2002) ou par observation microscopique couplée à une caméra (Xu et al., 2005).

Plus récemment, les bio-essais en plaques multi-puits sont développés. Ils sont utilisés pour quantifier la formation de biofilm bactérien afin d'évaluer les activités antibactériennes ou pour cribler l'activité anti-adhésion dans plusieurs domaines. Généralement, des microplaques 96 puits en polystyrène sont utilisées (Figure 4). Dans la même microplaque, plusieurs molécules peuvent être testées simultanément et des contrôles positifs et négatifs peuvent être inclus. La répétabilité ainsi que la reproductibilité de ce type de bio-essais sont plus faciles à maîtriser. En outre, cette technique est intéressante lorsqu'elle concerne des substances naturelles (souvent extraites en faibles masses), parce que de petites quantités sont suffisantes. Outre les molécules naturelles et les biocides commerciaux, il est aussi possible d'évaluer les propriétés anti-adhésion de revêtements (Shakeri et al., 2007 ; Camps et al., 2011). Le protocole pour ce type de test consiste à incuber les microplaques pendant un temps nécessaire à la formation du biofilm. Les bactéries non adhérées sont ensuite éliminées par plusieurs lavages successifs puis marquées en utilisant différents types de fluorochromes. L'efficacité des produits à tester contre l'adhésion bactérienne est évaluée par quantification du biofilm réalisée, soit par comptage direct au microscope (Acord et al., 2005 ; Stafslien, 2006 ; Burton et al., 2007 ; Leroy et al., 2007 ; Sandberg et al., 2008), soit par mesure automatique de la fluorescence du fluorochrome utilisé à l'aide d'un lecteur spécifique de microplaques (Viano et al., 2009 ; Camps et al., 2011 ; Pénez et al., 2011). L'utilisation de ce type de lecteur est beaucoup plus rapide et reproductible qu'un comptage par microscopie. Concernant les microplaques utilisées, elles sont fabriquées avec différents matériaux avec un nombre et une taille de puits différents et elles sont adaptées à l'analyse de plusieurs types d'organismes. Les microplaques noires 96 puits sont généralement utilisées pour l'étude des micro-organismes tels que les bactéries (Gentry & Dalrymple, 1980 ; Roberts et al., 2002 ; Rudney & Staikov, 2002 ; Sandberg et al., 2008 ; Viano et al., 2009 ; Camps et al., 2011 ; Pénez et al., 2011), les diatomées ou encore les cellules de bivalves (Domart-Coulon et al., 2000). Les microplaques 24 puits sont plutôt employées pour l'étude de macro-organismes comme les larves de balanes et les spores d'algues (Maréchal et al., 2004). Le matériau avec lequel est fabriquée une plaque dépend de la nature de l'organisme à tester. En effet, il existe des organismes qui adhèrent mieux sur le polystyrène tandis que pour d'autres les supports en verre, en PVC ou en acier inoxydable sont plus adaptés (Dobretsov et al., 2006b).

Concernant les fluorochromes adaptés à ces bio-essais, le cristal violet (Stafslien, 2006 ; Shakeri et al., 2007 ; Stafslien, 2007a ; Stafslien, 2007b ; Stafslien et al., 2007) et le DAPI (Leroy et al., 2007 ; Camps et al., 2011) sont les plus couramment utilisés. Le DAPI présente une meilleure plus grande spécificité et une sensibilité plus élevée. D'autres fluorochromes ont été récemment utilisés pour la quantification de biofilms bactériens marins : ils appartiennent à la gamme des SYTO (SYTO® 9, SYTO® 13 et SYTO® RED 61) (Camps et al., 2011). L'efficacité de ces fluorochromes dépend de la nature de la souche, ainsi certains de ces fluorochromes sont incapables de marquer certaines bactéries.

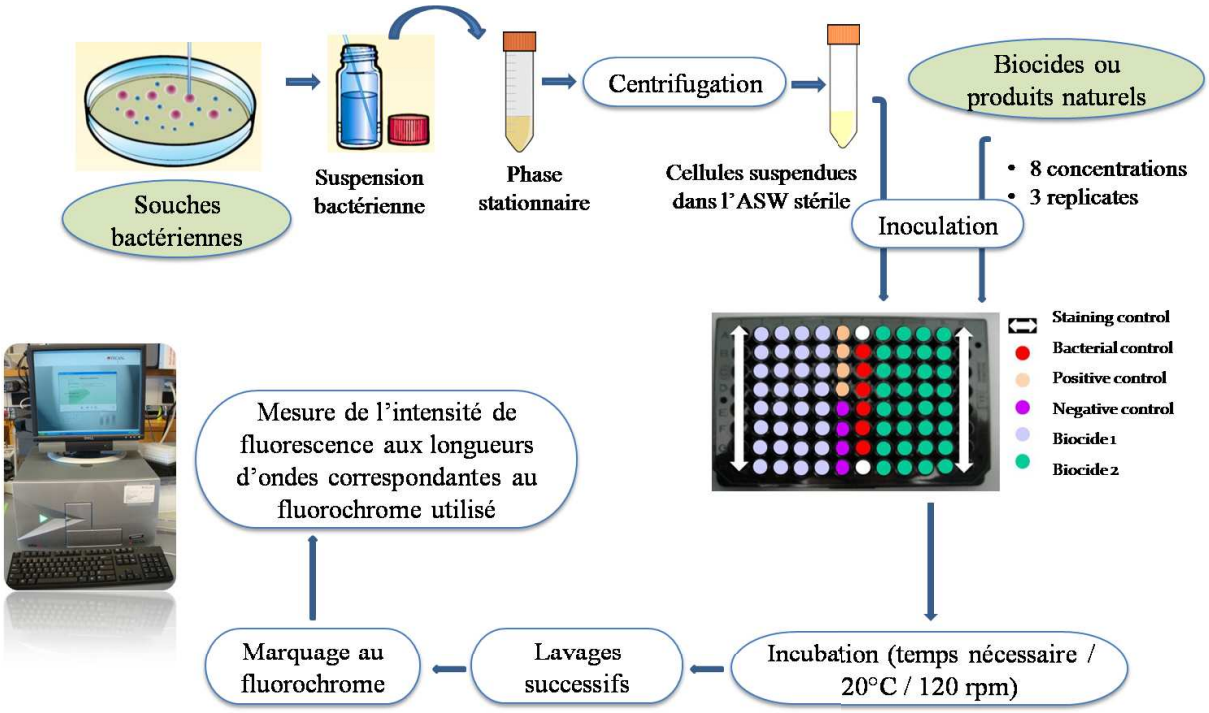


Figure 4 : Description des différentes étapes nécessaires à la réalisation du bio-essai anti-adhésion en microplaques 96 puits

II. Modèles biologiques de l'étude

La mer Méditerrannée est connue pour héberger un grand nombre d'algues marines, et plus particulièrement les algues brunes, parmi lesquelles certaines témoingnent d'un potentiel dans le domaine de l'antifouling. Les espèces choisies comme modèles pour notre travail ont été des algues brunes méditerranéennes appartenant à la famille des Dictyotacées : *Dictyota* spp. et *Taonia atomaria*.

II.1. Présentation générale des algues brunes

Les algues brunes, ou Phéophycées, forment une classe d'organismes photosynthétiques presque exclusivement marins qui appartiennent au phylum des Hétérokontes, ou Straménopiles. Elles sont communes dans le monde entier : elles se développent essentiellement dans les eaux tempérées profondes mais également dans les eaux tropicales chaudes. Une diversité très importante de la taille et de la forme des thalles est observée au sein de cette classe. La coloration brune de ces organismes est attribuée à la prédominance de pigments orangés, tels que les carotènes et les xanthophylles, par rapport aux chlorophylles (*a*, c_1 et c_2).

Avec 239 espèces connues, les Dictyotales représentent le troisième ordre le plus important parmi les algues brunes en termes de nombre d'espèces (après les Ectocarpales et les Fucales). Les espèces issues de cet ordre sont caractérisées par des thalles aplatis parenchymateux et des poils regroupés sous forme de petites touffes à la surface des frondes. Leur croissance est apicale et leur cycle de vie est diplohaplontique isomorphe. L'ordre des Dictyotales se compose d'une large famille, les « Dictyotaceae », ainsi que d'une famille peu commune, celles des « Scoresbyellaceae ». La famille des Dictyotaceae se subdivise en deux tribus, les « Dictyoteae » et les « Zonarieae » sur la base du nombre de cellules méristématiques aux sommets des thalles (De Clerck et al., 2006) (Figure 5).

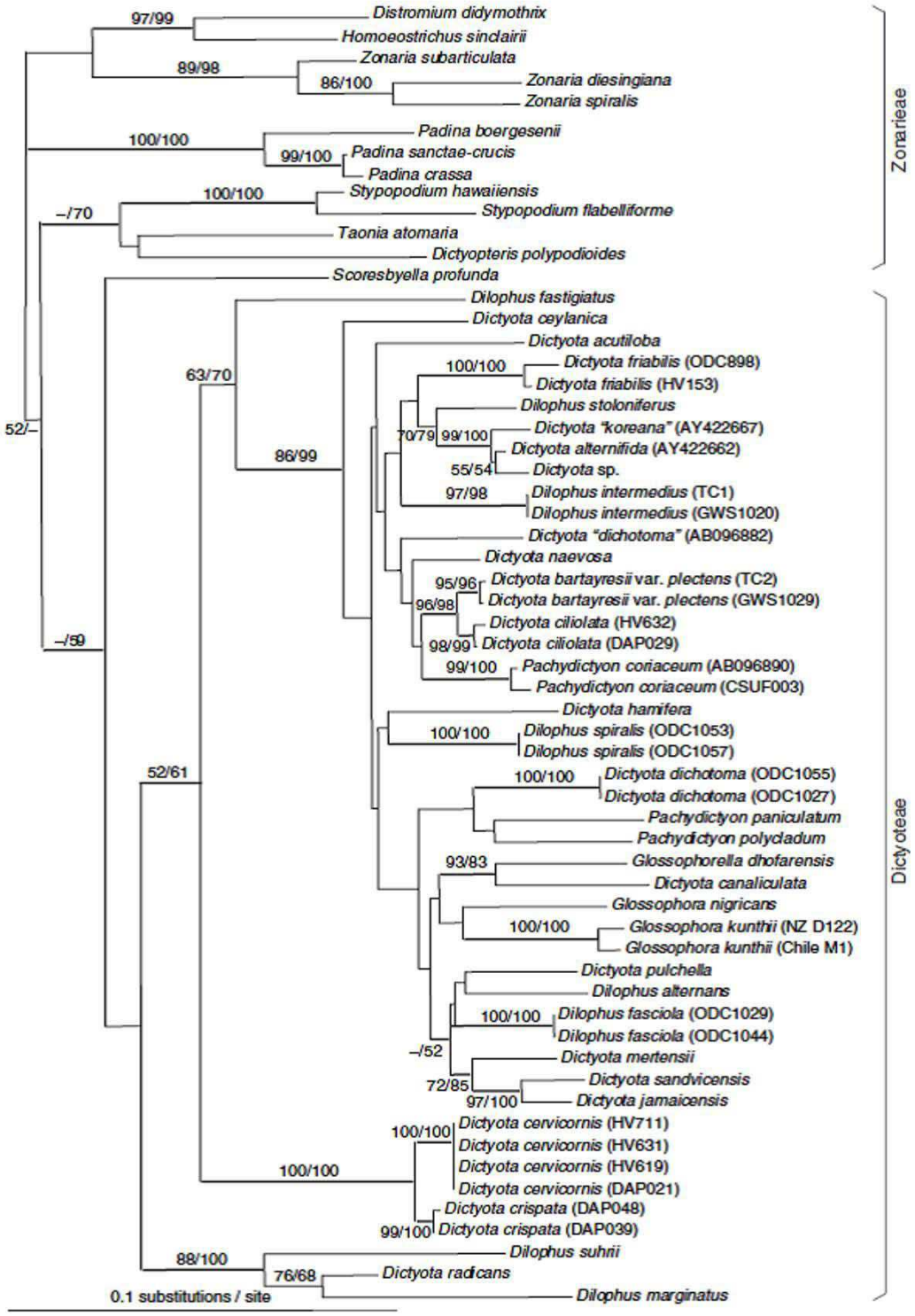


Figure 5 : Arbre phylogénétique de la famille des Dictyotaceae avec les deux tribus les « Dictyoteae » et les « Zonarieae » et la position des différentes espèces de *Dictyota* et de l'espèce *Taonia atomaria* (De Clerck et al., 2006)

II.2. Présentation des espèces étudiées

II.2.1. Position systématique

Le genre *Dictyota*, ainsi que 14 autres genres, fait partie de la tribu des Dictyoteae qui est celle comptant le plus grand nombre d'espèces parmi les Dictyotaceae. Plus précisément, il existe 76 espèces de *Dictyota* réparties dans l'ensemble des mers et océans. En mer Méditerranée, seules six espèces sont recensées : *D. dichotoma, D. fasciola, D. linearis, D. ciliolata, D. mediterranea* et *D. spiralis*.

L'espèce *T. atomaria* appartient à la tribu de Zonarieae qui inclut 13 genres. Il existe six espèces au sein du genre *Taonia* dans le monde : *T. atomaria, T. lacheana, T. pseudociliata, T.lennebackerae, T. abbottiana* et *T. australasica*. Les trois dernières espèces n'ont jamais été décrites en mer Méditerranée.

II.2.2. Métabolites secondaires des Dictyotaceae

D'un point de vue chimique, au sein des algues brunes les espèces issues de la famille des Dictyotaceae se distinguent par une production riche en métabolites secondaires : avec plus de 500 molécules, elles représentent en effet près d'un tiers des composés décrits dans cette classe d'organismes (MarinLit, 2013). Ces métabolites sont majoritairement des terpènes qui peuvent être classés en deux groupes :

- les terpènes "*sensu stricto*" désignant des composés dont la formule générale découle de $(C_5H_8)_n$, et qui sont constitués d'une ou plusieurs unités isopréniques. Ces substances à plusieurs unités isopréniques sont obtenues à partir du métabolisme des précurseurs bien définis. En fonction du nombre de ces unités, (Ruzicka, 1959) a proposé la nomenclature suivante :
  - les monoterpènes (C_{10}) dérivant du géranyl pyrophosphate (GPP),
  - les sesquiterpènes (C_{15}) provenant du farnésyl pyrophosphate (FPP),
  - les diterpènes (C_{20}) ayant comme précurseur le géranylgéranyl dirophosphate (GGPP),
  - les sesterpènes (C_{25}) dérivant du géranylfarnésyl pyrophosphate (GFPP),
  - et enfin les triterpènes (C_{30}), les tétraterpènes et caroténoïdes (C_{40}).

• les terpènes à biogenèse mixte dits "méroterpènes" comprenant un noyau méthylhydroquinonique plus ou moins substitué sur lequel est fixée une chaîne latérale terpénique souvent oxygénée. Dans cette classe de terpènes, on distingue pour les Dictyotaceae deux groupes principaux constitués par les méroditerpènes et les mérosesquiterpènes. Ces composés pouvant être linéaires (chaîne latérale terpénique linéaire), cyclisés (chaîne latérale contenant un ou plusieurs cycles carbonés).

Les algues brunes peuvent renfermer des structures terpéniques halogénées du fait de la présence d'halopéroxydase (enzyme impliquée dans les réactions d'halogénation) (Potin et al., 1999 ; Potin et al., 2002 ; Colin et al., 2003 ; Weinberger et al., 2007 ; La Barre et al., 2010). De manière générale, les espèces appartenant au genre *Dictyota* renferment principalement des diterpènes, alors que la composition chimique de celles issues du genre *Taonia* est plus variée puisqu'elle englobe aussi bien des diterpènes, que des sesquiterpènes et des méroditerpènes (Blunt et al., 2005) (Figure 6).

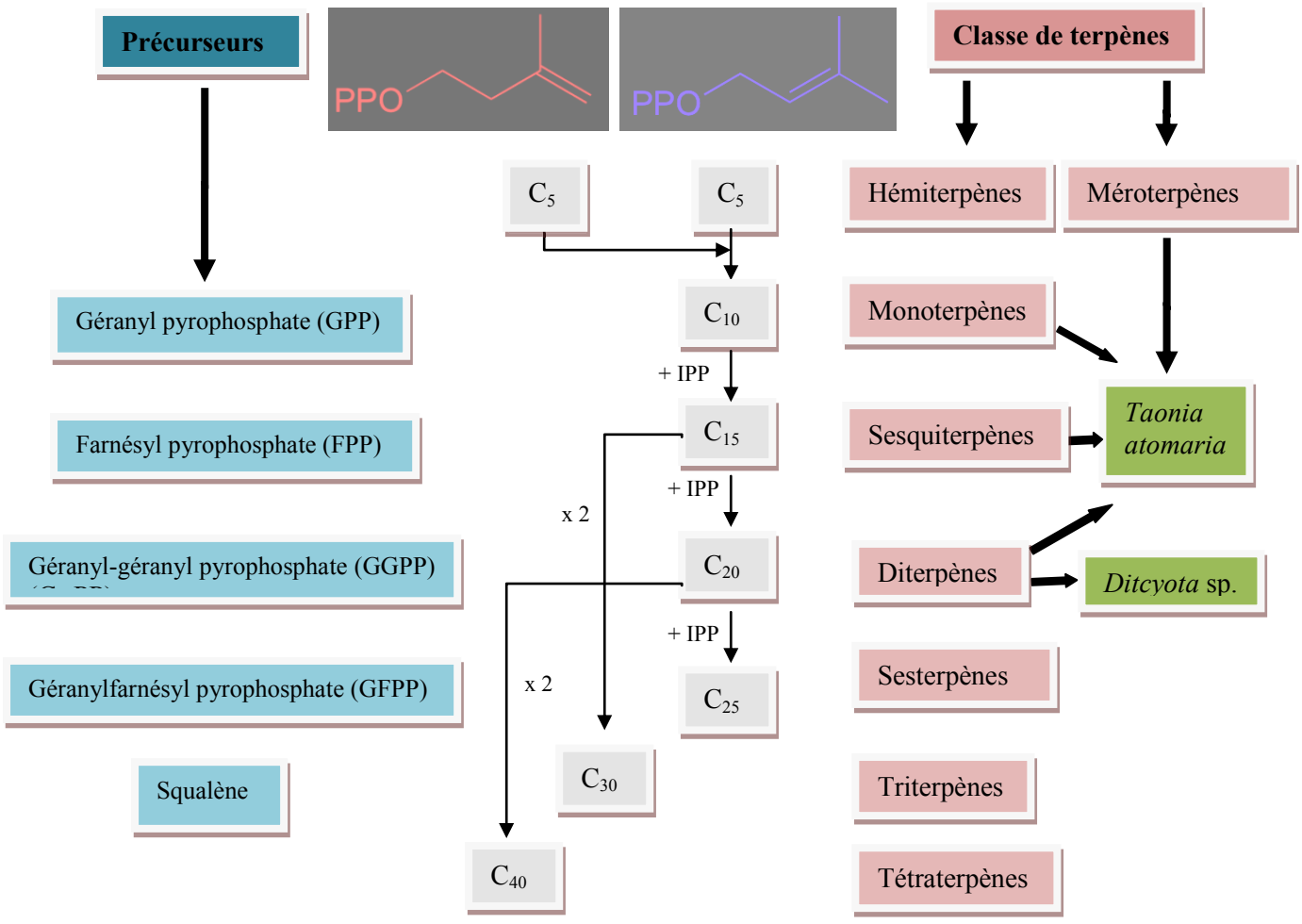


Figure 6 : Description des différentes classes de terpènes (IPP = Isopentényl-pyrophosphate)

II.2.3. Présentation des espèces de *Dictyota* étudiées

II.2.3.1. Description morphologique

Les espèces appartenant au genre *Dictyota* (Lamouroux) présentent une grande diversité morphologique même si pour la plupart d'entre-elles un thalle aplati en forme de lanières est observé. Les espèces de ce genre possèdent des rameaux dressés ou couchés, avec des marges lisses, dentées, crénelées ou ciliées et des ramifications dichotomiques, anisotomes ou altérnées. La forme de l'extrémité du thalle est variable (obtuse, arrondie, apiculée ou aigüe). La taille des individus varie entre 5 et 50 cm en fonction de l'espèce et de son stade de vie (Figure 7). Ces algues se fixent au substrat par des rhizoïdes, se terminant par des disques adhésifs, d'une manière soit basale soit marginale. La couleur de ces algues montre différentes nuances de brun. Les pigments bruns (principalement la fucoxanthine) prédominent et masquent la couleur verte due à la présence des chlorophylles *a* et *c*.

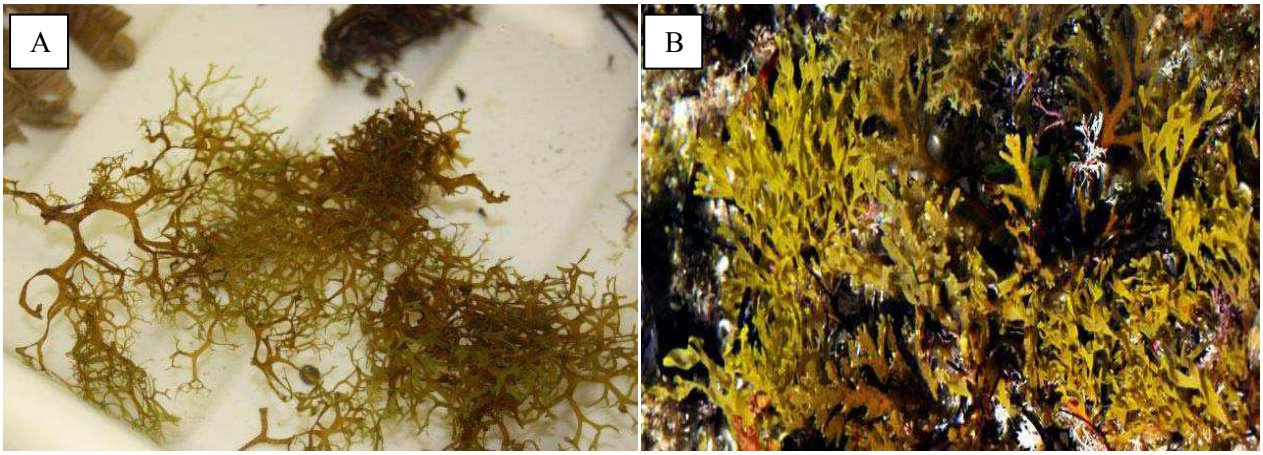


Figure 7 : Des espèces d'algues brunes appartenant au genre *Dictyota* : *D. implexa* **(A)** (http://botany.natur.cuni.cz/algo/images/Piran/macro/dictyotaimplexathecoastinpiranslovenia.html) et *D. fasciola* **(B)** (http://waste.ideal.es/dictyotafasciola.htm)

II.2.3.2. Eléments biologiques et écologiques

D'un point de vue biologique, les espèces appartenant au genre *Dictyota* sont dioïques c'est-à-dire qu'elles portent les organes mâles et femelles sur des pieds séparés. Leur cycle de reproduction est diphasique isomorphe faisant intervenir une alternance de deux générations semblables (Gayral & Cosson, 1986). Il s'agit d'espèces annuelles dont le thalle disparaît en hiver alors que leur taux maximal de croissance intervient pendant le printemps et jusqu'au début de l'été.

Concernant leur distribution géographique, ces algues sont largement répandues dans l'ensemble des mers du globe. Elles se rencontrent essentiellement dans les eaux tropicales et subtropicales chaudes et tempérées (De Clerck et al., 2006), mais elles peuvent atteindre les régions tempérées froides des hémisphères nord et sud (Paula et al., 2011). L'habitat de ces algues est diversifié : elles sont présentes jusqu'à des profondeurs de 30 m (Simeonidis, 1995), ainsi que dans les cuvettes de l'étage médiolittoral moyen et inférieur. Elles préfèrent les eaux claires peu battues où elles se fixent sur des fonds rocheux et elles sont capables de supporter un certain taux de pollution organique. Elles sont souvent épiphytes sur diverses algues et gorgones (Gayral & Cosson, 1986).

II.2.3.3. Métabolites secondaires des espèces appartenant au genre *Dictyota*

Dans la famille des Dictyotaceae, les algues du genre *Dictyota* sont les plus nombreuses mais également celles qui constituent les sources les plus prolifiques en métabolites secondaires. Les molécules issues de ces algues sont, à quelques rares exceptions près, des diterpènes cyclisés.

Au regard de leur structure chimique, ces diterpènes peuvent être divisés en trois groupes (I-III) en fonction de la première cyclisation formelle de leur précurseur biosynthétique commun, le géranylgéraniol (Figure 8).

Ainsi, les diterpènes du groupe **I** résultent d'une première cyclisation du géranylgéraniol entre C-1 et C-10. Les diterpènes appartenant à ce groupe montrent tous une structure de type guaianes prénylé et sont répartis en 10 sous-groupes dont les plus répandus sont ceux des dilophanes, des dictyanes, des spatanes et des sécospatanes (Figure 9).

Les ditepènes du groupe **II** sont issus d'une première cyclisation du précurseur acyclique entre C-1 et C-11. Les molécules qui découlent de cette cyclisation présentent un squelette de type dolabellane (groupe II A, Figure 10). Suite à une seconde cyclisation entre C10 et C14, des squelettes de type dolastane et sécodolastane sont obtenus (groupe II B, Figure 11).

Quant aux diterpènes du groupe **III**, sont issus d'une première cyclisation du géranylgéraniol en C-2/C-10. Ce groupe rassemble des composés répartis en huit sous-groupes différents dont les plus courants sont ceux regroupant les squelettes de type xénicane, dichotomane ou crénulide (Figure 12) (Teixeira & Kelecom, 1988).

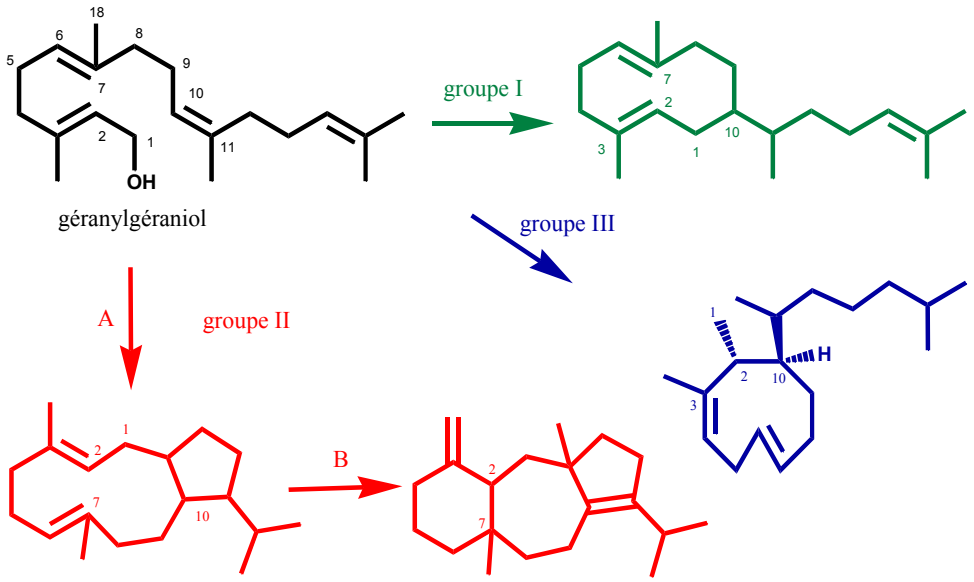
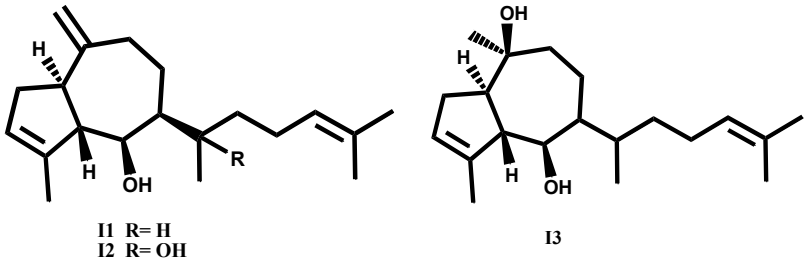


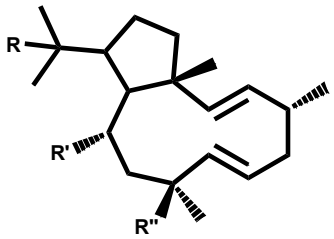
Figure 8 : Principaux groupes de diterpènes cycliques biosynthétisés par les différentes espèces de *Dictyota* (Teixeira & Kelecom, 1988)



I1 R= H
I2 R= OH

I3

Figure 9 : Exemples de diterpènes appartenant au groupe **I** isolés à partir de *Dictyota menstrualis* (I1), *D. guineensis* (I2) (Schlenk & Gerwick, 1987) et *D. mertensii* (I3) (Vallim et al., 2007)



IIA_1 R= R'= R"= OH
IIA_2 R= R' = OAc; R"= OH
IIA_3 R= R"= OH; R'= OAc

Figure 10 : Exemples de dolabellanes appartenant au groupe **IIA** (IIA1-IIA3) isolés à partir de *D. pfaffii* (Barbosa et al., 2007)

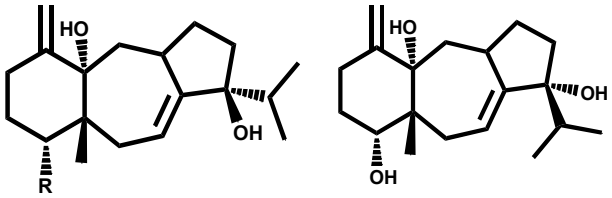


Figure 11 : Exemples de dolastanes appartenant au groupe **IIB** (IIB1-IIB3) isolés à partir de *D. cervicornis* (Vallim et al., 2010)

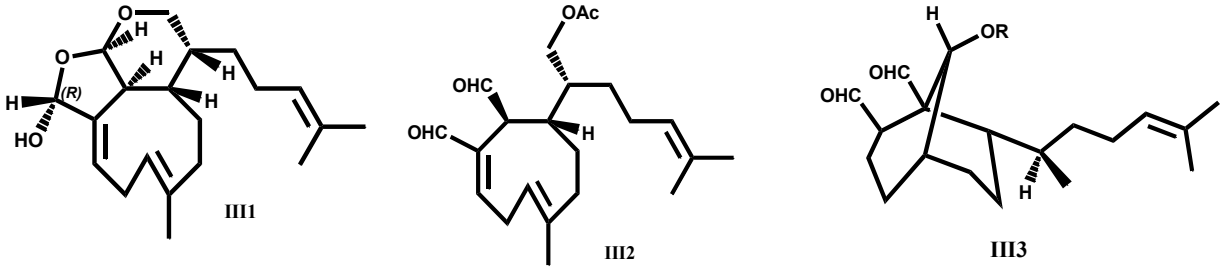


Figure 12 : Exemples de 'xenianes et de dichotomanes appartenant au groupe **III** isolés respectivement à partir de *D. ciliolata* (III1 & III2) et de *D. menstrualis* (III3) (Schmitt et al., 1995 ; Teixeira et al., 2001)

II.2.4. Présentation de *Taonia atomaria*

II.2.4.1. Description morphologique

Taonia atomaria est une algue qui présente un thalle aplati en lanières ressemblant à des feuilles fines et translucides mais dépourvues de nervure centrale. Cette espèce est caractérisée par la présence de quatre couches de cellules internes, soit deux couches de cellules périphériques plates et deux couches de cellules médullaires disposées de manière irrégulière. Les cellules de surface sont disposées en rangées longitudinales et sont différenciées à partir des cellules médullaires (Nizamuddin & Godeh, 1993). Le sommet de l'algue est divisé en plusieurs lobes contenant les cellules apicales. Cette espèce possède un crampon discoïde portant des rhizoïdes cloisonnés diversement ramifiés. Concernant sa taille, la plupart des individus mesurent entre 5 et 30 cm (Figure 13).

Figure 13 : L'algue brune *Taonia atomaria*
(http://www.seaweed.ie/descriptions/Taonia_atomaria.php)

II.2.4.2. Eléments biologiques et écologiques

Le cycle de vie de *Taonia atomaria* est digénétique isomorphe caractérisé par l'alternance de deux générations morphologiquement semblables. La reproduction peut se faire également par voie végétative asexuée. Cette espèce d'algue est annuelle, elle est présente dans la nature durant presque toute l'année mais sous forme très réduite durant l'automne et l'hiver.

T. atomaria est largement distribuée mais elle est plus particulièrement présente au niveau de l'océan Atlantique Nord, des Caraïbes, du sud de l'Australie, du sud du Sénégal, de la Colombie, du Pakistan et elle est surtout très répandue en mer Méditerranée (Nizamuddin & Godeh, 1993 ; Soares et al., 2003). *T. atomaria* est une espèce autotrophe photophile qui vit préférentiellement dans les eaux éclairées relativement calmes de l'étage infralittoral jusqu'à une profondeur de 15 m. Elle se fixe généralement sur des coquillages ou sur des substrats rocheux ou sableux.

II.2.4.3. Métabolites secondaires de *Taonia atomaria*

Les terpènes constituent la famille de composés majoritairement présents dans les extraits de *T. atomaria* : ce sont principalement des sesquiterpènes et des méroterpènes, ces derniers comportant une chaine latérale cyclisée de type sesqui- ou diterpénique.

- **Méroditerpènes**

Les méroditerpènes sont des diterpènes polycycliques à biogénèse mixte, caractérisés par la présence d'un noyau hydroquinonique plus ou moins substitué fixé à un enchaînement terpénique, souvent oxygéné. Les méroditerpènes sont les principaux métabolites trouvés chez *T. atomaria* (Ishitsuka et al., 1990) (Figure 14). Les premières molécules appartenant à cette famille, le taondiol (**1**) et l'acide atomarique (**3**), ont été isolées à partir de spécimens collectés aux îles des Canaries au début des années 70 (Gonzalez et al., 1971 ; Gonzalez et al., 1973 ; Gonzalez et al., 1974). En 1984, de nouveaux méroditerpènes (**2-8**) ont été isolés par Gonzales et ses collaborateurs. D'autres méroditerpenes ont été recensés plus récemment chez cette algue : il s'agit notamment des atomarianones A (**9**) et B (**10**) (Abatis et al., 2005), et de cinq autres méroditerpènes (**11**-**15**) (Azhaguraj et al., 2010).

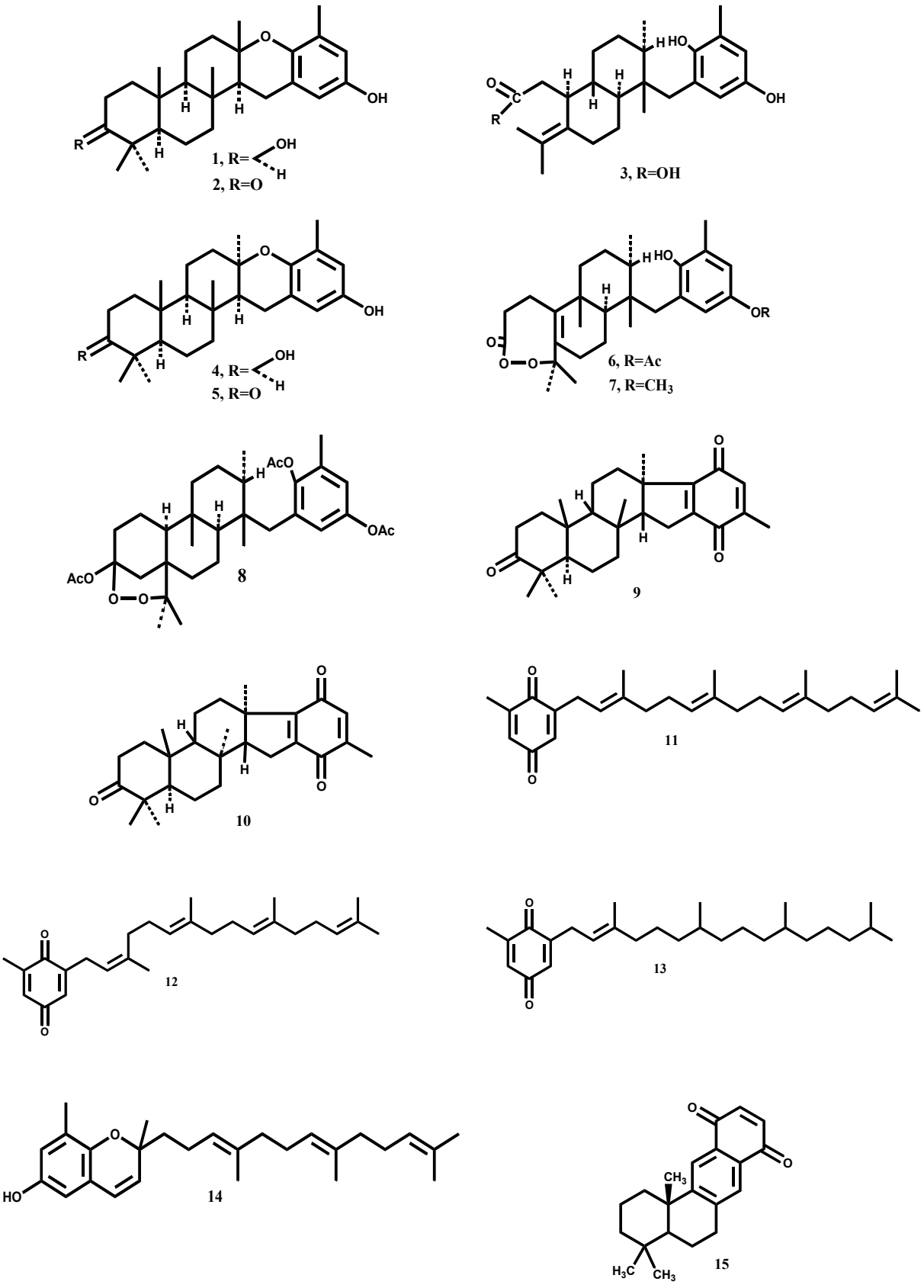


Figure 14 : Quelques exemples de méroditerpènes isolés de *T. atomaria*

- **Sesquiterpènes et autres**

Les sesquiterpènes entrent également dans la composition chimique de *T. atomaria* mais ils sont moins abondants que les méroditerpènes. Les composés qui présentent des squelettes carbonés de type cadinane et germacrane sont les plus répandus dans ce groupe chimique (Tringali et al., 1995) (Figure 15). Les premiers sesquiterpènes isolés de *T. atomaria* l'ont été à partir de spécimens provenant de mer Adriatique (De Rosa et al., 1994). Ils'agit du 4-cadinène (**16**), du cadina-4(14),5-diène (**17**), du germacrène D (**18**), de l'axénol (**19**), du cubébol (**20**) et du 4-cubébol (**21**) (ce dernier étant isolé pour la première fois à partir d'une source naturelle). Un an plus tard, Tringali et al. (1995) ont isolé le spathulénol (**22**), le 11-spathulénol (**23**) et le 7,11-dihydroxyaromadendrane (**24**). Lors de cette même étude, un dérivé diterpénique le géranylgéranylglycérol (**25**) a également été décrit. Enfin, un produit de dégradation de la fucoxanthine, le loliolide (**26**) a récemment été trouvé chez *T. atomaria* (Percot et al., 2009).

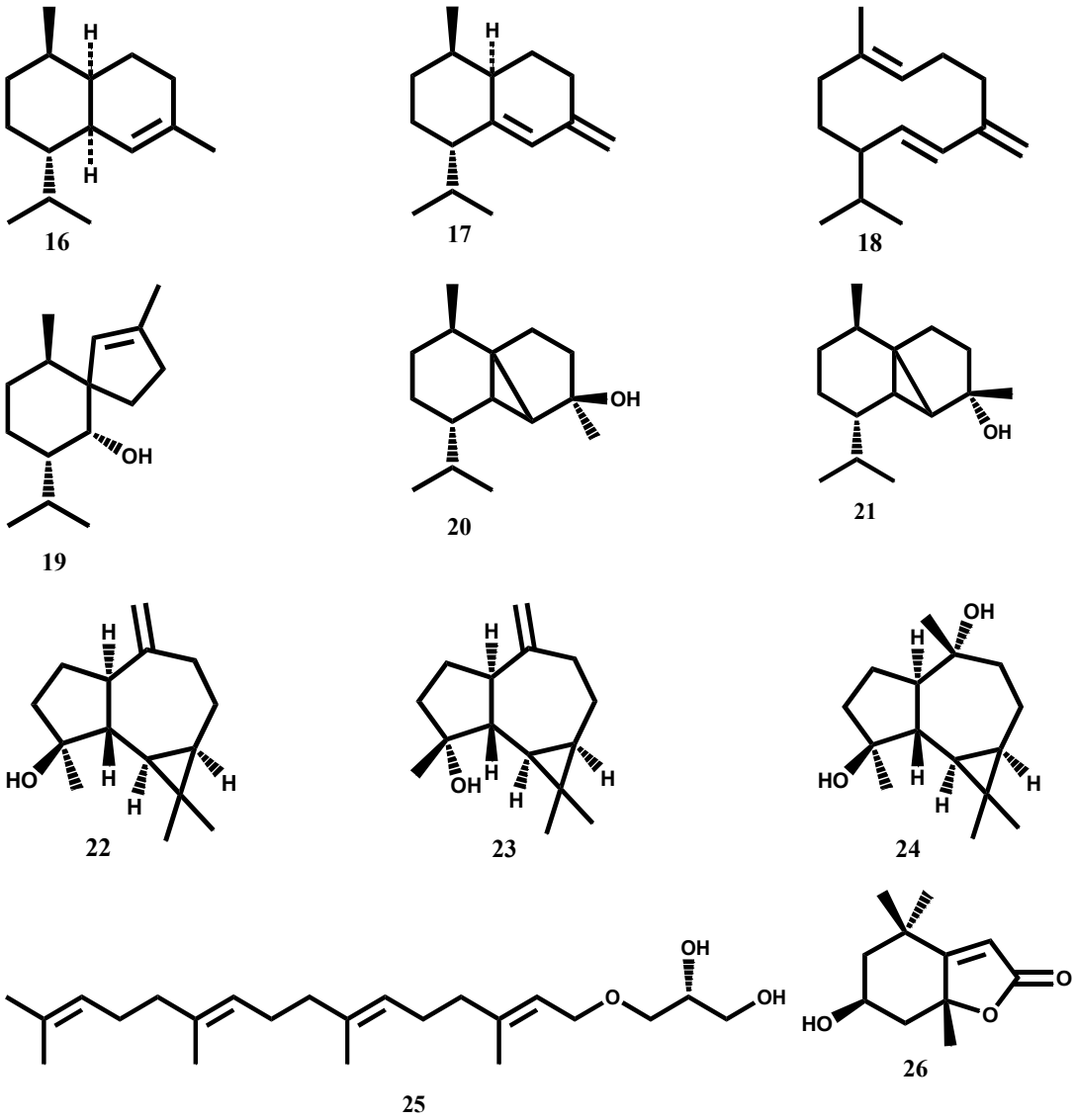


Figure 15 : Quelques exemples de sesquiterpènes et d'autres types de composés terpéniques isolés de *T. atomaria*

III. Interactions algues-biofilms

III.1. Biofilms sur surfaces biotiques

III.1.1. Biofilms sur les macro-algues

Les macro-algues sont des organismes marins particulièrement sujets au biofouling (Figure 16) pour deux raisons principales : (i) leurs thalles fournissent de larges surfaces favorables à l'installation des épibiontes (Lobban et al., 1985 ; Wahl, 1989 ; Kohlmeyer & Volkmann-Kohlmeyer, 2003 ; Wahl et al., 2012), (ii) la grande majorité des algues sont abondantes dans les zones trophiques là où les épibiontes peuvent trouver les conditions optimales de croissance en termes de lumière ou de nutriments (de Nys et al., 1995 ; Grossart, 2010)

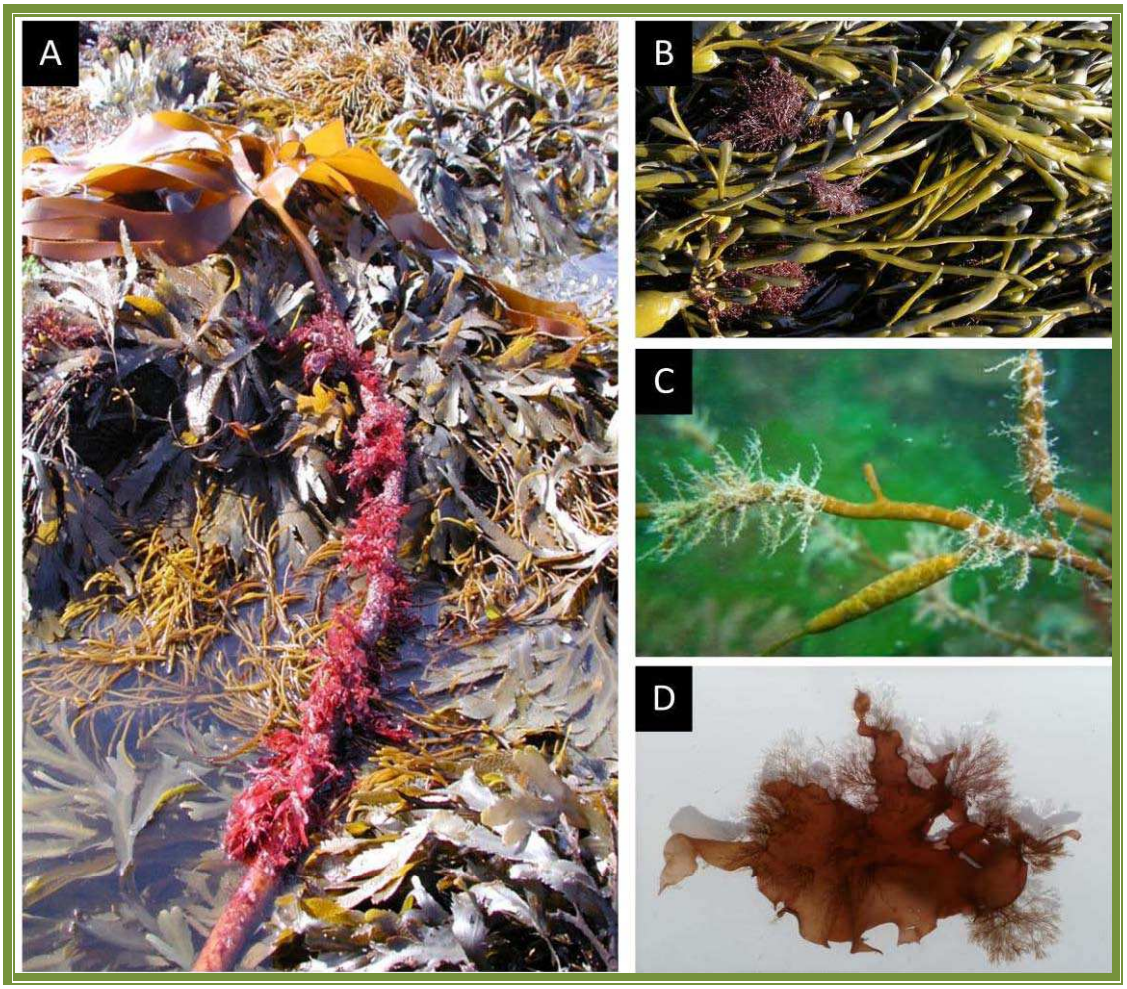


Figure 16 : Surfaces de différentes espèces d'algues marines recouvertes par des épibiontes

(A) l'algue brune *Laminaria hyperborea* recouverte par des algues rouges épiphytes (source : http://www.marlin.ac.uk/galleryimage.php?imageid=1894)
(B) l'algue brune *Ascophyllumnodosum*recouverte par des algues épiphytes (*Polysiphonialanosa*) (source : http://www.marlin.ac.uk/galleryimage.php?imageid=1894)
(C) l'algue brune *Halidrys siliquosa* colonisée par des hydraires (*Obeliageniculata*) (source : http://doris.ffessm.fr/fiche_imprime.asp?fiche_numero=2185)
(D) l'algue rouge *Grateloupia turuturа*recouverte par des algues épiphytes (*Neosiphonia harveyii*) (source : http://seapeachbio.blogspot.fr/2012/12/branching-bryozoa-and-red-algae.html)

III.1.1.1. Composition et densité des biofilms

Les bactéries sont les épibiontes les plus abondants à la surface des algues (Corre & Prieur, 1990). Les bactéries cultivables les plus étudiées sont principalement celles à Gram négatif (Laycock, 1974 ; Kong & Chan, 1979 ; Corre & Prieur, 1990 ; Camps et al., 2011 ; Salaün et al., 2012).

Dès les années 70, des études en culture et des observations microscopiques de la flore bactérienne ont montré des différences claires entre la composition des bactéries associées aux macro-algues et celles de l'eau de mer environnante, indiquant que les algues hébergent des communautés microbiennes spécifiques (Kong & Chan, 1979 ; Lemos et al., 1985 ; Mow-Robinson & Rheinheimer, 1985 ; Johnson et al., 1991 ; Steinberg & de Nys, 2002 ; Longford et al., 2007 ; Goecke et al., 2010). La composition de ces communautés est également variable suivant les différentes espèces d'algues et même, au sein d'une même espèce, selon les sections du thalle et les saisons (Cundell et al., 1977 ; Bolinches et al., 1988 ; Salaün et al., 2012 ; Egan et al., 2013).

Des études moléculaires basées sur les techniques de DGGE et de banques de clones de gènes d'ADNr 16S ont permis de décrire la flore bactérienne associée à la surface des macro-algues. Les groupes bactériens les plus souvent rencontrés sont les phyla des Gamma-protéobactéries (37%), des Bacteroidètes (dit aussi groupe « CFB » = *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides*) (20%), des Alpha-protéobactéries (13%), des Firmicutes (10%) et des Actinobacteria (9%). D'autres phyla sont moins fréquents tels que les Béta-, Delta- et Epsilon-protéobactéries, les Planctomycètes, les Cyanobactéries, les Verrucomicrobia, les Chloroflexi, les Deinococcobactéries, les Fusobacteriaceae et les Tenericutes (Figure 17, Tableau 2) (Hollants et al., 2012). Les chiffres donnés indiquent le pourcentage de présence de chaque phylum à la surface des macro-algues en se basant sur ce qui a été étudié, et non pas sur ce qui existe réellement dans le milieu naturel. Ces abondances sont donc relatives et dépendent fortement de l'espèce d'algue (Lachnit et al., 2009 ; Nylund et al., 2010 ; Barott et

al., 2011), des sites de collecte et de la saison (Laycock, 1974). Cette abondance varie aussi en fonction des différentes parties du thalle. Par exemple, certaines études ont permis de mettre en évidence la complexité des associations bactériennes à la surface de deux algues brunes *Saccharina latissima* (Staufenberger et al., 2008) et *Laminaria digitata* (Salaün et al., 2012) entre les quatre parties étudiées des thalles (crampon, stipe, méristème et fronde), mais aussi selon la situation géographique et la saison. Une autre étude a montré que l'abondance relative des groupes majeurs de bactéries variait en fonction de la concentration de molécules (bromoheptanones) produites à la surface de l'algue rouge *Bonnemaisonia hamifera* (Persson et al., 2011). Il a aussi été démontré que la composition des biofilms peut être affectée par différents facteurs de stress tels que la lumière et la température. En effet, une faible lumière ainsi qu'une température basse ont conduit à une réduction de l'abondance des bactéries épiphytes (Wahl et al., 2010) alors que dans une autre étude, cette abondance diminue avec l'augmentation de la température (Stratil et al., 2013).

En termes de densité de bactéries epiphytes, les valeurs varient entre 10^2 et 10^7 cellules.cm^{-2} selon les espèces de macro-algues, la section du thalle et la saison (Armstrong et al., 2000 **;** Dobretsov et al., 2006a ; Bengtsson et al., 2010). Selon une étude de Tujula et al. (2006), l'analyse d'image de la communauté microbienne associée à la surface de l'algue verte *Ulva australis* a indiqué que la densité bactérienne augmentait de la pointe du thalle (10^6 cellules.cm^{-2}) à la base de l'algue (10^7 cellules.cm^{-2}).

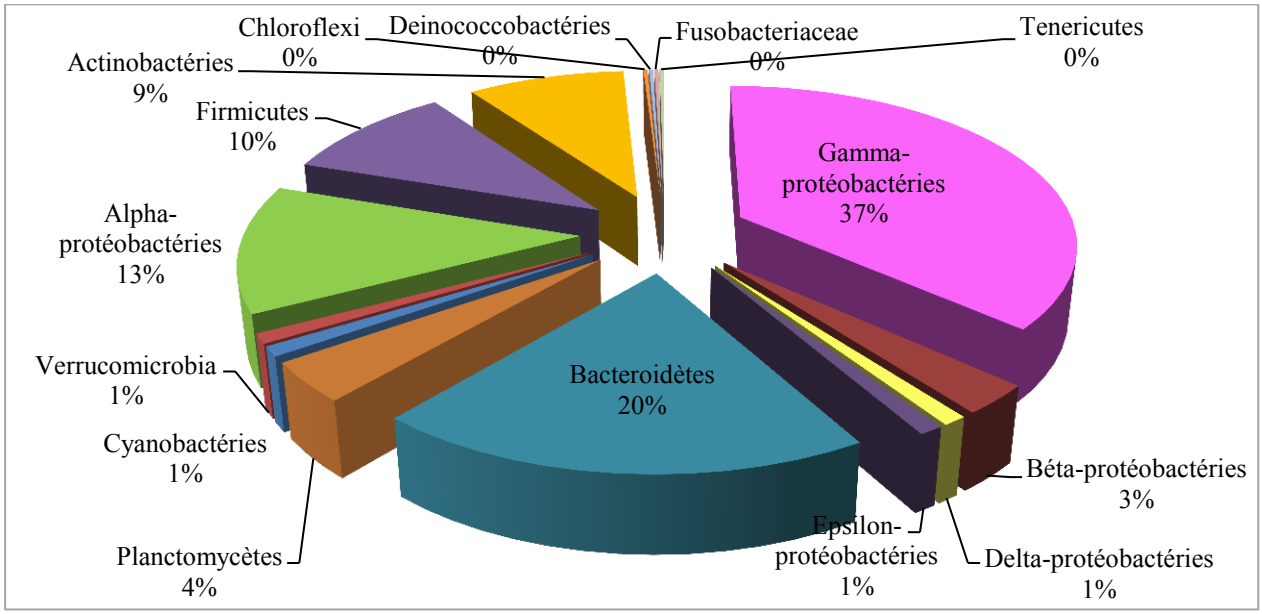


Figure 17 : Bilan des phyla bactériens rencontrés à la surface des macro-algues (Hollants et *al.*, 2012)

Le Tableau 2 récapitule les différents groupes bactériens en association avec les surfaces des trois phyla d'algues (Chlorophycées, Phaeophycées et les Rhodophycées).

Tableau 2 : Phyla bactériens associés à la surface de macro-algues marines

Classe d'algues	Espèce d'algue	Groupe de bactéries	Origine géographique	Référence
Chlorophytes				
	Bryopsis hypnoides	Bacteroidetes, Firmicutes, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, epsilonproteobacteria	Mexique	(Hollants et al., 2011a) (Hollants et al., 2011b)
	Bryopsis pennata	Bacteroidetes, Firmicutes, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, epsilonproteobacteria	Mexique	
	Caulerpa taxifolia	Bacteroidetes, Alphaproteobacteria, Bétaproteobacteria, Gammaproteobacteria, epsilonproteobacteria	Australie, Tahiti, Philippines et Méditerranée	(Meusnier et al., 2001)
	Chara aspera	Actinobacteria, Bacteroidetes, Alphaproteobacteria, Bétaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Planctomycètes	Allemagne	(Hempel et al., 2008)
	Desmidium grevillii	Bacteroidetes, Alphaproteobacteria, Bétaproteobacteria, Gammaproteobacteria	USA	(Fisher et al., 1998)
	Halimeda opuntia	Bacteroidete, Cyanobacteria	N. Antilles	(Barott et al., 2011)
	Hyalotheca dissiliens	Bacteroidetes, Alphaproteobacteria, Bétaproteobacteria, Gammaproteobacteria	USA	(Fisher et al., 1998)
	Spondylosium pulchrum	Bacteroidetes, Alphaproteobacteria, Bétaproteobacteria, Gammaproteobacteria	USA	
	Ulva lactuca	Proteobacteria	Australie	(Egan et al., 2000)
	Ulva australis	Actinobacteria, Bacteroidetes, Planctomycètes, Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria	Australie	(Longford et al., 2007)
	Ulva australis	Actinobacteria, Bacteroidetes, Planctomycètes, Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Cyanobacteria, Verrucomicrobia	Australie	(Burke et al., 2011)
	Ulva australis	Bacteroidetes, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria	Australie	(Tujula et al., 2010)
	Ulva intestinalis	Actinobacteria, Bacteroidetes, Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria, epsilonproteobacteria, Verrucomicrobia	Allemagne	(Tujula, 2006)
	Ulva prolifera	Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Alphaproteobacteria, Bétaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria, epsilonproteobacteria, Planctomycètes, Verrucomicrobia	Chine	(Liu et al., 2011)

Phaeophytes				
	Dictyota bartayresiana	Bacteroidetes, Cyanobacteria	N. Antilles	(Barott et al., 2011)
	Fucus Evanescens	Gammaproteobacteria	Japon	(Ivanova et al., 2002a)
	Fucus vesiculosus	Bacteroidetes, Cyanobacteria, Planctomycètes, Alphaproteobacteria, Bétaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria, epsilonproteobacteria, Verrucomicrobia	Allemagne	(Lachnit et al., 2011)
	Laminaria digitata	Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Flavobacteria		(Salaün et al., 2012)
	Laminaria hyperborea	Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Planctomycètes, Alphaproteobacteria, Bétaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Verrucomicrobia	Norvège	(Bengtsson & Ovreas, 2010)
	Laminaria longicruris	Flavobacteria	Canada	(Laycock, 1974)
	Laminaria rodriguezii	Bétaproteobacteria	Espagne	(Trias et al., 2012)
	Saccharina latissima	Actinobacteria, Bacteroidetes, Alphaproteobacteria,Bétaproteobacteria, Gammaproteobacteria,Firmicutes	Allemagne	(Wiese et al., 2009)
	Saccharina latissima	Bacteroidetes, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria	Allemagne	(Staufenberger et al., 2008)
Rhodophytes				
	Bonnemaisonia hamifera	Actinobacteria, Bacteroidetes, Alfaproteobacteria, Gammaproteobacteria	Suède	(Persson et al., 2011)
	Espèces d'algues corallines	Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicute, Planctomycètes, Alphaproteobacteria	N. Antilles	(Barott et al., 2011)
	Delisea pulchra	Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Planctomycètes, Alphaproteobacteria, Déltaproteobacteria, Gammaproteobacteria,Verrucomicrobia	Australie	(Longford et al., 2007)
	Delisea pulchra	Bacteroidetes, Planctomycètes, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria	Australie	(Fernandes et al., 2011)
	Gracilaria vermiculophylla	Actinobacteria, Cyanobacteria, Alphaproteobacteria, Planctomycètes, Bétaproteobacteria, Déltaproteobacteria, Rhodobacterales, Deinococcus-Thermus	Allemagne	(Lachnit et al., 2011)
	Osmundaria volubilis	Bétaproteobacteria	Espagne	(Trias et al., 2012)
	Phyllophora crispa	Bétaproteobacteria	Espagne	
	Porphyra yezoensis	Bacteroidetes, Alphaproteobacteria, Bétaproteobacteria, Flavobacteria Gammaproteobacteria, Lentisphaerae, Sphingobacteria	Japon	(Namba et al., 2010)

III.1.1.2. Facteurs influençant la formation et le maintien d'un biofilm à la surface des macro-algues

Plusieurs facteurs, biologiques, physiques et chimiques de la surface, sont susceptibles d'influencer la colonisation des bactéries et leur structuration qualitative et quantitative, et de maintenir ou non une association stable entre les algues et leurs biofilms (Figure 18). Les paramètres qui définissent l'environnement chimique de surface sont les métabolites libérés par les macro-algues, mais aussi les métabolites d'origine microbienne. De plus, les échanges gazeux et de matière organique entre l'hôte et les épibiontes [fourniture d'oxygène et de dioxyde de carbone, production d'espèces réactives d'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*)] peuvent moduler la formation du biofilm. Les paramètres physiques consistent en la capacité de la surface à attirer les colonisateurs mais aussi la capacité de ces derniers à s'adapter aux conditions de leur nouvelle niche. L'ensemble de ces paramètres sont revus par Egan et al. (2013), et sont détaillés ci-après (Cf. **III.2**).

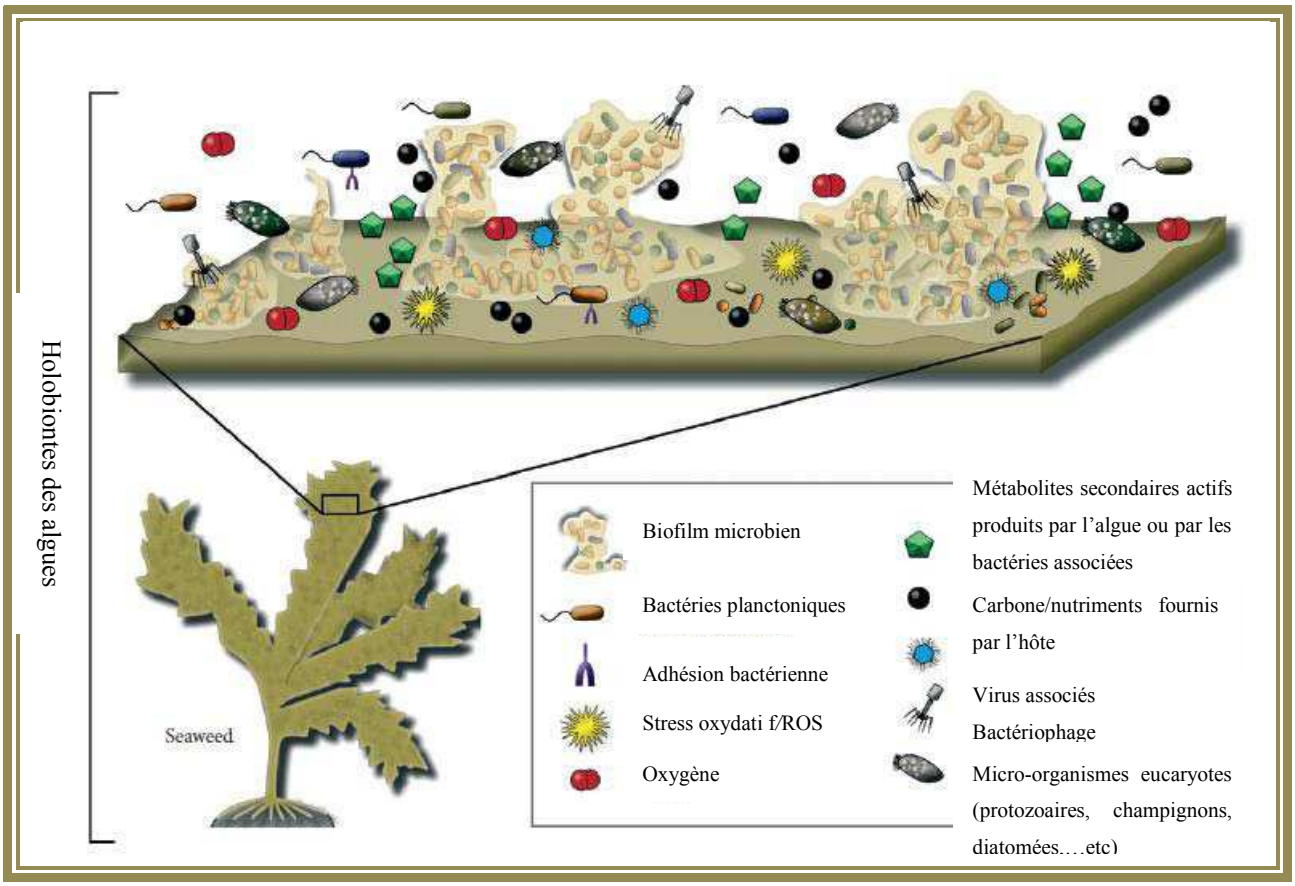


Figure 18 : Représentation schématique des facteurs susceptibles d'influencer la formation d'un biofilm à la surface des macro-algues (d'après Egan et *al*., 2013)

II.1.2. Compositions et densités d'épibiontes sur des surfaces vivantes

Lorsqu'il s'agit de surfaces biotiques, le phénomène de biofouling est appelé épibiose (du grec *épi*, « sur », et *bios*, « vie »), l'organisme colonisé (hôte) est nommé basibionte, et les organismes colonisateurs sont dits épibiontes (Wahl, 1989). Selon la nature de l'organisme support, on distingue deux types d'épibiontes : les épiphytes [épibiontes vivants sur un organisme végétal tels que les macro-algues et les phanérogames marins) (Figure 19 (a))] et les épizoaires [épibiontes vivant sur une espèce animale tels que les éponges, les bryozoaires ou les mollusques bivalves) (Figure 19 (b))]. Les épibiontes eux-mêmes peuvent être des organismes procaryotes, animaux ou végétaux, autotrophes ou hétérotrophes (Callow & Callow, 2006).

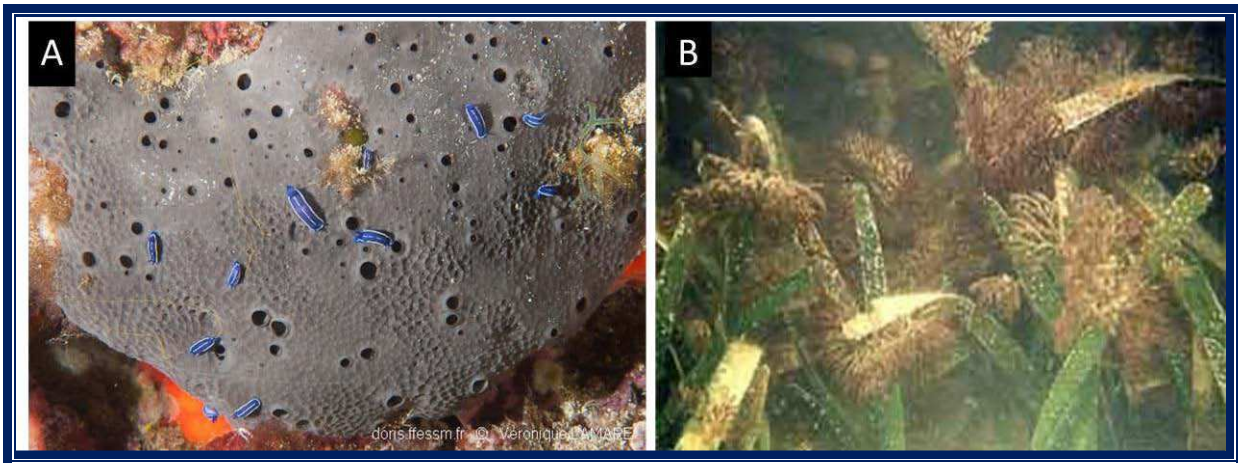


Figure 19 : Surfaces d'organismes marins revcouvertes par des épibiontes

(A) l'éponge *Cacospongia scalaris* portant des nudibranches (épizoaires) (source : http://doris.ffessm.fr),
(B) la phanérogame marine *Thalassia testudinum* recouverte par des algues (épiphytes) (source : http://www.flmnh.ufl.edu/fish/southflorida/seagrass/life.html)

Pour la grande majorité des organismes marins, les communautés bactériennes rencontrées à leur surface sont spécifiques, mais aussi variables et évolutives, en termes de composition et de densité, en fonction des aspects qualitatifs et quantitatifs du milieu tels que la lumière, les conditions thermiques, la composition chimique, la profondeur, la qualité de l'eau, l'approvisionnement en nutriments, la concurrence et le broutage (Allen, 1971 ; Lachnit et al., 2009 ; Sneed & Pohnert, 2011 ; Briand et al., 2012 ; Wahl et al., 2012). La composition et la densité cellulaire d'un biofilm sont aussi dépendantes de certains critères liés au basibionte (stade du cycle de vie, partie colonisée de l'hôte, propriétés physico-chimiques de surface et état physiologique) (Laycock, 1974 ; Prieur et al., 1993 ; Callow & Callow, 2006 ; Bourne et al., 2007 ; Salaün et al., 2012) et de l'épibionte (capacité des bactéries à répondre à

la sélection naturelle en fonction de leur tolérance vis-à-vis du substrat et de leur plasticité physiologique) (Lee, 2002). Cependant, certaines bactéries particulières sont durablement associées à quelques animaux marins, et sont différentes de celles trouvées dans l'eau de mer environnante (Thakur et al., 2004 ; Sharp et al., 2007). Par exemple, *Candidatus endobugula sertula* est spécifiquement associée à la surface des larves du bryozoaire *Bugula neritina* et les protège contre les poissons prédateurs (Sharp et al., 2007). Une autre bactérie *Bacillus* sp. est toujours exclusivement associée à la surface de l'éponge *Ircinia fusca* (Thakur et al., 2004).

En ce qui concerne la structure des communautés, les biofilms associés à la surface des organismes marins sont généralement dominés par les procaryotes, tandis que les eucaryotes tels que les micro-algues, et en particulier les diatomées, les champignons et les protozoaires, peuvent être présents mais en plus faible abondance (Bodammer & Sawyer, 1981 ; Burja & Hill, 2001 ; Hentschel et al., 2003 ; Webster & Taylor, 2012). Les organismes dont la surface est exempte de microfouling, notamment de bactéries, sont rares : c'est le cas de certaines ascidies (Wahl & Lafargue, 1990).

Les densités d'épibiontes peuvent généralement atteindre 10^6 cellules par ml d'eau de mer pour les bactéries, 10^3 pour les micro-algues, et 10^2 pour les propagules d'invertébrés et de macro-algues (Harder, 2009 ; Wahl et al., 2012). A la surface des éponges, ces densités peuvent largement varier selon l'espèce : on estime par exemple la présence d'une densité de 60 cellules.cm^{-2} chez l'espèce *Crambe crambe*, et de 3 à 4.10^4 chez *Ircinia fasciculata* et *Spongia officinalis* (Becerro et al., 1994). Une concentration cellulaire plus élevée a été trouvée chez *Ceratoporella nicholsoni* (7.10^6 cellules.cm^{-2}) (Santavy & Colwell, 1990) et une densité encore plus élevée (7 à 15.10^6 cellules.cm^{-2}) chez *Ircinia ramosa* (Thakur & Anil, 2000). Les coraux peuvent supporter des densités de bactéries de l'ordre de 5.10^5 cellules.cm^{-2} chez plusieurs espèces (Koh, 1997). *Oculina patagonica* semble constituer une exception puisque de fortes densités de l'ordre de 8,3.10^8 cellules.cm^{-2} y ont été décelées (Koren & Rosenberg, 2006). Les densités bactériennes à la surface de divers crustacés varient entre 7.10^4 et 3.10^6 cellules.cm^{-2} (Becker, 1996). Les crabes décorateurs semblent fortement colonisés mais aucune valeur de la densité à leur surface n'est rapportée dans la littérature (Hultgren & Stachowicz, 2011). Les densités cellulaires des bactéries associées au bryozoaire *Conopeum reticulatum* sont approximativement de 5.10^7 cellules.cm^{-2} (Kittelmann & Harder, 2005).

III.2. Types d'interactions algues / biofilms

Les macro-algues marines vivent en association avec des bactéries colonisant leurs surfaces. Ces organismes interagissent entre eux comme une unité fonctionnelle unifiée appelée « holobionte ». Ce concept a été décrit tout d'abord chez les coraux (Rosenberg et al., 2007 ; Bourne et al., 2009) et récemment chez les macro-algues (Barott et al., 2011). Au sein de l'holobionte, il existe un ensemble complexe d'interactions chimiques, physiques et biologiques entre l'hôte et ses épiphytes. Ces interactions évoluent en fonction de plusieurs facteurs en relation avec l'environnement (y compris les échelles spatiales et temporelles) et avec les espèces elles-mêmes. Elles peuvent être bénéfiques (mutualistes) ou préjudiciables pour l'un ou l'autre des organismes impliqués (Wahl & Mark, 1999 ; Goecke et al., 2010 ; Wahl et al., 2012 ; Egan et al., 2013). Globalement, les interactions macro-algues/bactéries décrites dans la littérature portent sur la production de phytohormones et la morphogénèse des macro-algues déclenchée par les produits bactériens, les activités antibiotiques spécifiques affectant les épibiontes et permettant l'obtention de mécanismes de stimulation du métabolisme oxydatif. Le contrôle du microfouling à leur surface par les algues leur permet de prévenir l'adhésion d'autres colonisateurs en particulier des pathogènes (Figure 20).

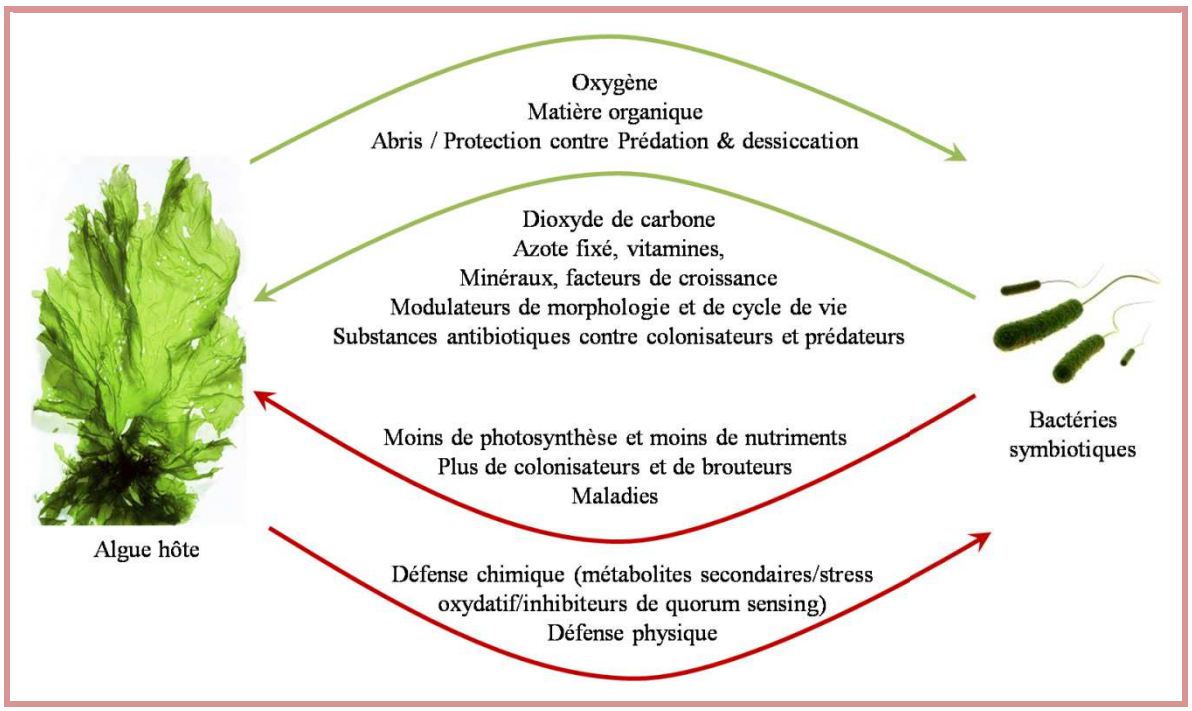


Figure 20 : Vue d'ensemble des interactions bénéfiques (en vert) et préjudiciables (en rouge) entre les macro-algues et les bactéries (adapté de Hollants et al. (2012).

III.2.1. Interactions bénéfiques

Dans les environnements marins benthiques, les relations entre les macro-algues et les communautés microbiennes associées peuvent être mutualistes, c'est-à-dire bénéfiques à la fois à l'hôte et aux épiphytes.

III.2.1.1. Relations trophiques

- **Echanges gazeux / matières organiques**

Le phycosphère est la zone entourant une cellule algale et dans lequel les micro-organismes sont influencés par les nutriments organiques des algues (Cole, 1982 ; Doucette, 1995). Ces derniers sont libérés au cours de la croissance cellulaire de l'algue et peuvent être disponibles directement pour les bactéries hétérotrophes (Cole, 1982). Les algues sont aussi capables de fournir de l'oxygène aux bactéries (Brock & Clyne, 1984 ; Hollants et al., 2012). A leur tour, les bactéries minéralisent la matière organique pour fournir aux algues du dioxyde de carbone, des minéraux, des enzymes, des vitamines et des facteurs morphogènes afin de favoriser leur croissance. Par exemple, certaines enzymes (amylase, lipase et protéinase), extraites des genres *Bacillus, Corynebacterium, Vibrio, Alcaligenes* et *Pseudomonas* participent à la croissance de deux algues vertes (*Enteromorpha* sp. et *Chaetornorpha* sp.) et d'une algue rouge (*Hypnea* sp.) (Lakshmanaperumalsamy & Purushothaman, 1982). Selon une étude de (Ramaiah & Chandramohan, 1992), il semble que les bactéries épiphytes de huit espèces d'algues marines utilisent les éléments nutritifs de ces algues pour leur biotransformation par le biais de certaines enzymes telles que les cellulases et les pectine lyases. Une autre enzyme, la catalase, produite par *Pseudoalteromonas porphyrae*, a un effet de promoteur de croissance sur l'algue brune *Laminaria japonica* (Dimitrieva et al., 2006). Les bactéries fournissent également des hormones aux macro-algues. Même si la production d'hormones semble être répandue au sein de divers genres bactériens marins, il a été démontré que les bactéries associées aux macro-algues produisent plus d'hormones de type cytokines et auxines par rapport aux bactéries planctoniques (Iwasaki, 1979 ; Maruyama et al., 1986 ; Maruyama et al., 1990). Grâce à la capacité des bactéries à solubiliser le fer, ce dernier devient biodisponible et peut donc stimuler la croissance des algues (Keshtacher-Liebso et al., 1995 ; Amin et al., 2009).

- **Fixation d'azote par les bactéries**

Des études ont montré que les bactéries marines épiphytes constituent de sources importantes d'azote fixé pour les algues. Les micro-organismes fixateurs d'azote les plus couramment associés aux macro-algues sont des cyanobactéries. Par exemple, des espèces d'algues brunes telles que *Sargassum natans* et *S. fluitans* reçoivent leurs besoins en azote de la cyanobactérie *Dichothrix fucicola* associée à leur surface (Carpenter, 1972). D'autres espèces fixatrices d'azote telles que *Calothrix* sp., *Anabaena* sp. et *Phormidium* sp. ont été observées en association avec des populations d'algues vertes du genre *Codium* (*C. adhaerens* et *C. fragile*) (Dromgoole et al., 1978 ; Rosenberg & Paerl, 1981) et *Microdictyon*, ainsi que la phéophycée *Dictyota* sp. (Capone et al., 1977). L'alimentation en azote de *Caulerpa taxifolia* (Chlorophytes) est assurée par une bactérie endosymbiotique *Agrobacterium rhizobium*, localisée au niveau des rhizoïdes de l'algue (Chisholm et al., 1996). L'activité significative de la nitrogénase a été attribuée à la bactérie fixatrice d'azote *Azotobacter* sp., présente à la surface de la macro-algue *Codium fragile* (Head & Carpenter, 1975). Dans les eaux du lac de l'Albufera (Valence, Espagne), certaines cyanobactéries telles que *Nostoc* sp., *Calothrix* sp. et *Anabaena* sp., isolées à l'algue verte (Chlorophyte) *Chara vulgaris* semblent en être les principaux pourvoyeurs en azote (Ariosa et al., 2004). L'algue rouge *Laurencia dendroidea* présente aussi à sa surface des cyanobactéries fixatrices d'azote qui constituent les micro-organismes dominants des communautés microbiennes associées (de Oliveira et al., 2012).

- **Détoxification de l'environnement par les bactéries**

En plus de la fixation de l'azote, le biofilm associé joue un rôle dans la protection de la macro-algue contre des éléments et des composés toxiques tels que les métaux lourds (Riquelme et al., 1997) ou encore le pétrole brut (Semenova et al., 2009). Les bactéries sont capables de détoxifier, par exemple, les métaux lourds par précipitation, adsorption ou transformation en formes moins toxiques (Yurkov & Beatty, 1998). Elles peuvent également agir comme un biofiltre qui diminue la disponibilité des ions Cu+2 libres dans l'environnement et qui sont toxiques pour les organismes marins par bioaccumulation (Andrade et al., 2004).

- **Effet des bactéries sur la morphologie des algues**

Outre les effets favorisant la croissance, les bactéries peuvent agir sur le cycle morphologique et de vie de leur hôte. Pour certaines algues, la présence des bactéries epiphytes est nécessaire pour se développer correctement (Armstrong et al., 2001 ; Hollants et al., 2012). Plusieurs études ont mis en évidence les effets de certaines bactéries sur la morphogenèse de macro-algues vertes foliacées telles qu'*Ulva linza*, *U. compressa* ((Fries & Åberg, 1978), *Ulva* sp. (Provasoli, 1980), *U. pertusa* (Nakanishi et al., 1996 ; Nakanishi et al., 1999), *U. fasciata* (Singh et al., 2011), *U. mutabilis* (Spoerner et al., 2012) et *Monostroma oxyspermum* (Tatewaki et al., 1983 ; Matsuo et al., 2003 ; Marshall et al., 2006). En effet, ces algues perdent leur morphologie typique quand elles sont cultivées en l'absence de leurs bactéries indigènes (en culture axénique ou aseptique). Les expériences de laboratoire montrent que l'introduction de filtrats de cultures bactériennes dans le milieu axénique permet la restauration de la morphologie des algues. Ce phénomène a également été observé chez les macro-algues rouges *Dasya pedicellatan* et *Polysiphonia urceolata* (Provasoli & Pintner, 1972).

- **Effets des bactéries sur la germination des spores**

Il a été découvert que les biofilms bactériens associés aux algues jouent un rôle dans la germination des spores. Par exemple, les biofilms formés par certaines souches attribuées aux groupes *Pseudomonas* et *Alteromonas* améliorent le nombre de spores germinés d'une algue verte du genre *Enteromorpha* (Thomas & Allsopp, 1983). Les bactéries épiphytes d'une autre algue verte *Monostroma oxyspermum* participent à l'accélération de croissance des spores de cette chlorophyte ainsi qu'à leur libération (Matsuo et al., 2003).

III.2.1.2. Interactions écologiques

Les interactions écologiques s'effectuent essentiellement par voie chimique. La médiation chimique entre macro-algues et bactéries associées constitue ainsi une facette originale à étudier par rapport aux aspects nutritionnels (Paul & Puglisi, 2004). Avec tout ce que l'algue fournit à ses épibiontes en terme de matière organique, elle présente non seulement un environnement propice pour le développement et la croissance des épiphytes, mais également un abri idéal (Lane & Kubanek, 2008) pour les protéger vis-à-vis de colonisateurs concurrents et de la dessiccation. A leur tour, les bactéries épiphytes produisent des substances antibiotiques qui peuvent protéger l'algue contre des agents pathogènes (maladies et

infections), des prédateurs et des brouteurs. Par exemple, certaines bactéries appartenant principalement au genre *Pseudoalteromonas*, isolées à partir de la surface de quelques algues marines [l'algue verte *Enteromorpha intestinalis* (Lemos et al., 1985) et les trois algues brunes *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata* (Boyd et al., 1998 ; Boyd et al., 1999) et *L. saccharina* (Wiese et al., 2009) présentent une activité antibactérienne à l'encontre d'autres bactéries marines. D'autres bactéries appartenant à ce même genre (*Pseudoalteromonas*) et associées à l'algue verte *Ulva lactuca* sont capables de présenter une large palette d'activités antifouling en inhibant l'attachement de larves d'invertébrés marins (*Hydroides elegans* et *Balanus amphitrite*) mais également des spores de l'algue rouge *Polysiphonia* sp. (Egan et al., 2001 ; Holmström et al., 2002 ; Franks et al., 2006).

III.2.2. Interactions péjudiciables

- **Compétition pour les nutriments**

La croissance des algues dans les eaux oligotrophes est généralement limitée par le manque de certains nutriments inorganiques essentiels tels que l'azote et le phosphore (Cole, 1982). Dans ces systèmes, les bactéries ont la capacité d'adsorber les éléments nutritifs plus rapidement que les algues (Currie & Kalff, 1984). Ce phénomène a un impact négatif sur la croissance et la reproduction algales (Honkanen & Jormalainen, 2005) et peut engendrer une mortalité accrue (Hemmi et al., 2005).

- **Effets des autres paramètres environnementaux**

Le métabolisme bactérien peut modifier l'environnement et le rendre défavorable à la croissance des algues. Dans certains milieux, lorsque la matière organique est importante, la respiration aérobie des bactéries peut consommer la totalité de l'oxygène dissous disponible. Ainsi, certains taxons d'algues peuvent être inhibés par le manque d'oxygène (Cole, 1982). Le métabolisme bactérien peut également entraîner une diminution du pH suite à la production d'acides organiques et à l'oxydation de certaines espèces chimiques (NH, H_2S), ce qui rend l'environnement acide et donc défavorable à la croissance de l'hôte. En outre, l'activité lytique des bactéries peut causer la lyse des cellules algales. Ainsi, les bactéries favorisent dans certains cas la germination des spores, mais peuvent l'inhiber dans d'autres cas. Par exemple, *Pseudoalteromonas tunicata* isolée à partir de l'algue verte *Ulva australis* produit un peptide algicide qui inhibe la germination des spores de son hôte (Egan et al., 2001). Un

effet similaire a été observé chez *Ulva pertusa* en présence de certains acides gras (acides oléique et hydroxymyristique) extraits de *Shewanella oneidensis* (Bhattarai et al., 2007).

- **Maladies des algues dues à des bactéries pathogènes**

Les maladies des algues associées aux biofilms de surface sont nombreuses. Ces maladies ont un impact sur la couleur, l'odeur et l'aspect des thalles (Wahl et al., 2012). Des bactéries pathogènes peuvent pénétrer dans le tissu algal et endommager la paroi cellulaire, favorisant ainsi l'entrée d'organismes opportunistes (Buschmann et al., 1997 ; Ivanova et al., 2005). Une dégradation accrue des tissus de l'hôte entraîne des mortalités importantes (Correa et al., 1996 ; Steinberg et al., 1997). La maladie des nécroses rouges chez l'algue brune commerciale *Laminaria japonica* est causée par la bactérie *Pseudoalteromonas bacteriolytica* (Yumoto et al., 1989 ; Sawabe et al., 1998). Chez cette même espèce d'algue, les thalles sont abimés sous l'effet de la bactérie *Pseudoalteromonas elyakovii* (Sawabe et al., 2000) et les sporophytes peuvent être atteints par une maladie causée par des souches bactériennes appartenant aux genres *Pseudoalteromonas*, *Vibrio* et *Halomonas* (Wang et al., 2008). La maladie des nécroses blanches chez l'algue brune *Nereocystis luetkeanais* est causée par une bactérie du genre *Acinetobacter* (Andrews, 1977). La même maladie touche l'espèce d'algue rouge *Porphyra leucosticta* et l'agent pathogène impliqué est alors *Vibrio* sp. (Tsukidate, 1983). Le blanchiment des thalles de *Gracilaria chilensis* (Rhodophyte) est causé par une bactérie endophytique du genre *Amoeba* (Correa & Flores, 1995). La maladie des nécroses vertes déclenchée par *Vibrio logei*est observée chez l'algue brune *Undaria pinnatifida* (Jiang et al., 1997). Le syndrôme de pourriture ou de dégradation des thalles touche des espèces d'algues rouges du genre *Gracilaria* ainsi que d'autres algues telle *Fucus evanescens* (Ivanova et al., 2002a ; Ivanova et al., 2002b) impliquant *Vibrio* sp. en tant qu'agent pathogène (Lavilla-Pitogo, 1992 ; Beleneva & Zhukova, 2006). Certaines bactéries agissent comme des pathogènes secondaires, accélérant la progression de la maladie suite à une première contamination (Correa et al., 1994).

- **Interactions chimiques / physiques**

Les algues peuvent inhiber l'adhésion des bactéries et la formation de biofilm à leur surface via plusieurs stratégies.

Par voie chimique :

Les algues marines dépendent fortement de leur arsenal de substances chimiques pour influencer la colonisation de leur surface par les bactéries. L'aspect de défense chimique a été largement étudié et détaillé durant ces 2 dernières décennies (e.g. Engel et al., 2002 ; Goecke et al., 2010). Les métabolites de surface peuvent donc être impliqués dans l'inhibition de la colonisation et de la croissance des bactéries rencontrées à la surface des algues (Maximilien et al., 1998 ; Steinberg et al., 2001 ; Bhadury & Wright, 2004 ; Dobretsov et al., 2006a ; Nylund et al., 2008 ; Lachnit et al., 2010 ; Saha et al., 2011 ; Thabard et al., 2011) (Cf. partie **III.2.1**).

Réciproquement, les épibiontes peuvent libérer à la surface des macro-algues des métabolites secondaires ayant le pouvoir d'attirer des consommateurs qui se nourrissent de manière significative de leur hôte (l'algue) (Karez et al., 2000). Ainsi, le taux de broutage des algues peut augmenter en fonction de la production métabolique des communautés bactériennes associées à leur surface (Wahl & Hay, 1995 ; Wahl et al., 1997 ; Karez et al., 2000 ; Huggett et al., 2006).

Les stratégies antifouling de macro-algues marines ne sont pas basées uniquement sur la libération de métabolites secondaires comme moyen de défense, mais elles peuvent également impliquer des réponses rapides à travers la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) à la périphérie de la cellule, on parle alors de stress oxydatif. Ce procédé est une réaction de défense non spécifique généralement caractérisée par une activation rapide des ROS provoquant la mort de l'épibionte (Weinberger & Friedlander, 2000 ; Steinberg & de Nys, 2002 ; Potin, 2008). Les oligosaccharides, les glycoprotéines, les glycopeptides et les acides gras libres sont des déclencheurs forts d'une stimulation du métabolisme oxydatif chez les macro-algues (Weinberger & Friedlander, 2000 ; Küpper et al., 2001 ; Ar Gall et al., 2008 ; Potin, 2008). Il s'agit de la dégradation de la paroi cellulaire polysaccharidique de l'épibionte par ces espèces toxiques d'oxygène. Pour se protéger, les bactéries libèrent également des enzymes telles que des peroxydases, des catalases et d'autres oxydases qui permettent de dégrader les ROS et de minimiser leurs dommages (Weinberger et al., 2007). Une troisième stratégie développée par l'algue pour empêcher sa colonisation concerne l'inhibition du *quorum sensing* (QS) des bactéries. Le QS est un processus qui permet aux bactéries de communiquer de cellule à cellule grâce à de petites molécules de signalisation qu'elles synthétisent. Ces molécules, généralement des acyl-homosérine-lactones (HSL) chez la plupart des bactéries, contribuent entre autre à la formation des biofilms bactériens. Les

furanones halogenées sont les principaux antagonistes des HSL chez l'algue rouge *Delisea pulchra* (Steinberg et al., 1997 ; Maximilien et al., 1998). Chez l'algue brune *Laminaria digitata*, le système d'halogénopéroxydase naturel est aussi capable d'inhiber la signalisation des HSL (Borchardt et al., 2001). Par contre, il existe des algues qui sont elles-mêmes sensibles aux molécules du QS (Joint et al., 2002 ; Wheeler et al., 2006). En effet, les HSL peuvent par exemple affecter le flux de calcium dans les spores d'*Ulva* sp. entrainant leur mortalité (Joint et al., 2007). Les HSL peuvent également induire la libération de spores et faciliter le recrutement d'organismes épiphytes ainsi que d'autres colonisateurs (Weinberger et al., 2007).

Par voie physique :

Outre les moyens de défense chimique, les algues emploient des mécanismes physiques pour lutter contre la présence de bactéries épiphytes à leur surface. Les stratégies développées sont notamment la production d'un revêtement mucilagineux (Filion-Myklebust & Norton, 1981 ; Moss, 1982), l'élimination de la couche externe de la cellule (Nylund et al., 2005), et l'érosion continue des extrémités distales pour éliminer les bactéries présentes à la surface (Mann, 1973 ; Ott, 1980).

En réalité, il est extrêmement difficile de comprendre les interactions entre eucaryotes et procaryotes marins en raison de la complexicité des phénomènes et des facteurs qui influencent l'environnement marin et qui sont généralement sous estimés. En se basant uniquement sur des expérimentations ou des bio-essais ciblés *in vitro*, nous ne pouvons pas corréler à un rôle écologique un organisme ou un autre. L'approche par métabolomique environnementale devrait pouvoir fournir des possibilités pour améliorer notre compréhension fondamentale des interactions entre les différents organismes en tenant compte de différents processus naturels.

III.3. Approche métabolomique pour l'analyse des molécules produites à la surface des macro-algues

III.3.1. Intérêt de l'étude des métabolites de surface

De nombreux travaux en chimie des substances naturelles montrent que les macro-algues contiennent communément des métabolites possédant des propriétés antifouling.

Cependant, ces études ne démontrent pas en général si ces composés ont un rôle effectif dans le milieu vis-à-vis des organismes pouvant coloniser leur surface (Steinberg et al., 2001). La plupart des travaux visant à rechercher des produits antifouling à partir d'algues ont été conduits principalement sur des extraits bruts. Ces derniers contiennent plusieurs molécules, y compris celles qui ne sont pas en contact avec les communautés épiphytes, d'où la difficulté de juger un extrait brut comme actif à l'échelle écologique. Par exemple, chez l'algue rouge *Delesseria sanguinea*, les extraits bruts ont un effet anti-adhésion contre *Balanus improvisus*, en bioessais de laboratoire. Par contre, l'algue dans son milieu semble stimuler l'attachement de ces organismes (Nylund & Pavia, 2003). Cette contradiction apparente résulte probablement du fait que ces métabolites ne sont pas excrétés à l'extérieur de l'algue, et donc n'interagissent jamais avec les organismes épiphytes.

Certains critères ont été définis pour démontrer que les algues utilisent bien des substances chimiques pour lutter contre la colonisation de leur surface (Hay et al., 1987 ; Davis et al., 1989 ; Schmitt et al., 1995 ; Clare, 1996): (i) la surface de la macro-algue doit être naturellement dépourvue de biofouling dans son milieu naturel, (ii) le composé anti-fouling putatif doit inhiber l'attachement des organismes colonisateurs à la concentration se trouvant naturellement à la surface de l'algue, (iii) les tests biologiques effectués pour vérifier cette activité doivent employer un large panel d'organismes colonisateurs écologiquement pertinents, et (iv) le composé supposé actif doit être continuellement dégagé dans l'eau environnante. L'étude du métabolome de surface a donc constitué un point de départ logique pour les chercheurs en écologie chimique marine afin de comprendre comprendre le rôle réel de certaines molécules produites par des organismes marins et actives en antifouling.

Un grand intérêt a été accordé à l'algue rouge australienne *Delisea pulchra* dans le cadre de la recherche des composés actifs de surface. Quelques études ont débuté par des observations de la surface de l'algue. Ces observations ont révélé que la densité bactérienne près du crampon était significativement plus importante que celle trouvée sur les pointes apicales (Steinberg et al., 1997), où les plus fortes concentrations de furanones halogénées ont été détectées (de Nys et al., 1996). Ces observations ont conduit Maximilien et al. (1998) à explorer l'hypothèse selon laquelle les furanones halogénées (Figure 21) étaient impliquées dans l'inhibition de la colonisation bactérienne à la surface de l'algue. Les bio-essais en laboratoire ont montré que les furanones utilisées à une plage de concentrations naturellement présentes à la surface de *D. pulchra* ont fortement inhibé l'attachement, le swarming et le swimming (trois caractéristiques importantes associées à la colonisation de la surface par les

bactéries) d'un grand nombre des souches bactériennes marines. Dans une deuxième expérience, les mêmes auteurs ont montré que l'adhésion de trois souches isolées à partir du substrat avoisinant a été beaucoup plus fortement affectée que celle de trois souches isolées de la surface de *D. pulchra*. Ces composés halogénés ont montré également une forte activité anti-adhésion vis-à-vis des propagules de quatre espèces d'algues colonisatrices (*Ulva* sp., *Ceramium* sp., *Polysiphonia* sp. et *Ectocarpus siliculosis*) représentatives de la communauté d'épibiontes de *D. pulchra* (Dworjanyn et al., 2006) et vis-à-vis des spores de l'algue rouge *Polysiphonia* sp. (Nylund et al., 2007). Ces données, couplées à la connaissance de la localisation des furanones (au niveau de la surface) fournissent une démonstration rigoureuse du rôle antifouling de ces métabolites. En effet, il a été démontré que les furanones sont localisées dans la vésicule centrale des cellules glandulaires de *D. pulchra* (Steinberg et al 2001). Une compréhension de la localisation des métabolites secondaires est essentielle pour comprendre leur rôle écologique dans la médiation d'interactions entre l'algue et son biofilm. Steinberg et al (2001) ont supposé que les vésicules des cellules glandulaires ont un rôle lors du transfert des métabolites vers la surface.

Figure 21 : Exemples de structures de furanones halogénés

Laurencia obtusa, une autre espèce d'algue rouge dont la surface est généralement exempte d'épibiontes, a fait l'objet de quelques études similaires (Sudatti et al., 2006 ; Sudatti et al., 2008). L'élatol, un sesquiterpène halogéné, est le principal métabolite secondaire détecté au niveau de la surface de cette algue mais sa quantité était beaucoup plus faible que celle trouvée dans le thalle entier. L'élatol est probablement stocké dans une structure appelée « corps en cerise » ayant un lien avec la paroi cellulaire de *L. obtusa*. Il s'agit des canaux de connexions membraneuses qui ont, peut être, pour rôle de transporter les composés du corps en cerise vers la paroi cellulaire (Sudatti et al., 2008).

D'autres études ont également montré que les produits naturels extraits à partir de la surface d'algues jouent un rôle en antifouling. L'algue brune *Fucus vesiculosus* présente aussi

un effet inhibiteur significatif sur la colonisation par des balanes (Brock et al., 2007, Lachnit et al., 2010) grâce aux phlorotannins qu'elle sécrète. Une étude antérieure a suggéré que ces substances sont stockées dans des structures appelées « physodes » au niveau de la surface (Schoenwaelder, 2002). Parmi les métabolites exsudés à la surface de *F. vesiculosus*, la fucoxanthine semble être écologiquement pertinente en tant qu'un agent anti-adhésion vis-à-vis plusieurs souches bactériennes (Saha et al., 2011). Thabard et al. (2011) ont démontré que les molécules de surface de l'algue brune *Sargassum polyceratium* affectaient significativement la croissance bactérienne et le développement embryonnaire de trois invertébrés tropicaux. Les travaux d'Andras et al (2012) ont conclu que le neurymenolide A, un métabolite présent à la surface de l'algue rouge *Phacelocarpus neurymenioides*, est l'agent allélopathique principal contre les coraux se trouvant à proximité de l'algue. En effet, selon leurs expériences, les coraux mis en contact avec des substrats inertes n'ont pas subi de changement d'aspect. Alors que, dès leur contact avec *P. neurymenioides*, leur blanchiment a été observé.

Les études qui viennent d'être citées ont permis un début de compréhension des rôles écologiques potentiels des composés naturels issus d'algues dans la médiation des interactions intra- et interspécifiques et le développement des associations avec les communautés épibiontes. A l'inverse, de nombreux travaux ont présenté des propriétés antifouling de métabolites secondaires isolés à partir de macro-algues marines sans toutefois vérifier le rôle écologique exact de ces composés.

Dans ce contexte, il est primordial dans le cadre de recherches en écologie chimique marine de développer des approches méthodologiques liées à une meilleure connaissance du métabolome de surface afin de mieux comprendre et évaluer l'importance des produits chimiques de surface lors des interactions entre les différentes espèces de macro-algues et la grande diversité de leurs communautés épiphytes.

III.3.2. Intérêt d'une approche métabolomique de surface

La métabolomique est un domaine de recherche pluridisciplinaire développé récemment et basé sur l'interprétation d'une multitude d'informations visant à compléter la compréhension de processus biologiques (Oliver et al., 1998 ; Lindon et al., 2003). Il s'agit d'une nouvelle façon de faire progresser les connaissances sur la structure et la fonction des organismes dans leurs écosystèmes. Plus clairement, c'est une approche qui vise à analyser

globalement le métabolome d'une cellule, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme vivant dans un état donné (Fiehn, 2002). Le métabolome est défini comme l'ensemble des métabolites trouvés dans un milieu biologique donné. Il comprend toutes les substances organiques d'origine naturelle du métabolisme d'un organisme vivant et exclu toutes les substances provenant de l'expression des gènes, mais aussi les polymères biologiques, les xénobiotiques et leurs produits de biotransformation.

Parce que les métabolites présentent une diversité chimique élevée, il est impossible d'effectuer leur analyse avec une technique unique et universelle (Roux et al., 2011). Les trois principales techniques analytiques qui fournissent des informations structurales et pertinentes pour l'identification des métabolites sont la résonance magnétique nucléaire (RMN), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). Chacun de ces outils fournit des informations complémentaires à celles obtenues avec d'autres approches, mais parfois redondantes (Lindon & Nicholson, 2008 ; Goulitquer et al., 2012). Cependant, il est difficile, d'un point de vue pratique, d'analyser l'ensemble du métabolome d'un système biologique, à cause de sa complexité et du grand nombre de composés de structure chimique inconnue (Goulitquer et al., 2012).

Concernant les macro-algues marines, les approches métabolomiques n'ont été jusqu'à maintenant que rarement employées à des fins écologiques. (Nylund et al., 2011) ont étudié, par métabolomique, la défense chimique chez l'algue rouge invasive *Gracilaria vermiculophylla* vis-à-vis de l'isopode *Idotea baltica* en décrivant les réponses de l'algue dans deux conditions : un thalle intact et un thalle lysé ont été exposés à l'organisme herbivore. L'analyse multivariée des données à l'aide des techniques de GC-MS et de LC-MS ont montré que cette algue avait un effet anti-herbivore, traduit par un changement significatif du profil métabolique du thalle lysé par rapport à celui du thalle intact (témoin). Cela signifie que *G. vermiculophylla* possède un système de stimulation rapide et qu'elle est capable de produire des substances assurant la défense chimique lors de stress.

III.3.3. Protocoles d'extraction et de quantification des métabolites à la surface de macro-algues

De Nys et al. (1998) ont été les premiers à développer une méthodologie propre à l'extraction des molécules de surface à partir de macro-algues marines. Dix espèces ont fait

l'objet de leurs expérimentations : quatre algues rouges (*Delisea pulchra, Laurencia obtusa, Laurencia rigida* et *Pterocladia capillacea*), cinq algues brunes (*Dictyopteris acrostichoides, Dictyota dichotoma, Zonaria diesingiana, Dilophus marginatus* et *Sargassum linearifoliurn*) et une algue verte *Ulva* sp.

Le protocole d'extraction a été basé sur le choix de deux paramètres principaux : le solvant organique d'extraction et le temps d'exposition. Dans un premier test pour déterminer le solvant approprié, cinq solvants organiques ont été évalués pour leurs effets sur la lyse des cellules épithéliales chez deux espèces d'algues rouges (*D. pulchra* et *L. obtusa*) en utilisant la microscopie à épifluorescence. Les solvants, dans l'ordre de polarité croissante, ont été le *n*-hexane, le dichlorométhane (CH_2Cl_2), l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle et le méthanol (MeOH). Des morceaux de thalle ont été immergés dans les solvants et maintenus pendant des durées de 10, 20, 30 et 60s. Pour les autres algues, deux solvants uniquement ont été testés : le *n*-hexane à 30 et 60s, et le méthanol à 30s uniquement. A l'issu du temps d'exposition, les morceaux de thalles ont été directement observés au microscope à épifluorescence et la présence de la lyse cellulaire a été évaluée qualitativement et quantitativement. Les pigments dans les chloroplastes des algues autofluorescent lorsqu'ils sont excités dans le proche UV à la lumière bleue, émettant une fluorescence jaune au rouge. Les cellules intactes ont des chloroplastes discrets. Lorsque les cellules sont perturbées, les chloroplastes sont lysés tout en remplissant la cellule avec un pigment.

Les analyses ont donné les résultats suivants : pour la première série d'expériences concernant les deux algues *D. pulchra* et *L. obtusa*, seul le *n*-hexane a eté retenu pour 30s Quant à la deuxième série d'expériences, le méthanol à 30s paraissait totalement destructif pour les huit algues, le *n*-hexane, lui, permettait de conserver l'integrité cellulaire des algues à 30 et à 60s (Figure 22).

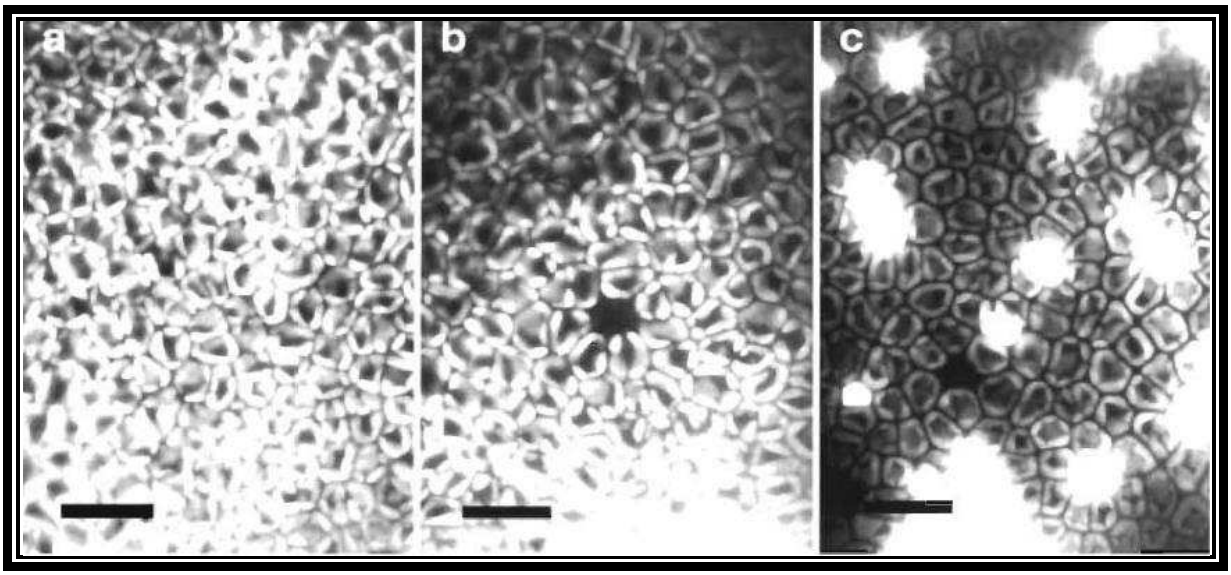


Figure 22 : Observation au microscope à épifluorescence de la surface de *D. pulchra*. Cellules non traitées (témoin) **(a)**, cellules extraites dans l'hexane pendant 30s **(b)**, et cellules extraites dans l'hexane pendant 60s **(c)**. Barre d'échelle = 22 µm (De Nys et al., 1998)

Les études suivantes concernant l'extraction de surface ont été intégralement inspirées des travaux de de Nys et al. (1998). Le tableau ci-dessous (Tableau 3) rassemble les données sur l'ensemble des protocoles utilisés à ce jour pour l'extraction de molécules de surface à partir d'algues.

Tableau 3 : Protocoles utilisés pour l'extraction des métabolites de surface

Espèce d'algue	Solvant d'extraction	Durée d'exposition	Remarques	Référence
Delisea pulchra (masse=2 g)	*n*-hexane (v=15 mL)	20s	Concentrations toujours efficaces dans l'inhibition des colonisateurs.	Dworjanyn et al. (1999)
Delisea pulchra (Surface=9 cm^2)	*n*-hexane (v=20 mL)	30 s	Furanones bioactives	Dworjanyn et al. (2006)
Laurencia obtusa	*n*-hexane (85%) (v=100 mL)	50 et 60 s	-Temps de lyse cellulaire > 50s donc t = 40s choisi -Concentrations d'élatol à la surface très inférieures à celles trouvées dans le thalle entier	Sudatti et al. (2006)
Fucus vesiculosus	*n*-hexane (6% de CH_2Cl_2)	30, 40, 50 et 60 s	t = 40s choisi	Brock et al. (2007)
Delisea pulchra	*n*-hexane (v =5 mL)	30, 40, 50 et 60 s	Lyses à partir de 50s	Nylund et al. (2007)
Pterocladia capillacea		20, 30, 40 et 50 s	Lyses à partir de 50s	
Solieria robusta		20, 30, 40, 50 et 60 s	Lyses à partir de 50s	
Caulerpa filiformis	*n*-hexane (5% de CH_2Cl_2)	30 et 60 s	Absence de lyses	
Dictyopteris acrostichoides	*n*-hexane (4% de CH_2Cl_2)	30, 40, 50 et 60 s	Lyses à partir de 50s	
Dilophus marginatus	CH_2Cl_2 /*n*-hexane (6% de CH_2Cl_2)	20, 30, 40, 50 et 60 s	Lyses à partir de 0s	
Laurencia rigida	*n*-hexane (1% de CH_2Cl_2)	20, 30, 40 et 50 s	Lyses à partir de 30s	
Fucus vesiculosus	MeOH (v/v ; 1:1) (v = 5 mL)	1, 5, 10, 15 et 60 s	-Utilisation du bleu d'Evans comme marqueur vital pour la microscopie pendant 30 min -t =10s choisi	Lachnit et al. (2010)
Sargassum polyceratium	*n*-hexane	10s, 30s, 10 min et 30 min	t = 10 et 30s choisis	Thabard et al. (2011)
Fucus vesiculosus	*n*-hexane/MeOH (v/v ; 1:1)	10 s		Saha et al. (2011)

En conclusion, la technique de trempage des algues dans les solvants organiques semble être efficace pour l'extraction des métabolites de surface et surtout applicable sur une gamme importante d'algues marines (vertes, rouges ou brunes), mais avec l'inconvénient de ne permettre l'obtention que d'une partie du métabolome de surface. Toutefois, il existe une autre méthode pour ce type d'extraction basée sur l'utilisation de tampons « *swabbing* » (Schmitt et al., 1995). Il s'agit de frotter la partie supérieure des thalles avec des tampons (cotons tiges) après le rinçage et l'essorage des algues. Le matériel obtenu par frottement des thalles est ensuite extrait pendant plusieurs heures dans un mélange dichlorométhane/méthanol (1:1 ; v/v) puis filtré. Les principales limites de cette technique sont : (i) la difficulté de son application sur les algues représentant des surfaces petites et/ou

non planes (par exemple les algues filamenteuses) et (ii) le fait que le frottement du tampon peut endommager les cellules algales de surface.

La validation de l'effet de l'extraction avec les différents solvants sur l'intégrité membranaire des algues, a été effectuée par observation en microscopie à épifluorescence. Certains auteurs se sont basés sur le changement de l'état des chloroplastes (fluorescence) selon la technique de de Nys et al. (1998) (Sudatti et al., 2006 ; Brock et al., 2007 ; Nylund et al., 2007; Thabard et al., 2011). D'autres chercheurs ont utilisé le bleu d'Evans (0,05%) qui est un marqueur des cellules mortes pendant 30 min et ils ont observé le changement de la couleur à l'intérieur de la cellule par rapport à un témoin négatif (échantillon non traité) et un témoin positif [échantillon exposé pendant 60s à un mélange hexane/méthanol (1:1, v/v)] (Lachnit et al., 2010 ; Saha et al., 2011).

La quantification des métabolites de surface est primordiale en écologie chimique afin de pouvoir interpréter les activités biologiques dans un contexte écologique réel. Ainsi, différentes techniques chromatographiques et spectrales ont été utilisées, après l'obtention des extraits surfaciques, pour détecter, localiser et quantifier les métabolites de surface : il s'agit notamment de la GC-MS (de Nys et al., 1998 ; Dworjanyn et al., 1999 ; Dworjanyn et al., 2006 ; Lachnit et al., 2010 ; Thabard et al., 2011), la GC-ECD (Sudatti et al., 2006) et l'HPLC préparative (Saha et al., 2011). Enfin, d'autres techniques ont permis l'observation directe de la surface des macro-algues sans extraction préalable (Lane et al., 2009 ; Andras et al., 2012).

Chapitre II

Matériels & Méthodes

I. Matériel algal

I.1. Collectes

Plusieurs échantillons d'algues brunes appartenant à la famille de Dictyotaceae ont fait l'objet des travaux de cette thèse, il s'agit de deux espèces appartenant au genre *Dictyota* et d'une troisième identifiée comme étant *Taonia atomaria*.

Deux lots de *Dictyota* spp. morphologiquement distincts sont récoltés sur deux sites différents. Le premier échantillonnage (A) a été effectué en juin 2009 sur la côte algérienne (Tipaza, 36°37'12" N, 2°39'00" E) (Figure 23). Ces échantillons sont identifiés par le Dr H. Seridi (Université de Blida, Algérie) comme étant *Dictyota dichotoma*, avec une certaine ambiguïté. Le second échantillonnage (B) consiste en un mélange d'algues récoltées au mois d'avril 2011 sur la côte méditerranéenne française (Carqueiranne, 43°5'12.41"N, 6°5'3.26"E) à une profondeur de 1 m (Figure 23). L'identification de ces échantillons est achevée par le Pr O. De Clerck (Université de Gand, Belgique) qui a défini deux espèces appartenant au genre *Dictyota* au sein de ce mélange ; *D. implexa* et *D. fasciola*. Toutes ces algues sont regroupées sous l'appelation de *Dictyota* spp.

Concernant *T. atomaria*, trois lots sont récoltés sur le site de Carqueiranne à différentes périodes : en mars 2012 (échantillon C) et en juin 2012 (échantillon D). Les échantillons prélevés en mars 2012 sont identifiés par le Pr O. De Clerck.

Figure 23 : Localisation des deux sites de collecte des algues (Google earth)

Après la collecte, le matériel algal est conservé dans de l'eau de mer et au froid puis est immédiatement transporté au laboratoire. Les thalles sont ensuite débarrassés manuellement des épiphytes et rincés avec une solution de tampon phosphate salin (PBS = en anglais « *Phosphate Buffered Saline* », 1×, pH=7,4) qui permet de faciliter l'élimination de l'eau de mer avant le traitement des échantillons.

Pour chaque échantillon traité, les trois étapes supplémentaires (extraction du matériel algal, fractionnement de l'extrait brut et purification des fractions) sont ensuite mise en œuvre afin de conduire à l'obtention des molécules pures.

I.2. Obtention du métabolome total des algues

I.2.1. Extraction

Après leur séchage sur papier filtre à l'air libre pendant au moins trois jours, les algues sont broyées grossièrement, puis extraites avec différents mélanges de solvants organiques :
- trois fois avec un mélange MeOH/$CHCl_3$ (1:1, v/v ; 3 × 500 mL) pour l'échantillon A,
- trois fois avec un mélange MeOH/CH_2Cl_2 (1:1, v/v ; 3 × 500 mL) pour l'échantillon B,
- deux fois avec un mélange MeOH/CH_2Cl_2 (1:1, v/v ; 2 × 500 mL) séparément pour les trois échantillons de *T. atomaria* (échantillons C, D et E).

Cette première étape conduit, après filtration (papier filtre), à l'obtention d'un extrait brut total. Pour chaque échantillon, les extraits résultants sont rassemblés et concentrés par évaporation des solvants.

I.2.2. Fractionnement de l'extrait brut

L'étape suivante consiste à fractionner les extraits bruts totaux précédemment obtenus (soit en partie, soit en totalité en fonction de la masse obtenue). Pour cela, l'un des deux protocoles suivants est utilisé :

- Fractionnement par chromatographie "flash" (Armen Instrument, Spot) moyenne pression (détection UV : 205 nm ; débit : 20 $ml.min^{-1}$) en phase inverse (colonne Merck, modèle SVFD26-RP18, 25-40 µm, 31 g). Les extraits bruts des échantillons A, C, D et E sont soumis à ce type de fractionnement selon un gradient linéaire de polarité décroissante allant de 100% H_2O à 100% MeOH, puis de 100% MeOH à 100% CH_2Cl_2 avec des durées d'élution différentes pour chaque échantillon.

- Fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte à pression atmosphérique en utilisant une colonne en verre (hauteur : 100 cm ; diamètre : 3 cm) remplie de silice (Si60, 40-63 μm, Merck). Ce protocole est appliqué à l'extrait brut de l'échantillon B en utilisant des éluants de polarité croissante allant d'un mélange de cyclohexane/AcOEt (9:1, v/v) à 100% AcOEt puis de 100% AcOEt à 100% de MeOH.

La chromatographie en mode "flash" est une méthode plus rapide et plus reproductible que la colonne chromatographique ouverte. L'avantage de cette dernière est qu'elle permet de fractionner des quantités d'extraits bruts plus importantes (m > 5 g). Cette étape de fractionnement avec les deux techniques abouti à l'obtention de plusieurs fractions ordonnées selon un gradient de polarité.

I.2.3. Purification de composés à partir des fractions obtenues

Toutes les expérimentations liées à la purification de molécules sont réalisées sur une chaîne de chromatographie liquide haute performance (CLHP) composée d'un dégazeur, d'une pompe monovoie (Varian modèle Prostar 210) et d'un détecteur réfractométrique (Varian modèle 350 RI). La purification finale des molécules est effectuée par injections répétées en phase inverse sur une colonne semi-préparative (Merck Purospher STAR RP18e ; 5 μm ; 10 × 250 mm ; 3 mL.min^{-1}). La phase mobile utilisée consistant en des mélanges MeCN/H_2O de proportions diverses. Suite à cette étape, la pureté des molécules est vérifiée par RMN ^{1}H.

I.2.4. Caractérisation structurale des produits purs

La caractérisation structurale de l'ensemble des métabolites isolés à partir des modèles biologiques de l'étude est menée en mettant en œuvre les techniques spectroscopiques suivantes :

- La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est basée sur des propriétés magnétiques de certains noyaux possédant un spin nucléaire non nul et pouvant donc s'orienter spécifiquement dans un champ magnétique. Cette technique spectrale permet de déterminer l'enchaînement des atomes (notamment ceux d'hydrogène et de carbone) au sein d'une molécule et, dans certains cas, de remonter à sa structure tridimensionnelle. Les expériences de RMN mono- (^{1}H, ^{13}C, DEPT 45, 90 et 135) et bidimensionnelles (COSY ^{1}H-^{1}H, NOESY ^{1}H-^{1}H, HMBC et HSQC) ont été réalisées avec un spectromètre Bruker Avance 400 (400 MHz en ^{1}H et 100 MHz en ^{13}C) en utilisant les micro-programmes Bruker correspondants. Le solvant utilisé pour

ces expériences est le chloroforme deutéré ($CDCl_3$). Les déplacements chimiques des spectres RMN sont calibrés en utilisant les signaux résiduels du solvant : δ_H 7,26 ppm en RMN ^1H et δ_C 77,16 ppm en RMN ^{13}C. Les spectres obtenus sont traités en utilisant le logiciel MestReNova (Mestrelab Research).

- La spectrométrie de masse autorise la détermination de la masse molaire d'un composé grâce à l'étude de son pic moléculaire et l'obtention d'informations sur ses caractéristiques structurales par l'analyse de sa fragmentation. En outre, la spectrométrie de masse à haute résolution conduit à la connaissance de la formule brute du composé analysé via l'étude de son pic moléculaire. Les expériences à basse résolution sont conduites sur un spectromètre de masse Esquire 6000 (Bruker) à ionisation par électronébulisation (*Electro Spray Ionization-Mass Spectrometry*, ESI-MS) et équipé d'un analyseur à trappe d'ion (*Ion Trap*, IT). Les spectres à haute résolution (*High ResolutionElectro Spray Ionization-Mass Spectrometry*, HR/ESI-MS) sont réalisés à l'aide d'un spectromètre de masse LTQ/FTOrbitrap (Thermo Finnigan).

- La polarimétrie permet de déterminer si un composé est optiquement actif lorsqu'il provoque une rotation angulaire, appelée pouvoir rotatoire, du plan de polarisation d'une lumière monochromatique préalablement polarisée. Les mesures de pouvoir rotatoire sont effectuées à 589 nm sur un polarimètre Perkin-Elmer 343. Les molécules étudiées sont dissoutes dans MeOH à des concentrations variant de 0,5 à 2 $mg.ml^{-1}$ et sont analysées à 25°C dans une cellule d'une longueur de 10 cm.

- La spectroscopie UV-Visible donne des informations sur certains éléments structuraux des molécules qui absorbent de l'énergie dans ce domaine spectral (chromophores). Les spectres UV-Visible sont enregistrés sur un spectrophotomètre Shimadzu UV-2501 PC. Les échantillons à analyser sont solubilisés dans MeOH à des concentrations allant de 0,1 à 1 $mg.ml^{-1}$.

- La spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (Infra Red Fourier Transform, IRTF) permet de déterminer la présence de certaines fonctions chimiques caractéristiques au sein d'une molécule. Les expériences sont conduites sur un spectrophotomètre Jasco J-410 en formant un film de l'échantillon à analyser entre deux pastilles de KBr.

Les données spectrales obtenues par le biais des techniques susmentionnées sont analysées, le cas échéant comparées avec la littérature, et permettent de remonter à la

structure chimique des molécules étudiées. Après que la caractérisation soit achevée, les molécules pures sont conservées sous argon à -20°C.

I.3. Développement d'un protocole expérimental pour l'analyse du métabolome de surface de *Taonia atomaria*

I.3.1. Protocoles d'extraction des métabolites de surface

I.3.1.1. Protocoles d'extraction

L'échantillonnage des algues est effectué sur le site de Carqueiranne (43°5'12.41"N, 6°5'3.26"E). Les thalles collectés sont placés dans des sacs en plastique contenant de l'eau de mer environnante et transportés au laboratoire sur glace (T < 10 °C). Au laboratoire, les thalles les moins épiphytés sont choisis et rincés trois fois avec du PBS (1×). Ce traitement initial est effectué dans les deux heures qui suivent la récolte. Pour l'obtention des molécules de surface, deux méthodes ont initialement été utilisées. Pour la première technique, les thalles sont imprégnés de silice C-18 (Supra C18-E, 50 µm, 65 Å), puis après récupération de la silice une étape d'extraction en phase solide (*Solid Phase Extraction*, SPE) est mise en œuvre. Au cours de cette extraction, les métabolites de surface fixés par la phase stationnaire sont ensuite élués, en utilisant successivement 5 ml de MeOH puis 5 ml de CH_2Cl_2, sur une cartouche SPE (Strata^{TM} Phenomenex) préalablement conditionnée par rinçage au MeOH (10 ml). Le deuxième protocole utilisé est basé sur l'extraction des métabolites de surface par le trempage des thalles dans un ou plusieurs solvants organiques comme décrit précédemment (Cf. **III.3.1** dans chapitre I) dans plusieurs études similaires. Dans un premier temps, les paramètres d'extraction des molécules de surface, tels que le choix du solvant ainsi que la durée d'extraction sont optimisés afin de conserver une parfaite intégrité cellulaire de la surface. Quatre solvants ou mélanges de solvants organiques [dans un ordre de polarité croissant : hexane, CH_2Cl_2, mélange MeOH/CH_2Cl_2 (1:1, v/v) et MeOH] et cinq durées d'extraction (5, 15, 20, 30 et 60s) sont testés. Compte tenu de ces paramètres, des jeunes thalles d'environ 10 cm de hauteur sont séchés à l'essoreuse. Ensuite, chaque thalle est divisé en six parties égales d'une surface variant de 10 à 12 cm^2 chacune ; cinq d'entre-elles sont destinées à l'étude des cinq temps d'extraction, tandis que la dernière est utilisée pour l'obtention de l'extrait brut total. Cette extraction est effectuée en triplicats pour chaque solvant dans un volume total de 2 ml (Figure 24).

Afin de vérifier si l'algue est capable de libérer, sans extraction, les mêmes molécules que celles extraites de sa surface par des solvants organiques, des échantillons d'algues de tailles égales sont prélevés et incubés dans des flacons (250 ml) contenant de l'eau de mer environnante. Le protocole utilisé met en jeu trois flacons avec des échantillons incubés pendant 12h, trois flacons avec des échantillons incubés pendant 24h et trois flacons témoins contenant uniquement de l'eau de mer incubée pendant 24h. A l'issue du temps d'incubation, l'eau de tous les échantillons est passée sur cartouche SPE conditionnée par rinçage au MeOH (10 mL). L'extraction des molécules retenues sur la phase stationnaire est effectuée en utilisant un mélange MeOH/CH_2Cl_2 (1:1, v/v) (10 ml).

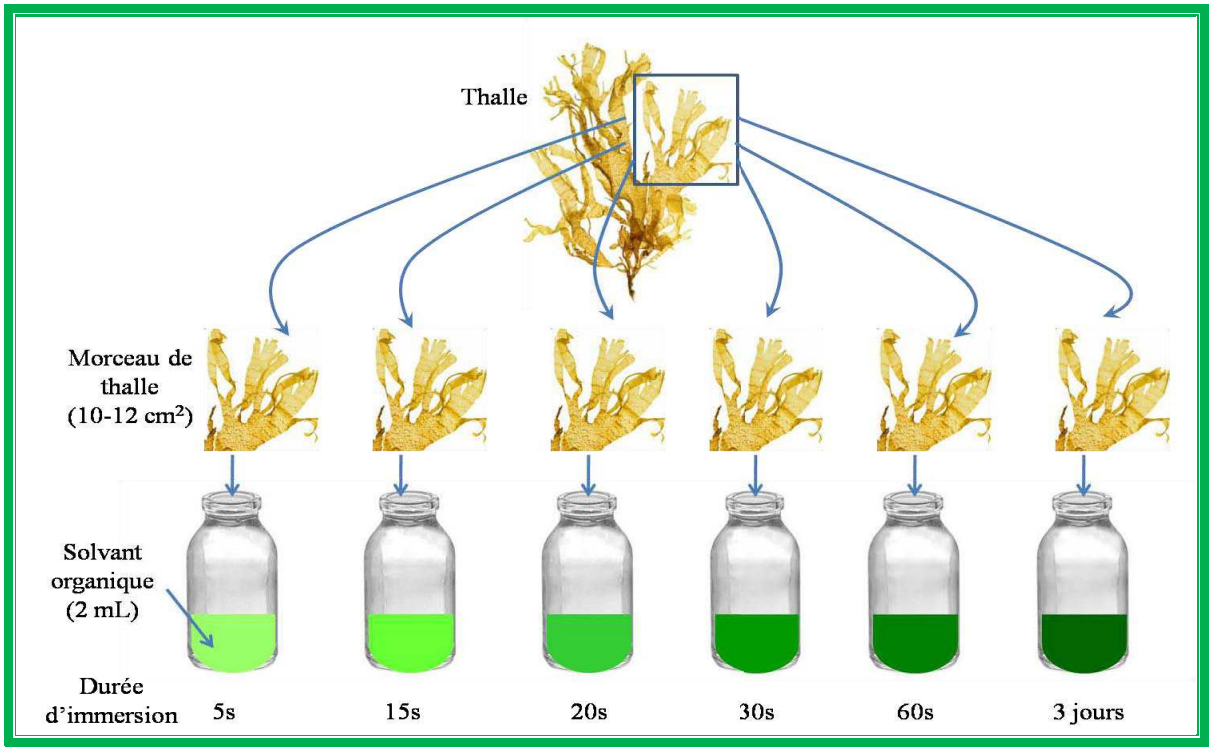


Figure 24 : Schéma explicatif du protocole d'extraction des métabolites de surface par la méthode de trempage.

I.3.1.2. Vérification de l'intégrité membranaire pour la méthode de trempage dans les solvants organiques

Une fois l'extraction achevée, l'effet sur la lyse cellulaire algale de chaque solvant est évalué pour chaque temps d'extraction. Plusieurs marqueurs vitaux sont testés : DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole), la FDA (fluorescein diacetate), l'iodure de propidium, le Sytox green® et le bleu de trypan (Tableau 4).

Tableau 4 : Données relatives aux différents marqueurs vitaux utilisés

Marqueur	FDA	DAPI	Iodure de propidium	Sytox green®	Bleu de trypan
Concentration utilisée	12 µM	30 et 60 µM	2 µM	1,5 µM	0,05% et 0,1% à partir d'une solution mère à 4%
λ excitation (nm)	495	345	536	504	-
λ émission (nm)	519	455	617	523	-
Sélectivité	Marqueur des cellules vivantes	Marqueurs des cellules mortes			
Mode d'action	Interaction avec l'ADN				Interaction avec la membrane cellulaire

Ces colorants sont capables de marquer sélectivement le noyau des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, à l'exception de la FDA qui marque le noyau des cellules vivantes et le bleu de trypan qui marque le cytoplasme des cellules mortes. Une préparation des échantillons a précédé leur marquage. Des morceaux de thalles (≈ 4×3 mm) sont positionnés, à raison de un par puits, dans une plaque de 24 puits à fond plat en polystyrène (Costar, USA), où sont préalablement déposées des lamelles rondes en verre (*cover-slip*). Deux témoins positifs et négatifs de la lyse cellulaire sont préparés en triplicats. Les témoins positifs consistent en des cellules mortes suite à un traitement de 24h au paraformaldéhyde à 4% (PFA) après perméabilisation au triton (0,05%), tandis que les témoins négatifs, ont été obtenus à partir d'échantillons non traités. Pour les échantillons à analyser, un morceau de thalle ayant subi l'étape d'extraction est découpé (environ 0,15 cm^2) et introduit dans le puits. Cette étude est toujours réalisée en triplicats. Lorsque tous les morceaux sont positionnés dans les puits (Figure 25), un rinçage au PBS (500 µl) est effectué à trois reprises. Ensuite, les échantillons traités ainsi que les témoins positifs et négatifs, sont doublement marqués par la FDA (500 µl, 12 µM) pendant 20 min suivi par un marqueur de cellules mortes [DAPI (30 et 60 µM), iodure de propidium (2 µM) ou Sytox green® (1,5 µM) ; 500 µl] pendant 30 min. Chaque *cover-slip* est retiré de la plaque, monté sur une lame en utilisant un liquide de montage (ProLong® Gold Antifade Reagent, Life Technologies) et observé directement par microscopie à épifluorescence (Leica Microsystems, Allemagne). La lyse cellulaire est évaluée par comptage des cellules mortes par rapport aux cellules vivantes dans cinq champs visualisés au microscope pour chaque échantillon. Dans le cas du bleu de trypan (concentration diluée à 0,05% et 0,1% à partir d'une solution mère à 4%), un marquage simple

est réalisé pendant 20 min et les échantillons sont observés au microscope optique après leur montage entre lame et lamelle en utilisant du glycérol.

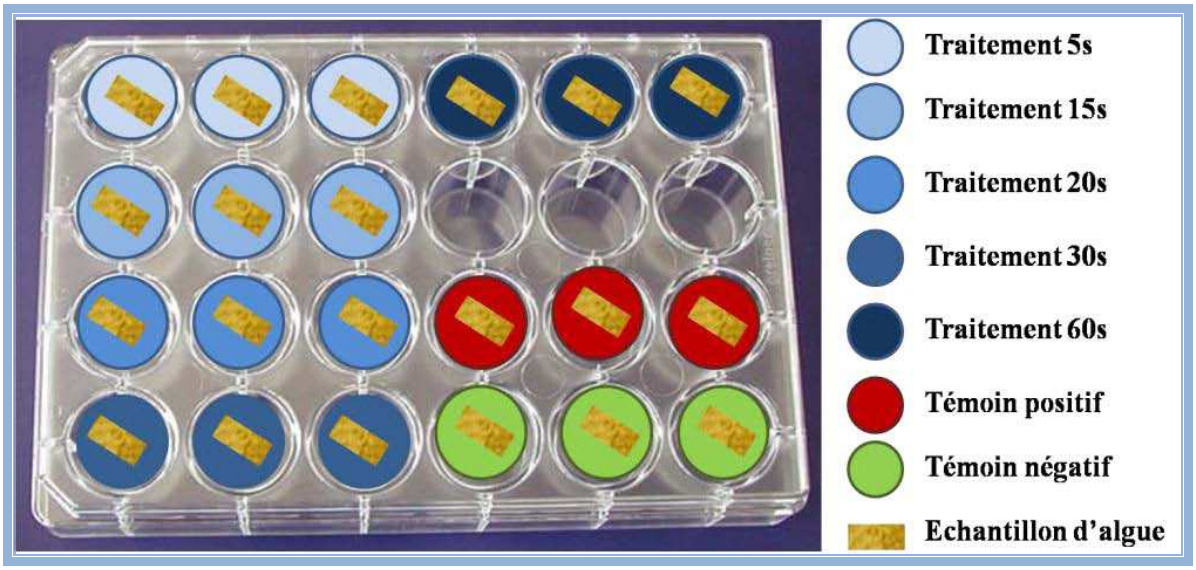


Figure 25 : Schéma de la disposition des échantillons d'algues dans une plaque 24 puits pour le marquage de viabilité cellulaire servant à l'évaluation de l'effet de l'extraction de surface sur la lyse des cellules algales

I.3.2. Identification des métabolites de surface

Les extraits surfaciques obtenus sont analysés par des techniques chromatographiques couplées telles que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) à ionisation par impact électronique (*Electronic Impact*, EI) et la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS) à ionisation par électronébulisation (*Electro Spray Ionization*, ESI).

Les analyses de GC-MS sont réalisées sur un système chromatographique Hewlett Packard (HP) Séries 6890 composé : (i) d'un injecteur permettant de porter l'échantillon à l'état gazeux, (ii) d'un four à colonne équipé d'une colonne capillaire (Factor Four™, Varian) sous la forme d'un tube de silice enroulé sur lui même (l =30 m, diam. Interne = 250 μm et épaisseur de film = 0,2 µm) et (iii) d'un détecteur de masse (HP Séries 6890) à ionisation par impact électronique. Toutes les injections sont réalisées en mode *split* avec une pression d'entrée de 0,58 bars. L'injecteur est maintenu à 250°C et la température de l'interface avec le spectromètre de masse est fixée à 350°C. Le gradient de température utilisé est le suivant : la température est maintenue initialement à 100 °C pendant 3 min puis augmentant jusqu'à

325 °C à raison de 5 °C par min pour finalement atteindre 350 °C à raison de 2° C par min. Le gaz vecteur est de l'hélium dont le débit est fixé à de 1 mL/min. La durée totale de l'analyse est de 60,5 min.

Les analyses de LC-MS ont été réalisées sur une chaîne LCHP de marque VWR-Hitachi composée d'une pompe quaternaire L-2130 équipée d'undégazeur en ligne, d'un injecteur automatique L-2200 disposant d'un système d'injection à volume variable (Volume d'injection choisi : 10 µL) et d'un four L-2300 dont la température est fixée à 30°C. Les séparations sont réalisées en phase inverse sur une colonne analytique (Phenomenex, Gemini C6-Phenyl, 5 μm, 250 × 3 mm) à un débit de 0,5 mL/min. L'élution est effectuée en utilisant une programmation binaire d'eau et d'acétonitrile (acidifiés avec 0,1% d'acide formique). Le gradient utilisé est le suivant : (i) palier isocratique initial de 10 min avec 65% d'acétonitrile dans l'eau (v/v), (ii) gradient linéaire conduisant de 65% à 100% d'acétonitrile en 20 min, (iii) palier isocratique final de 30 min avec 100% d'acétonitrile, (iv) retour aux conditions initiales (1 min) et équilibrage de la colonne (9 min).

Cette chaîne CLHP est équipée d'une triple détection :

- un spectromètre de masse (Bruker, Esquire 6000) à ionisation par électronébulisation (ESI) équipé d'une trappe à ions (IT). Les conditions opératoires sont les suivantes : température de séchage : 350°C, voltage du capillaire : 4000 V, pression du nébuliseur : 3,45 bars, gaz de séchage : hélium à un débit de 12 L/min, trappe à ions en mode *Full scan* de *m/z* 50 à 1200 avec un temps maximum de remplissage de 200 ms.
- un détecteur UV-Visible à barrettes de photodiodes (VWR-Hitachi, L-2455) dans le domaine spectral 190-700 nm.
- un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL, Eurosep, Chromachem) dont la température de nébulisation est fixée à 30 °C et celle d'évaporation à 50 °C. La pression en gaz de séchage (N_2) est de 1,5 bar.

L'identification sur les profils chromatographiques des différents composants chimiques des extraits est obtenue par comparaison des temps de rétention et des données spectrales des molécules de référence injectées dans les mêmes conditions ainsi qu'en se basant sur les données issues de la littérature.

Tous les solvants utilisés dans ces travaux sont de qualité gradient CLHP (VWR ou Sigma-Aldrich).

I.3.3. Variation saisonnière des métabolites de surface

Les métabolites de surface de l'algue sont extraits selon le protocole décrit en **I.3.1.1** avec les solvants retenus à l'issu de la validation du protocole. L'extraction est effectuée mensuellement à six reprises durant l'année 2013 de février à juillet, période pour laquelle *T. atomaria* est trouvée abondamment dans son milieu naturel. Ces prélèvements permettent d'effectuer un suivi saisonnier du métabolome de surface afin d'explorer la variation de sa diversité chimique. Les extraits surfaciques obtenus tous les mois sont concentrés par évaporation des solvants et conservés à -20 °C jusqu'aux dernières expérimentations de juillet. Les analyses chromatographiques des différents extraits (10 mg/ml) sont effectuées en LC-MS dans les mêmes conditions. A l'issue de l'analyse, les chromatogrammes +MS (BPC : *Base peak chromatogram*) sont exportés et convertis en fichiers *.mzData* (mode centroïde, niveau de bruit de fond : 1.10^5) par le logiciel Mzmine (Katajamaa et al., 2006 ; Pluskal et al., 2010). Les chromatogrammes obtenus à l'aide des détecteurs UV-Vis et DEDL permettent de vérifier que certains composés, s'ionisant peu ou pas, puissent être pris en compte pour le reste de l'analyse. Le même logiciel est ensuite utilisé pour la construction de la matrice de données (composé détecté, aire du pic, temps de rétention et bruit de fond) par un cheminement en plusieurs étapes : (i) re-construction du chromatogramme (‘*min. time span* : 12 s, *min. height* : 10^4, *m/z tolerance* : 0,5), (ii) déconvolution des pics (*chromatographic threshold* : 85%, *RT range* : 60 s., *min. relative height*: 10%, *min. absolute height* : 10^4), et (iii) alignement des pics (*absolute RT tolerance* : 30 s, *m/z tolerance* : 1.0).

La métabolomique requiert souvent l'analyse d'un nombre important d'échantillons. Pour cette raison, il est très utile de pouvoir diminuer le temps de l'analyse chromatographique tout en conservant des paramètres de séparation satisfaisants. Dans le cadre de notre étude, le choix s'est porté sur une technologie de phase stationnaire relativement récente et performante : l'utilisation de particules *core-shell* (particules superficiellement poreuses). L'avantage de ce type de phase réside principalement dans la possibilité d'augmenter la vitesse linéaire de la phase mobile sans une augmentation trop importante de la pression en tête de colonne chromatographique (Gritti & Guiochon, 2010). L'utilisation d'une colonne chromatographique (Kinetex, 2,6 µm, 100 × 3 mm, Phenomenex) utilisant cette technologie a permis de diviser par deux les temps d'analyse et a conduit à une amélioration générale de la résolution.

II. Matériel bactérien

Tous les matériels, les solutions et les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave (Systec, 5050 MLV) avant chaque utilisation. Deux cycles de stérilisation sont appliqués: (i) un cycle de 7 min à 134°C sous 1 bar pour la verrerie et les plastiques, (ii) un cycle de 20 min à 120°C pour les solutions et les milieux liquides.

II.1. Milieux de culture

II.1.1. Väätänen Nine Salt Solution (VNSS) / VNSS Agar

Toutes les cultures planctoniques des souches faisant l'objet de cette étude sont réalisées dans du milieu VNSS liquide. Il s'agit d'un milieu translucide qui permet la quantification du biofilm. Pour l'obtention de ce milieu, le NSS (Nine-Salt Solution) est préalablement préparé et peut être stocké. Il est composé uniquement de sels : NaCl (17,6 g), Na_2SO_4 (1,47 g), $NaHCO_3$ (0,08 g), KCl (0,25 g), KBr (0,04 g), $MgCl_2.6H_2O$ (1,87 g), $CaCl_2.2H_2O$ (0,41 g), $SrCl_2.6H_2O$ (0,01 g) et H_3BO_3 (0,01g), solubilisés dans 1 L d'eau déminéralisée. D'autres ingrédients sont ajoutés au NSS pour préparer le VNSS avant stérilisation et utilisation : peptone (1 g), extrait de levure (0,5 g), glucose (0,5 g), amidon soluble (0,5 g), $FeSO_4$.7H2O (0,01 g) et Na_2HPO_4 (0,01 g). Ce milieu est considéré comme relativement pauvre par rapport à d'autres milieux de culture. Il peut être conservé durant un mois à température ambiante après stérilisation par autoclavage.

Le VNSS agar est préparé à partir du milieu VNSS liquide auquel est ajouté 1,5% (p/v) d'agar bactériologique (Sigma Aldrich®). L'agar est solubilisé dans la solution de VNSS par chauffage à ébullition. Après son passage à l'autoclave, le VNSS-agar est laissé refroidir à température ambiante, puis coulé en boite de Pétri (Polystyrène, Ø 90 mm, Gosselin, Hazebrouck, France). Les boites de Pétri sont conservées à 4 °C. Ce milieu gélosé permet la croissance de toutes les souches bactériennes marines utilisées dans cette étude.

II.1.2. ZoBell-agar

Ce milieu gélosé, considéré comme riche, a été utilisé pour certains isolements et étalements des souches bactériennes marines à partir de la surface de *T. atomaria*. Le Zobell-agar est composé de peptone (5 g) et d'extrait de levure (1 g) ajoutés dans 1 L d'eau

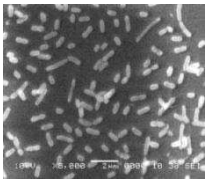
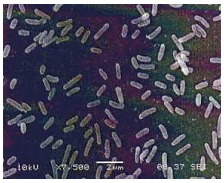
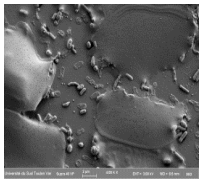
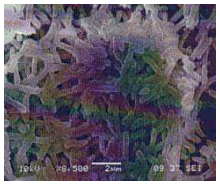
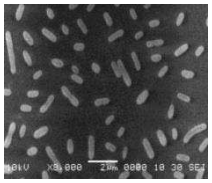
déminéralisée. 15 g d'agar bactériologique sont ensuite additionnés. Les boites de Pétri sont préparées, comme précédemment décrit avec le VNSS-agar.

II.2. Souches bactériennes marines de référence

Les bio-essais anti-adhésion sont effectués sur cinq souches bactériennes marines dites de référence et provenant d'isolats de surfaces artificielles (Tableau 5), trois souches méditerranéennes (TC5, TC8 et TC11) et deux souches bretonnes (D41 et 4M6). Les souches méditerranéennes ont été isolées à partir de biofilms naturels qui ont colonisé des plaques en silicone (20X15, Intersleek 760®, International Paint Limited) immergés à une profondeur de 1 m durant 8h en février 2008 (TC5 et TC8) et 2010 (TC11) dans la Rade de Toulon (Mourillon, 43°06'23''N ; 5°57'17''E) (Camps et al, 2011, Brian-Jaisson et al., 2013). Elles sont identifiées respectivement comme *Polaribacter dokdonensis*, *Pseudoalteromonas lipolytica* et *Shewanella pneumatophori* (Brian-Jaisson et al., 2013).

Concernant les souches provenant de l'Atlantique, la D41, identifiée comme *Pseudoalteromonas* sp. (Leroy et al., 2007) a été isolée à partir d'un biofilm naturel sur lame de téflon immergée durant 24 h dans la rade de Brest à Sainte Anne du Portzic (48°21'32'' N ; 4°32'58'' O) en novembre 1998 par l'IFREMER (Rubio, 2002). Quant à la 4M6, qui appartient au genre *Paracoccus* (Grasland et al., 2003), elle a été isolée en mars 2000 à partir d'une lame en verre stérile immergée dans le golfe du Morbihan (Ile Bailleron, 47°34'37''N-2°44'54''O) à une profondeur de 1 m, durant 6h. Elle nous a été fournie par le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marine (LBCM) de l'Université de Bretagne Sud (UBS). Elle

Tableau 5 : Données relatives aux cinq souches bactériennes marines de référence

Code	**TC5**	**TC8**	**TC11**	**D41**	**4M6**
Taxinomie	*Polaribacter dokdonensis*	*Pseudoalteromonas lipolytica*	*Shewanella pneumatophori*	*Pseudoalteromonas* sp.	*Paracoccus sp.*
Classe	Flavobacteria	Gamma proteobacteria	Gamma proteobacteria	Gamma proteobacteria	Alpha proteobacteria
Lieu d'isolement	Rade de Toulon	Rade de Toulon	Rade de Toulon	Rade de Brest	Golf de Morbihan
Support	Silicone	Silicone	Silicone	Téflon	Verre
Morphologie	Bacille ronde	Bacille étalée	Bacille ronde	Bacille	Bacille
Gram	-	-	-	-	-
Couleur	Jaune brillant	Beige	Blanche	Beige	Blanche
Photo MEB					
Référence	Camps et al. (2011)	Camps et al. (2011)	Brian-Jaisson et al. (2013)	Leroy et al. (2007)	Grasland et al. (2003)

II.3. Souches bactériennes marines isolées de *T. atomaria*

II.3.1.Isolement et culture des bactéries associées à la surface

II.3.1.1. Observation de la surface de l'algue

Trois techniques sont utilisées pour observer la surface de *T. atomaria* et le biofilm associé : le MEB (Microscope Electronique à Balayage), l'AFM (*Atomic Force Microscopy* = Microscopie à Force Atomique) et la microscopie à épifluorescence.

- **MEB : Microscopie Electronique à Balayage**

Des morceaux de l'algue de 0,2 cm^2 de surface appartenant à 3 parties distinctes du thalle (extrémité distale, zone intermédiaire et zone basale) sont rincés avec une solution stérile de PBS (1×). Ils sont fixés à l'aide d'une solution de glutaraldéhyde 3% dans un tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,4), pendant au moins 1h et au plus une nuit, à 4 °C. Les échantillons sont ensuite lavés trois fois à un intervalle de dix min dans un tampon phosphate

0,1 M. La déshydratation des morceaux de thalle est effectuée sur deux étapes. Une première déshydratation à l'éthanol consiste à rincer les échantillons dans trois bains successifs d'éthanol à 70% (10 min), puis dans trois bains successifs d'éthanol à 95% (10 min) et enfin trois lavages à l'éthanol absolu (10 min). La seconde étape de déshydratation totale est effectuée par trois premiers rinçages successifs dans une solution éthanol/acétone à 30% (10 min), suivis par trois rinçages successifs dans une solution éthanol/acétone à 50% (10 min), puis trois lavages successifs dans une solution éthanol/acétone à 70% (10 min). Finalement, les échantillons sont déshydratés par trois bains successifs dans de l'acétone absolu (10 min). Les morceaux d'algues traités sont ensuite déposés sur un support propre et laissés à sécher sous une hotte pour permettre l'évaporation totale des solvants. Avant l'observation au microscope électronique à balayage (ZEISS Supra® 40 VP, Allemagne), une métallisation à l'or est effectuée (pendant 1h) pour tous les échantillons.

- **AFM : Atomic Force Microscopy**

La microscopie à force atomique permet d'observer la topographie de la surface d'un objet présentant un relief. Cette technique vise à mesurer les forces d'interactions entre l'échantillon et une pointe effilée qui balaie l'échantillon point par point. Différentes parties du thalle sont coupées à l'aide d'un scalpel stérile et rincées au PBS (1×). Après séchage à l'air libre, elles sont fixées individuellement et délicatement à l'antifade sur un *cover-slip*, afin de ne pas modifier la topographie de la surface. Les réglages des paramètres de l'appareil ainsi que les analyses des photos sont effectués par le Dr. Ahmad Fahs au laboratoire MAPIEM sur un appareil de marque NanoScope V (France).

- **Microscopie à épifluorescence**

Cette microscopie permet de visualiser les échantillons qui sont naturellement fluorescents ou rendus fluorescents grâce à l'utilisation de fluorochromes. Des morceaux de thalles sont découpés, rincés au PBS puis les biofilms de surface sont colorés au DAPI à une concentration de 60 µM. L'observation est réalisée avec un microscope Leica Microsystems (Allemagne).

II.3.1.2. Isolement des bactéries associées à la surface

Pour l'isolement des bactéries associées à la surface de *T. atomaria*, les thalles sont prélevés stérilement. L'échantillonnage est effectué sur le site de Carqueiranne (43°5'12.41"N,

6°5'3.26"E) en juin 2012. Les algues récoltées sont placées dans des sacs plastique stériles, hermétiquement fermés et contenant de l'eau de mer environnante, puis, transportées au laboratoire. Deux méthodes d'isolement sont utilisées. La première technique consiste à tremper des thalles, pré-rincés au PBS (1×), dans de l'ASW et à les mettre dans un bain à ultra-sons pendant 5 min pour permettre de décrocher les bactéries associées à leur surface. La solution d'ASW contenant les bactéries est filtrée sous vide sur un filtre en microfibres de verre (filtre Whatman GF/F ; 0,7 µm ; 47 mm Ø). La deuxième technique consiste à frotter quelques thalles, pré-rincés au PBS (1×), à l'aide d'un coton-tige stérile.

II.3.1.3. Conditions de culture

Les filtres obtenus par la première méthode ainsi que les coton-tiges obtenus par la deuxième méthode sont étalés sur des boîtes de Pétri contenant soit du VNSS-agar soit du ZoBell-agar. Les boîtes de Pétri sont incubées à 20 °C jusqu'à ce que des colonies bactériennes soient visibles. A ce stade, les colonies formées sont choisies selon leur morphologie et leur couleur pour être ensemencées individuellement sur des boîtes de Pétri contenant du VNSS-agar qui permet d'obtenir des souches bactériennes pures. Les bactéries sont codées "TC", abréviation de Toulon Collection, suivi d'un numéro correspondant à l'ordre de leur insertion dans la collection.

II.3.1.4. Cryoconservation des souches bactériennes

Les bactéries marines isolées à partir de la surface de *T. atomaria* sont conservées par cryogénisation. Une solution de 500 µl de suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance en milieu VNSS, à laquelle sont ajoutés 500 µl de glycérol, est préparée pour chaque cryotube stérile (Thermo Scientific™ Nunc™). Plusieurs cryotubes sont préparés pour chaque souche et conservés à -80 °C.

II.3.2. Caractérisation des souches bactériennes associées à la surface de *T. atomaria*

Certaines souches associées à la surface de l'algue sont choisies et caractérisées. Cette sélection est effectuée selon leur capacité à croître en VNSS et à adhérer en microplaque. La morphologie, la couleur et la taille de leurs colonies en milieu gélosé servent également à garder une certaine diversité au sein des souches sélectionnées.

II.3.2.1. Morphologie

Pour déterminer la forme des bactéries, une goutte de culture bactérienne préparée la veille est déposée entre une lame en verre et une lamelle et observée directement au microscope électronique (Olympus BH2-UMA, Japon) à un grossissement de 500.

II.3.2.2. Culture et croissance

Les bactéries sont, tout d'abord, mises en culture en milieu VNSS-agar sur des boites de Pétri à 20 °C à partir de cryotubes. Les pré-cultures sont obtenues par introduction d'une colonie bactérienne dans 10 ml de VNSS liquide, puis incubées à 20 °C sous agitation à 120 rpm pendant toute une nuit. La croissance bactérienne se traduit par une turbidité du milieu. À partir de ces pré-cultures, trois flacons de cultures contenant du VNSS (pour chaque souche) sont ensemencés dans du VNSS à une densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) de 0,1. Les cultures sont incubées à 20 °C sous agitation à 120 rpm. La croissance est suivie afin de déterminer les différentes phases de croissance en mesurant la densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) toutes les heures à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific Genesys 20). Ces mesures sont effectuées en triplicats. Elles servent à tracer les courbes de croissance [DO = f (temps)] ainsi que pour déterminer le taux de croissance maximum (μ_{max}) de chaque souche.

II.3.2.3. Coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration différentielle qui permet de classifier les bactéries en se basant sur la structure de leur paroi. La coloration de Gram est effectuée suivant un protocole rapide. Une goutte de culture bactérienne est déposée sur une lame en verre et séchée sous la hotte à température ambiante. Ensuite, le frottis est fixé dans l'éthanol absolu (5 min) et la lame est flambée à la chaleur douce puis laissée à refroidir sur un portoir reposant sur un bac de coloration. Une fois refroidi, le frottis est recouvert avec du cristal violet pendant 1 min environ puis rincé à l'eau déminéralisée. Le frottis est recouvert abondamment avec de l'iode. Après un temps de réaction d'1 min, l'iode est éliminé en rinçant la lame à l'eau déminéralisée. Une décoloration rapide de la lame avec une solution d'acétone/isopropanol (1:3 ; v/v) est effectuée. Ces étapes permettent de former un complexe entre le cristal violet et l'iode avec un constituant spécifique des bactéries à Gram positif insoluble dans l'alcool. Elles restent donc colorées en violet, tandis que les bactéries à Gram négatif subissent une perméabilisation importante de leur paroi avec l'alcool. La décoloration

est suivie d'un rinçage à l'eau déminéralisée puis d'une recoloration de la lame à la safranine pendant 30 s. La safranine donne aux bactéries à Gram négatif, précédemment décolorées par l'alcool, une teinte rose. La préparation a finalement été lavée doucement à l'eau déminéralisée et séchée avant d'être observée au microscope à un grossissement de 400.

II.3.2.4. Observation au MEB

Une plaque 24 puits stérile en polystyrène est préparée avec des lamelles rondes en verre (*cover-slip*) déposées dans les puits. Dans chaque puits, 1,5 ml d'une culture bactérienne pour chaque souche ensemencée à une DO_{600nm} de 0,1 est introduite. Ensuite, la plaque est incubée à 20 °C durant 24 à 48h pour permettre la formation d'un biofilm sur les *cover-slips*. Dès l'observation d'un biofilm au fond des puits, les *cover-slips* sont prélevés à l'aide d'une pince stérile et déposés individuellement dans des boites de Pétri en verre (Anumbra, Ø=5 cm). Ils sont rincés doucement au PBS (1×). Par la suite, les mêmes étapes décrites précédemment (cf. **II.3.1.1**) sont suivies pour visualiser les bactéries au MEB.

II.3.3. Etude du métabolome des souches cultivables de *T. atomaria*

II.3.3.1. Obtention des extraits bruts bactériens

- **Protocole d'extraction**

Trois cultures liquides en milieu VNSS de 100 ml chacune sont préparées pour chaque souche bactérienne. En parallèle, 100 ml du milieu VNSS liquide sans bactéries est utilisé comme témoin dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les cultures bactériennes. L'ensemble est incubé à 20 °C sous une agitation de 120 rpm. La croissance bactérienne est suivie toutes les heures par mesure de la densité optique à 600nm (DO_{600nm}) afin de pouvoir récupérer de préférence les bactéries en fin de phase stationnaire. Ensuite, les trois cultures de chaque souche sont rassemblées et centrifugées (Sigma, 3-K30) dans des tubes en téflon à 6000 g (7596 rpm) pendant 25 min à 4 °C. A l'issue de cette étape, un surnageant et un culot sont obtenus pour chaque souche (Figure 26). Concernant le surnageant, il est récupéré par pipetage et extrait une fois à l'AcOEt (1:1 ; v/v par rapport au volume du surnageant). La phase organique est alors concentrée et la masse de l'extrait brut obtenu est déterminée. Quant au culot, il est récupéré et extrait par un mélange CH_2Cl_2/MeOH (1:2 ; v/v) dans un bain à ultrasons pendant 10 min. Le mélange obtenu est filtré sur un papier filtre et le filtrat résultant

est concentré et pesé. Le matériel bactérien resté sur le filtre est séché et pesé. Le rendement d'extraction du culot (R) a été calculé comme suit:

$$R = 100 \times (M_{EB} / (M_{EB} + M_B))$$

Avec M_{EB} = masse de l'extrait brut

et M_B = masse des bactéries sur papier filtre après extraction.

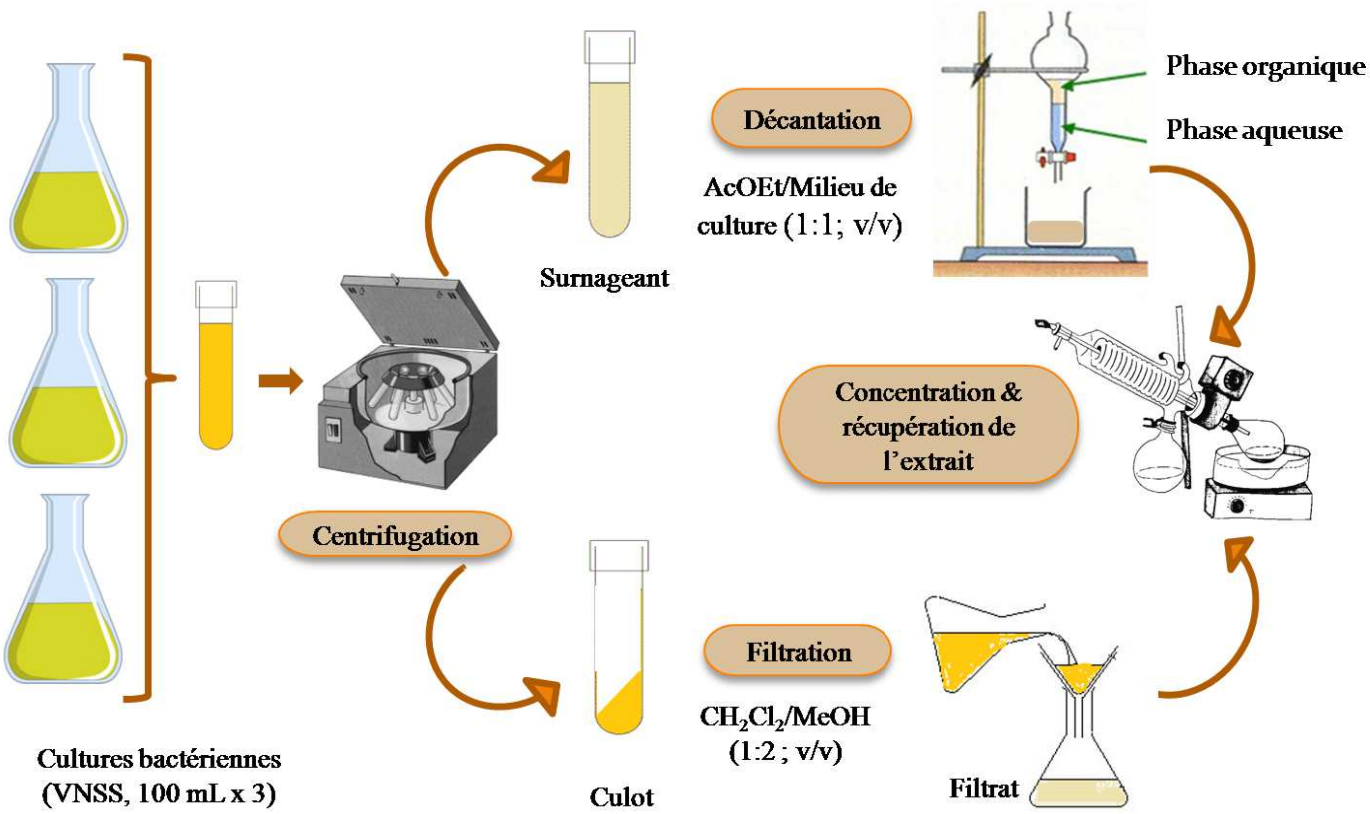


Figure 26 : Schéma explicatif du protocole d'extraction des extraits bruts bactériens

- **Analyses chromatographiques**

Les extraits bactériens bruts (ceux issus des surnageants et ceux issus des culots) sont analysés par LC-MS. Les données obtenues sont extraites et traitées par le logiciel Mzmine en suivant les mêmes procédures que celles décrites précédemment pour les extraits surfaciques de *T. atomaria*. Les échantillons sont injectés à une concentration de 10 mg/ml. Le but étant d'étudier la différence de la production métabolique entre les souches choisies dans cette étude, afin de s'assurer que nous travaillons sur des espèces différentes.

II.4. Activités biologiques

II.4.1. Biocides commerciaux

Quatre biocides commerciaux sont utilisés comme références pour les bio-essais afin de comparer leurs effets à ceux des molécules naturelles isolées des algues. Le TBTO est fourni par Acros (Fisher Scientific, France) et est directement mis en solution dans MeOH. La pyrithione de zinc (ZnPT) et la pyrithione de cuivre (CuPT) sont obtenus respectivement de Janssen Pharmaceutica (Belgique) et d'Arch UK Biocides (Royaume-Uni), tandis que le zinc éthylène-bis-dithiocarbamate (Zineb) est fourni par Agrica SA (Bulgarie). Ces trois derniers biocides sont solubilisés dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

II.4.2. Fluorochromes

Les fluorochromes sont utilisés afin de marquer les bactéries adhérées aux microplaques et ainsi de pouvoir les quantifier. Les fluorochromes sélectionnés sont le SYTO® 9 et le SYTO® RED 61. Ils sont choisis en fonction de leur capacité à marquer les différentes souches de l'étude. Ce sont des molécules fluorescentes qui possèdent des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission spécifiques. Le SYTO® 9 fluoresce dans le vert et possède les caractéristiques suivantes : λ_{ex}= 485 nm / λ_{em}= 498 nm. Le SYTO® RED 61 (λ_{ex}= 628 nm / λ_{em}= 645 nm) fluoresce lui dans le rouge. Les deux SYTO sont achetés chez Molecular Probes®Invitrogen (France). Un autre fluorochrome est utilisé pour évaluer la toxicité des biocides commerciaux et des composés naturels sur les souches bactériennes, la résazurine (Sigma Aldrich, St Quentin, France). Cette molécule est un indicateur d'oxydo-réduction. Elle est de couleur bleue et non fluorescente sous sa forme réduite. Lorsqu'elle est oxydée en résorufine par les enzymes de la chaîne respiratoire bactérienne, elle devient rose et fluorescente (λ_{ex}= 575 nm et λ_{em}=585nm) (Figure 27).

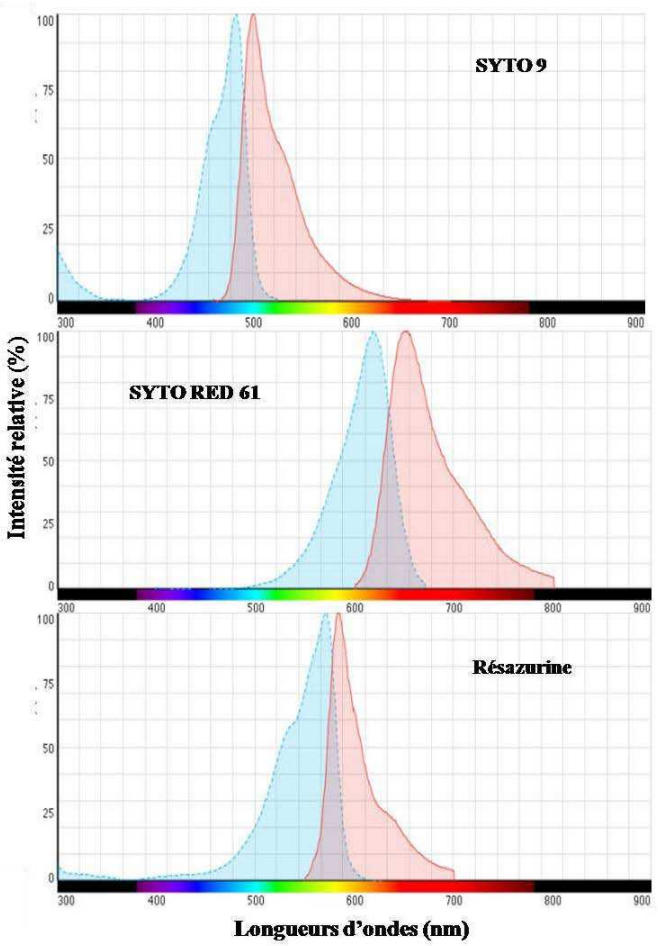


Figure 27 : Spectres d'excitation (bleu) et d'émission (rouge) des trois fluorochromes utilisés

II.4.3. Bio-essais anti-adhésion

II.4.3.1. Description du protocole

Le protocole de bio-essai anti-adhésion est issu des travaux de thèse de M. Camps (2011) effectués dans notre laboratoire. Dans le cadre de cette thèse, cinq bactéries pionnières issues de biofilms marins sur substrats artificiels, dites bactéries de référence (TC5, TC8, TC11, D41 et 4M6) ainsi que cinq bactéries marines isolées de la surface des thalles de *T. atomaria* (TC30, TC44, TC48, TC50 et TC55), sont sélectionnées pour effectuer les bio-essais anti-microfouling/anti-adhésion.

Le principe de ce protocole est de mettre en contact des molécules à tester avec des bactéries cibles pour évaluer les capacités de ces molécules à inhiber ou non l'attachement des bactéries au polystyrène. Les bactéries sont mises en culture dans du VNSS liquide (DO_{600nm} = 0,1) et laissées pousser à 20 °C sous une agitation de 120 rpm. L'ensemencement

des microplaques est effectué en début de phase stationnaire des bactéries, quand l'adhésion est maximale. Les temps de croissance pour atteindre la phase plateau (stationnaire) des cinq souches de référence sont précédemment déterminées (9 à 10h pour la TC5, 4 à 5h pour la TC8, 6 à 7h pour la TC11 et la D41 et 12 à 14h pour la 4M6). Une fois en phase stationnaire, les bactéries sont centrifugées à 6000 rpm pendant 10 min. Puis, le milieu de culture est éliminé et remplacé par le même volume d'eau de mer artificielle stérile (ASW-Artificial Sea Water, Sigma). L'ASW possède une composition en sels proche d'une eau de mer « moyenne » (36 $g.l^{-1}$). Elle permet de maintenir les bactéries marines en vie tout en bloquant leur croissance et favorisant l'adhésion bactérienne. La densité optimale d'ensemencement à 600 nm est également déterminée pour chaque souche (DO_{600nm} = 0,3 finale pour la TC5, DO_{600nm} = 0,2 finale pour la TC8, DO_{600nm} = 0,4 finale pour la TC11, DO_{600nm} = 0,3 finale pour la D41 et DO_{600nm} = 0,3 finale pour la 4M6). Le temps nécessaire pour l'adhésion bactérienne est aussi optimisé (15h pour la TC5 et la D41, et 24h pour la TC8, la TC11 et la 4M6).

La microplaque est ensemencée selon le schéma représenté dans la Figure 28. Les deux colonnes du bord (1 et 12) contenaient 200 µL d'ASW constituant le blanc. Les produits à évaluer sont testés à huit concentrations et chaque concentration est testée en triplicats. Ils sont introduits dans les colonnes 2 à 5 et 8 à 11 avec les bactéries (100 µL de biocide + 100 µL d'inoculum bactérien). La première et la dernière ligne (A et H) correspondent aux blancs échantillons (molécules à tester sans bactéries mais avec le fluorochrome), le but est de vérifier l'absence d'interaction aspécifique entre les molécules et le fluorochrome. Trois témoins sont pris en compte lors de l'ensemencement de la plaque : i) le témoin bactérien ou témoin positif d'adhésion réalisé en 6 replicats au niveau de la $7^{ème}$ colonne, il s'agit de la suspension bactérienne sans biocides (100 µL d'inoculum + 100 µL d'ASW). Il sert de référence d'adhésion pour l'ensemble de la microplaque ; ii) le témoin solvant réalisé en triplicats dans la colonne 6 (100 µL du solvant + 100 µL d'inoculum). Ce témoin correspond au pourcentage maximal de solvant toléré par la bactérie. Il permet de vérifier que l'activité anti-adhésion (s'il y'en a) ne sera pas l'effet du solvant utilisé pour solubiliser les composés, mais celui des composés eux même, et iii) le témoin biocide ou témoin positif d'activité, introduit en triplicats dans la colonne 6 (100 µL du biocide + 100 µL d'inoculum). Il s'agit généralement du TBTO utilisé à la concentration effective CE_{50} (entre 10 et 15 µM). Ce témoin est employé pour vérifier la sensibilité de la souche ainsi que la reproductibilité du bio-essai.

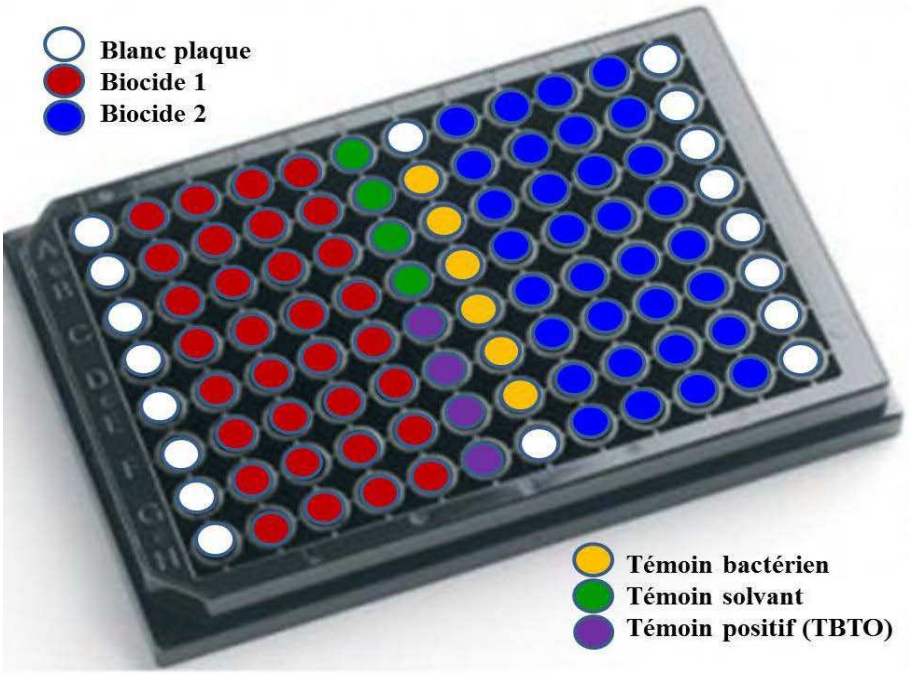


Figure 28 : Schéma d'ensemencement des microplaques pour le bio-essai anti-adhésion

Toutes les molécules et tous les extraits testés sont solubilisés dans le MeOH puisqu'il est moins toxique pour les bactéries que le DMSO (Camps et al., 2011). Une fois ensemencée, la microplaque est incubée à 20 °C sous une agitation de 120 rpm. Après un temps d'adhésion nécessaire déterminé pour chaque souche, les bactéries non adhérées sont éliminées par retournement de la microplaque suivi par trois lavages successifs avec cune solution de NaCl à 36 $g.l^{-1}$. Ensuite, les bactéries adhérées sont marquées avec un fluorochrome à 1 µM (soit le SYTO® 9 soit le SYTO® RED 61). Après 20 min à l'obscurité, l'excès de SYTO® RED 61 qui n'a pas interagit avec l'ADN bactérien est éliminé par retournement de la microplaque et un seul lavage (NaCl, 36 $g.l^{-1}$). La lecture de la microplaque est effectuée à l'aide du lecteur de microplaque Infinit M 200 pro (TECAN) et la fluorescence (FI) est déterminée aux longueurs d'onde spécifiques à chaque marqueur.

Pour l'analyse des données, le pourcentage d'adhésion pour chaque puits est calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ adhésion} = (IF_T - IF_{Pdt}) / (IF_{TB} - IF_{Blc}) \times 100$$

Avec : * IF_T = Moyenne des triplicats d'IF pour chaque concentration testée (composé + bactéries + fluorochrome)

* IF_{Pdt} = IF du produit seul en présence du fluorochrome sans bactéries

* IF_{TB} = Moyenne des six replicats d'IF du témoin d'adhésion bactérienne (bactéries + fluorochrome)
* IF_{Blc} = Moyenne des blancs (ASW + fluorochrome).

Le ratio IF_T / IF_{Pdt} est un indicateur de l'adhésion bactérienne. Il doit être supérieur à 2,5 pour témoigner d'une bonne adhésion et permettre l'interprétation des résultats du bio-essai (Camps et al., 2011).

II.4.3.2. Choix des souches marines de référence

Pour les bio-essais impliquant les métabolites secondaires isolées de *Dictyota* spp., trois souches de référence sont utilisées comme cibles ; il s'agit de TC5, D41 et 4M6. Nous avons essayé de choisir des souches présentant des caractéristiques différentes afin de mieux visualiser la gamme de sensibilité vis-à-vis des produits à tester. Dix souches bactériennes (cinq bactéries de référence et cinq bactéries isolées de *T. atomaria*) sont utilisés pour tester l'effet des molécules naturelles de *T. atomaria* y compris les molécules de surface, et ce dans le but d'élargir la gamme d'organismes cibles et la rendre plus représentative de l'environnement naturel. Les extraits bruts bactériens de dix souches provenant de la surface de *T. atomaria* sont testés contre les trois souches de référence de Toulon (TC5, TC8 et TC11). Ces bactéries ont été choisies car elles représentent mieux l'environnement de l'algue que les bactéries provenant de l'océan Atlantique.

Les deux souches bretonnes D41 et 4M6 ont déjà été étudiées dans le cadre de plusieurs études (Leroy et al., 2007 ; Viano et al., 2009 ; Camps et al., 2011 ; Pénez et al., 2011 ; Salaün et al., 2012), elles constituent donc des modèles connus. La D41 est utilisée car elle présente une bonne capacité d'adhésion en plus d'une mise en culture facile (Rubio, 2002). Le choix de la 4M6 est basé sur le fait qu'elle a été isolée sur un support plus hydrophile (verre) que les autres souches avec un temps d'immersion plus court (6 h contre 8 h pour les TC et 24 h pour la D41). De plus, il est intéressant d'étudier une autre souche que la D41 issue de l'océan Atlantique mais n'appartenant pas au même genre. Concernant les souches de Toulon, TC8 et TC11 sont choisies pour leur mise en liquide facile, leur bonne capacité à adhérer aux microplaques (polystyrène) et leur croissance rapide. En plus, elles ont une grande capacité à former un biofilm (Brian-Jaisson et al., 2013). La souche TC11 appartient au genre *Shewanella* : il s'agit d'un modèle classique de bactérie issue de biofilm mais pas encore étudié dans le cadre du bio-essai au laboratoire. Le choix de la TC5 repose

sur le fait qu'elle présente des caractéristiques différentes des autres souches. En effet, elle est caractérisée par une moins bonne capacité à adhérer en raison de sa faible capacité à former un biofilm (Brian-Jasson et al., 2013). En plus, elle est difficilement marquée par le fluorochrome utilisé habituellement pour les autres souches (SYTO® RED 61). Dans ce contexte, il est particulièrement intéressant d'inclure cette bactérie dans le cadre de nos bio-essais.

II.4.3.3. Choix des souches isolées de *T. atomaria*

Parmi toutes les souches isolées à partir de la surface de *T. atomaria*, une sélection de cinq souches est effectuée. Cette sélection est basée tout d'abord sur la capacité de ces bactéries à croître dans le milieu VNSS liquide (première condition pour réaliser les bio-essais). A l'issue de cette première sélection, une deuxième a été réalisée en fonction de la capacité de ces bactéries à adhérer au polystyrène (microplaques noires 96 puits).

II.4.3.4. Optimisation des paramètres d'adhésion des bactéries de *T. atomaria* en microplaque : Cinétique d'adhésion et densité d'ensemencement

Pour assurer une bonne adhésion aux microplaques, deux facteurs importants sont optimisés : la densité d'ensemencement et la durée d'incubation. Ces deux paramètres sont déjà optimisés pour les souches bactériennes de référence (Camps et al, 2011), mais il faut effectuer une mise au point pour les nouvelles souches isolées à partir de la surface de *T. atomaria*. La densité optimale d'ensemencement conduit à l'obtention d'un tapis bactérien « monocouche » permettant que le signal de fluorescence reste proportionnel à la quantité de bactéries présentes dans le puits. Le temps d'adhésion correspond au temps nécessaire qui favorise l'adhésion irréversible des bactéries mises en suspension dans l'ASW et inoculées dans une microplaque. En se basant sur les travaux de Camps et al. (2011) montrant que les bactéries testées adhéraient mieux entre 15 et 24h, nous avons testé les deux temps d'adhésion 15h et 24h. Une gamme de six DO_{600nm} (0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 et 0,6) est testée aux deux temps d'adhésion choisis afin de définir les meilleures conditions d'adhésion pour chaque souche.

Pour le protocole, des cultures bactériennes d'une sélection de souches sont préparées, puis les bactéries sont récupérées en début de phase stationnaire. Les suspensions sont centrifugées à 6000 rpm durant 10 min afin d'éliminer le milieu de culture. Le culot formé est remis en suspension dans un même volume d'ASW que le volume du milieu éliminé. Ensuite,

une gamme de dilution des suspensions bactériennes est effectuée de façon à déterminer les densités à tester. L'ensemencement des microplaques noires 96 puits à fonds plats en Polystyrène (Nunc, Fisher scientific, Illirch, France) est ainsi achevé. Les deux lignes d'extrémité (A et H) ainsi que les deux colonnes de bord (1 et 12) sont remplies avec uniquement 200 µL d'ASW servant comme blanc. Chaque DO_{600nm} est évaluée à six réplicats. Deux plaques avec la même disposition pour chaque souche sont préparées correspondant aux deux temps d'adhésion définis. Une fois ensemencées, les microplaques sont incubées à 20 °C sous une agitation de 120 rpm. Une première série est donc incubée durant 15h et une deuxième pendant 24h. Ensuite, les bactéries non adhérées sont éliminées par retournement de la microplaque, puis par trois lavages successifs avec une solution de NaCl à 36 $g.L^{-1}$. Les bactéries adhérées après lavage, sont marquées avec du SYTO® RED 61. La lecture des microplaques est réalisée après un temps de latence de 20 min à l'obscurité. Le traitement des données relatives aux valeurs enregistrées de fluorescence permet de définir la combinaison entre le temps optimal d'adhésion et la densité optimale d'ensemencement.

II.4.4. Test d'inhibition de croissance / toxicité

II.4.4.1. Inhibition de croissance

Le suivi de la croissance pour ce bio-essai n'est pas réalisé en flacons comme pour les tests précédents, mais directement dans les microplaques transparentes 96 puits en polystyrène à fond plat (Greiner Bio-one Cellstar, Fisher scientific, Illkirch, France). Les bactéries sont récupérées en début de phase exponentielle puis introduites dans les puits à une DO_{600nm}de 0,1. Le schéma de la microplaque est identique à celui du bio-essai anti-adhésion sauf qu'au lieu d'utiliser l'ASW, on utilise du VNSS afin de permettre aux bactéries de croître normalement. 200 µl de VNSS (blanc) sont introduits dans les colonnes 1 et 12. Les colonnes 2 à 5 et 8 à 11 contenaient 100 µl de la suspension bactérienne (dans le VNSS) en présence de 100 = µl des composés à tester (huit concentrations en triplicats). Les lignes A et H servent de blanc échantillon, elles contiennent les composés sans bactéries. Le témoin bactérien contient 100 µl de VNSS et 100 µl de cellules bactériennes dans la colonne 7 en six réplicats. Le témoin solvant introduit dans la colonne 6 (en triplicats) correspond à 100 µL de VNSS additionnés à 100 µl du solvant (à son pourcentage maximal acceptable pour la bactérie). Le témoin d'inhibition de croissance dit témoin positif (colonne 6 aussi en triplicats) est préparé à partir d'une solution d'éthanol diluée à 70% dans du VNSS (Figure 25). Dès que l'ensemencement de la microplaque est fini, une première mesure de la turbidité à 600 nm (t_0)

est effectuée à l'aide du lecteur de microplaque Infinit M200 pro (TECAN). Puis la microplaque est incubée à 20 °C sous une agitation de 120 rpm. Le suivi de la croissance est réalisé toutes les heures durant toute la phase exponentielle de chaque souche. Le taux de croissance μ (h^{-1}) est calculé aux huit concentrations testées de chaque biocide selon l'équation suivante :

$$N = N_0 \times e^{\mu t}$$

Avec : * N = nombre de bactéries au temps t

* N_0 = nombre de bactéries au temps t_0

* μ = taux de croissance

Le pourcentage d'inhibition de croissance est calculé comme suit :

$$(\mu_0 - \mu_i / \mu_0) \times 100$$

Avec : * μ_0 = taux de croissance en l'absence de molécule

* μ_i = taux de croissance pour une molécule à une concentration donnée

Ces données nous permettent de tracer une courbe sigmoïde dose-réponse [% d'inhibition de croissance = f (Log Ci)] (Ci désigne la concentration d'une molécule à tester) et de calculerla concentration inhibitrice 50% des bactéries (CI_{50}).

II.4.4.2. Viabilité

La viabilité bactérienne est évaluée à partir des microplaques utilisées pour le test d'inhibition de croissance. Lorsque les bactéries atteignent leur phase stationnaire, 50 µl de résazurine (20 µM dans de l'ASW) sont introduits dans tous les puits. Les plaques sont incubées pendant 2h à l'obscurité. Ensuite, la fluorescence est mesurée avec le lecteur de microplaque (λ_{ex} = 575 nm et λ_{em} = 585nm). Le traitement des données et le calcul du pourcentage de viabilité est effectué de la même façon que pour le bio-essai anti-adhésion. Ces données permettent de tracer la courbe sigmoïde dose-réponse [% de viabilité = f (Log Ci)] et de déterminer la concentration létale 50 (CL_{50}).

II.5. Etude de la variation saisonnière des communautés microbiennes de surface

II.5.1. Extraction de l'ADN bactérien

Pour étudier la variation saisonnière de la flore bactérienne épiphyte associée à la surface de *T. atomaria*, un prélèvement par mois est effectué durant 6 mois entre février et juillet 2013 à Carqueiranne (43°5'12.41"N, 6°5'3.26"E). Pour chaque prélèvement, trois thalles sont récoltés de manière stérile. Ils sont placés individuellement dans des sacs en plastique stériles hermétiquement fermés et contenant de l'eau de mer environnante. Après le transport au laboratoire au froid, chaque thalle est immédiatement rincé au PBS et divisé en trois parties égales (surface totale entre 10 et 12 cm^2 pour chaque partie de thalle). Le grattage des bactéries épiphytes est effectué à l'aide d'un scalpel stérile et le matériel gratté est introduit dans des tubes ependorf portant chacun un numéro d'un échantillon. L'extraction de l'ADN bactérien est effectuée en utilisant le Kit Dneasy Blood and tissus Hand book (Qiagen, Courtaboeuf, France). Ce kit permet d'extraire l'ADN tout en éliminant les impuretés comme les protéines et les ARN. L'ADN est ensuite quantifié à l'aide d'un spectromètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

II.5.2. Analyses par DGGE

La DGGE (*Denaturating Gradient Gel Electrophoresis*) a pour objectif de déterminer la diversité bactérienne au sein d'une communauté complexe de micro-organismes en se basant sur leurs empreintes moléculaires, et donc leurs génotypes. Cette méthode conduit à la séparation de fragments d'ADN de taille identique mais de séquences variables. Elle consiste en une électrophorèse des fragments préalablement amplifiés par une PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en utilisant le couple d'amorces 358F et 907RM. L'amorce 358F (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') est une amorce spécifique des eubactériespossédant une séquence ou queue riche en GC de 40 paires de bases. Cette queue artificielle permet de réaliser la DGGE (Schauer et al., 2000) et empêcher la totale séparation de la double hélice de l'ADN lors de sa dénaturation. L'amorce 907RM (5'-CCG TCA ATT C(AC)T TTG AGT TT-3') est une amorce universelle procaryote du gène de la sous unité ribosomale 16S. L'amplification est réalisée suivant le programme décrit dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Programme PCR

	1ère boucle	2ème boucle	3ème boucle	4ème boucle
Nombre de cycles	1	10	20	1
Dénaturation	5 min à 94°C	1 min à 94°C	1 min à 94°C	
Hybridation		1 min à 65°C (-1°C/cycle)	1 min à 55°C	
Elongation		3 min à 72°C	3 min à 72°C	5 min à 72°C

Tout d'abord, un gel de 0,75 mm d'épaisseur, contenant plusieurs concentrations d'acrylamide (0%, 40% et 80%) est préparé. Puis, du tétraméthyléthylenediamine (Temed), de l'ammonium persulfate (APS, à 20%) et du tampon gamma butyrolactone (GBL) sont ajoutés pour assurer la polymérisation du gel. Ce dernier est ensuite coulé entre deux plaques de verre disposées verticalement et la polymérisation du gel s'est faite durant 2 à 3 h. La température de la cuve à DGGE contenant du TAE (1×) (Tris/Acétate/EDTA) est réglée à 60 °C. Dès l'atteinte de cette température, le gel ainsi que les produits de PCR (20 à 25 µl) y sont introduits, puis 5 µl de tampon GBL sont déposés dans le puits. L'électrophorèse est mise en route durant 16h à 100 V. Le gel est ensuite déposé dans un bac et recouvert par le marqueur Syber gold dilué dans du TAE (1×). Apres 45 min, le gel est rincé plusieurs fois avec de l'eau bi-permutée puis les fragments d'ADN sont observés sous UV. Une image numérisée du gel DGGE est obtenu à l'aide d'un appareil photo numérique Biorad et analysées en utilisant le logiciel GelCompar II (Applied Math NV). Cela permet de déterminer la position de chaque bande de l'acide nucléique, conduisant à une matrice sur la base de la présence/absence de bandes.

La PCR ainsi que les analyses DGGE sont réalisées à l'INRA de Thonon-les-Bains par Brigitte Leberre (UMR CARRTEL).

II.6. Analyses statistiques

Afin de pouvoir analyser les résultats concernant les fluctuations du métabolome de surface de *T. atomaria* ainsi que les variations saisonnières de la structure des communautés des biofilms, nous avons utilisé des analyses statistiques multivariées. Concernant les fluctuations du métabolome de surface de *T. atomaria*, des Analyses en Composantes

Principales (ACP) ont été effectuées. Les mêmes résultats sont obtenus si les données sont normalisées ou pas. L'ensemble des données issues des analyses DGGE des communautés des biofilms a permis de construire des matrices de dissimilarité en utilisant l'indice de Bray et Curtis (matrice quantitative). Ces matrices ont ensuite été représentées dans un espace à deux dimensions par la méthode MDS (*Multi Dimentional Scale*).

Quant aux analyses statistiques des résultats des bio-essais, elles sont effectuées grâce au logiciel GraphPadPrism 5® (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) qui permet d'ajuster les trois types de courbes sigmoïde dose-réponse [% adhésion = f (Log Ci), % d'inhibition de croissance = f (Log C_i) et % de viabilité = f (Log Ci)] et de déterminer les CE_{50}, les CI_{50} et les CL_{50} pour chaque composé. Ce logiciel permet aussi la réalisation des tests statistiques permettant d'analyser soit deux variables simultanément (telles que la différence entre souches et entre biocides), soit des comparaisons multiples (ANOVA à deux facteurs et post test de Bonferroni). Les différences significatives ont été acceptées à partir de $p < 0,05$.

Chapitre III

Analyse des métabolites secondaires des espèces étudiées

Dans ce chapitre, le métabolome total de *Dictyot*a spp. et de *Taonia atomaria* a été étudié dans le but d'explorer le plus globalement possible leur diversité chimique, puis d'évaluer l'activité anti-adhésion des métabolites obtenus. Pour cela, nous avons dans un premier temps isolé et caractérisé les métabolites secondaires majoritaires dans les extraits totaux à l'aide de différentes techniques spectrales (RMN 1D et 2D, SM, IR-TF, UV-Visible et polarimétrie). Puis, les molécules isolées ont été évaluées dans un second temps pour leur activité anti-adhésion vis-à-vis de plusieurs souches de bactéries marines. Dans le cadre de ces travaux, nous nous sommes focalisés plus particulièrement sur des souches impliquées dans les premières étapes de développement d'un biofilm. Nous avons choisi des souches bactériennes présentant des caractéristiques différentes en termes de taxinomie (différentes espèces) et de substrat d'isolement (verre, téflon ou silicone) afin de voir si elles réagissaient de manière similaire ou différente en présence des molécules testées. Seuls les composés isolés en quantités suffisantes ont vu leur activité en anti-adhésion évaluée. De plus, l'un des enjeux majeurs dans la recherche de molécules à effet antifouling étant de prouver qu'elles sont respectueuses de l'environnement, la toxicité des composés estimés être actifs en anti-adhésion a donc ensuite été évaluée.

I. Etude de *Dictyota* sp.

I.1. Caractérisation des métabolites issus des extraits totaux

I.1.1. Obtention des métabolites

La composition chimique de deux échantillons de *Dictyota* spp. a été explorée. Les spécimens d'algues ont été collectés sur deux sites différents en mer Méditerranée, à savoir Tipaza (Algérie) au Sud [échantillon A] et Carqueiranne (France) au Nord [échantillon B].

L'échantillon A serait probablement *D. dichotoma* selon une identification faite par H. Seridi (Université Houari Boumedienne, Alger, Algérie). L'échantillon B correspond à deux espèces distinctes : *D. implexa* et *D. fasciola* identifiés par O. De Clerck (Université de Gand, Belgique). Considérant la difficulté pour un non-spécialiste d'identifier au niveau morphologique ces deux espèces, elles ont été regroupées sous la dénomination *Dictyota* spp. (Figure 29).

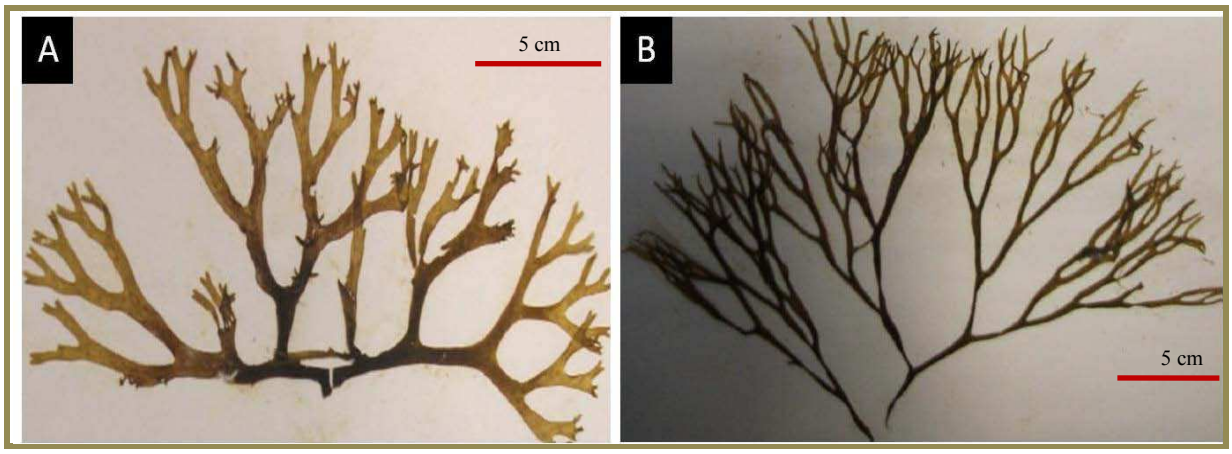


Figure 29 : Variété morphologique des espèces de *Dictyota* collectées à Carqueiranne : *D. implexa* **(A),** *D. fasciola* **(B)**

L'échantillon A, présentant un poids sec de 248 g, a été extrait par un mélange MeOH/$CHCl_3$. Cette étape a conduit à l'obtention d'un résidu huileux vert foncé d'une masse totale de 18,7 g après évaporation des solvants, soit un rendement d'extraction de 7,5% par rapport à la masse d'algue sèche. Une partie de cet extrait brut total (2,5 g) a ensuite été fractionnée par chromatographie « flash » avec un gradient d'élution allant de 100% H_2O à 100% MeOH en 23 min, puis de 100% MeOH à 100% CH_2Cl_2 en 14 min suivi d'un palier isocratique de 10 min à 100% CH_2Cl_2.Un total de 40 fractions a ainsi été obtenu (Figure 30).

Certaines fractions sélectionnées ont été soumises à une série de purifications par CLHP semi-préparative en phase inverse. Généralement, les fractions qui présentent une masse importante et qui renferment des composés spécifiques (après examen par RMN ^1H) sont choisies pour être purifiées. Considérant ces données, la fraction 17 (147 mg) a été sélectionnée. Suite à son élution en chromatographie « flash » par un mélange MeOH/CH_2Cl_2 (95:5, v/v), elle a été ensuite purifiée par CLHP en utilisant un mélange MeCN/H_2O (9:1, v/v) comme éluant pendant un temps total d'analyse de 25 min. Plusieurs injections successives réalisées avec cette fraction ont permis l'obtention de 37 mg du composé **Ds1** (t_R = 17,62 min) (Figure 31). D'autres fractions ont conduit à l'obtention de plusieurs acides gras, de glycérides ou de glycéroglycolipides et du mannitol.

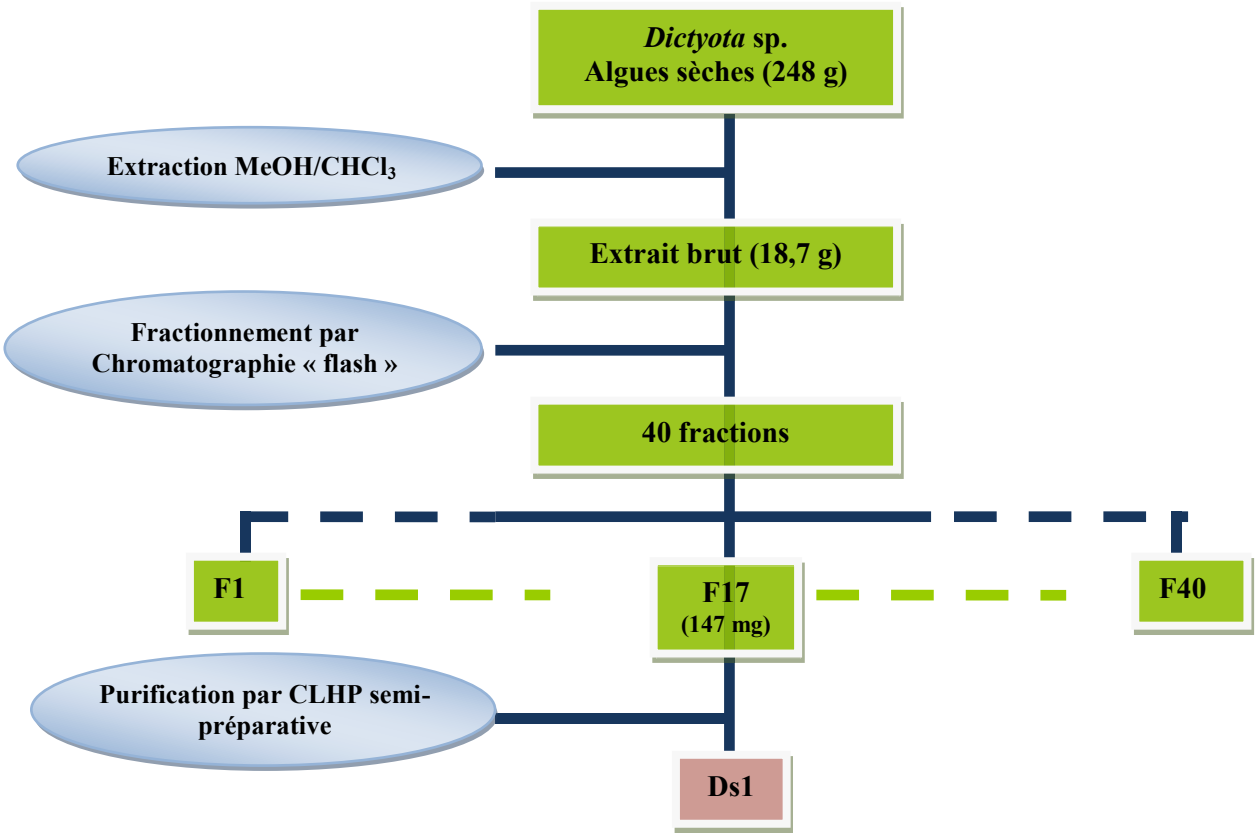


Figure 30 : Etapes d'obtention du composé **Ds1** à partir de *Dictyota* spp. (échantillon A)

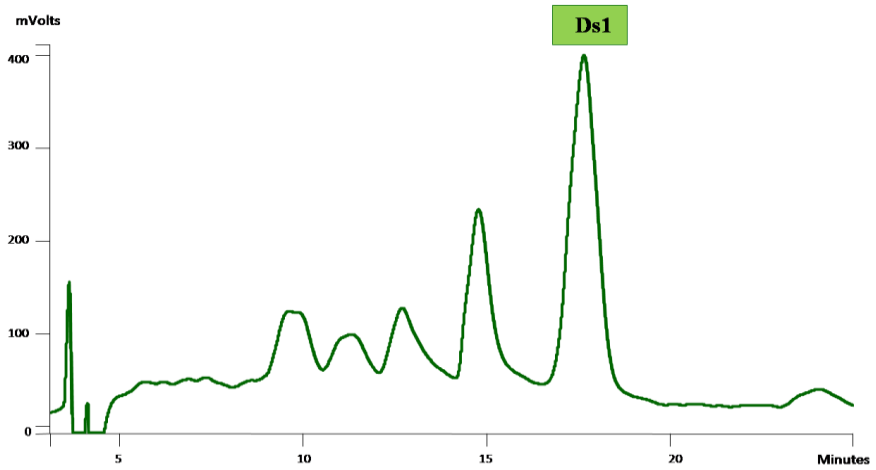


Figure 31 : Chromatogramme CLHP [colonne RP-18e ; détection réfractométrique ; éluant : MeCN/H_2O (9 :1, v/v) ; débit : 3mL/min] de la fraction **17** de *Dictyota* spp. (échantillon A)

Pour l'échantillon B, le matériel sec (140 g) a été broyé et extrait trois fois avec un mélange MeOH/CH_2Cl_2. Les solutions résultantes ont ensuite été filtrées, rassemblées et concentrées pour donner 14,5 g d'un extrait brut huileux de couleur vert foncé, soit un rendement d'extraction de 10,5% par rapport au poids sec du matériel algal. Ces étapes ont été suivies par le fractionnement d'une partie de l'extrait brut (8,5 g) par chromatographie sur colonne ouverte de silice (Si60) avec une élution de polarité croissante allant d'un mélange cyclohexane/AcOEt (9:1, v/v) à 100% AcOEt puis de 100% AcOEt à 100% MeOH. Cette étape a abouti à l'obtention de 32 fractions (Figure 32). La fraction 7, éluée avec un mélange de cyclohexane/AcOEt (1:1, v/v) et ayant la masse la plus importante (1,1 g), a été sélectionnée. Elle a été soumise à une seconde étape de fractionnement par CLHP en phase inverse en utilisant comme éluant un mélange MeCN/H_2O (95:5, v/v). Suite à la réalisation d'injections successives, quatre composés ont été purifiés à partir de cette fraction : **Ds2** (t_R = 7,26 min; 43,6 mg), **Ds3** (t_R = 7,76 min; 36,8 mg), **Ds4** (t_R = 9,49 min; 80,1 mg) et **Ds5** (t_R = 10,24 min; 131,3 mg) (Figure 33).

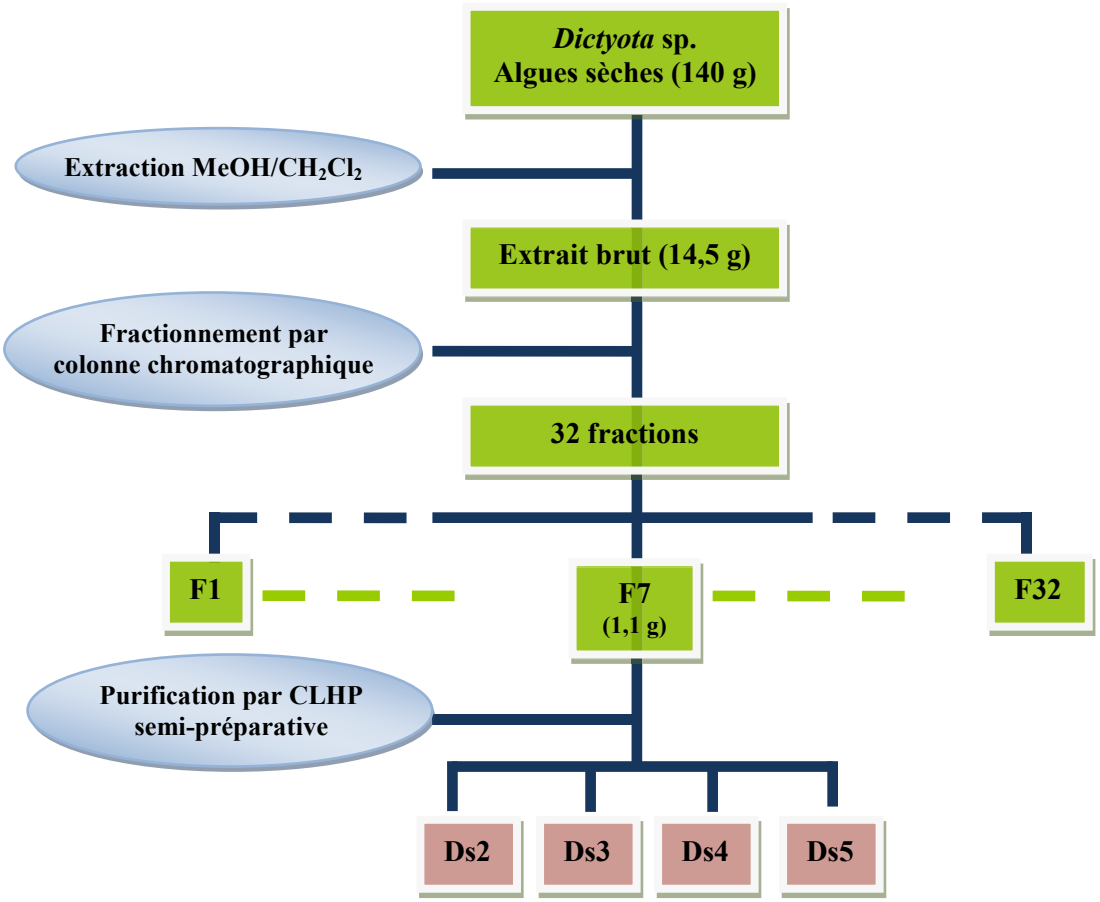


Figure 32 : Etapes d'obtention des composés **Ds2-Ds5** à partir de *Dictyota* spp. (échantillon B)

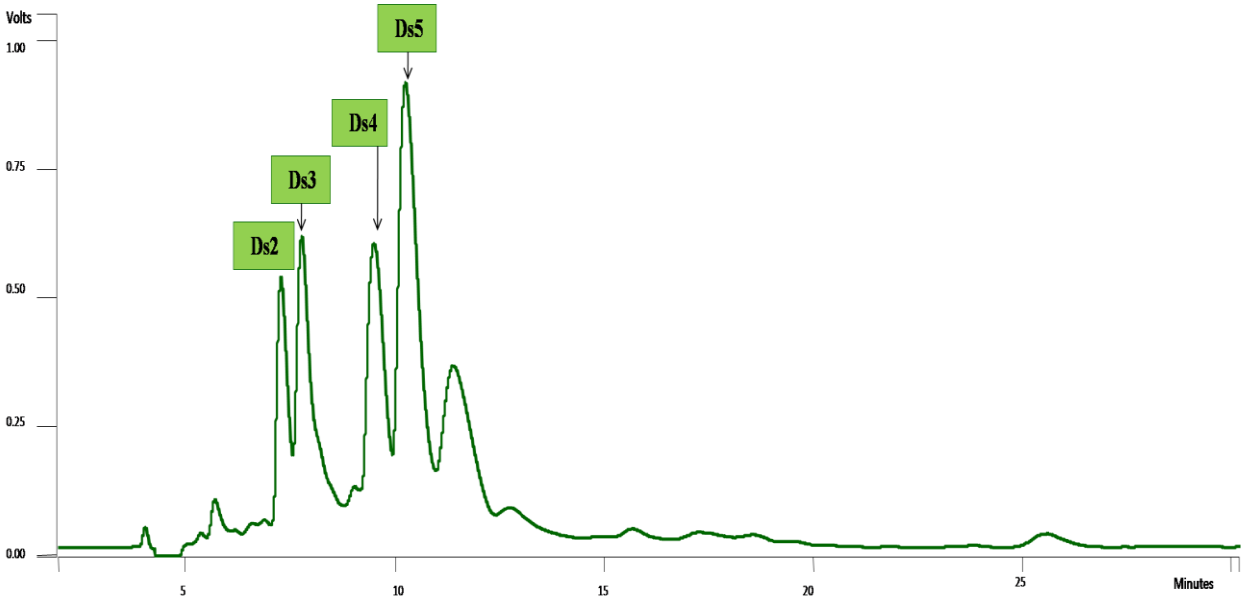


Figure 33 : Chromatogramme CLHP [colonne RP-18e ; détection réfractométrique ; éluant : MeCN/H_2O (95:5, v/v) ; débit : 3mL/min] de la fraction **7** de *Dictyota* spp. (échantillon B)

I.1.2. Caractérisation structurale des métabolites

Après la purification des composés isolés, vient l'étape de leur élucidation structurale. La structure chimique des produits purs a été déterminée sur la base de leurs données spectrales, principalement celles obtenues par spectrométrie de masse et par des expériences de RMN mono- et bidimensionnelles, ainsi que par comparaison avec des données issues de la littérature.

I.1.2.1. Analyse structurale du composé Ds1

Ds1 est le composé majoritaire de la fraction 17 obtenue à partir de l'extrait brut d'un échantillon de *Dictyota* sp. d'Algérie (échantillon A), il représente 0,25% de l'extrait brut total. A l'issue de sa purification, cette moléculeest obtenue sous forme d'une huile légèrement verdâtre.L'analyse des données de RMN ^{1}H et ^{13}C de Ds1 (Cf. Annexe 1) montre la présence de 23 atomes de carbone correspondant à quatre atomes de carbone quaternaires (tous sp^2), cinq méthines (quatre sp^2 et un sp^3 oxygéné), neuf méthylènes (tous sp^3) et cinq méthyles. Des signaux typiques de la présence d'une unité de glycérol sont observés sur le spectre RMN ^{1}H [δ_H 3,64 *dd* (J = 11,5 ; 5,0 Hz) et 3.72 *dd* (J = 11,5 ; 5,0 Hz), $H_{a,b}$-1' ; δ_H 3,87 *ddd* (J = 6,0 ; 5,0 et 4,0 Hz), H-2' ; δ_H 3,49 *dd* (J = 9,5 et 6,0 Hz) et 3,54 *dd* (J = 9,5 et

4,0 Hz), $H_{a,b}$-3'] ainsi que la présence de signaux caractéristiques d'une chaîne diterpénique comprenant cinq méthyles (δ_H 1,68 *s*, H_3-16; δ_H 1,60 *s*, H_3-17, H_3-18 et H_3-19 et δ_H 1,67 *s*, H_3-20) et quatre protons oléfiniques (δ_H 1,98 *m*, H_2-8 et H_2-12 et δ_H 2,06 *m*, H_2-9 et H_2-13). Les données RMN ainsi que leur comparaison avec celles issues de la littérature (Tableau 7) ont permis d'identifier **Ds1** comme étant le sn-3-*O*-(géranylgéranyl)glycérol (Figure 34). Cette molécule a été précédemment isolée à partir de deux autres algues brunes de la famille des Dictyotacées, *Dilophus fasciola* (Amico et al., 1977) et *Taonia lacheana* (Tringali et al. 1995). Le composé **Ds1** est décrit ici pour la première fois à partir d'une algue appartenant au genre *Dictyota*.

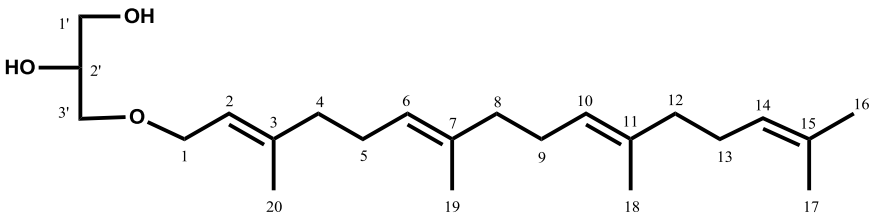


Figure 34 : Structure chimique du composé **Ds1**

Tableau 7 : Comparaison des données RMN ^{1}H et ^{13}C ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ds1** avec celles de la littérature

	Ds1			**(Zhang et al. 2006)**		
	δ_C (ppm)	DEPT	δ_H mult. (J en Hz)	δ_C (ppm)	DEPT	δ_H mult. (J en Hz)
1	67,1	CH_2	4,03 *d* (7,0)	68,1	CH_2	4,02 *d* (6,8)
2	119,4	CH	5,33 *br t* (7,0)	120,5	CH	5,32 *t* (6,4)
3	140,2	C	-	141,17	C	
4	38,7	CH_2	2,06 *m*	39,9	CH_2	1,9 – 2,1 *m*
5	25,4	CH_2	2,10 *m*	26,5	CH_2	1,9 – 2,1 *m*
6	122,9	CH	5,10 *m*	123,9	CH	5,10 *m*
7	134,6	C	-	135,6	C	
8	38,3	CH_2	1,98 *m*	39,8	CH_2	1,9 – 2,1 *m*
9	25,9	CH_2	2,06 *m*	27,0	CH_2	1,9 – 2,1 *m*
10	123,3	CH	5,10 *m*	124,4	CH	5,10 *m*
11	134,1	C	-	135,2	C	
12	38,9	CH_2	1,98 *m*	39,9	CH_2	1,9 – 2,1 *m*
13	25,8	CH_2	2,06 *m*	26,8	CH_2	1,9 – 2,1 *m*
14	123,5	CH	5,10 *m*	124,6	CH	5,10 *m*
15	130,4	C	-	131,5	C	
16	24,9	CH_3	1,68 *s*	25,9	CH_3	1,66 *d*
17	16,8	CH_3	1,60 *s*	17,9	CH_3	1,66 *d*
18	15,2	CH_3	1,60 *s*	16,2	CH_3	1,66 *d*
19	15,2	CH_3	1,60 *s*	16,2	CH_3	1,66 *d*
20	15,7	CH_3	1,67 *s*	16,7	CH_3	1,66 *d*
3’	70,8	CH_2	a: 3,49 *dd* (9,5, 6,0) b: 3,54 *dd* (9,5, 4,0)	71,8	CH_2	a: 3,45 *m* b: 3,54 *m*
2’	69,6	CH	3,87 *ddt* (6,0, 5,0, 4,0)	70,8	CH	3,86 *m*
1’	63,4	CH_2	a: 3,64 *dd* (11,5, 5,0) b: 3,72 *dd* (11,5, 4,0)	64,4	CH_2	a: 3,58 *m* b: 3,72 *m*

I.1.2.2. Analyse structurale du composé Ds2

Le composé **Ds2** est isolé sous forme d'une huile de couleur verte. Son spectre RMN ^{13}C présente 22 signaux, ce qui dans le cas des molécules isolées à partir de *Dictyota* spp. correspond généralement à un diterpène acétylé. Cette hypothèse est confirmée par la présence, sur les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C de **Ds2** (Cf. Annexe 2), des signaux propres à un groupement acétate (δ_C 169,8, C-22 ; δ_C 21,3 etδ_H 2,03 *s*, CH_3-21). L'analyse des spectres RMN^{13}C et DEPT a conduit au recensement de cinq atomes de carbone quaternaires, cinq méthyles, quatre méthylènes et huit méthines. Ces informations permettent de proposer la formule brute $C_{22}H_{32}O_4$ pour **Ds2.** Plus précisément, une analyse approfondie des données RMN met en évidence la présence d'un cycle cyclopropane (δ_C 8,4, C-8 ; δ_H 0,36 *q* (J = 5,0 Hz) et 1,03 *m*, $H_{a,b}$-8) : dans le cas de diterpènes cycliques d'origine algale, cet élément structural est caractéristique d'un squelette de type crénulide. La comparaison de l'ensemble des données RMN 1D et 2D de **Ds2** avec celles issues de la littérature (Tableau 8) mène à son identification comme étant l'acétoxycrénulide (Figure 35).

Ce composé a été initialement isolé à partir de l'algue brune *Dictyota crenulata* (Sun et al., 1983) ainsi que des glandes digestives d'*Aplysia vaccaria* (Midland et al., 1983), un lièvre de mer connu pour se nourrir d'algues brunes du genre *Dictyota*. L'acétoxycrénulide a ensuite été décrit plus récemment à partir de divers échantillons de *Dictyota dichotoma* (Siamopoulou et al., 2004 ; Kolesnikova et al., 2009), de *Dictyota volubilis* (Wright et al., 1993), et de *Dilophus ligulatus* (Bouaicha et al., 1993).

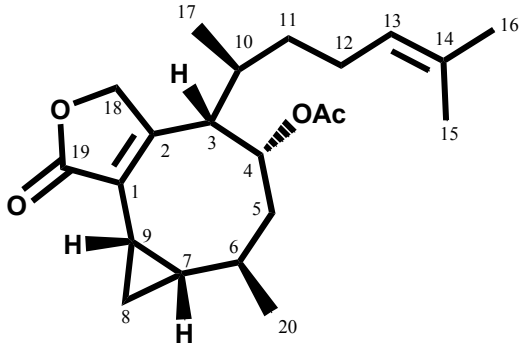


Figure 35 : Structure chimique du composé **Ds2**

Tableau 8 : Comparaison des données RMN ^{1}H et ^{13}C ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ds2** avec celles issues de la littérature

	Ds2			**Midland et al. (1983)**		
	δ_C (ppm)	DEPT	δ_H mult. (*J* en Hz)	δ_C (ppm)	DEPT	δ_H mult. (*J* en Hz)
1	127,8	C	-	128,7	C	-
2	165,9	C	-	166,6	C	-
3	46,3	CH	3,19 *d* (8,0)	47,4	CH	3,21*d* (8,0)
4	71,2	CH	5,43 *br s*	72,2	CH	5,45*br s*
5	43,0	CH_2	a : 1,77 *dd* (15,0, 3,0) b : 1,92 *dd* (15,0, 3,0)	43,8	CH_2	a : 1,78*dd* (15,1, 3,1) b : 1,81*dd* (15,1, 3,1)
6	28,2	CH	1,09 *m*	29,2	CH	1,28*m*
7	9,3	CH	1,48 *m*	10,2	CH	0,96*m*
8	7,4	CH_2	a : 0,36 *q* (5,0) b : 1,04 *m*	8,4	CH_2	a : 0,36 *q* (5,0) b : 1,03 *dt* (5,5, 8,8)
9	24,5	CH	1,90 – 2,10 *m*	25,5	CH	1,49 *tdd* (8,8, 5,5, 2,2)
10	31,8	CH	1,57 *s*	32,8	CH	2,06 *dtq* (8,0, 7,0, 6,8)
11	34,7	CH_2	a : 1,12*m* b : 1,27 *m*	35,6	CH_2	1,12 *dtd* (13,5, 8;8, 5,5)
12	24,8	CH_2	a : 0,92*m* b : 1,67 *s*	25,7	CH_2	1,93 *m*
13	122,5	CH	5,04 *t* (7,0)	123,5	CH	5,04 *tsep* (7,2, 1,0)
14	131,3	C	-	132,5	C	-
15	16,8	CH_3	1,57 *s*	17,7	CH_3	1,69*s*
16	25,0	CH_3	1,67 *s*	25,9	CH_3	1,58*s*
17	16,1	CH_3	0,99 *d* (7,0)	17,1	CH_3	1,01*d* (6,8)
18	70,5	CH_2	a : 4,72 *dd* (17,0, 3,0) b : 4,82 *dd* (17,0, 3,0)	71,5	CH_2	a : 4,72 *dd* (18,0, 2,5) b : 4,82 *dd* (18,0, 2,5)
19	173,4	C	-	174,2	C	-
20	22,6	CH_3	0,96 *d* (7,0)	23,4	CH_3	0,98*d* (6,8)
21	20,4	CH_3	2,02 *s*	21,3	CH_3	2,03*s*
22	168,9	C	-	169,8	C	-

I.1.2.3. Analyse structurale du composé Ds3

Le composé **Ds3** est obtenu sous l'apparence d'une huile jaune pâle. Les données de RMN (spectres RMN ^{13}C et DEPT 45, 90 et 135) (Cf. Annexe 3) révèlent la présence de vingt signaux attribués à quatre méthyles, sept méthylènes, quatre méthines et quatre atomes de carbone quaternaires. L'analyse de cette molécule par spectrométrie de masse (ESI/MS) conduit à l'observation d'un ion à *m/z* 285 $[M-H_2O+H]^+$ en accord avec une masse molaire de 302 $g.mol^{-1}$.L'ensemble de ces données expérimentales conduisent à l'attribution de la formule brute $C_{20}H_{30}O_2$pour **Ds3** et leur comparaison avec celles issues de la littérature (Tableau 9) montre que ce composé correspond à un diterpène connu de type dolabellane le 3,4-époxy-14-oxo-7,18-dolabelladiène (Figure 36). Ce composé a été initialement isolé à partir de *Dictyota dichotoma* (Amico et al., 1980 ; Piattelli et al., 1995), et sa stéréochimie a été récemment révisée lorsque ce métabolite a été décrit dans les extraits organiques de l'algue brune *Dilophus spiralis*, actuellement reconnue comme *Dictyota spiralis* (Ioannou et al., 2011). Le composé **Ds3** a également été précédemment isolé à partir de la dictyotacée *Dilophus ligulatus* (Bouaicha et al., 1993).

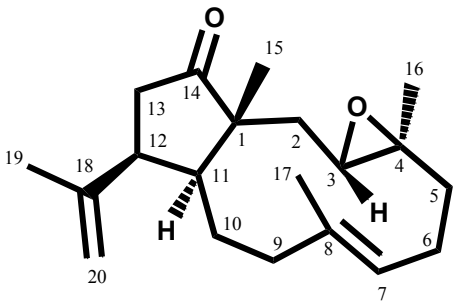


Figure 36 : Structure chimique du composé **Ds3**

Tableau 9 : Comparaison des données RMN ^{1}H et ^{13}C ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ds3** avec celles issues de la littérature

	Ds3			**Piattelli et al. (1995)**		
	δ_C (ppm)	DEPT	δ_H mult. (*J* en Hz)	δ_C (ppm)	DEPT	δ_H mult. (*J* en Hz)
1	52,3	C	-	51,9	C	-
2	36,3	CH_2	a: 1,31*m* b: 1,90 *dd* (14,0, 3,0)	36,0	CH_2	a: 1,34 *dd* (14,0, 11,0) b: 1,93 *dd* (11,0, 2,6)
3	63,3	CH	2,96 *dd* (11,0, 3,0)	62,9	CH	2,99*dd* (11,0, 2,6)
4	61,7	C	-	61,2	C	-
5	38,7	CH_2	a: 1,21*m* b: 2,16 *m*	38,8	CH_2	a: 1,25 *m* b: 2,18*m*
6	24,5	CH_2	a: 2,19*m* b: 2,38 *m*	24,1	CH_2	a: 2,22 *m* b: 2,38 *m*
7	127,3	CH	5,06 *br d* (11,0)	126,9	CH	5,11*br d* (11,0)
8	133,5	C	-	133,2	C	-
9	37,1	CH_2	a: 2,15*m* b: 2,23 *m*	36,8	CH_2	a: 2,15*m* b: 2,27*m*
10	21,6	CH_2	a: 1,33*m* b: 1,53 *s*	21,2	CH_2	a: 1,35 *m* b: 1,54*s*
11	40,2	CH	2,28 *m*	39,8	CH	2,31 *m*
12	44,5	CH	2,76 *dt* (13,0, 7,0)	44,0	CH	2,82*dt* (14,0, 7,0)
13	40,3	CH_2	a: 2,21 *m* b: 2,40 *m*	39,9	CH_2	a: 2,18 *dd* (14,0, 15,0) b: 2,44 *dd* (14,0, 7,0)
14	ND			220,9	C	-
15	18,8	CH_3	1,29 *s*	18,5	CH_3	1,33*s*
16	16,0	CH_3	1,23*s*	15,6	CH_3	1,27*s*
17	16,1	CH_3	1,62*s*	15,8	CH_3	1,67*s*
18	143,6	C	-	143,2	C	-
19	22,8	CH_3	1,74*s*	22,4	CH_3	1,79*s*
20	112,3	CH_2	a: 4,69 *m* b: 4,98 *m*	111,9	CH_2	a: 4,74 *br s* b: 5,03 *br s*

I.1.2.4. Analyse structurale du composé Ds4

Le composé **Ds4**, isolé sous l'apparence d'une huile jaune pâle, présente 22 signaux sur son spectre RMN ^{13}C (Figure 38) et sa structure chimique pourrait ainsi correspondre à celle d'un diterpène acétylé. Cette hypothèse est vérifiée par la présence des signaux caractéristiques d'un groupement acétate sur les spectres de RMN ^{1}H (Figure 37) et^{13}C (δ_C 170,6, C-21 ; δ_C 21,3, δ_H 1,97, *s*, CH_3-22). A l'aide des expériences DEPT et HSQC (Cf. Annexe 4), les autres signaux visibles en RMN ^{13}C sont attribués à trois méthyles, sept méthylènes (six sp^3 et un oléfinique), six méthines (trois sp^3, dont l'un est lié à un atome d'oxygène, deux oléfiniques et un aldéhyde) et quatre carbones quaternaires (un sp^3 et trois oléfiniques). L'étude par ESI-MS montre un pic à *m/z* 285 $[M\text{-}AcOH+H]^+$en accord avec une masse molaire de 344 $g.mol^{-1}$ et une formule brute de $C_{22}H_{32}O_3$.Le spectre RMN ^{1}H de **Ds4** révèle ensuite les signaux d'un proton aldéhydique (δ_H 9,44, *d* (*J* = 1,5 Hz), H-17), de trois méthines déblindés (δ_H 6,73, *dd* (*J* = 12,5 ; 5,0 Hz), H-7; 5,62,*br d* (*J* = 12,5 Hz), H-9; 5,48, *ddq* (*J* = 11,5 ; 4,5 ; 1,5 Hz), H-3), d'un méthylène oléfinique,(δ_H 4,63, *s*et δ_H 4,86, *s*, $H_{a,b}$-20), de trois méthyles (δ_H 1,16, CH_3-15; 1,47, CH_3-19; 1,57, CH_3-16, *s*) et de plusieurs signaux complexes observés entre 1,40 et 3,00 ppm et attribués à différents méthines et méthylènes. Plus précisément, la présence d'un groupe isoprényle en C-12 est déduite grâce, d'une part, aux corrélations COSY ^{1}H-^{1}H entre $H_{a,b}$-20/H_3-19 et $H_{a,b}$-20/H-12 et, d'autre part, auxcorrélations HMBC de $H_{a,b}$-20 avec C-12, C-18 et C-19 et de H_3-19 avec C-12, C-18, et C-20. Tels que définis dans la figure 39, les couplages complémentaires entre H-11/H-12, H-12/H_2-13 et H_2-13/$H_{a,b}$-14 observés sur le spectre COSY ^{1}H-^{1}H de **Ds4**, ainsi que les corrélations HMBC de H_2-13 avec C-11, C-1, de H_b-14 avec C-1 et C-11, etde H_3-15 avec C-1, C-11 et C-14, permettent l'identification d'un cycle pentane portant un méthyle en C-1. Par ailleurs, la présence d'un cycle à 11 atomes de carbone est soutenue par l'observation des systèmes de couplage de spins homonucléaires entre $H_{a,b}$-2/H-3/H_3-16, $H_{a,b}$-5/$H_{a,b}$-6/H-7 et H-9/$H_{a,b}$-10/H-11, des corrélations HMBCde H3-16 avec C- 3, C-4 et C-5 et de H-17 avec C-7, C-8 et C-9. Enfin, les corrélations observées sur le spectre HMBC entreH-9/C-21 et H_3-21/C-9 positionnent le groupement acétate en C-9. En terme de stéréochimie, la configuration des doubles liaisonsΔ^3 et Δ^7est déterminée comme *E* en se basant sur la présence de corrélations en NOESY entreH-3/$H_{a,b}$-5, H_b-2/H_3-16, H-7/H-17 et H_b-6/H-9. La configuration relative des stéréocentres en C-1, C-11 et C-12 est déduite par comparaison avec les données de la littérature ayant trait aux dolabellanes portant un groupement isoprényle. En particulier, la

valeur du déplacement chimique en RMN ^{13}C de C-19 (δ_C 23,4) est en accord avec une orientation *cis* du H-12 par rapport à H-11 et une orientation *trans* de ces deux protons par rapport au groupement méthyle en C-1 (CH_3- 15) (Ioannou et al. 2011). D'autres corrélations observées sur le spectre NOESY ^1H-^1H de **Ds4** entreH-3/H_b-6, H-3/H_3-15, H-9/H_b-6 et H-9/H_3-15, d'une part, et entreH-7/H_a-6 et H_a-6/H_3-22, d'autre part, suggèrent des orientations respectives *cis*- et *trans*- pour H-9 par rapport à H_3-15 et H-17 (Tableau 10). Il est néanmoins difficile de confirmer avec certitude cette proposition en raison de la flexibilité du macrocycle. Ainsi, le composé **Ds4** est identifié comme étant le (1*R**, 3*E*, 7*E*, 11*S**, 12*S**) 9-acétoxydolabella-3,7,18-trién-17-al (Figure 40). Il s'agit d'un composé nouveau décrit ici pour la première fois (Othmani et al. 2013).

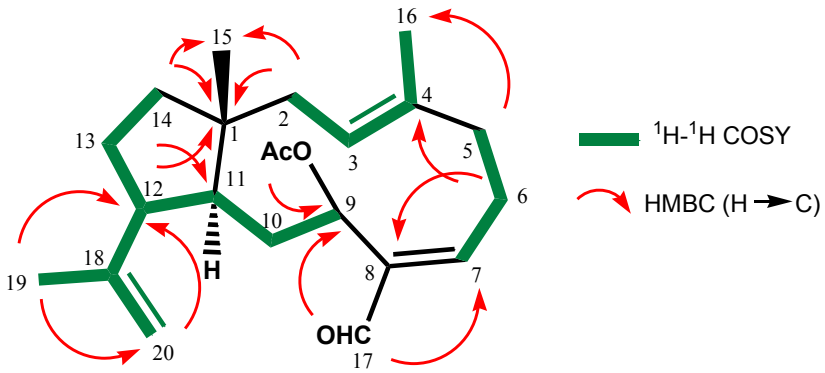


Figure 39 : Principales corrélations RMN observées pour le composé **Ds4**

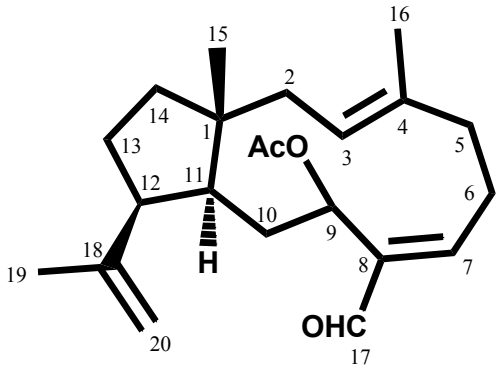


Figure 40 : Structure chimique du compsé **Ds4**

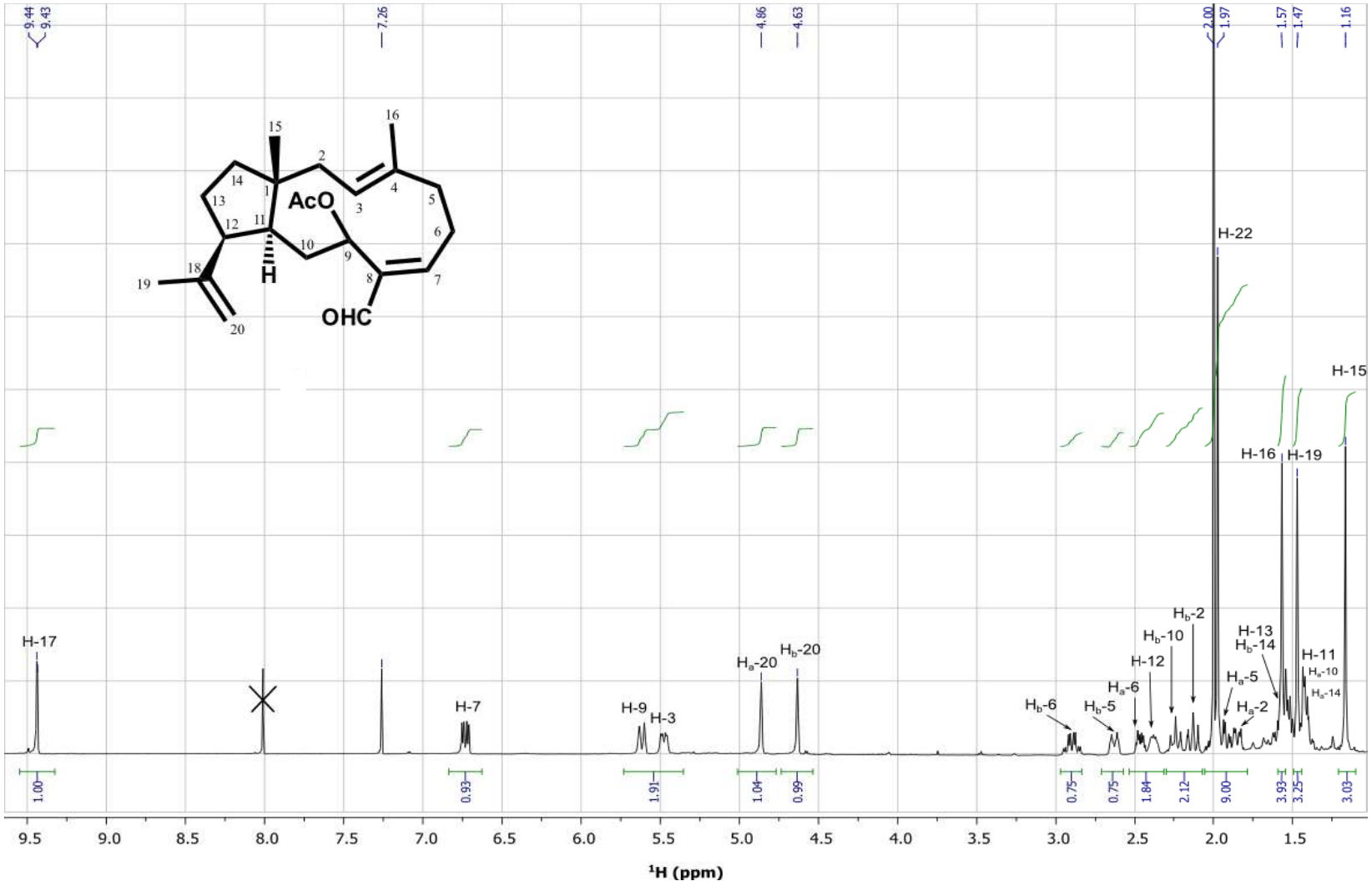


Figure 37 : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ds4** ($CDCl_3$, 400MHz)

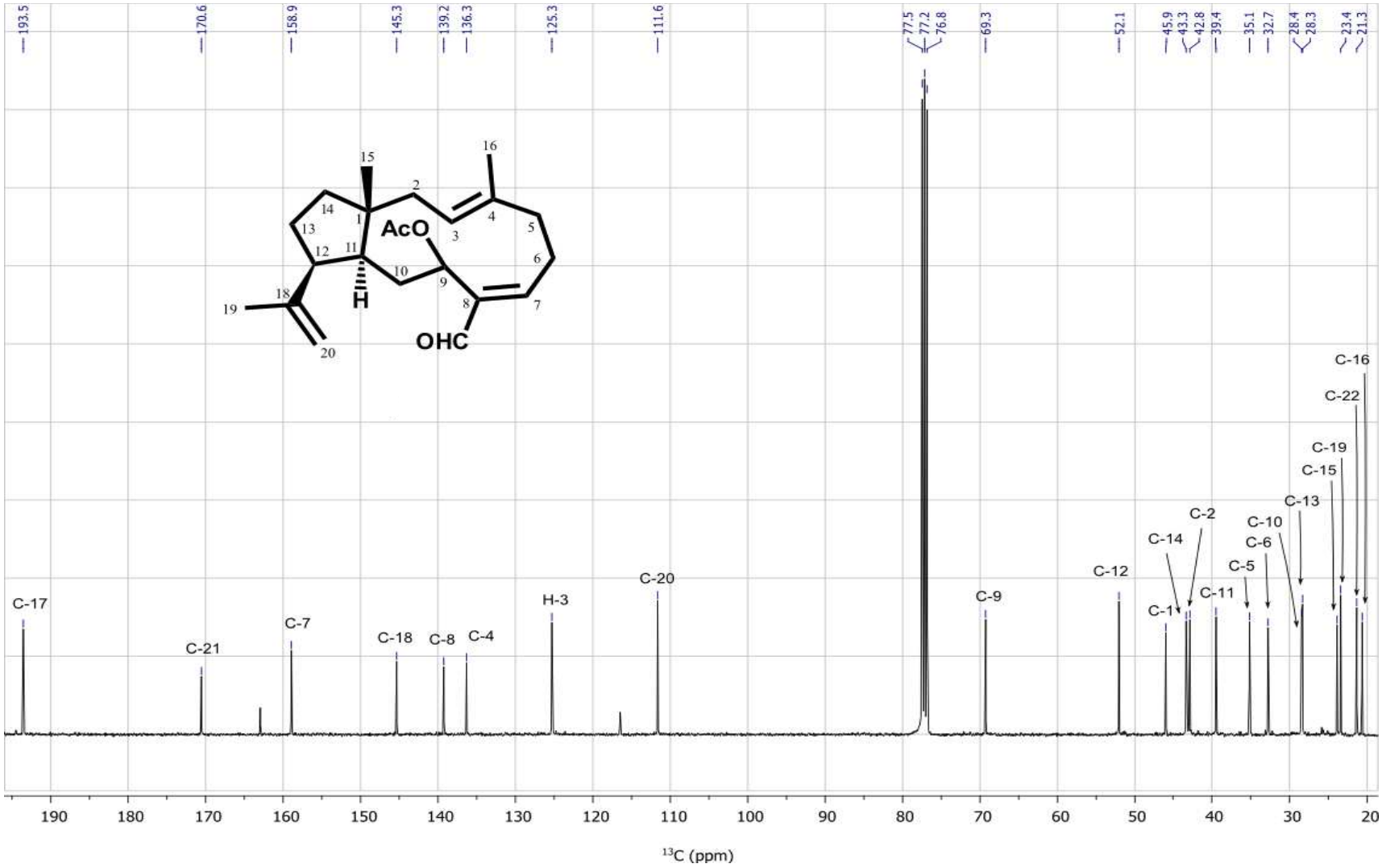


Figure 38 : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ds4** ($CDCl_3$, 100MHz)

Tableau 10 : Données RMN 1D et 2D ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ds4**

	δ_C (ppm)	DEPT	δ_H mult. (J en Hz)	HMBC	COSY ^1H-^1H	NOESY ^1H-^1H
1	45,9	C	-	-	-	-
2	42,8	CH_2	a: 1,85 *dd* (12,5, 4,5) b: 2,13 *br t* (12,5)	a: C-1, C-3, C-4, C-11, C-14, C-15 b: C-1, C-3, C-4, C-11, C-14, C-15	a: H_b-2, H-3 b: H_a-2, H-3	a: H_b-2 b: H_a-2, H-3, H_3-16
3	125,3	CH	5,48 *ddq* (11,5, 4,5, 1,5)	C-2, C-5, C-16	$H_{a,b}$-2, H_3-16	H_b-2, H_b-5, H_b-6, H_3-15
4	136,3	C	-	-	-	-
5	35,1	CH_2	a: 1,91 *dd* (13,5, 4,0) b: 2,63 *dt* (13,5, 4,0)	a: C-3, C-4, C-6, C-7, C-16 b: C-3, C-4, C-6, C-7, C-16	a: H_b-5, $H_{a,b}$-6 b: H_a-5, $H_{a,b}$-6	a: H_b-5 b: H-3, H_a-5
6	32,7	CH_2	a: 2,47 *dq* (13,0, 4,0) b: 2,90 *qd* (13,0, 4,0)	a: C-4, C-5, C-7, C-8 b: C-4, C-5, C-7, C-8	a: $H_{a,b}$-5, H_b-6, H-7 b: $H_{a,b}$-5a, H_a-6, H-7	a: H_b-6, H-7, H_3-22 b: H-3, H_a-6, H-9
7	158,9	CH	6,73 *dd* (12,5, 5,0)	C-5, C-6, C-8, C-9, C-17	$H_{a,b}$-6	H_a-6, H-17
8	139,2	C	-	-	-	-
9	69,3	CH	5,62 *br d* (12,5)	C-7, C-8, C-10, C-17, C-21	$H_{a,b}$-10	H_b-6, H_3-15
10	28,4	CH_2	a: 1,43 *m* b: 2,24 *t* (13,0)	a: signaux superposés b: C-1, C-8, C-9, C-11, C-12	a: H-9 b: H9, H-11	a: - b: -
11	39,4	CH	1,43 *m*	signaux superposés	H_b-10, H-12	
12	52,1	CH	2,38 *m*	C-10, C-11, C-13, C-14, C-18, C-19, C-20	H-11, H_2-13, H_a-20	H_3-19
13	28,3	CH_2	1,54 *m*	C-1, C-11, C-12	H-12, H_a-14	
14	43,3	CH_2	a: 1,42 *m* b: 1,52 *m*	a: signaux superposés b: C-1, C-11, C-12, C-13, C-15	a: H-13 b: -	a: - b: -
15	23,9	CH_3	1,16 *s*	C-1, C-2, C-11, C-14	-	H-3, H-9
16	20,6	CH_3	1,57 *s*	C-3, C-4, C-5	H-3	H_b-2
17	193,5	CH	9,44 *d* (1,5)	C-7, C-8, C-9	-	H-7
18	145,3	C	-	-	-	-
19	23,4	CH_3	1,47 *s*	C-12, C-18, C-20	H_3-20	-
20	111,6	CH_2	a: 4,63 *s* b: 4,86 *s*	a: C-12, C-18, C-19 b: C-12, C-18, C-19	a: H-12, H_3-19, H_b-20 b: H_3-19, H_a-20	a: H-12 b:
21	170,6	C	-	-	-	-
22	21,3	CH_3	1,97 *s*	C-9, C-21	-	H_a-6

I.1.2.5. Analyse structurale du composé Ds5

Il s'agit d'un composé huileux de couleur jaune dont l'analyse du spectre RMN ^{13}C (Cf. Annexe 5) permet de détecter 20 signaux, ce qui semble correspondre à une structure diterpénique. Plus précisément, quatre méthyles, six méthylènes, six méthines et quatre atomes de carbone quaternaires sont recensés à l'aide des spectres RMN ^{13}C et DEPT. Une analyse plus fine des données RMN de Ds5 (Tableau11) indiquent la présence :

- d'une double liaison 1,1-disubstituée (δ_C 152,0, C-10 ; 107,7, CH_2-18 ; δ_H 4,74 *d* (J = 10,0 Hz) et 4,77 s, $H_{a,b}$-18).
- d'une chaîne latérale terpénique mise en évidence par le biais des signaux caractéristiques d'une unité isoprénique terminale (δ_C 124,5, CH-14 ; 131,8, C-15 ; 25,8, CH_3-16 et 17,8, CH_3-20 ; δ_H 5,14 *t* (J = 7,0 Hz), H-14 ; 1,67 *s*, H_3-16 ; 1,60*s* H_3-20).

Ces groupements chimiques étant uniquement recensés au sein de diterpènes présentant un squelette de type dictyane, la comparaison des données RMN de **Ds5** avec celles issues de la littérature pour des composés de cette famille a permis d'identifier ce composé comme étant le dictyol E (Figure 41).

Il est à noter que le composé **Ds5** constitue dans notre cas le métabolite majoritaire de l'extrait brut de *Dictyota* spp. (environ 1% de l'extrait brut total). Le dictyol E semble être un métabolite commun à plusieurs espèces appartenant au genre *Dictyota* car il a été isolé auparavant à partir d'échantillons de *Dictyota dichotoma* (Amico et al., 1980 ; Blount et al., 1982 ; Siamopoulou et al., 2004), *Dictyota menstrualis* (Cronin et al., 1995 ; Schmitt et al., 1995), *Dictyota ciliolata* (Cronin et al. 1995), *Dictyota guineensis* (De-Paula et al., 2012), *Dictyota fasciola* (Ioannou et al., 2009) et *Dictyota* sp. (Viano et al. 2009). Il a en outre été également décrit dans plusieurs autres Dictyotacées telles que *Dilophus ligulatus* (Danise et al., 1977), *Dilophus mediterraneus*, [actuellement reconnue comme *Dictyota mediterranea* (Goez et al., 1994)], *Pachydictyon coriaceum* [actuellement reconnue comme *Dictyota coriacea* (Choi et al., 2011)], *Glossophora galapagensis* [renommée *Dictyota galapagensis* (Sun & Fenical, 1979)], ainsi que dans un mélange complexe d'espèces constitué par *Halimeda stuposa* et *Dictyota* sp. (Ovenden et al., 2012).

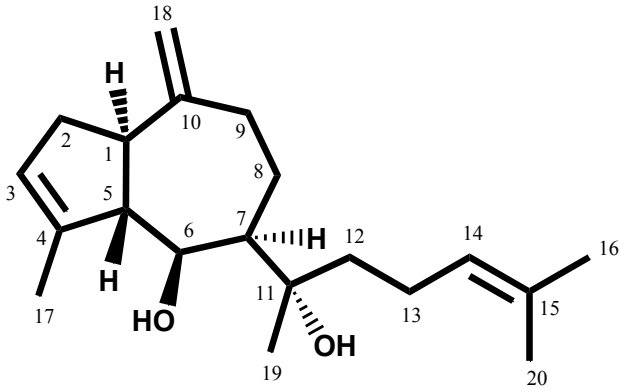


Figure 41 : Structure chimique du composé **Ds5**

Tableau 11 : Comparaison des données RMN ^{1}H et ^{13}C ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ds5** avec celles de la littérature

	Ds5			**Ovenden et al. (2012)**		
	δ_C (ppm)	DEPT	δ_H mult. (J en Hz)	δ_C (ppm)	DEPT	δ_H mult. (J en Hz)
1	46,3	CH	2,58 *q* (9,0)	46,0	CH	2,60 *q* (9,1)
2	33,9	CH_2	a : 2,21 *m* b : 2,48 *m*	33,7	CH_2	a : 2,22 *dd* (14,8, 7,8) b : 2,51 *m*
3	124,4	CH	5,32 *s*	124,2	CH	5,34 *br s*
4	140,9	C	-	141,0	C	-
5	60,4	CH	2,36 *t* (8,0)	60,4	CH	2,37 *m*
6	74,5	CH	4,18 *dd* (8,0 , 2,0)	74,7	CH	4,20 *dd* (7,8, 2,0)
7	48,7	CH	1,63 *s*	48,7	CH	1,657 *m*
8	21,7	CH_2	a : 1,67 *s* b : 1,78 *m*	21,6	CH_2	a : 1,73 *m* b : 1,81 *m*
9	40,7	CH_2	a : 2,10 *m* b : 2,66 *ddd* (15,0, 5,0, 3,0)	40,6	CH_2	a : 2,13 *m* b : 2,69 *ddd* (14,8, 4,6, 2,4)
10	152,0	C	-	152,0	C	-
11	76,5	C	-	76,3	C	-
12	41,0	CH_2	1,72 *m*	40,9	CH_2	1,74 *t* (8,6)
13	23,4	CH_2	a : 1,97 s b : 2,09 *m*	23,2	CH_2	a : 2,02 *dq* (14,8, 6,9) b : 2,12 *dd* (14,8, 8,6)
14	124,5	CH	5,14 *t* (7,0)	124,2	CH	5,16 *br t* (6,9)
15	131,8	C	-	132,0	C	-
16	25,8	CH_3	1,67 *s*	25,7	CH_3	1,69 *s*
17	15,9	CH_3	1,80 *s*	15,9	CH_3	1,82 *br s*
18	107,7	CH_2	a : 4,74 *d* (10,0) b : 4,77 *s*	107,4	CH_2	a : 4,76 *br s* b : 4,78 *br s*
19	25,4	CH_3	1,22 *s*	25,3	CH_3	1,24 *s*
20	17,8	CH_3	1,60 *s*	17,5	CH_3	1,62 *brs*

I.2. Activité anti-adhésion

L'ensemble des composés extraits de *Dictyota* spp., à l'exception de la molécule originale **Ds4** qui s'est révélée être instable, ont été étudiés pour leurs activités anti-adhésion. Quatre biocides commerciaux : le TBTO, le Zineb, la pyrithione de zinc (PtZn) et la pyrithione de cuivre (PtCu) ont été utilisés comme références positives. Tous ces produits ont été testés pour leurs propriétés en anti-adhésion vis-à-vis de trois souches bactériennes marines *Pseudoalteromonas* sp. (D41), *Paracoccu*s sp. (4M6) et *Polaribacter dokdonensis* (TC5). Ces souches ont été choisies pour leurs différences sur les plans taxinomique et géographique mais aussi parce qu'elles ont déjà été utilisées dans plusieurs études menées au laboratoire (Viano et al., 2009 ; Camps et al., 2011 ; Pénez et al., 2011 ; Nguyen et al., 2013). Trois concentrations de chaque composé ont été utilisées initialement afin de repérer la concentration effective permettant d'inhiber l'adhésion de 50% des bactéries (CE_{50}). Ensuite, huit concentrations ont été choisies de telle sorte à pouvoir calculer la valeur de la CE_{50}.

En se basant sur les valeurs des CE_{50} obtenues (Figure 42), nous avons observé une variation des réponses au bio-essai semblant être dépendante à la fois des souches et des composés testés (ANOVA à deux facteurs, $p < 0,0001$). Le TBTO s'est avéré être le composé le plus efficace et en même temps le plus toxique pour l'environnement marin. Les deux souches D41 et 4M6 semblent être les plus sensibles au TBTO montrant une CE_{50} de 4 µM, alors qu'il a fallu une concentration plus élevée (23 ± 12 µM) pour observer le même effet chez la souche TC5 ($p < 0,01$). Ces résultats sont conformes avec ceux décrits précédemment pour le TBTO (Camps et al., 2011). Toutes les souches ont montré une sensibilité similaire au Zineb (CE_{50} entre 30 et 55 µM, $p > 0,05$). De même, le PtZn et le PtCu, connus pour être des agents antifouling efficaces (Faimali et al., 2003 ; Myers et al., 2006 ; Zhou et al., 2006), n'ont pas montré d'effets distincts entre les trois souches ($p > 0.05$) avec de très fortes activités ($CE_{50} < 10$ µM). Aucune valeur de CE_{50} liée à leur potentiel en anti-adhésion n'a jamais été rapportée dans la littérature pour ces trois biocides.

Les produits naturels précédemment décrits semblent avoir moins d'effet sur l'adhésion bactérienne, sauf le composé **Ds1** qui a été nettement actif avec des valeurs de CE_{50} comprises entre 30 et 50 µM, valeurs semblables à celles obtenues avec le Zineb. Il est intéressant de souligner que ce composé est le seul, parmi ceux testés, qui renferme un groupement glycérol. Ce groupement pourrait être impliqué dans la remarquable activité anti-adhésion de **Ds1**.

Cette hypothèse est renforcée par les résultats obtenus pour le 1-*O*-octadecenoylglycérol, un composé précédemment isolé dans le laboratoire à partir d'une algue du genre *Dictyota*. Cet acyl-glycérol a également montré une activité anti-adhésion intéressante (20 µM < CE_{50} <55 µM) (Othmani et al., 2013). Le composé **Ds2** n'a présenté aucune différence significative entre les souches 4M6 et D41 avec de bonnes activités (CE_{50} comprises entre 50 et 100 µM, respectivement). Au contraire, son activité anti-adhésion envers TC5 a été environ deux fois plus faible ($p < 0,05$). Quant au composé **Ds3**, il a montré une faible efficacité vis-à-vis des trois souches testées ($CE_{50} > 150$ µM). Concernant la molécule **Ds5**, testée précédemment contre la souche D41 (Viano et al., 2009), son activité a été évaluée à l'encontre des deux autres souches (4M6 et TC5). Ces dernières ont montré une sensibilité similaire au composé **Ds5** (CE_{50} d'environ 100 µM), activité considérée comme modérée). Ce même composé a été précédemment évalué pour son activité antifouling contre les larves du bryozoaire *Bugula neritina* (Schmitt et al., 1995). Ceci illustre la nécessité de probablement combiner plusieurs molécules pour pouvoir être efficaces face à l'ensemble des organismes colonisateurs.

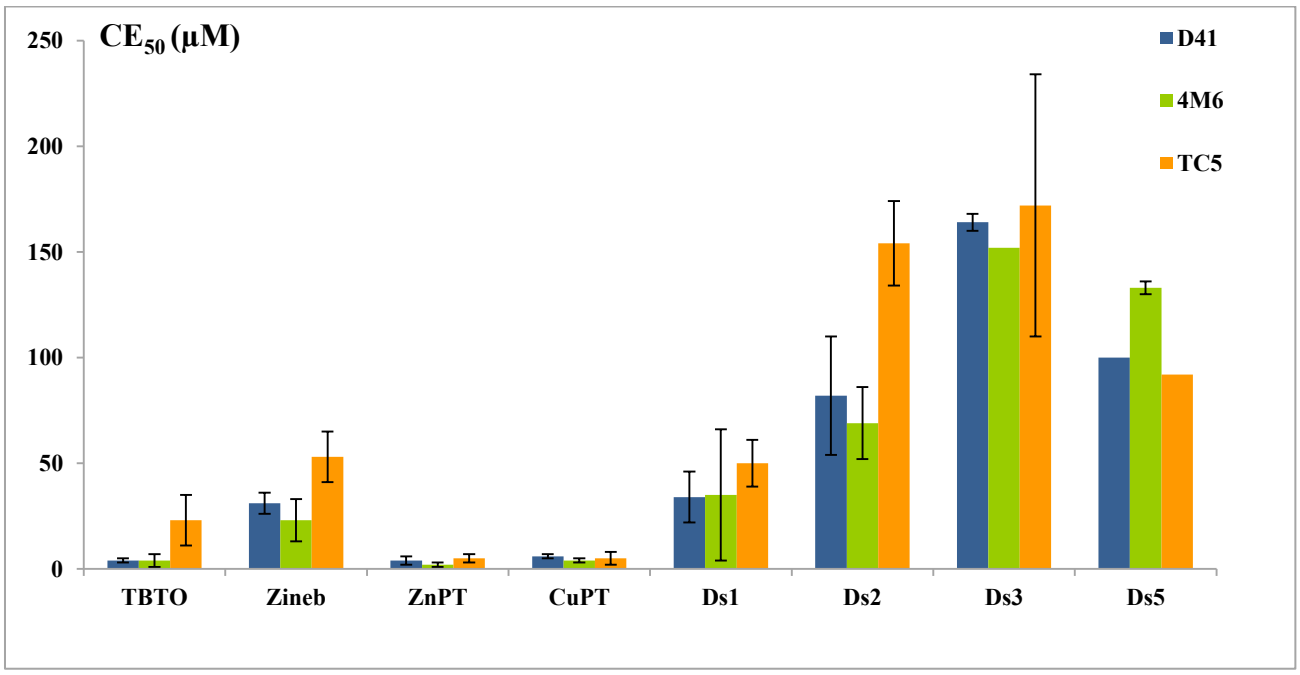


Figure 42 : Capacités en anti-adhésion (CE_{50}) des composés **Ds1**-**Ds3** et **Ds5** contre trois souches bactériennes marines (D41, 4M6 et TC5)

Le produit le plus actif (**Ds1**) provient des spécimens de *Dictyota* sp. récoltés en Algérie. En comparaison, des échantillons de *Dictyota* sp. provenant des côtes françaises méditerranéennes ont fourni le dictyol C comme le composé le plus actif, inhibant l'adhésion de la souche bactérienne D41 avec une CE_{50} de 30 µM (Viano et al., 2009). Par conséquent, les molécules efficaces dépendent non seulement des espèces d'algues, mais aussi de leur localisation géographique où le nombre et les types de colonisateurs varient en fonction des conditions écologiques de leur habitat. La libération de tels métabolites dans l'environnement par l'hôte pourrait alors être considérée comme une stratégie de défense. Une étude récente a révélé que la structure de la population en surface des algues, ainsi que la densité, des biofilms diffèrent en fonction des sites (Goecke et al., 2010). Sur les surfaces artificielles, pour lesquelles plus d'études sont disponibles, outre l'aire géographique, la qualité de l'eau peut aussi jouer un rôle dans cette distribution (Briand, 2009 ; Zargiel et al., 2011 ; Salta et al., 2013).

D'autres diterpènes issus des Dictyotacées, montrant différents types de squelettes carbonés, avaient déjà témoigné des propriétés anti-fouling. Par exemple, le pachydictyol isolé de *D. menstrualis* a montré un effet inhibiteur lors de la fixation des larves de *Bugula neritina* (Schmitt et al.,1995) tandis qu'un dolabellane issu de *D. pfaffi* inhibait celle des larves de *Perna perna* (Barbosa et al., 2007). Le dictyolactone et le sanadaol, extraits de *D. dichotoma*, ont présenté une activité algicide contre plusieurs espèces phytoplanctoniques (Kim et al., 2006).

A l'issue de ces premiers résultats obtenus via les bio-essais anti-adhésion, la toxicité des composés les plus efficaces, en particulier les quatre biocides commerciaux (TBTO, Zineb, PtZn et PtCu) mais également le sn-3-*O*-(géranylgéranyl)glycérol (**Ds1**), a été évaluée en utilisant les mêmes souches bactériennes (D41, 4M6 et TC5). Le but étant de déterminer si l'efficacité d'une molécule provient de sa toxicité ou de plutôt de sa capacité à inhiber spécifiquement l'adhésion bactérienne.

Les résultats compilés dans le tableau 12 montrent que les biocides TBTO, PtZn et PtCu sont de forts inhibiteurs de la croissance des trois bactéries (CI_{50} entre 0,5 et 10 µM), lié à une toxicité élevée (0,71 µM < CL_{50} < 6,3 µM). Les travaux de Zhou et al. (2006) ont montré que le PtZn et le PtCu sont encore plus toxiques avec des valeurs de CI_{50} inférieures à 0,5 µM vis-à-vis de *Vibrio fischeri*. En revanche, le Zineb a montré un effet inhibiteur de croissance faible (CI_{50}> 50 µM sauf contre TC5) et une toxicité moins élevée (CL_{50} > 20 µM)

que les autres biocides commerciaux. Concernant les molécules naturelles, l'inhibition de croissance et la toxicité du composé **Ds1** ont été beaucoup plus faibles contre les souches TC5 et 4M6 que celles obtenues à l'encontre de la souche D41 (CI_{50} et CL_{50} > 100 µM).

Pour évaluer l'intérêt des agents antifouling, l'indice de sélectivité (IS), parfois appelé « ratio thérapeutique » (CL_{50}/CE_{50}) a été déterminé. Généralement, un composé montrant un ratio IS supérieur à 10 est considéré comme non toxique. Néanmoins, un composé relativement toxique avec un faible IS peut toujours être pris en compte s'il se dégrade facilement dans le milieu naturel (Qian et al., 2010). En se basant sur ces notions, tous les composés testés sont toxiques puisque leurs ratios IS sont inférieurs à 3 et leurs CL_{50} sont souvent inférieures à celles de leurs CE_{50}. Toutefois, il est intéressant de noter que le composé naturel **Ds1** a montré des valeurs d'IS (> 2) largement supérieures à celles des biocides commerciaux (< 0,5).

Tableau 12 : Activité anti-adhésion (CE_{50}), inhibition de croissance (CI_{50}) et mortalité (CL_{50}) des composés **Ds1**-**Ds3** et **Ds5** et de quatre biocides standards vis-à-vis de trois souches bactériennes marines (D41, 4M6 et TC5)

Composé	D41				4M6				TC5			
	CE_{50} (µM)	CI_{50} (µM)	CL_{50} (µM)	IS	CE_{50} (µM)	CI_{50} (µM)	CL_{50} (µM)	IS	CE_{50} (µM)	CI_{50} (µM)	CL_{50} (µM)	IS
Ds1	34 ± 12 R^2 = 0,86	68 R^2 = 0,76	80 R^2 = 0,86	2,3	35 ± 31 R^2 = 0,88	137 R^2 = 0,76	97 R^2 = 0,97	2,8	50 ± 11 R^2 = 0,95	>100	>100	>2
Ds2	82 ± 28 R^2 = 0,87				69 ± 17 R^2 = 0,85				154 ± 20 R^2 = 0,76			
Ds3	164 ± 4 R^2 = 0,76				152* R^2 = 0,93				172 ± 62 R^2 = 0,78			
Ds5	100* R^2 = 0,99				133 ± 3 R^2 = 0,83				92* R^2 = 0,83			
TBTO	4 ± 1 R^2 = 0,98	2.5 R^2 = 0,90	7.8 R^2 = 0,86	1,9	4 ± 3 R^2 = 0,93	0.9 R^2 = 0,90	1,1 R^2 = 0,63	0,25	23 ± 12 R^2 = 0,92	8,4 R^2 = 0,98	6.3 R^2 = 0,96	0,3
Zineb®	31 ± 5 R^2 = 0,93	87 R^2 = 0,89	55 R^2 = 0,97	1,8	23 ± 10 R^2 =0,92	52 R^2 = 0,80	31 R^2 = 0,99	1,3	53 ± 12 R^2 = 0,93	6.6 R^2 = 0,95	23 R^2 = 0,86	0,4
PtZn	4 ± 2 R^2 = 0,84	4.5 R^2 = 0,66	1.9 R^2 = 0,99	0,5	2 ± 1 R^2 = 0,95	0.8 R^2 = 0,99	0,7 R^2 = 0,99	0,4	5 ± 2 R^2 = 0,90	0.7 R^2 = 0,94	0.7 R^2 = 0,99	0,1
PtCu	6 ± 1 R^2 = 0,88	4.1 R^2 = 0,89	2.4 R^2 = 0,99	0,4	4 ± 1 R^2 = 0,93	1.2 R^2 = 0,75	0,7 R^2 = 0,97	0,2	5 ± 3 R^2 = 0,88	0.5 R^2 = 0,96	0.4 R^2 = 0,99	0,1

CE_{50}: concentration permettant l'inhibition de l'adhésion de 50% des bactéries (Les valeurs indiquées correspondent aux moyennes d'au moins trois mesures indépendantes, quelques expérimentations n'ont été effectuées qu'une seule fois (*) en raison de quantités insuffisantes en certains des composés ; CI_{50} : concentration permettant 50% d'inhibition de croissance des bactéries ; CL_{50} : concentration létale pour 50% des bactéries; IS: indice de sélectivité ou «ratio thérapeutique" (CL_{50}/CE_{50}); R^2: coefficient d'ajustement de la courbe sigmoïde dose-réponse permettant le calcule de la CE_{50}; ND : données non déterminées

I.3. Problèmes liés à d'identification des espèces au niveau du genre *Dictyota*

Pour les échantillons d'algues provenant de Carqueiranne, nous avons rencontré un problème majeur lors de l'identification de l'espèce (ou des espèces) prélevées(s).

Initialement, nous pensions travailler sur une seule et même espèce d'algue appartenant au genre *Dictyota*. L'identification au niveau spécifique au sein de ce genre est délicate et difficile du fait de la grande similarité morphologique, notamment en ce qui concerne les espèces méditerranéennes. L'extraction a donc été effectuée sur l'ensemble des échantillons collectés en leur attribuant le nom *Dictyota* spp. Quelques spécimens ont été conservés sous forme d'un herbier au sein du laboratoire et ont par la suite été envoyés pour identification au Pr. O. de Clerck (Université de Gand, Belgique). Il s'est avéré que les échantillons que nous avions prélevés consistaient en un mélange de deux espèces *Dictyota implexa* et *Dictyota fasciola*. Pour les récoltes suivantes, la distinction entre ces deux espèces n'a pas pu être effectuée car les critères discriminants restent difficiles à identifier pour des non-spécialistes, surtout lorsque les thalles sont frais. La solution a finalement été de choisir un autre modèle d'algue *Taonia atomaria* appartenant à la même famille des Dictyotaceae mais plus aisément identifiable pour la suite des manipulations (suivi saisonnier du métabolome de surface, suivi saisonnier des communautés bactériennes de surface,…etc). Cette espèce présentait aussi l'avantage d'avoir été beaucoup moins étudiée, notamment en termes d'activité antifouling.

II. Etude de *Taonia atomaria*

II.1. Caractérisation des métabolites issus des extraits totaux

II.1.1. Obtention des métabolites

L'analyse chimique de deux échantillons de l'algue brune *Taonia atomaria* récoltée sur le site de Carqueiranne à deux périodes de l'année (mars et juin 2012) a été entreprise. Il s'agit de deux variétés morphologiquement distinctes : la première est caractérisée par des thalles en lanières larges et aplatis, de couleur brun jaune, alors que la deuxième variété présente des thalles enroulés en spirale, de couleur brune plus foncée (Figure 43). Ces deux

morphotypes ont été identifiés par O. De Clerck (Université de Gand, Belgique) comme étant *T. atomaria*.

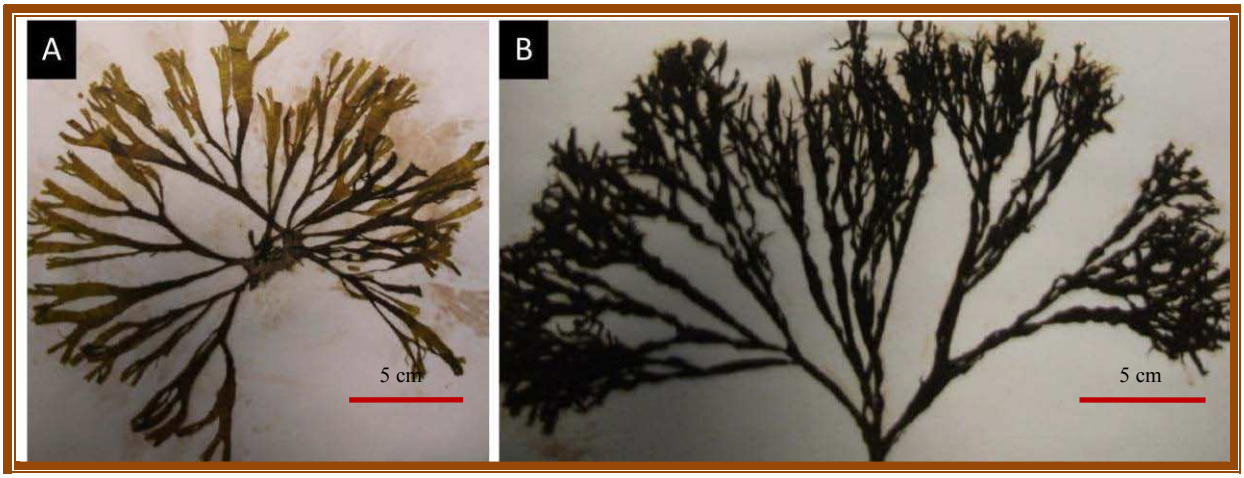


Figure 43 : Variété morphologique de *T. atomaria* collectée à Carqueiranne : thalles en lanières larges et aplatis **(A)**, thalles enroulées en spirale **(B)**

L'échantillon C représentant 25 g de la biomasse algale sèche est extrait dans un mélange CH_2Cl_2/MeOH (1:1 ; v/v). Cette étape a conduit à l'obtention d'un extrait brut huileux de couleur vert foncé d'une masse totale de 1,7 g (soit un rendement d'extraction de 6.8%). Le fractionnement par chromatographie « flash » a été effectué sur la totalité de cet extrait brut. Le gradient d'élution utilisé suit la séquence suivante : de 100% H_2O à 100% de MeOH en 25 min, puis de 100% MeOH à 100% CH_2Cl_2 en 15 min suivi d'un palier isocratique de 5 min. A l'issue de cette étape, 29 fractions ont été obtenues, parmi les-quelles trois ont été sélectionnées pour une purification ultérieure : la fraction 7 (186,0 mg) éluée avec 100% MeOH, les fractions 8 (306,6 mg) et 9 (134,6 mg) éluées avec un mélange MeOH/CH_2Cl_2 (85:15, v/v) (Figure 44). Les métabolites **Ta1** (t_R= 7,92 min; 8,4 mg) et **Ta2** (t_R= 9,18 min; 29,5 mg) ont été purifiés à partir de la fraction 7 (Figure 45), le composé **Ta3** (t_R= 17,12 min; 3 mg) de la fraction 8 (Figure 46) et **Ta4** (t_R= 29,15 min; 22,4 mg) de la fraction 9 (Figure 47).

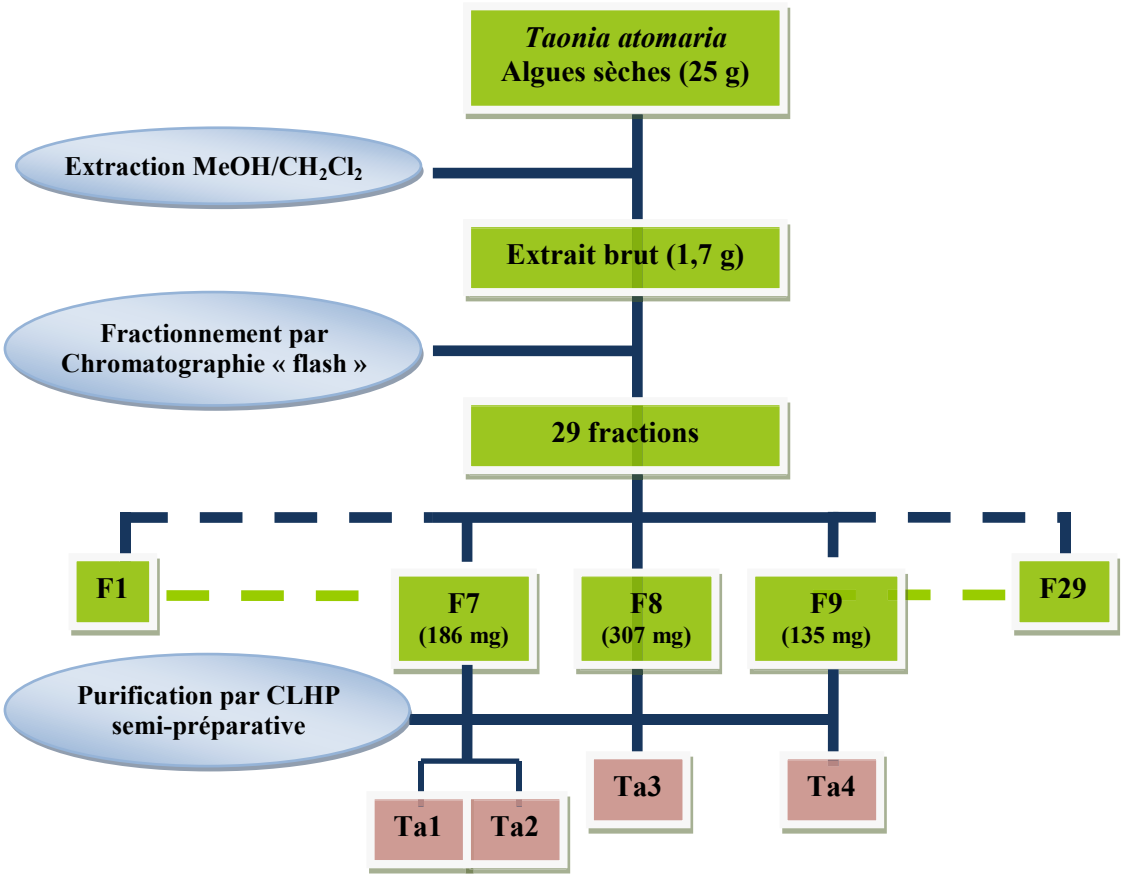


Figure 44 : Etapes d'obtention des composés purs à partir de *T. atomaria* (échantillon C)

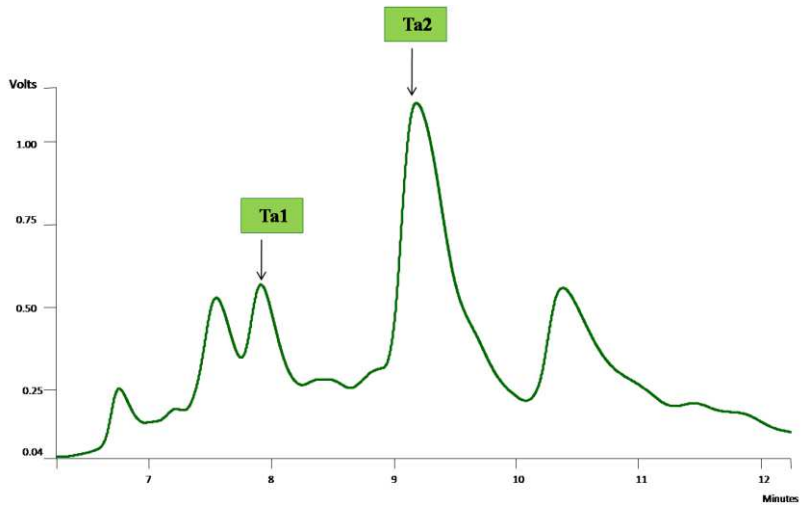


Figure 45 : Chromatogramme CLHP [colonne RP-18e ; détection réfractométrique ; éluant : 100% MeCN ; débit : 3mL/min] de la fraction 7 de *T. atomaria* (échantillon C)

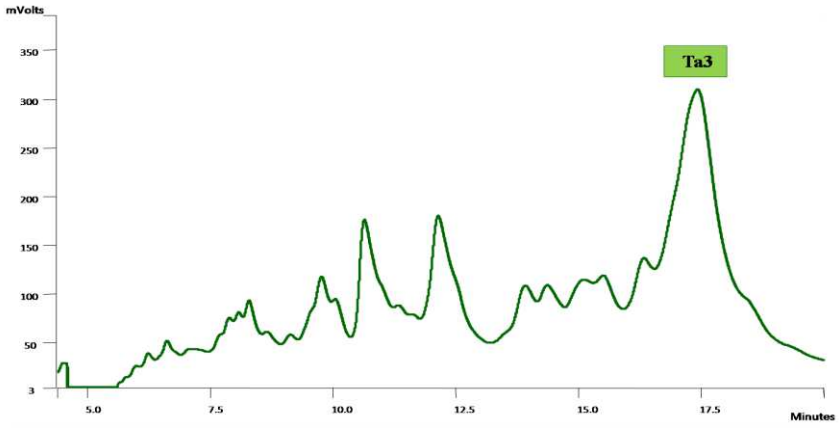


Figure 46 : Chromatogramme CLHP [colonne RP-18e ; détection réfractométrique ; éluant : 100% MeCN ; débit : 3mL/min] de la fraction 8 de *T. atomaria* (échantillon C)

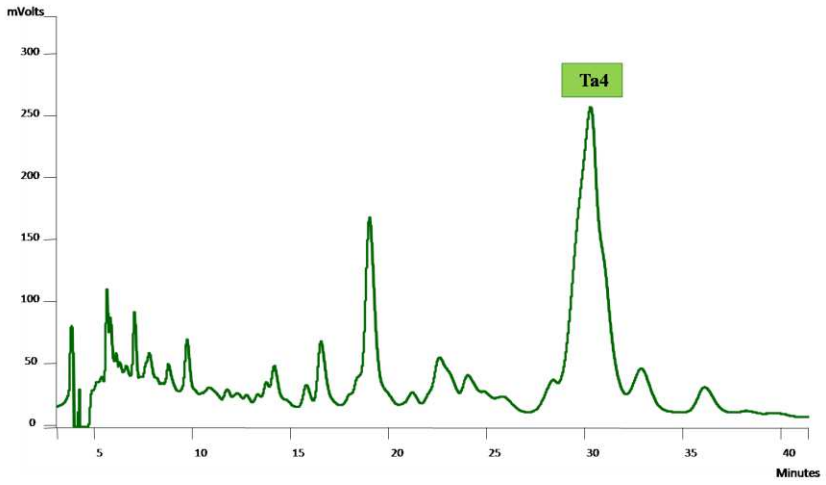


Figure 47 : Chromatogramme CLHP [colonne RP-18e ; détection réfractométrique ; éluant : 100% MeCN ; débit : 3mL/min] de la fraction 9 de *T. atomaria* (échantillon C)

Pour l'échantillon D, à partir d'une biomasse sèche de 42 g, un extrait brut total (5,9 g) a été obtenu après extraction des algues par un mélange CH_2Cl_2/MeOH (1:1, v/v). Puis, 3,2 g de cet extrait brut ont été fractionnés par chromatographie « flash » selon le même gradient utilisé précédemment pour l'échantillon C conduisant à l'obtention de 27 fractions. Les fractions 14 (256,3 mg), 15 (188,6 mg) et 16 (145,5 mg) éluées avec un mélange MeOH/CH_2Cl_2 (entre 9:1 et 8:1, v/v) ont été sélectionnées (Figure 48). Leur fractionnement par CLHP semi-préparative en phase inverse à l'aide d'acétonitrile a permis d'isoler six composés purs dont trois avaient déjà décrits à partir de l'échantillon C [**Ta1** (1,2 mg), **Ta2**

(24,4 mg) et **Ta4** (8,1 mg)], ainsi que quatre autres composés : **Ta5** (8,4 mg), **Ta6** (16,2 mg), **Ta7** (1,0 mg), **Ta8** (15,0 mg) (Figure 49-51).

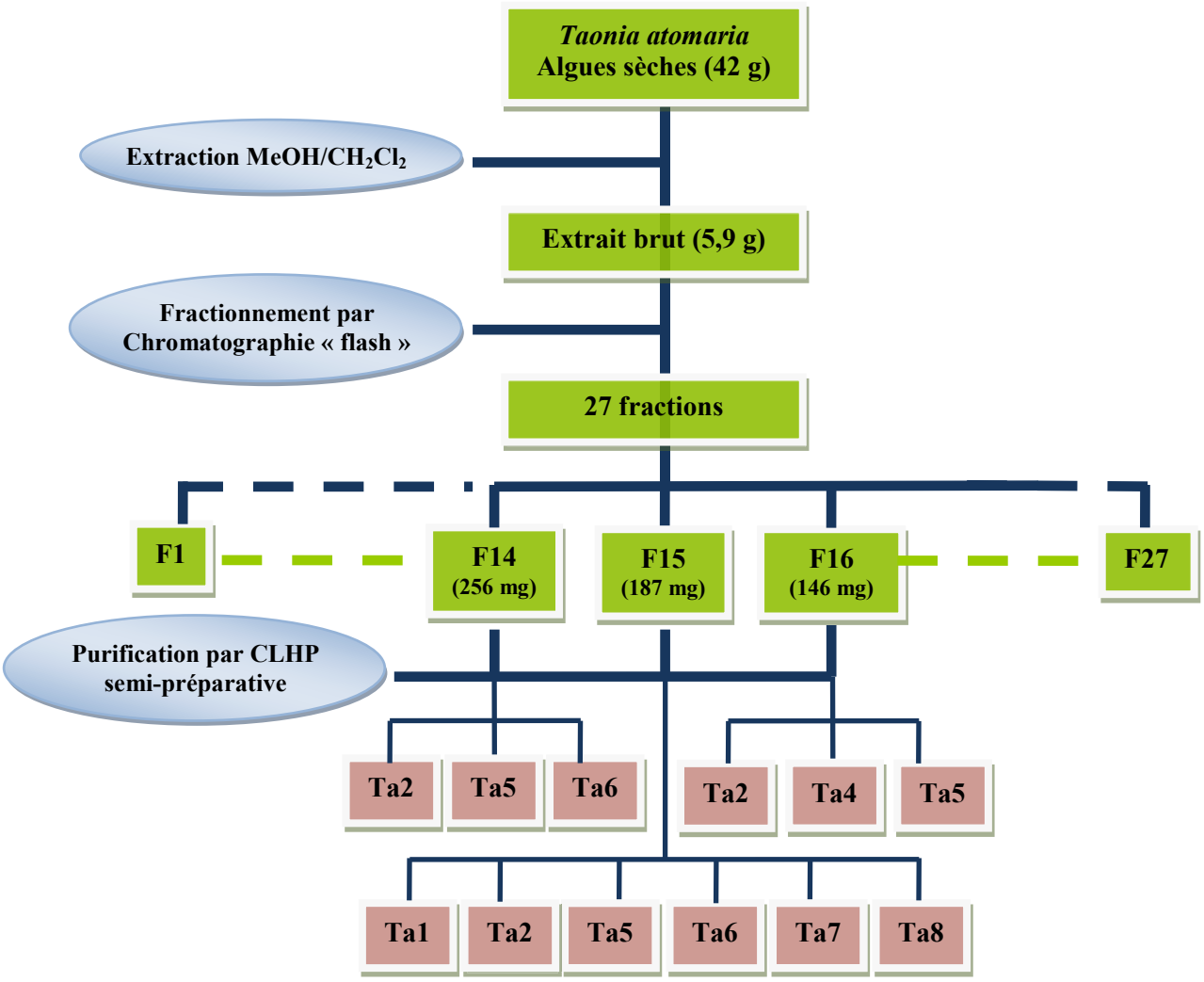


Figure 48 : Etapes d'obtention des composés purs à partir de *T. atomaria* (échantillon D)

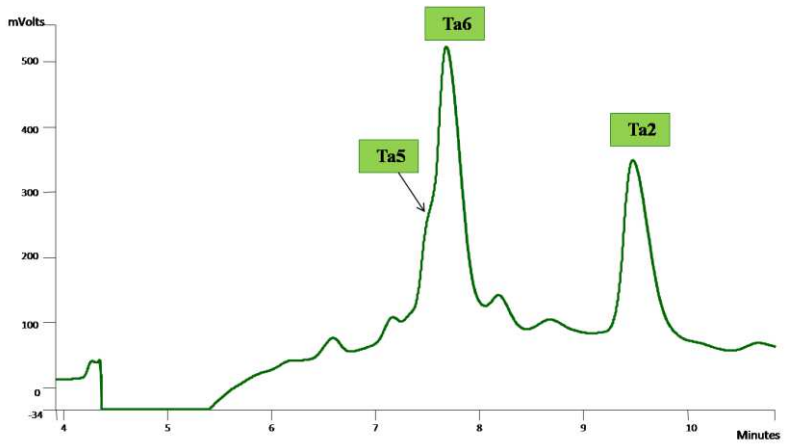


Figure 49 : Chromatogramme CLHP [colonne RP-18e ; détection réfractométrique ; éluant : 100% MeCN ; débit : 3mL/min] de la fraction 14 de *T. atomaria* (échantillon D)

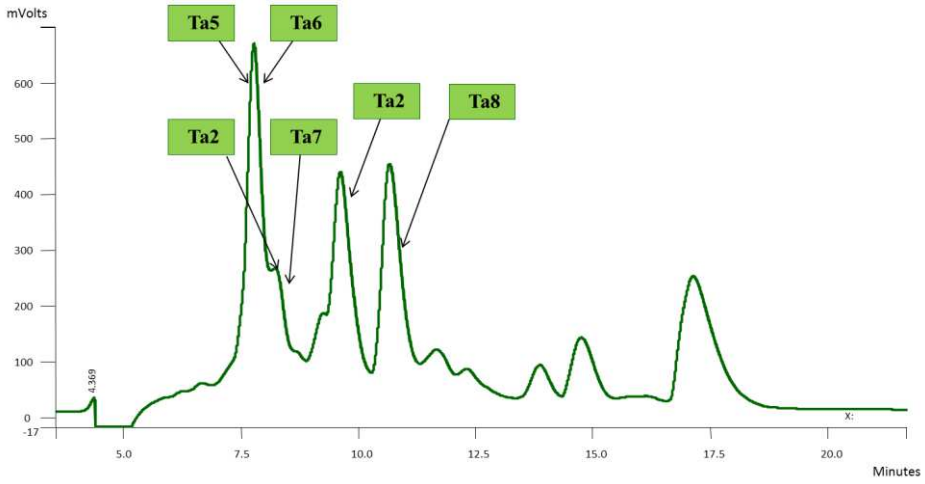


Figure 50 : Chromatogramme CLHP [colonne RP-18e ; détection réfractométrique ; éluant : 100% MeCN ; débit : 3mL/min] de la fraction 15 de *T. atomaria* (échantillon D)

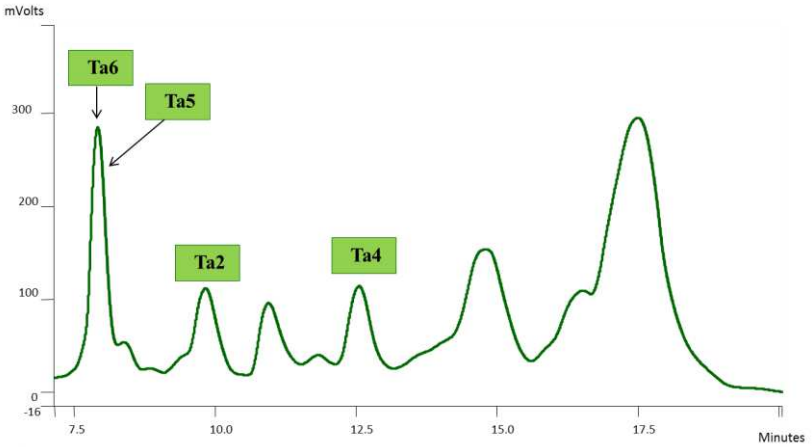


Figure 51 : Chromatogramme CLHP [colonne RP-18e ; détection réfractométrique ; éluant : 100% MeCN ; débit : 3mL/min] de la fraction 16 de *T. atomaria* (échantillon D)

II.1.2. Caractérisation structurale des métabolites

II.1.2.1. Analyse structurale du composé Ta1

Ta1 est isolé sous l'aspect d'une huile jaune pâle optiquement active ($[\alpha]_D^{25}$-104°, MeOH, *c* 5). Le spectre RMN ^{13}C de **Ta1** (Cf. Annexe 6) montre 17 signaux dont 2 sont caractéristiques d'un groupement acétate (δ_C 170,6, CH_3-COO-, C-16 ; 21,6, CH_3-COO-, CH_3-17) (Tableau 13). L'observation d'un pic de base à *m/z* 203 $[M\text{-}AcOH+H]^+$ (sur la base de la formule brute $C_{17}H_{26}O_2$, soit M = 262 g.mol^{-1}) sur le spectre de masse (ESI-MS) de **Ta1**

et de deux bandes intenses à 1736 et 1236 cm^{-1}enspectroscopie infra-rouge conforte cette hypothèse qui est également confirmée par RMN ^1H (δ_H1,97 *s*, C$\underline{H_3}$-COO-, H_3-17).

Outre ceux du groupement acétate, 15autres signaux sont observés sur le spectre RMN ^{13}C de **Ta1**. Leur multiplicité est déterminée à l'aide des expériences DEPT et HSQC permettant ainsi de mettre en évidence 2 méthyles, 6 méthylènes (dont 2 hybridés sp^2), 5 méthines (2 hybridés sp^2, 3 hybridés sp^3 dont un oxyméthine) et 2 atomes de carbone quaternaires (hybridés sp^2). Le spectre RMN ^1H de **Ta1** montre les signaux caractéristiques de deux méthyles doublets [δ_H 0,82 *d* (*J* = 7,0 Hz), H_3-12 ; 0,90 *d* (*J* = 7,0 Hz), H_3-13], de deux doubles liaisons 1,1-disubstituées (δ_H 5,36 *s*, et 5,14*s*, $H_{a,b}$-14 ; 4,93 *s*, et 4,89*s*, $H_{a,b}$-15) et d'une double liaison 1,2-disubstituée [δ_H 6,10 *d* (*J* = 16,0 Hz), H-5 ; 5,44 *dd* (*J* = 16,0 et 10,5 Hz), H-6]. Ces différents éléments sont ensuite reliés entre eux par le biais des corrélations observées sur les spectres COSY ^1H-^1H et HMBC.

Grâce à ces données, et par comparaison avec celles issues de la littérature, **Ta1** est identifié comme étant le (1*S*, 5*E*, 7*S*)1-acétoxygermacra-4(15),5,10(14)-triène (Figure 52), un sesquiterpène acétylé précédemment décrit à partir de la dictyotacée *Dilophus fasciola* (Fattorusso et al., 1978), renommée depuis *Dictyota fasciola* (Algaebase). La stéréochimie en C-1 et C-7 de ce composé est notamment attribuée sur la base de précédents travaux portant sur l'analyse de son énantiomère par dichroïsme circulaire (Nagashima et al., 1990).

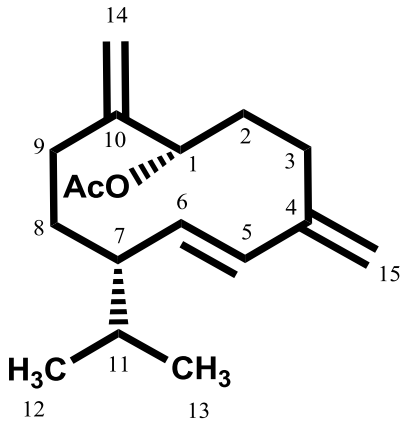


Figure 52 : Structure chimique du composé **Ta1**

Tableau 13 : Comparaison des données RMN ^{1}H et ^{13}C ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ta1** avec celles issues de la littérature

	Ta1			**Enantiomère de Ta1 [Nagashimaet al. (1990)]**		
	δ_C	DEPT	δ_H*mult.*(*J*en Hz)	δ_C	DEPT	δ_H*mult.* (*J*en Hz)
1	77,6	CH	5,05 *dd* (13,0, 4,0)	77,3	CH	5,05 *dd* (11,7, 3,9)
2	33,0	CH_2	a : 2,10 *m* b : 1,63 *m*	32,8	CH_2	a : 2,11*m* b : 1,56 - 1,73*m*
3	29,8	CH_2	a : 2,48 *m* b : 2,20 *dq* (13,5, 6,0, 3,0)	29,5	CH_2	a : 2,43 - 2,51*m* b : 2,20 *m*
4	146,1	C	-	145,9	C	-
5	129,6	CH	6,10 *d* (16,0)	129,4	CH	6,10 *d* (15,6)
6	138,4	CH	5,44 *dd* (16,0, 10,5)	138,6	CH	5,44 *dd* (15,6, 10,3)
7	52,6	CH	1,82 *m*	52,4	CH	1,82 *m*
8	36,1	CH_2	a : 2,03 *m* b : 1,60 *m*	35,9	CH_2	a : 2,04*m* b : 1,56 - 1,73*m*
9	34,5	CH_2	a : 2,48 *m* b : 1,70 *m*	34,3	CH_2	a : 2,43 - 2,51*m* b : 1,56 - 1,73*m*
10	149,3	C	-	149,1	C	-
11	32,0	CH	1,50 *t* (14,0, 7,0)	31,7	CH	1,49*m*
12	20,7	CH_3	0,82 *d* (7,0)	20,5	CH_3	0,82 *d* (6,8)
13	20,9	CH_3	0,90 *d* (7,0)	20,7	CH_3	0,90 *d* (6,8)
14	114,1	CH_2	a : 5,36 *s* b : 5,14 *s*	113,9	CH_2	a : 5,36 *s* b : 5,14 *s*
15	113,4	CH_2	a : 4,93 *s* b : 4,89 *s*	113,3	CH_2	a : 4,93 *s* b : 4,89 *s*
16	170,6	C	-	170,4	C	-
17	21,6	CH_3	1,97 *s*	21,4	CH_3	1,96*s*

II.1.2.2. Analyse structurale du composé Ta2

Cette molécule est isolée sous l'aspect d'une huile verdâtre optiquement active ($[\alpha]_D^{25}$ -22°, MeOH, *c* 10) pour laquelle un pic à *m/z* 205 $[M\text{-}H_2O+H]^+$ (M = 222 g.mol^{-1}) est observé en spectrométrie de masse (ESI-MS). L'analyse de son spectre IR montre une forte bande d'absorption à 3462 cm^{-1}indiquant la présence d'un groupement hydroxyle, ainsi que d'une bande peu intense à 1609 cm^{-1} typique d'un alcène. Sur le spectre RMN ^{13}C de **Ta2**, 15 signaux sont observés et l'analyse des spectres DEPT et HSQC conduit à leur attribution en tant que deux atomes de carbone quaternaires (1 sp^2 et 1 sp^3), cinq méthines (1 sp^2 et 4 sp^3, dont 1 oxyméthine), quatre méthylènes (tous sp^3) et quatre méthyles. Le spectre RMN^{1}H (Cf. Annexe 7) montre des signaux caractéristiques de la présence d'un proton oléfinique (δ_H 5,17 *br s*, H-1), d'un oxyméthine (δ_H 3,53 *br s*, H-6), et de quatre méthyles (δ_H 0,91 *d* (*J* = 7,0 Hz), H-12 ;δ_H 0,92 *d* (*J* = 7,0 Hz), H-13 ;δ_H 0,74 *d* (*J* = 7,0 Hz), H-14 et δ_H 1,73 *d* (*J* = 1,0 Hz), H-15). L'analyse approfondie des spectres HMBC et COSY ^{1}H-^{1}H permet, dans un premier temps, de mettre en évidence un groupement isopropyle, une double liaison trisubstituée et un alcool secondaire puis, dans un second temps, de relier ces groupements entre eux. Enfin, la comparaison de ces données avec la bibliographie permet la détermination de la structure plane de **Ta2** comme étant celle d'un sesquiterpène de type spiroaxane (Figure 53) préalablement décrit dans la littérature (Tableau 14), notamment à partir d'échantillons de *T. atomaria* récoltés au nord de la mer Adriatique (De Rosa et al. 1994), ainsi que de l'éponge *Eurypon* sp. provenant de Nouvelle-Zélande (Barrow et al., 1988). L'analyse du spectre NOESY ^{1}H-^{1}H permet de déterminer la stéréochimie relative en C-5 par le biais de la corrélation entre H-1 et H-7. La configuration relative en C-6 est obtenue grâce à la faible valeur de la constante de couplage $J_{H6,H7}$ qui, le groupement isopropyle lié en C-7 étant en position équatoriale, fixe l'hydroxyle en position axiale. Parallèlement, la configuration relative en C-10 est déterminée via le fort couplage entre H-10 et H_b-9 qui permet de positionner le groupement méthyle (CH_3-14) en position équatoriale. Enfin, la configuration absolue de **Ta2** est confirmée par comparaison avec les données spectrales du (-)-gleenol obtenu par synthèse (Blay et al., 2005 ; Nakazaki et al., 2007). Ces données récentes, montrent que **Ta2** est bien identique au composé précédemment isolé de *Taonia atomaria*, et qu'il s'agit de l'énantiomère du (+)-gleenol obtenu à partir de l'éponge *Eurypon* sp.

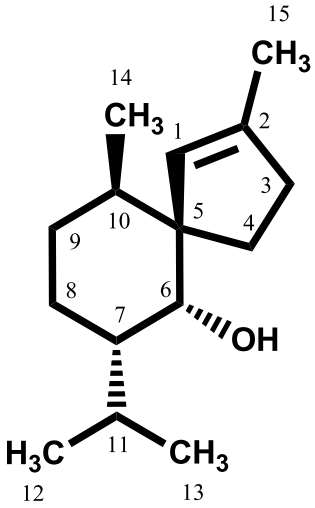


Figure 53 : Structure chimique du composé **Ta2**

Tableau 14 : Comparaison des données RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ta2** avec celles issues de la littérature

	Ta2			**Barrow et al. (1988)**		**De Rosa et al. (1994)**	
	δ_C	DEPT	δ_H*mult.* (*J*en Hz)	δ_C	δ_H*mult.*(*J*en Hz)	δ_C	δ_H*mult.*(*J*en Hz)
1	125,7	CH	5,17*br sext.* (1,5)	125,4	5,18 *ddddd* (1,5, 1,5, 1,5, 1,5, 1,5)	126,3	5,18*br s*
2	142,9	C	-	142,6	-	142,6	
3	36,5	CH_2	2,21*m*	36,3	2,21 *ddddddd* (8,0, 8,0, 1,5, 1,5, 1,5, 1,5, 1,5)	36,5	
4	34,1	CH_2	a : 1,81 *ddd* (13,5, 8,0, 5,5) b : 1,88 *ddd* (13,5, 9,5, 7,0)	31,7	a: 1,78 *ddd* (12,5, 8,0, 8,0) b: 1,88 *ddd* (12,5, 8,0, 8,0)	34,1	
5	59,0	C	-	58,8	-	59.4	
6	76,6	CH	3,53 *br d* (1,5)	76,3	3,52 *br s*	76.2	3,54*br s*
7	45,5	CH	1,14 *m*	45,3	1,15 *m*	45.8	
8	24,5	CH_2	a : 1,28 *qd* (13,0, 4,0) b : 1,65 *m*	24,4	a: 1,26 *dddd* (3,7, 12,8, 12,8, 12,8) b: 1,65 *m*	24,7	
9	31,9	CH_2	a : 1,08 *qd* (13,0, 4,0) b : 1,45 *dq* (13,0, 3,5)	33,9	a: 1,05 *dddd* (3,7, 12,8, 12,8, 12,8) b: 1,45 *m*	32,3	
10	34,2	CH	1.69 *m*	34,0	1,70 *m*	34,2	
11	29,4	CH	1,54*hept.d* (7,0, 2,5)	29,3	1,55 *m*	29,6	
12	20,9	CH_3	0,91 *d* (7,0)	21,2	0,92 *d* (6,6)	20,9	0,92d (6,5)
13	21,4	CH_3	0,92 *d* (7,0)	20,7	0,93 *d* (6,6)	21,4	0,93*d* (6,5)
14	16,4	CH_3	0,74 *d* (7,0)	16,3	0,73 *d* (6,7)	16,6	0.83 *d* (6,7)
15	17,1	CH_3	1,73*d* (1,0)	16,9	1,75 *q* (1,5)	16,9	1,62 *br s*

II.1.2.3. Analyse structurale du composé Ta3

Le composé **Ta3** est isolé sous la forme d'une huile de couleur jaune pâle. Son spectre de RMN ^{13}C (Figure 55) met en évidence 16 signaux qui sont attribués en tant que 5 méthyles, 5 méthylènes (tous sp^3), 5 méthines(4 sp^3 et 1 sp^2) et 2 atomes de carbone quaternaires (1 sp^2 et 1 sp^3 lié à un atome d'oxygène). L'analyse du spectre RMN ^1H de **Ta3** (Figure 54) montre également la présence de 5 méthyles, dont un méthoxyle (δ_H 3,20 *s*, H_3-16), ainsi que d'un proton oléfinique (δ_H 5,51 *s*, H-4).Comme dans le cas de **Ta1** et **Ta2**, le composé **Ta3** présente les signaux RMN caractéristiques d'un groupement isopropyle [δ_H 0,77 *d* (J = 7,0 Hz), H_3-12 ; 0,92 *d* (J = 7,0 Hz), H_3-13 ; 2,15 *dd* (J = 7,0 et 3,0 Hz), H-11 ; δ_C 15,3, CH_3-12 ; 21,7, CH_3-13, 26,1, CH-11] ainsi que ceux d'une triple liaison trisubstituée (δ_H 5,51 *br s*, H-5 ; δ_C 122,6, CH-5 ; 135,2, C-4) portant un méthyle (δ_H 1,67 *s*, CH_3-15). La structure plane de **Ta3** est ensuite déterminée par l'intermédiaire des différentes corrélations observées sur les spectres COSY ^1H-^1H et HMBC comme le montre la Figure 56. L'ensemble de ces données (Tableau 15) ainsi que leur confrontation avec celles issues de la littérature conduisent à la détermination de la structure chimique de **Ta3** comme présentée figure 24 (Dupré et al., 1991). Plus précisément, la forte valeur de la constante de couplage entre H-1 et H-6 implique une jonction *trans* des cycles : ce qui est en accord avec un squelette carboné de type cadinane plutôt que muurolane (Figure 57). Néanmoins, la dégradation de ce composé préalablement à l'obtention de son pouvoir rotatoire nous empêche de conclure quant à la stéréochimie de **Ta3** en C-10 : une valeur négative impliquerait une orientation β du méthoxyle (**Ta3** serait dans ce cas l'éther méthylique de l'α-cadinol) tandis qu'une valeur positive serait en accord avec une orientation α de ce même groupement (**Ta3** correspondrait alors à l'éther méthylique du τ-cadinol) (Borg-Karlson et al., 1981). Dans tous les cas, **Ta3** ne correspond pas à une molécule nouvelle.

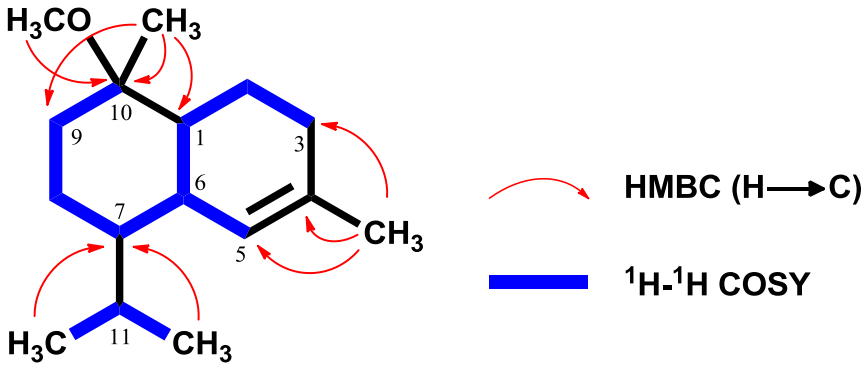


Figure 56 : Principales corrélations observées en RMN 2D (HMBC et COSY ^{1}H-^{1}H) pour le composé **Ta3**

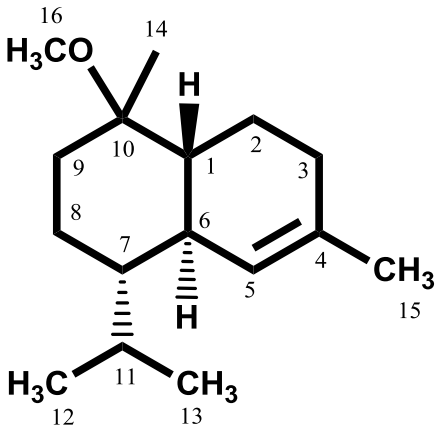


Figure 57 : Structure chimique du composé **Ta3**

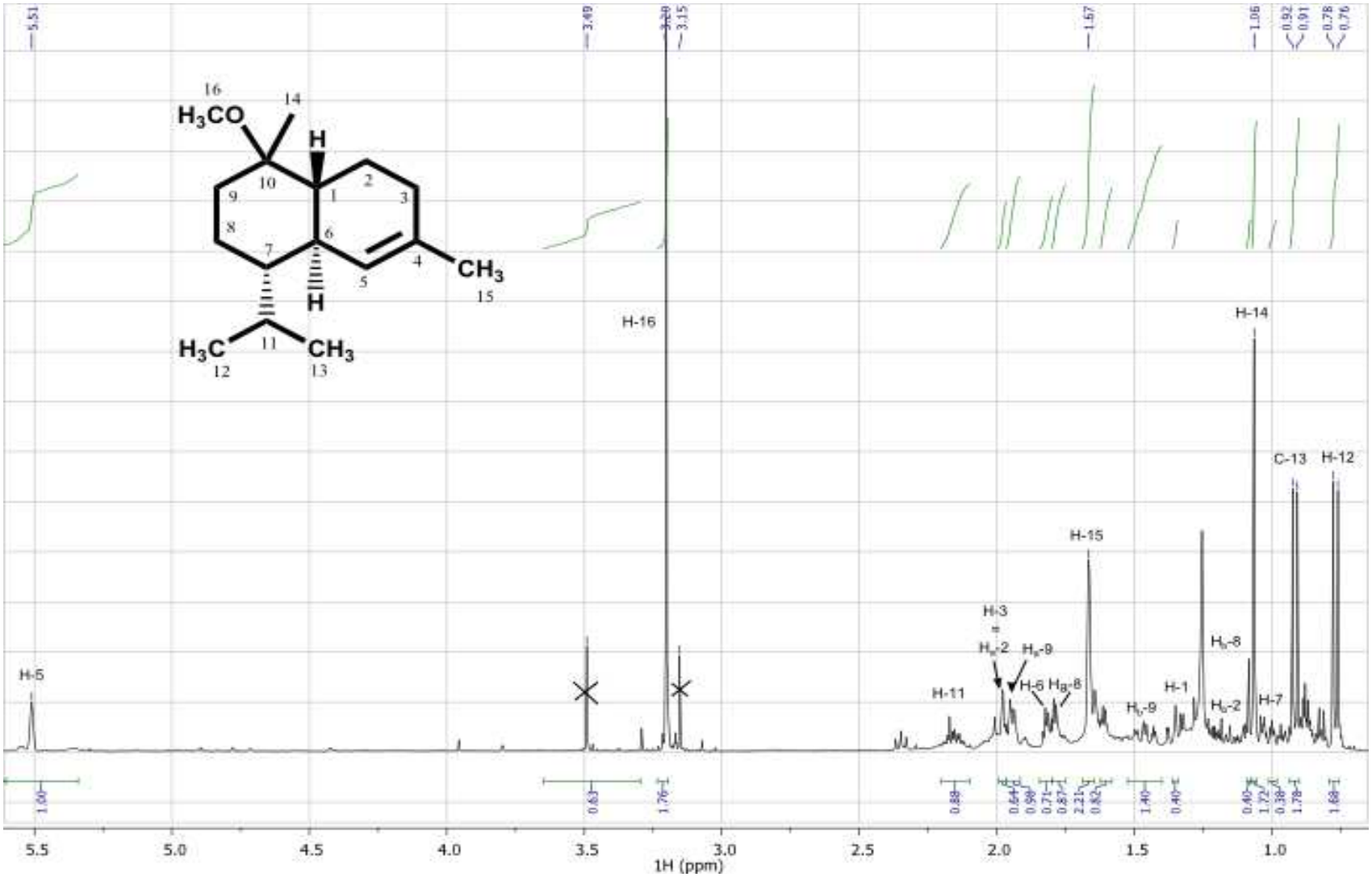


Figure 54 : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ta3** ($CDCl_3$, 400MHz)

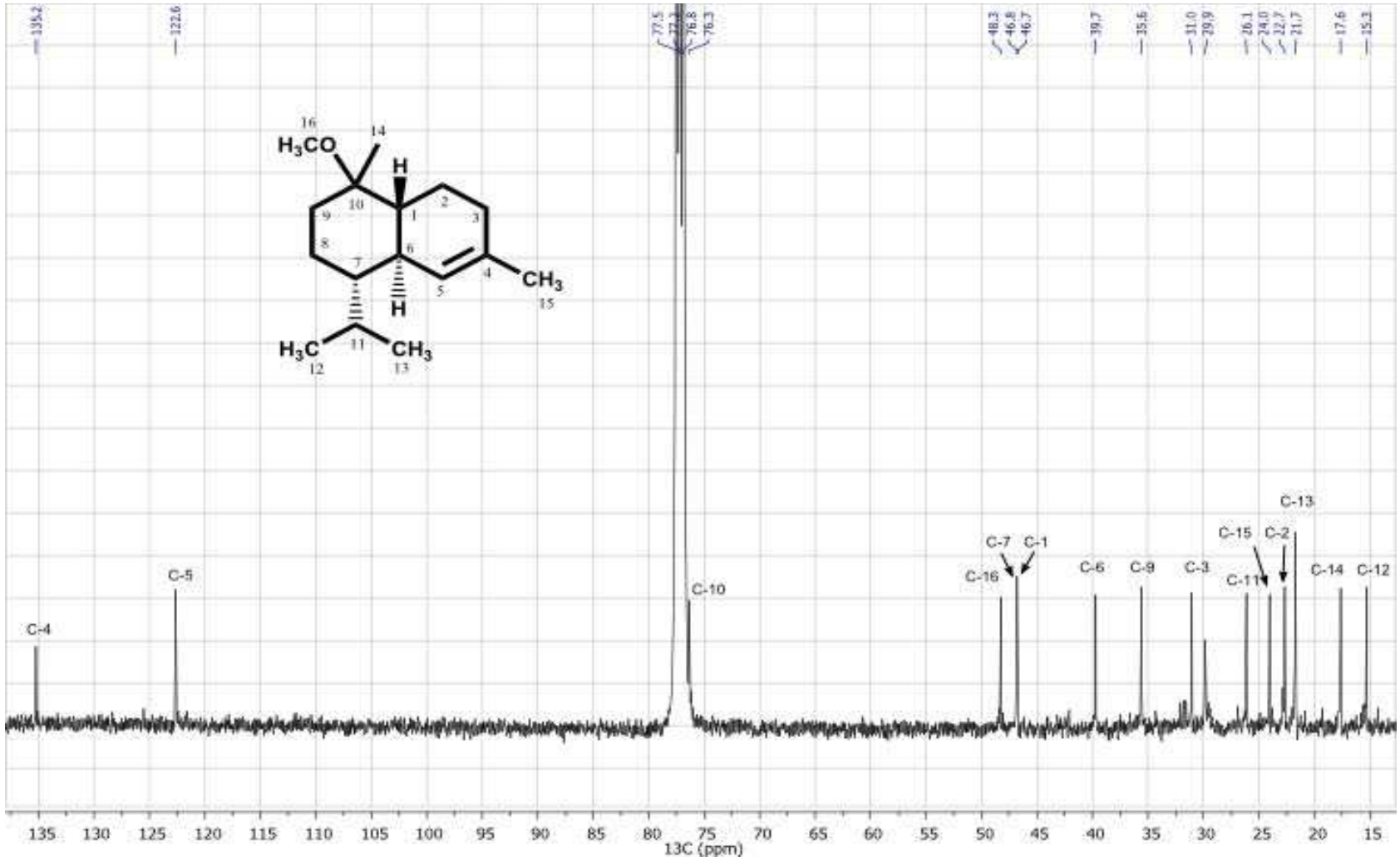


Figure 55 : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ta3** ($CDCl_3$, 100MHz)

Tableau 15 : Données RMN 1D et 2D ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ta3**

	δ_C	DEPT	δ_H *mult.* (*J* en Hz)	HMBC	COSY ^1H-^1H	NOESY ^1H-^1H
1	46,7	CH	1,35 *ddd* (12,0, 10,5, 1,5)	C-3, C-6, C-9, C-10, C-14	H_b-2, H-6	H_a-2, H_2-3
2	22,7	CH_2	a : 1,95 *m* b : 1,17 *m*	a : C-1, C-3, C-4, C-6 b : C-3, C-6, C-10	a : H_b-2 b : H-1, H_a-2, H_2-3	a : H-1, H_b-2 b : H_a-2, H_2-3
3	31,0	CH_2	1,95*m*	C-1, C-2, C-4, C-5	H_b-2, H-5	H-1, H_b-2
4	135,2	C	-	-	-	-
5	122,6	CH	5,51*brs*	C-1, C-3, C-6, C-7, C-15	H_2-3, H-6, H_3-15	H-6, H-11, H_3-12, H_3-15
6	39,7	CH	1,77 *m*	C-1, C-7, C-8	H-1, H-5, H-7	H-5, H_b-8
7	46,8	CH	0,99 *m*	C-8	H-6, H_a-8	H_a-8
8	39,7	CH_2	a : 1,62 *m* b : 1,09 *m*	a : C-6, C-7, C-9, C-10 b : C-11	a : H-7, H_b-8, $H_{a,b}$-9 b : H_a-8, $H_{a,b}$-9	a : H-7, H_b-8 b : H-6, H_a-8
9	35,6	CH_2	a : 1,80 *m* b : 1,45 *td* (12,5, 4,0)	a : C-1, C-7, C-8, C-10, C-14 b : C-1, C-7, C-8, C-10, C-14	a : $H_{a,b}$-8, H_b-9 b : $H_{a,b}$-8, H_a-9	a : H_b-9, H_3-16 b : H_a-9
10	76,3	C	-	-	-	-
11	26,1	CH	2,15*hept. d* (7,0, 3,0)	C-8, C-12, C-13	H_3-12, H_3-13	H-5
12	15,3	CH_3	0,77 *d* (7,0)	C-7, C-11, C-13	H-11	H-5
13	21,7	CH_3	0,92 *d* (7,0)	C-7, C-11, C-12	H-11	
14	17,6	CH_3	1,06 *s*	C-1, C-9, C-10		
15	24,0	CH_3	1,67*s*	C-3, C-4, C-5	H-5	H-6
16	48,3	CH_3	3,20*s*	C-10		H_a-9

II.1.2.4. Analyse structurale du composé Ta4

Le composé **Ta4** est isolé sous l'aspect d'une huile de couleur jaune pâle optiquement active ($[\alpha]_D^{25}$ +8°, MeOH, *c* 10) et présente un pic à *m/z* 203 $[M+H]^+$ (sur la base de la formule brute $C_{15}H_{22}$, soit M = 202 g.mol^{-1}) sur son spectre de masse (ESI-MS). L'analyse de son spectre RMN ^{13}C permet de dénombrer 15 atomes de carbone dont la détermination de la multiplicité conduit à 4 méthyles, 2 méthylènes (tous sp^3), 6 méthines (3 sp^3 et 3 sp^2) et 3 atomes de carbone quaternaires (tous sp^2). Sur le spectre RMN ^1H de **Ta4**, des signaux caractéristiques sont observés ; ils correspondent à ceux de 3 protons aromatiques [δ_H 6,95 *brd* (*J* = 8,0 Hz) H-2 ; 7,02 *s*, H-4 et 7,12 *brd* (*J* = 8,0 Hz), H-1] et de 4 méthyles [δ_H 0,71 *d* (*J* = 7,0 Hz) H_3-12 ; 1,00 *d* (*J* = 7,0 Hz) H_3-13 ; 1,26 *d* (*J* = 7,0 Hz) H_3-14 et 2,30 *s*, H_3-15]. Les corrélations observées par RMN 2D (HMBC et COSY ^1H-^1H) permettent de confirmer la présence d'un groupement isopropyle et d'un cycle aromatique trisubstitué, tout en liant ces différentes parties pour conduire à la structure plane proposée pour **Ta4** (Figure 58). En ce qui concerne les configurations absolues en C-7 et C-10, la comparaison des données RMN de **Ta4** avec celles issues de la littérature montre qu'elles sont parfaitement identiques à celles du (-)-*trans*-calaménène obtenu par synthèse (Nakashima et al., 2002) (Tableau 16). Du fait de la valeur de son pouvoir rotatoire, **Ta4** est finalement identifié comme étant le (+)-*trans*-calaménène. Ce composé a été décrit précédemment à partir de plusieurs plantes terrestres mais également à partir de coraux tels que *Sarcophyton glaucum* (Feller et al., 2004) et *Nephthea erecta* (Cheng et al., 2009).

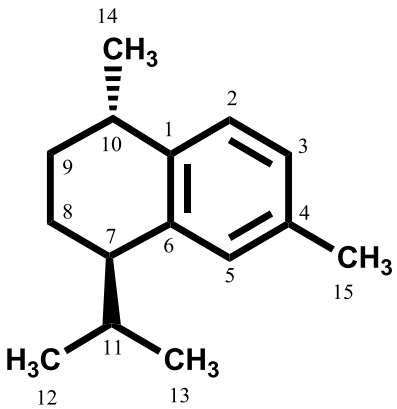


Figure 58 : Structure chimique du composé **Ta4**

Tableau 16 : Comparaison des données RMN ^{1}H et ^{13}C ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ta4** avec celles issues de la littérature

	Ta4			**Enantiomère de Ta4, (Nakashima et al., 2002)**		
	δ_C	DEPT	δ_H*mult.*(*J*en Hz)	δ_C	DEPT	δ_H*mult.*(*J*en Hz)
1	140,2	C	-	140,1	C	-
2	126,9	CH	7,12 *d* (8,0)	126,8	CH	7,12*d* (8,0)
3	126,3	CH	6,95 *brd* (8,0)	126,2	CH	6,94*brd* (8,0)
4	134,6	C	-	134,5	C	-
5	128,9	CH	7,02 *br s*	128,8	CH	7,02*brs*
6	140,1	C	-	140,0	C	-
7	43,9	CH	2,69 *br q* (6,5)	43,8	CH	2,70*m*
8	21,6	CH_2	a : 1,60 *m* b : 1,83 *m*	21,5	CH_2	a: 1,60*m* b: 1,81*m*
9	31,0	CH_2	a : 1,34 *m* b : 1,95 *m*	30,8	CH_2	a: 1,39 *m* b: 1,95 *m*
10	32,6	CH	2,76 *sext* (7,0)	32,5	CH	ND
11	32,0	CH	2,24 *oct.* (7,0)	31,9	CH	2,22*m*
12	17,5	CH_3	0,71 *d* (7,0)	17,3	CH_3	0,72 *d* (7,2)
13	21,4	CH_3	1,00 *d* (7,0)	21,1	CH_3	1,00*d* (7,2)
14	22,5	CH_3	1,26 *d* (7,0)	22,3	CH_3	1,26 *d*(7,2)
15	21,3	CH_3	2,30 *s*	21,3	CH_3	2,30 *s*

ND : non déterminé

II.1.2.5. Analyse structurale du composé Ta5

Le composé **Ta5** est obtenu, après purification, sous forme d'une huile vert clair optiquement active ($[\alpha]_D^{25}$-134, MeOH, *c* 10). Un pic à *m/z* 203 $[M-H_2O+H]^+$ est observé sur son spectre ESI-MS tandis que l'analyse du spectre IR de **Ta5** montre des bandes d'absorption caractéristiques d'un groupement hydroxyle (3357 cm^{-1}) et de doubles liaisons conjuguées et non conjuguées (1606 et 1645 cm^{-1}). Le spectre RMN ^{13}C (Figure 60) révèle que ce composé renferme 15 atomes de carbone dont 2carbones quaternaires (sp^2), 5 méthines (deux sp^2 et trois sp^3, dontun oxyméthine), 6méthylènes (deux sp^2 et quatre sp^3) et 2 méthyles. Le spectre RMN ^1H de **Ta5** (Figure 59) montre la présence de six protons oléfiniques [δ_H 6,00,*d* (*J* = 16,0 Hz), H-5 ; 5,43 *dd* (*J* = 16,0 ; 10,5 Hz), H-6; 5,27 *s* et 5,00 *s*, $H_{a,b}$-14; 4,92 *s* et 4,84 *s*, $H_{a,b}$-15], d'un proton d'un oxyméthine [δ_H 3,77 *dd* (*J* = 12,0 et 4,0 Hz], H-9) et deux méthyles doublets [δ_H 0,82*d* (*J* = 6,5 Hz), H_3-12, 0,90 *d* (*J* = 6,5 Hz), H_3-13). La forte valeur de la constante découplage $J_{H-5,H-6}$ (16,0 Hz) indique une double liaison 1,2-disubstituée de configuration *E*, tandis que les autres signaux de RMN sont caractéristiques de deux doubles liaisons 1,1-disubstituées. En outre, les corrélations observées sur le spectre COSY ^1H-^1H entre les deux méthyles H_3-12 et H_3-13 et le proton H-11 sont typiques de la présence d'un groupement isopropyle (Figure 61). Ces données sont complétées par l'ensemble des corrélations visibles sur les spectres COSY ^1H-^1H et HMBC (Cf. Annexe 10, Tableau 17) : ceci permet de lier entre eux les différents groupements préalablement décrits et d'identifier **Ta5** comme étant le germacra-4(15),5,10(14)-trién-9-ol (Figure 62). Ce produit dont la stéréochimie en C-7 et C-9 reste à attribuer n'avait encore jamais été décrit précédemment.

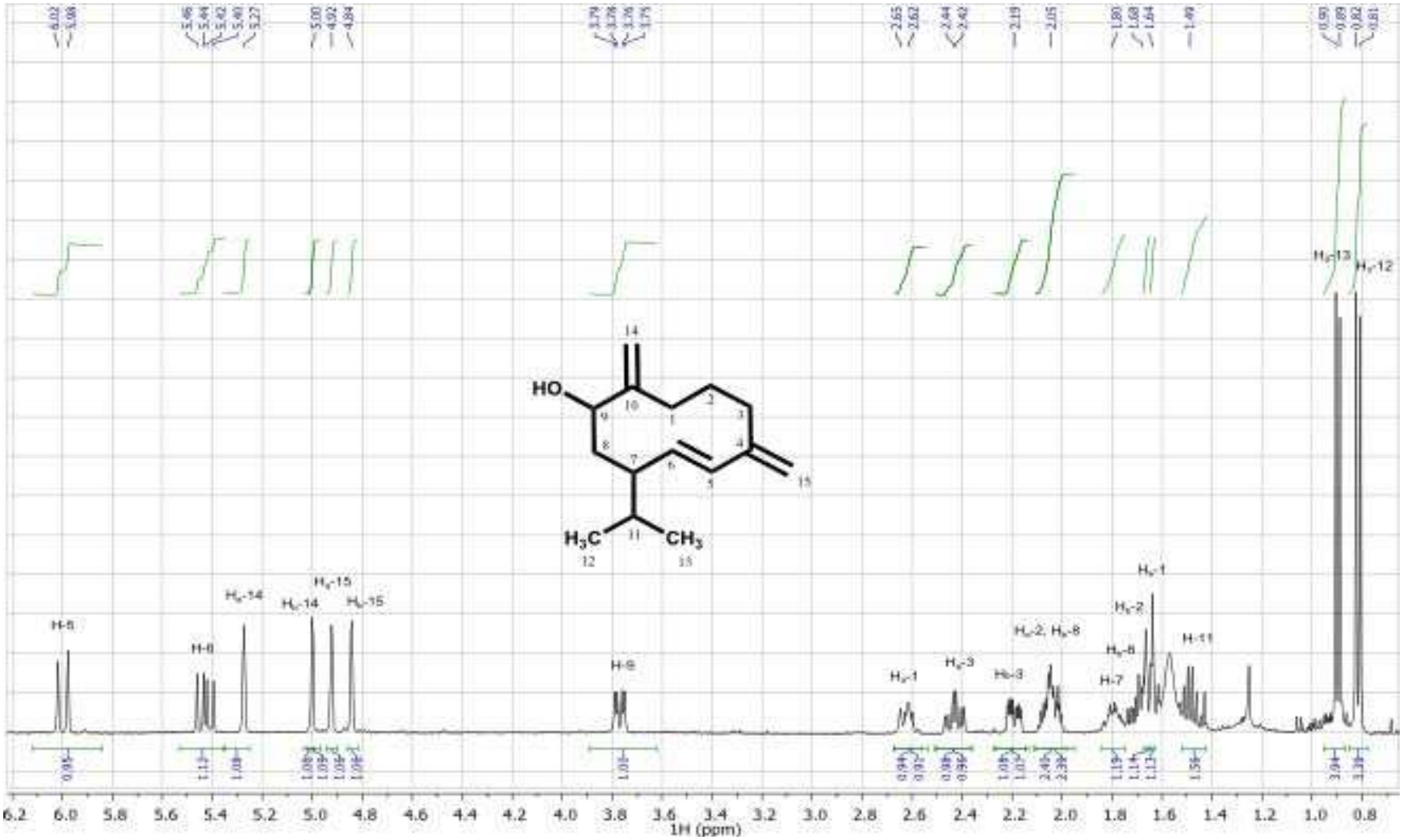


Figure 59 : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ta5** ($CDCl_3$, 400MHz)

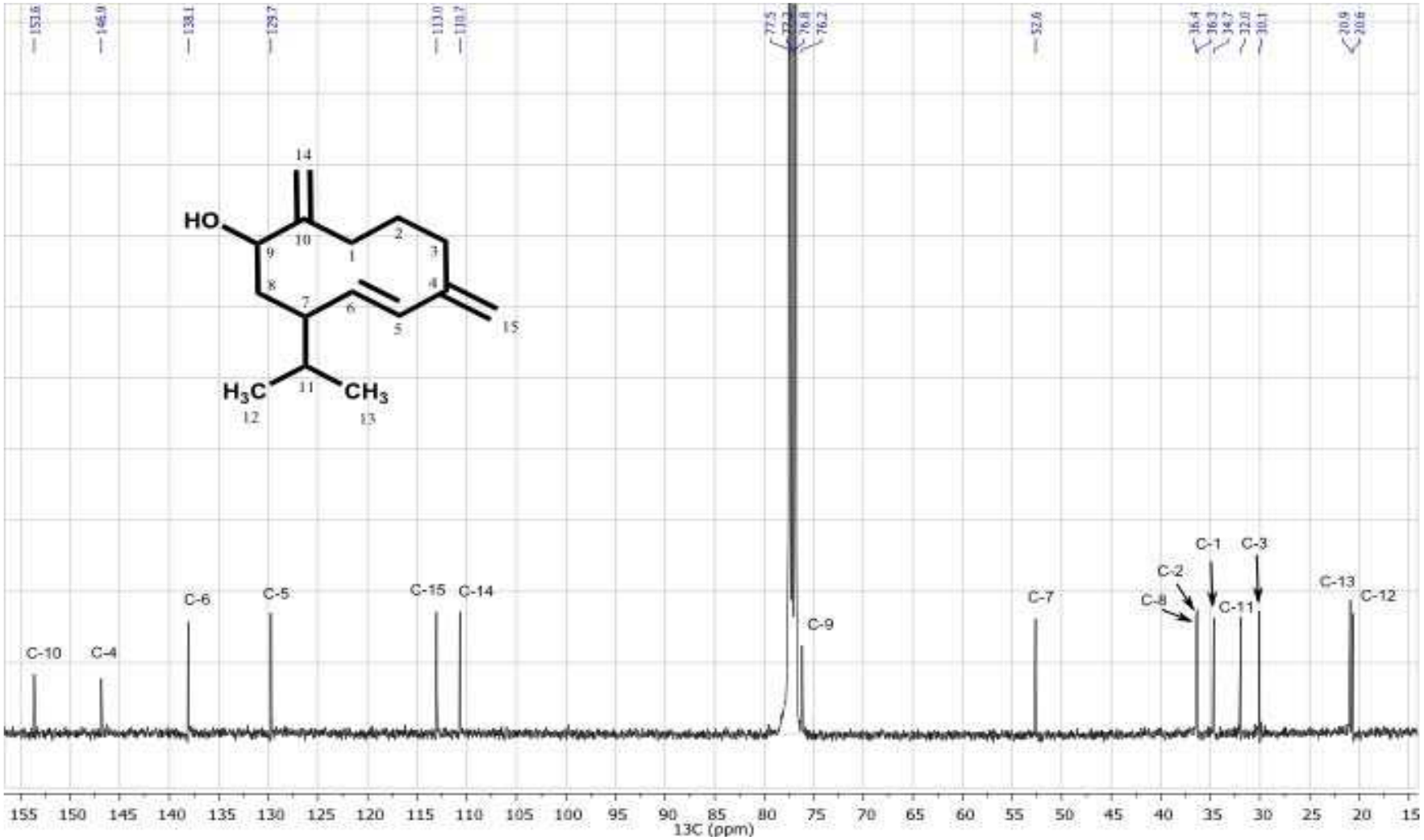


Figure 60 : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ta5** ($CDCl_3$, 100MHz)

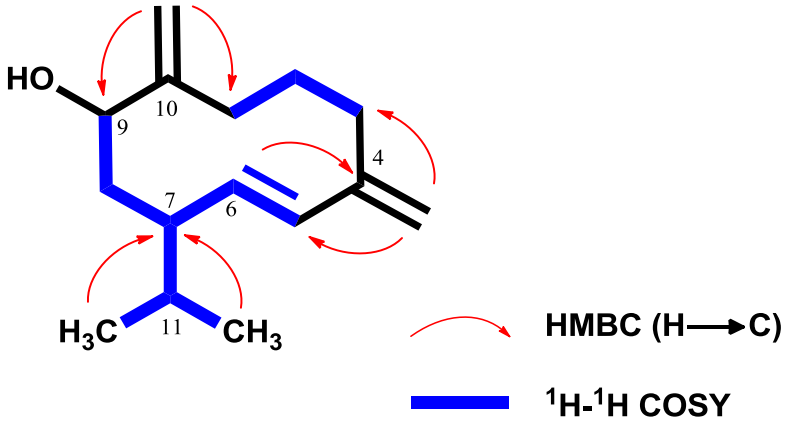


Figure 61 : Principales corrélations observées en RMN 2D (HMBC et COSY ^{1}H-^{1}H) pour le composé **Ta5**

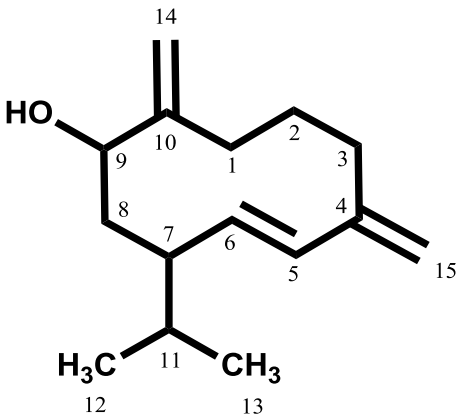


Figure 62 : Structure chimique de **Ta5**

Tableau 17 : Données RMN 1D et 2D ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ta5**

	δ_C	DEPT	δ_H*mult.*(*J* en Hz)	HMBC	COSY ^1H-^1H	NOESY ^1H-^1H
1	34,7	CH_2	a: 1,64 *m* b: 2,62*m*	a: C-10, C14 b: C-10	a: H_b-1 b: H_a-1, $H_{a,b}$-2, $H_{a,b}$-14	a: H_b-1, H-9, H_a-14 b: H_a-1, $H_{a,b}$-2, H_a-14
2	36,3	CH_2	a: 1,65 *m* b: 2,05 *m*	a: C-3, C10 b: C-10	a: $H_{a,b}$-3, H-1, H_b-2 b: $H_{a,b}$-3, H-1, H_a-2	a: H_b-2,H_a-3, H_b-1 b: H_a-2, H_b-1
3	30,1	CH_2	a: 2,19 *ddd*(13,0, 5,5, 3,0) b: 2,43*td* (13,0, 5,0)	a: C-5 b: C-2, C-15, C-5, C-4	a: H_b-3, $H_{a,b}$-2 b: H_a-3, $H_{a,b}$-2	a: H_b-3, H_b-15 b: H_a-3, H-6
4	146,9	C	-	-	-	-
5	129,7	CH	6.00 *d* (16,0)	C-3, C-4, C-7, C-15	H-6	H-7
6	138,1	CH	5.43 *dd* (16,0, 10,5)	C-4, C-7	H-5, H-7, $H_{a,b}$-15	H_b-3
7	52,6	CH	1,80 *m*	n.o.	H-6, $H_{a,b}$-8, H-11	H-5, H-11, H_3-12
8	36,4	CH_2	a: 1,68 *m* b: 2,05 *m*	a: C-9, C10 b: C-6, C-10	a: H-7, H_b-8, H-9 b: H-7, H_a-8, H-9	a: H_b-8, H-9 b: H_a-8, H-9, H_b-14, H_3-12
9	76,2	CH	3,77 *dd* (12,0, 4,0)	C-10, C-14	$H_{a,b}$-8, H_a-14	H_a-1, $H_{a,b}$-8
10	153,6	C	-	-	-	-
11	32,0	CH	1,49 *oct* (6.5)	C-6, C-7, C-8, C-12, C13	H_3-12, H_3-13, H-7	H-7, H_3-12, H_3-13
12	20,6	CH_3	0,82 *d* (6,5)	C-7, C-11, C-13	H-11, H_3-13	H-7, $H_{a,b}$-8, H-11
13	20,9	CH_3	0,90 *d* (6,5)	C-7, C-11, C-12	H-11, H_3-12	H-11
14	110,7	CH_2	a: 5,00 *s* b: 5,27 *s*	a: C-1, C-9, C-10 b: C-1, C-9	a: H_b-1, H-9 b: H_b-1	a: $H_{a,b}$-1 b: H_b-8
15	113,1	CH_2	a: 4,84 *s* b: 4,92 *s*	a: C-3, C-5 b: C-3, C-5	a: H-6 b: H-6	a: n.o b: H_a-3

n.o : non observé

II.1.2.6. Analyse structurale du composé Ta6

Après purification, le composé **Ta6** est obtenu sous la forme d'une huile optiquement active ($[\alpha]_D^{25}$-59°, MeOH, *c* 5) de couleur orange. Plusieurs pics intenses sont observés à *m/z* 259 $[M + Na]^+$, 237 $[M + H]^+$, 219 $[M - H_2O + H]^+$, 203 $[M - 2\ H_2O + H^+]^+$ sur son spectre de masse (en accord avec la formule brute $C_{15}H_{24}O_2$, soit M = 236 g.mol^{-1}). La distribution des atomes d'hydrogène de **Ta6** sur les 15 atomes de carbone observés par RMN ^{13}C (Figure 64) est déterminée par les spectres DEPT et HSQC : il ressort que ce composé est constitué de 3 carbones quaternaires (1 sp^2 et 2 sp^3), 4 méthines (1 sp^2 et 3 sp^3), 4méthylènes (tous sp^3) et 4 méthyles. Le spectre RMN ^1H du composé **Ta6** (Figure 63) montre les signaux caractéristiques d'une double liaison trisubstituée [δ_H 6,09 *d* (*J* = 2,0 Hz), H-5] et de quatre méthyles [δ_H 0,82 *d* (*J* = 7,0 Hz), H_3-12 ; 0,89*d* (*J* = 7,0 Hz), H_3-13 ; 1,03*d* (*J* = 7,0 Hz), H_3-14 ; 1,36*s*, H_3-15]. Les données de RMN 2D, en particulier les corrélations HMBC et les expériences COSY ^1H-^1H, permettent la construction de la molécule comme décrit sur la Figure 65. Aucune bande caractéristique de groupements hydroxyle et carbonyle n'apparaissant sur le spectre IR de **Ta6**, la seule possibilité permettant de positionner les atomes d'oxygène est la présence d'un groupement peroxyde entre C-1 et C-4. Cette hypothèse est confirmée par la comparaison des données de RMN de **Ta6** (Tableau 18) avec celles issues de la littérature. Il s'avère que ces données sont parfaitement identiques à celles d'un sesquiterpène précédemment isolé à partir du corail mou *Sarcophyton erhenbergi* (Shaker et al., 2010) et d'une plante terrestre (Nagashima & Asakawa, 2001). Néanmoins, la valeur du pouvoir rotatoire de **Ta6** étant opposée à celle de ce composé, il s'agit donc de son énantiomère (Figure 66). Ce produit est donc nouveau, la stéréochimie en C-1 et C-4 restant néanmoins à déterminer.

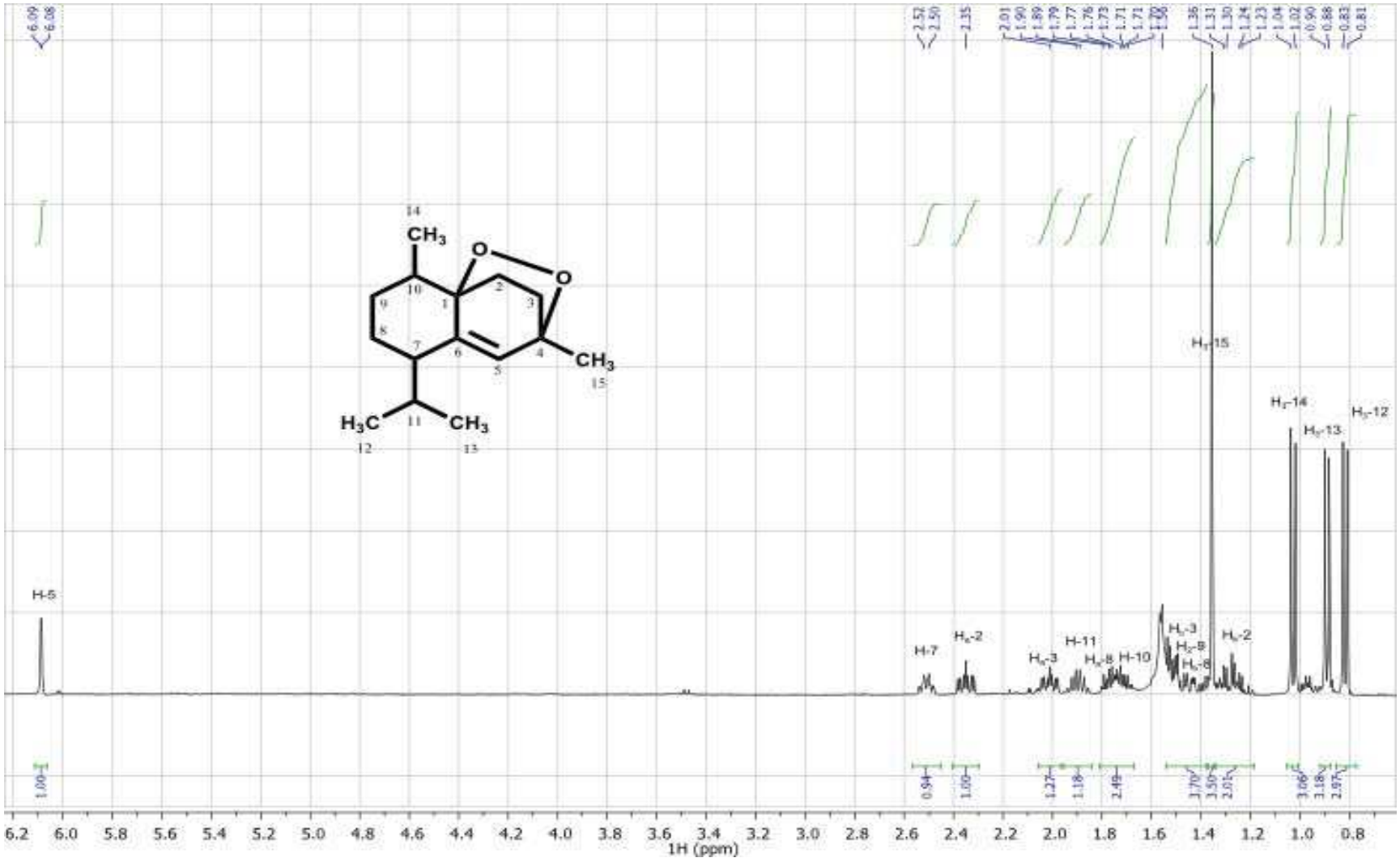


Figure 63 : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ta6** ($CDCl_3$, 400MHz)

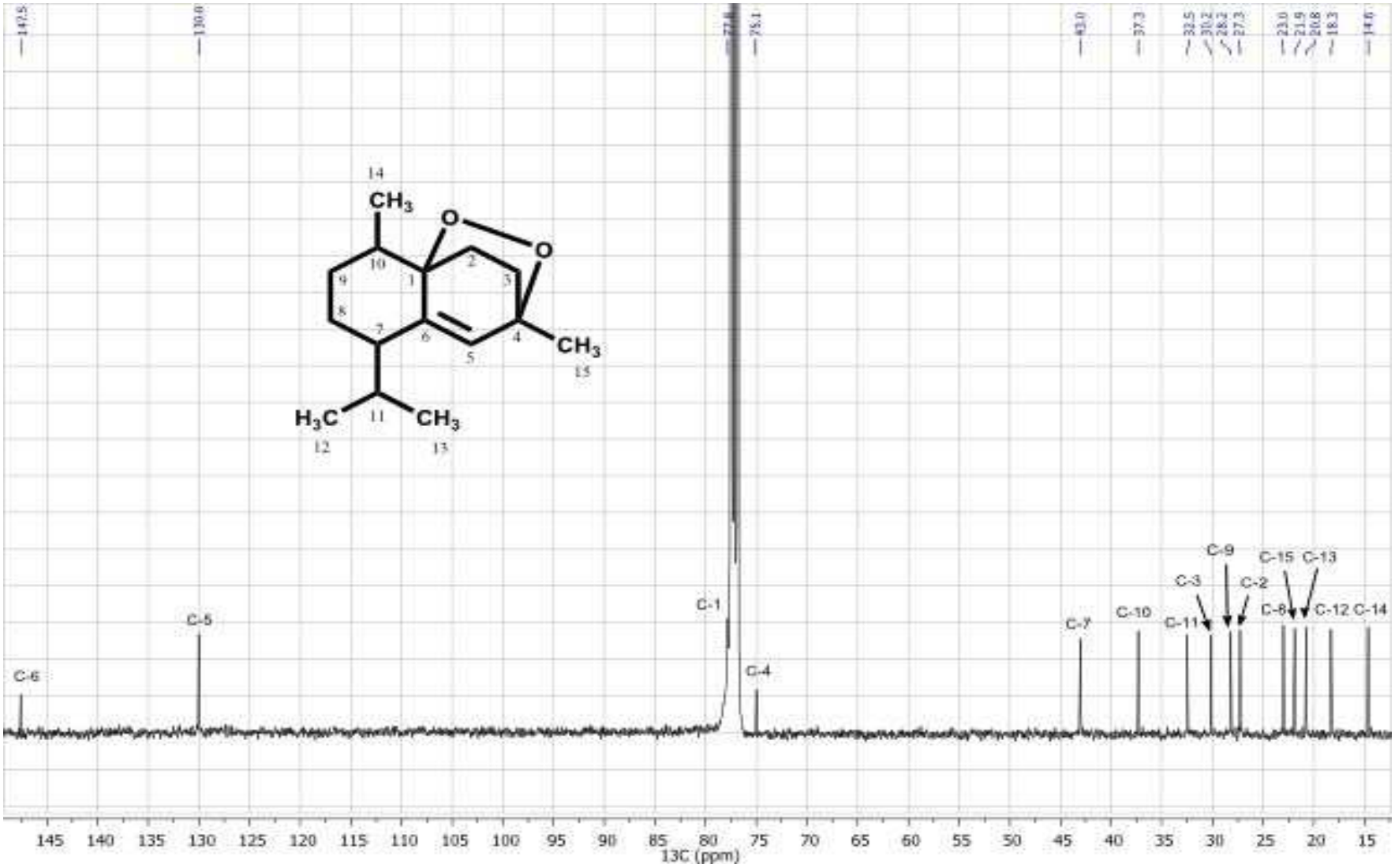


Figure 64 : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ta6** ($CDCl_3$, 400MHz)

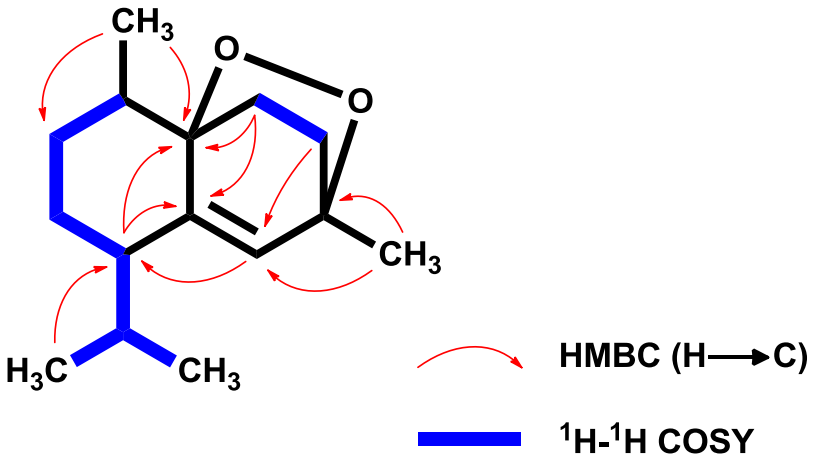


Figure 65 : Principales corrélations observées en RMN 2D (HMBC et COSY ^{1}H-^{1}H) pour le composé **Ta6**

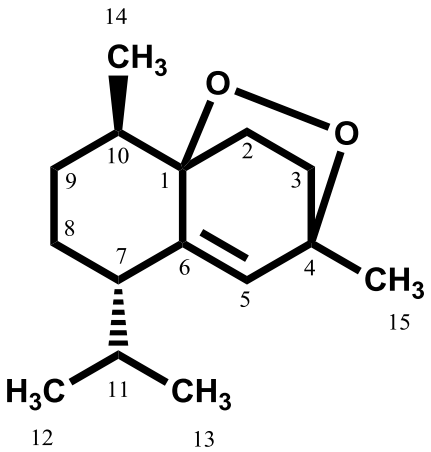


Figure 66 : Structure chimique du composé **Ta6**

Tableau 18 : Données RMN 1D et 2D ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ta6**

	δ_C (ppm)	DEPT	$\delta_H$mult. (J en Hz)	HMBC	COSY ^1H-^1H	NOESY ^1H-^1H
1	77,8	C	-	-	-	-
2	27,3	CH_2	a: 1,27 *ddd* (13,0, 12,0, 4,0) b: 2,35 *ddd* (13,0, 9,5, 4,0)	a: C-1, C-3, C-4, C-10 b: C-1, C-3, C-4, C-6, C-10	a: H_b-2, $H_{a,b}$-3 b: H_a-2, H_b-3	a: H_b-2, H_3-14 b: H_a-2, H_b-3
3	30,2	CH_2	a: 1,53 *m* b: 2,01 *ddd* (13,0, 9,5, 4,0)	a: C-1, C-2, C-4, C-5, C-15 b: C-1, C-2, C-4, C-5, C-15	a: H_a-2, H_b-3 b: $H_{a,b}$-2, H_a-3	a: H_b-3 b: H_b-2, H_a-3, H_3-15
4	75,1	C	-	-	-	-
5	130,0	CH	6,09 *d* (2,0)	C-1, C-3, C-4, C-7, C-15	H-7	H-11, H_3-15
6	147,5	C	-	-	-	-
7	43,0	CH	2,51 *dddd* (8,5, 7,5, 6,0, 2,0)	C-1, C-5, C-6, C-8, C-11, C-12,C-13	H-5, $H_{a,b}$-8, H-11	
8	23,0	CH_2	a: 1,45 *m* b: 1,77 *m*	a: C-7, C-10, C-11 b: C-6, C-7, -9, C-10, C-11	a : H-7, H_b-8 b : H-7, H_a-8, H_2-9	
9	28,2	CH_2	1,51 *m*	C-1, C-7, C-8, C-10, C-14	H_b-8, H-10	H_3-14
10	37,3	CH	1,72 *m*	C-1, C-2, C-8, C-9, C-14	H_2-9, H_3-14	H_3-14
11	32,5	CH	1,90 *oct*(7,0)	C-6, C-7, C-8, C-12, C-13	H-7, H_3-12, H_3-13	H-5
12	18,3	CH_3	0,82 *d*(6,5)	C-7, C-11, C-13	H-11	
13	20,8	CH_3	0,89 *d* (7,0)	C-7, C-11, C-12	H-11	
14	14,6	CH_3	1,03 *d* (7,0)	C-1, C-9, C-10	H-10	H_a-2, H_2-9, H-10
15	21,9	CH_3	1,36*s*	C-3, C-4, C-5	-	H-5

II.1.2.7. Analyse structurale du composé Ta7

Ta7 est une molécule optiquement inactive ayant l'aspect d'une huile orangée. L'analyse de ses spectres RMN ^{13}C et HMBC montre la présence de 20 atomes de carbone dont un atome de carbone quaternaire (carbonyle), 10 méthines (tous sp^2), 8 méthylènes (tous sp^3) et 1 méthyle. Le spectre RMN ^{1}H présente tous les signaux caractéristiques d'un acide gras polyinsaturé : (i) un massif correspondant aux protons oléfiniques (5,38 *m*, 10H), (ii) un massif correspondant à des méthylènes doublement insaturés en α (2,83 *m*, 8H), (iii) les signaux des méthylènes en α [δ_H 2,37 *t* (J = 7,5 Hz), H-2] et β [δ_H 1,7 *quint* (*J* = 7,5 Hz), H-3] de la fonction acide carboxylique, (iv) les signaux de méthylènes α insaturés [δ_H 2,14 *td* (*J* = 7,0 et 7,5 Hz), H-4 ; 2,08 *qd* (*J* = 7,0 et 7,5 Hz), H-19], et (v) le signal d'un méthyle [δ_H 0,97*t* (*J* = 7,5 Hz), H_3-20]. L'analyse de ces données et la comparaison avec la littérature (Tableau 19) ont permis l'identification du composé **Ta7** comme étant l'acide (5*Z*, 8*Z*, 11*Z*, 14*Z*, 17*Z*) eicosapenta-5,8,11,14,17-énoïque (Figure 67). Cet acide gras polyinsaturé est communément présent dans divers organismes : il a été notamment décrit à partir de la dictyotacée *Zonaria tournefortii* (El Hattab et al., 2009) où il est considéré comme un précurseur biosynthétique d'une série d'acylphloroglucinols.

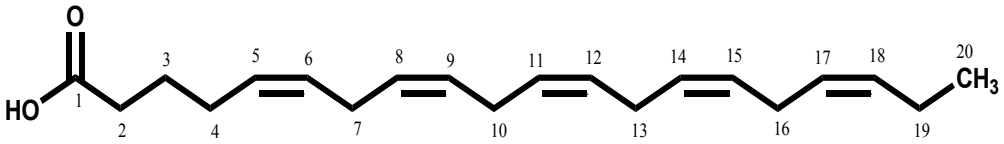


Figure 67 : Structure chimique du composé **Ta7**

Tableau 19 : Comparaison des données RMN ^{1}H et ^{13}C ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ta7** avec celles issues de la littérature

	Ta7			**El Hattab et al. (2009)**
	δ_C (ppm)	DEPT	$\delta_H$mult. (*J*en Hz)	δ_C (ppm)
1	177,5	C	-	179,0
2	33,0	CH_2	2,37 *t* (7,5)	33,2
3	24,7	CH_2	1,71 *quint* (7,5)	24,5
4	26,6	CH_2	2,14 *td* (7,5, 7,0)	26,5
5	128,9	CH	5,38 *m*	129,0
6	129,2	CH	5,38 *m*	128,8
7	25.7-25.8[1]	CH_2	2,83 *m*	25,6
8	128.0-128.7[2]	CH	5,38 *m*	128,6
9	128.0-128.7[2]	CH	5,38 *m*	127,9
10	25.7- 25.8[1]	CH_2	2,83 *m*	25,6
11	128.0-128.7[2]	CH	5,38 *m*	128,1
12	128.0-128.7[2]	CH	5,38 *m*	128,0
13	25.7-25.8[1]	CH_2	2,83 *m*	25,6
14	128.0-128.7[2]	CH	5,38 *m*	128,1
15	128.0-128.7[2]	CH	5,38 *m*	128,2
16	25.7- 25.8[1]	CH_2	2,83 *m*	25,6
17	127,2	CH	5,38 *m*	127,0
18	132,2	CH	5,38 *m*	132,1
19	20,7	CH_2	2,08 *qd* (7,5, 7,0)	20,6
20	14,5	CH_3	0,97 *t* (7,5)	14,3

II.1.2.8. Analyse structurale du composé Ta8

L'analyse des données spectrales du composé **Ta8** a montré leur parfaite adéquation avec le composé **Ds1**. Ce qui permet d'identifier cette molécule comme étant le sn-3-*O*-(géranylgéranyl)glycérol.

L'algue brune *T. atomaria*, étudiée dans le cadre de ces travaux, a été collectée en mer Méditerranée et a produit exclusivement des sesquiterpènes. Ceci est en accord avec les résultats de travaux antérieurs (Tringali et al., 2005) portant sur l'étude de la composition chimique de cette espèce d'algue sur les côtes méditerranéennes : ils ont en effet démontré qu'elle produisait majoritairement des sesquiterpènes (squelettes cadinane et germacrane) et ont identifié la présence de géranylgéranylglycérol dans ses extraits. Cette dernière molécule semble être caractéristique de *T. atomaria* de Méditerranée. Les individus de Mer Adriatique produisent également des sesquiterpènes y compris le (+)-gleenol (De Rosa et al., 1994) isolé dans le cadre de ces travaux. En revanche, la même espèce d'algue provenant des îles Canaries (Gonzalez et al., 1971 ; Gonzalez et al., 1973 ; Gonzalez et al., 1974) ou de mer Egée (Abatis et al., 2005 ; Tziveleka et al., 2005) est connue pour produire majoritairement des méroditerpènes. Le fait que plusieurs méroditerpènes tels que le taondiol et l'acide atomarique aient été également retrouvées chez des espèces d'algues du genre *Stypopodium* (Areche et al., 2009) suggère la possibilité que des espèces de ces deux genres morphologiquement et phylognétiquement proches (*Taonia* et *Stypopodium*) aient été confondues (Paula et al., 2011). Des différences de production métabolique en focntion du lieu de récolte pourraient également être à l'origine de ces variations.

II.2. Activité anti-adhésion

Dans le cas de *T. atomaria*, cinq molécules (**Ta2**, **Ta4**-**Ta6** et **Ta8**) ont été testées vis-à-vis de cinq souches bactériennes isolées de biofilms marins. Il s'agit des trois souches précédemment utilisées lors de l'évaluation de l'activité en anti-adhésion des molécules de *Dictyota* sp. (D41, 4M6 et TC5) ainsi que de deux souches supplémentaires [*Pseudoalteromonas lipolytica* (TC8) et *Shewanella pneumatophori* (TC11)] isolées près de Toulon. L'objectif de travailler avec cinq souches étant d'évaluer l'activité anti-adhésion des molécules issues de *T. atomaria* avec un plus large spectre de sensibilité. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 20. L'activité de ces métabolites a été comparée à celle de deux biocides standards (TBTO et Zineb®). Comme attendu, les valeurs de CE_{50}

obtenues avec le TBTO montrent que ce biocide a une forte activité vis-à-vis de TC8 et TC11 (6,9 µM et 1,8 µM, respectivement) tandis que le Zineb présente des activités un peu moins fortes (CE_{50} entre 15 et 50 µM). En observant la Figure 68 relative aux CE_{50} des différents produits isolés à partir de *T. atomaria*, il est évident que le composé **Ta8** est celui qui présente la plus forte activité avec des valeurs de CE_{50} comprises entre 30 et 50 µM. Les autres composés témoignent d'activités anti-adhésion modérées (60 µM < CE_{50} < 150 µM), à l'exception du composé **Ta5** qui montre un fort effet anti-adhésion (CE_{50} = 33 µM) envers la souche D41. Les produits **Ta4** et **Ta5** isolés en quantités trop faibles n'ont pas été testés en triplicats.

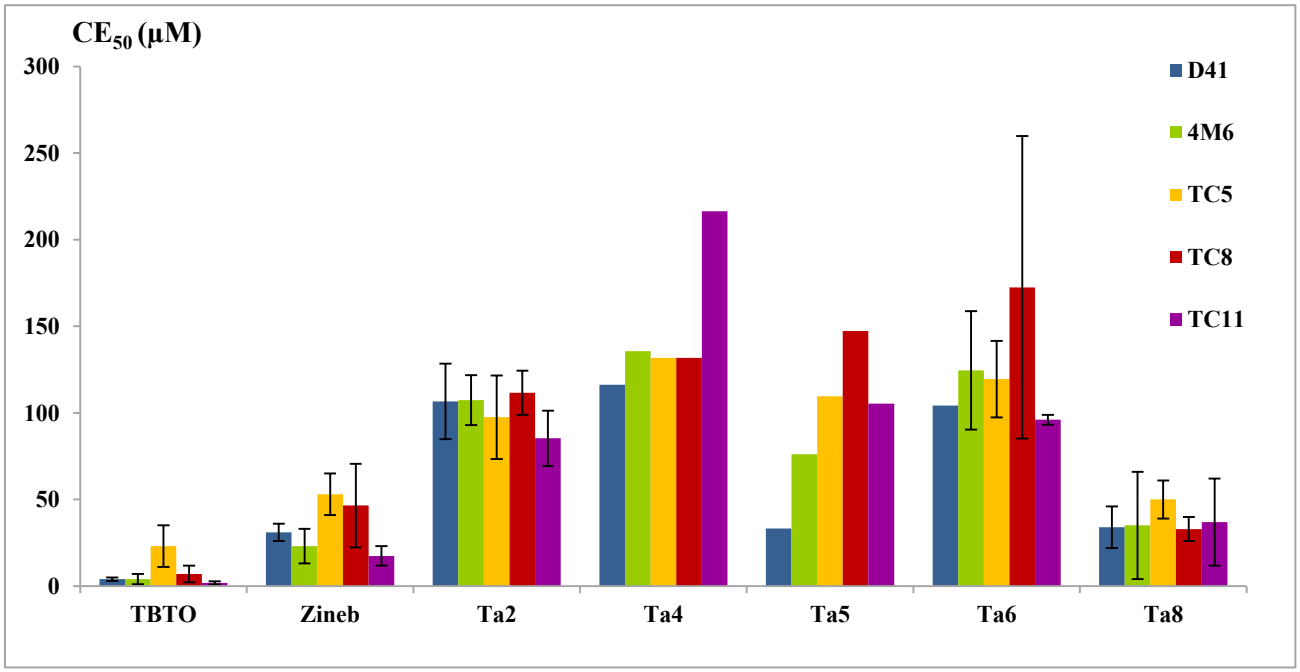


Figure 68 : Capacités en anti-adhésion (CE_{50}) de biocides de référence et des composés **Ta2**, **Ta4-Ta6** et **Ta8** vis-à-vis de cinq souches bactériennes marines

De nombreux autres sesquiterpènes appartenant à différents types d'organismes marins ont déjà témoingné de propriétés en antifouling. Par exemple, la métamorphose des larves de *Balanus amphitrite* a été inhibée par des sesquiterpènes isolés à partir de l'éponge marine *Acanthella cavernosa*, comprenant notamment des groupements isocyanate, isothiocyanate et thiocyanate (Hirota et al., 1996 ; Okino et al., 1996). Une autre éponge, *Dysidea herbacea*, est capable de produire un furanosesquiterpène ayant un effet anti-adhésion à l'encontre de la moule bleue *Mytilus edulis galloprovincialis* (Sera et al., 1999).

D'autres sesquiterpènes halogénés extraits à partir d'algues rouges du genre *Laurencia* ont montré une activité antibactérienne significative (Vairappan et al., 2008). Des dérivés de type guaiane, isolés à partir de l'algue verte *Ulva fasciata*, sont capables d'inhiber significativement la croissance de *Vibrio* spp. à des concentrations allant de 25 à 35 $\mu g.ml^{-1}$ (Chakraborty et al., 2010).

Les bio-essais de toxicité et d'inhibition de croissance ont été effectués vis-à-vis de deux souches supplémentaires (TC8 et TC11) pour les deux biocides de référence et **Ta8**, mais aussi pour le composé **Ta5** vis-à-vis uniquement de D41 (Tableau **14**). Le TBTO inhibe fortement la croissance des deux bactéries TC8 et TC11 ($2,5\ \mu M < CI_{50} < 4,5\ \mu M$) et il est toxique à partir d'une CL_{50} de 3,7 µM, alors que le Zineb montre un effet inhibiteur moins fort ($CI_{50} > 29\ \mu M$). Concernant les produits naturels, des valeurs de CI_{50} et de CL_{50} supérieures à 50 µM ont été enregistrées contre les souches cibles. Les produits naturels semblent être donc moins toxiques que les biocides commerciaux avec des valeurs d'IS plus élevées que pour les molécules commerciales.

Tableau 20: Activité anti-adhésion (CE_{50}), inhibition de croissance (CI_{50}) et mortalité (CL_{50}) des composés **Ta2**, **Ds4**, **Ds5** et **Ds6** et de deux biocides de référence (TBTO et Zineb) contre cinq souches de bactéries marines (D41, 4M6, TC5, TC8 et TC11)

	D41				4M6				TC5			
Composé	**CE_{50} (µM)**	**CI_{50} (µM)**	**CL_{50} (µM)**	**IS**	**CE_{50} (µM)**	**CI_{50} (µM)**	**CL_{50} (µM)**	**IS**	**CE_{50} (µM)**	**CI_{50} (µM)**	**CL_{50} (µM)**	**IS**
Ta2	107 ± 22 R^2 = 0,6				108 ± 14 R^2 = 0,85				98 ± 24 R^2 = 0,87			
Ta4	116* R^2 = 0,94				136* R^2 = 0,76				132* R^2 = 0,81			
Ta5	33* R^2 = 0,72	52 R^2 = 0,73	70 R^2 = 0,84	2,1	76* R^2 = 0,77				110* R^2 = 0,95			
Ta6	104* R^2 = 0,88				125 ± 34 R^2 = 0,73				120 ± 22 R^2 = 0,75			
Ta8	34 ± 12 R^2 = 0,99	68 R^2 = 0,76	80 R^2 = 0,86	2,3	34 ± 31 R^2 = 0,99	137 R^2 = 0,76	97 R^2 = 0,97	2,8	50 ± 11 R^2 = 0,83	>100	>100	>2
TBTO	4 ± 1 R^2 = 0,98	2.5 R^2 = 0,90	7.8 R^2 = 0,86	1,9	4 ± 3 R^2 = 0,93	0.9 R^2 = 0,90	1,1 R^2 = 0,63	0,25	23 ± 12 R^2 = 0,92	8,4 R^2 = 0,98	6,3 R^2 = 0,96	0,3
Zineb®	31 ± 5 R^2 = 0,93	87 R^2 = 0,89	55 R^2 = 0,97	1,8	23 ± 10 R^2 =0,92	52 R^2 = 0,80	31 R^2 = 0,99	1,3	53 ± 12 R^2 = 0,93	6.6 R^2 = 0,95	23 R^2 = 0,86	0,4

	TC8				TC11			
Composé	**CE_{50} (µM)**	**CI_{50} (µM)**	**CL_{50} (µM)**	**IS**	**CE_{50} (µM)**	**CI_{50} (µM)**	**CL_{50} (µM)**	**IS**
Ta2	112 ± 13 R^2 = 0,75				85 ± 16 R^2 = 0,64			
Ta4	132* R^2 = 0,94				217* R^2 = 0,68			
Ta5	147* R^2 = 0,98				105* R^2 = 0,73			
Ta6	173 ± 87 R^2 = 0,76				96 ± 3 R^2 = 0,78			
Ta8	33 ± 7 R^2 = 0,83	75 R^2 = 0,81	>100 R^2 = 0,83	>3	37 ± 25 R^2 = 0,83	78 R^2 = 0,66	92 R^2 = 0,85	2,5
TBTO	7 ± 5 R^2 = 0,92	4,5 R^2 = 0,76	4,8 R^2 = 0,91	0,7	2 ± 1 R^2 = 0,92	2,5 R^2 = 0,87	3,7 R^2 = 0,94	1,8
Zineb®	47 ± 24 R^2 = 0,96	65 R^2 = 0,84	61 R^2 = 0,87	1,3	17 ± 6 R^2 = 0,83	29 R^2 = 0,83	31 R^2 = 0,92	1,8

CE_{50}: concentration permettant l'inhibition de l'adhésion de 50% des bactéries (Les valeurs indiquées sont les moyennes d'au moins trois mesures indépendantes, quelques valeurs ont été mesurées une seule fois (*) étant donné que les quantités descomposés n'étaient pas suffisantes); CI_{50}: concentration permettant l'inhibition de croissance de 50% des bactéries; CL_{50}: concentration létale pour 50% des bactéries; IS: indice de sélectivité (CL_{50}/CE_{50}); R^2: coefficient d'ajustement de la courbe sigmoïde dose-réponse

Chapitre IV

Interactions algues/bactéries

Les eucaryotes marins sessiles peuvent héberger des communautés bactériennes diversifiées et spécifiques à leur surface. Parmi ces organismes, les macro-algues marines vivent en association avec des bactéries avec lesquelles elles développent une multitude d'interactions. Sur le plan écologique, les interactions algues/bactéries n'ont pas fait l'objet d'un nombre important d'études destinés à comprendre l'ensemble des mécanismes impliqués. Dans certains cas, les algues semblent capables de sélectionner leurs biofilms, ce qui pourrait impliquer leur métabolome de surface. Ces biofilms, eux-mêmes peuvent protéger leurs hôtes contre d'autres colonisateurs. Ainsi, l'exploration des communautés microbiennes associées à la surface et de leurs rôles écologiques par rapport à leur hôte méritent d'être étudiés.

I. Observation des biofilms à la surface de *T. atomaria*

Dans son milieu naturel, l'algue brune *T. atomaria* semble être exempte de biofouling à l'échelle macroscopique. Cependant, des observations de sa surface effectuées à l'aide de plusieurs techniques microscopiques ont dévoilé la présence d'une colonisation microbienne.

Dans un premier temps, des observations par MEB ont montré que cette algue est recouverte par un biofilm diversifié quelle que soit la partie du thalle visualisée (extrémité distale, zone intermédiaire et zone basale). D'après ces observations, il semble que l'extrémité du thalle soit moins colonisé que les autres parties de l'algue. Toutefois, aucune analyse quantitative n'a été effectuée pour vérifier cette hypothèse. Le biofilm semble constitué essentiellement de bactéries (bacilles ou coques), de cyanobactéries en chaînes et de diatomées. On note également la présence d'une matrice exopolymérique incluant ces micro-organismes (Figure 69**)**. Des observations similaires ont été précédemment effectuées à la surface de l'algue brune *Laminaria digitata* (Salaün, 2009), ainsi que sur celle d'autres macro-algues (*Ceramium rubrum*, *Corallina officinalis*, *Palmaria palmata*, *Mastocarpus stellatus*, *Cladophora rupestris*, *Ulva* sp.) (Lam et al., 2008).

Dans un second temps, des analyses de *T. atomaria* par AFM ont permis de visualiser des reliefs au niveau de la surface du thalle (Figure 70) : il s'agit de structures rondes, et d'autres plus ou moins allongées avec des hauteurs variables. Etant donné l'absence d'études antérieures traitant de l'observation des surfaces de macro-algues par le biais de cette technique, il nous a été difficile de confirmer si ces reliefs correspondaient à la forme du biofilm associé ou à la forme de la surface de l'algue. Nous suggérons que les structures

rondes observées sont des bactéries sur la base des observations effectuées par MEB, et qu'il existe des micro-organismes de tailles différentes ou plus ou moins accumulés selon les hauteurs des reliefs observées. L'utilisation de cette technique surtout développée pour l'étude des matériaux à l'échelle nanoscopique ou pour des études d'adhésion bactérienne à l'échelle cellulaire mériterait d'être exploré dans le cadre de ce type de surface biotique.

Enfin, la troisième technique utilisée, la microscopie à épifluorescence avec le DAPI en tant que marqueur bactérien, a montré la présence de nombreuses bactéries de différentes tailles mais aussi celles de filaments en forme de chaînes correspondant probablement à des cyanobactéries de l'ordre des Oscillatoriales (Figure 71). On note que ces cyanobactéries ont tendance à s'agréger entre-elles.

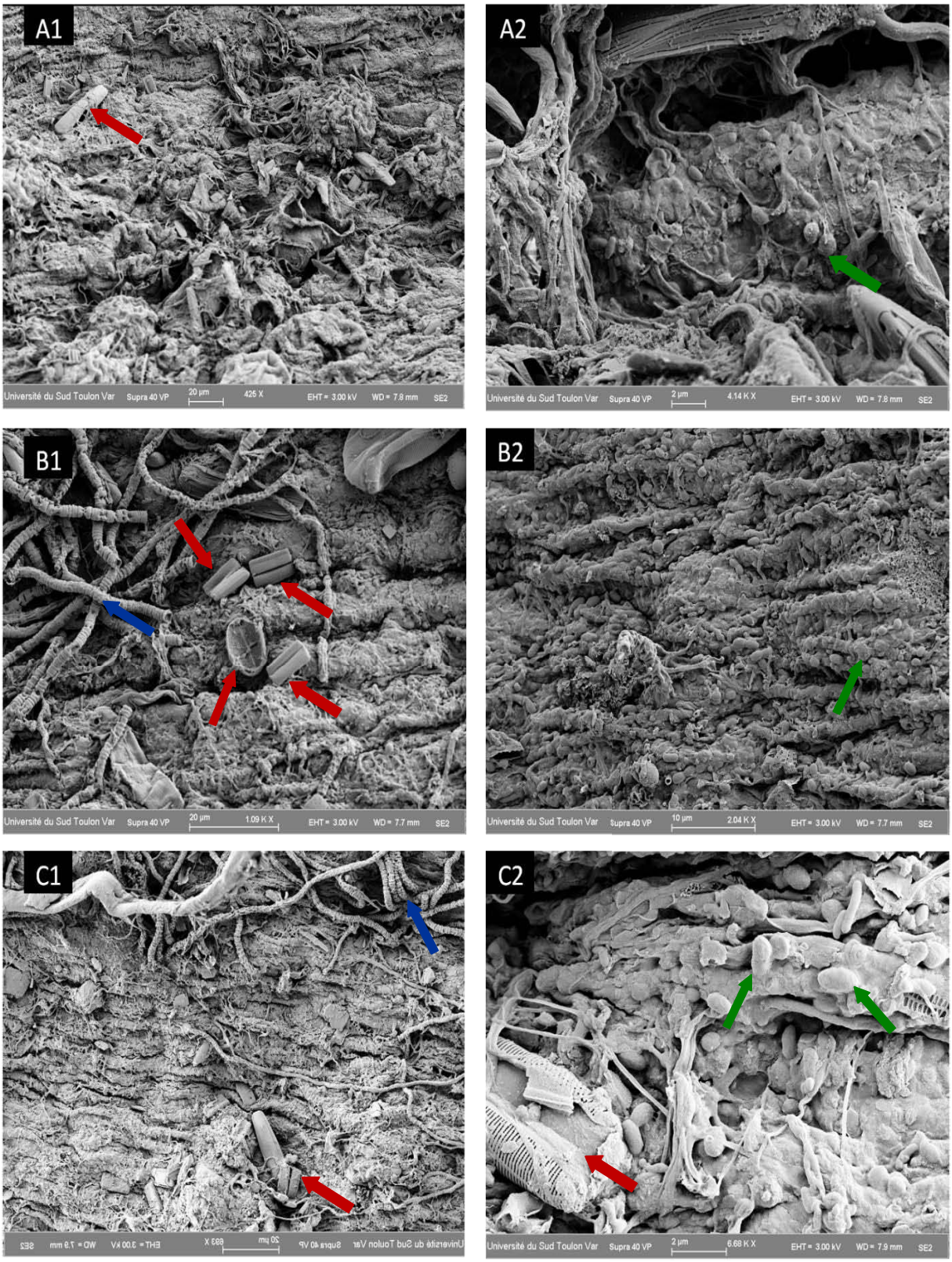


Figure 69 : Observation du biofilm associé à la surface de *T. atomaria* par MEB, **A1** et **A2** : au niveau de l'extrémité distale, **B1** et **B2** : au niveau de la zone intermédiaire, et **C1** et **C2 :** au niveau de la zone basale.

Flèches vertes → bactéries, flèches rouges → Diatomées et flèches bleues → cyanobactéries

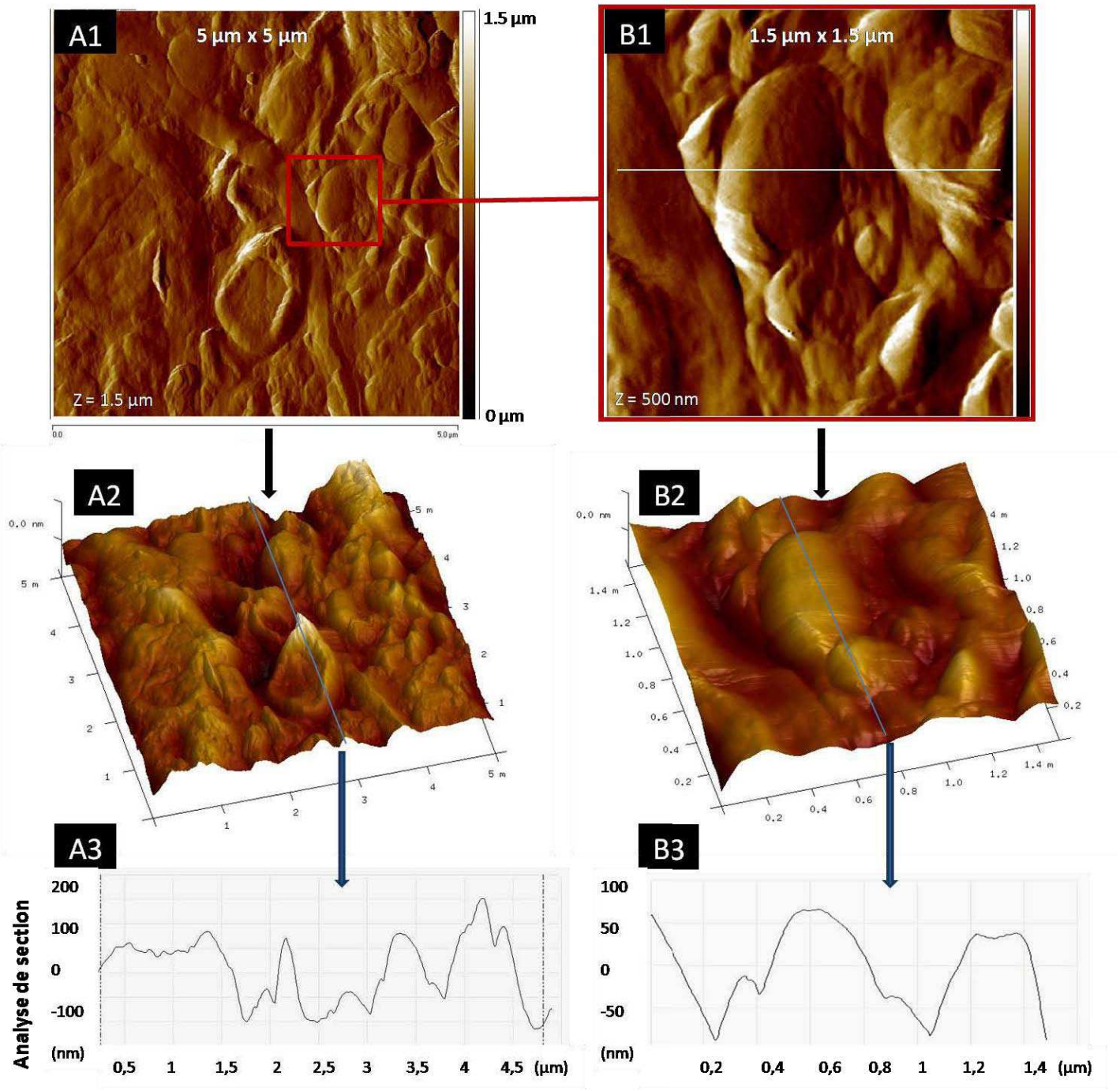


Figure 70 : Observation du biofilm associé à la surface de *T. atomaria* par AFM. (**A1** : Surface d'un morceau de thalle (25 µm^2), **A2** : Topographie en 3D correspondant à A1, **A3** : Analyse d'une section obtenue à partir de A2. **B1** Agrandissement d'une zone à partir de A1 (2,25 µm^2), **B2** Topographie en 3D correspondant à B1, et **B3** : Analyse d'une section obtenue à partir de B2).

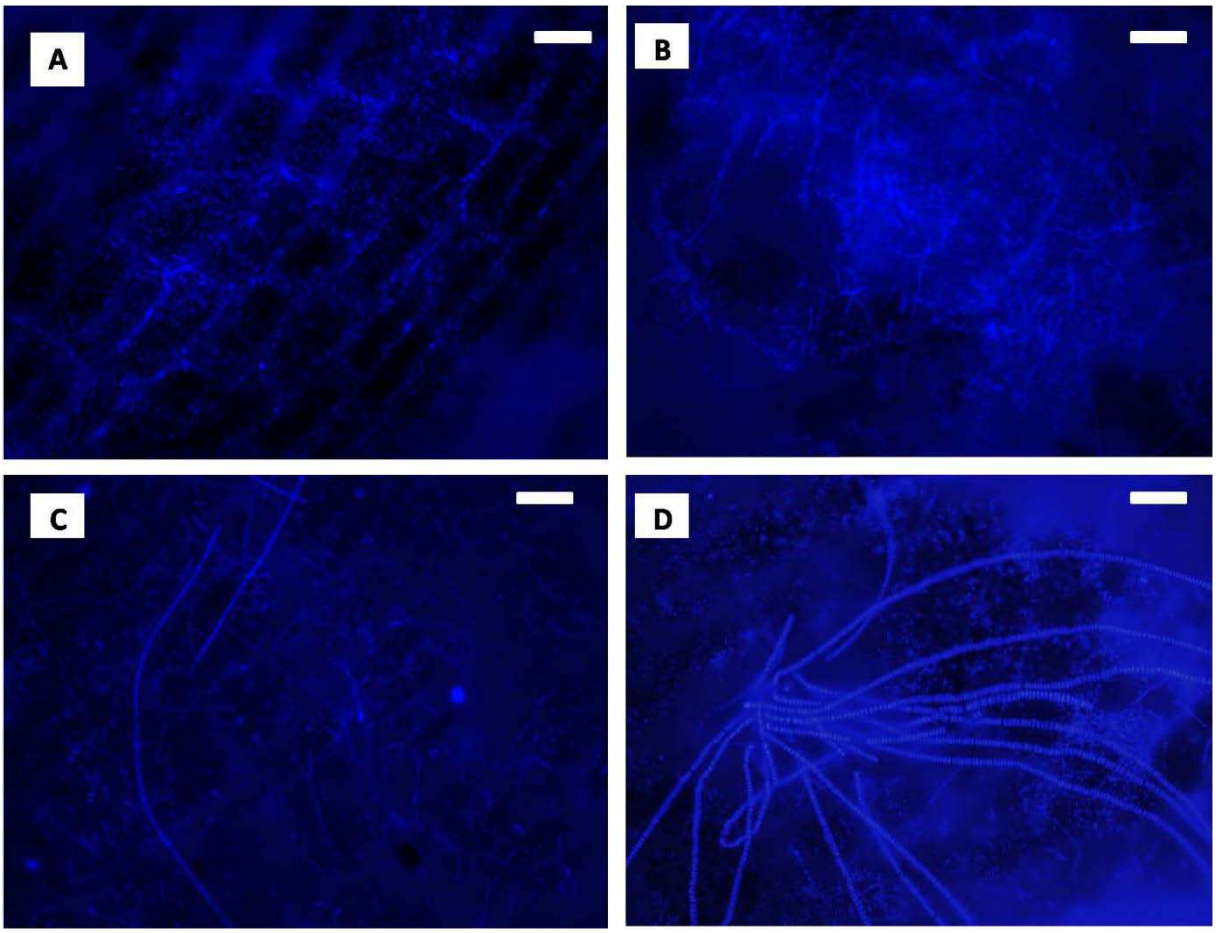


Figure 71 : Observation du biofilm associé à la surface de *T. atomaria* en microscopie à épifluorescence après marquage au DAPI (60 µM) (Barre d'échelle = 20 µm). **A** : structure des cellules algales avec des bactéries associées, **B** et **C** : associations de micro-organismes, et **D** : cyanobactéries filamenteuses

II. Métabolome de surface

L'analyse des métabolites de surface constitue une étape clé de l'approche envisagée qui tend à améliorer la compréhension de l'impact de la médiation chimique entre l'algue *T. atomaria* et son environnement, en particulier les bactéries associées à sa surface, et du rôle écologique de ces molécules.

II.1. Optimisation du protocole d'extraction des molécules de surface

Deux protocoles ont été testés lors de cette étape d'extraction des métabolites de surface de *T. atomaria* : a) extraction par trempage dans un solvant organique et b) imprégnation avec de la silice greffée C_{18}. Celui basé sur le trempage des thalles a été retenu car contrairement à la technique consistant à imprégner les thalles avec un adsorbant, les métabolites surfaciques ont pu être clairement détectés lors des analyses chromatographiques

ultérieures. Ainsi, la technique retenue consiste à immerger des thalles dans un ou plusieurs solvants organiques pendant une durée suffisante afin de récupérer les métabolites de surface tout en conservant l'intégrité cellulaire de l'algue (pour être sûr de n'extraire que les molécules exsudées à la surface). Pour mettre au point cette méthodologie, différentes combinaisons de solvants et de temps d'extraction ont été testées. Dans un premier temps, nous avons effectué une sélection de solvants ou de mélanges de solvants selon leur capacité à extraire les métabolites de différentes polarités, et ce dans une gamme plus ou moins grande de polarité. Les résultats obtenus ont montré que l'hexane et le dichlorométhane seuls ne sont pas efficaces, étant donné qu'aucune molécule n'a été détectée sur les profils chromatographiques obtenus. Ces deux systèmes de solvants n'ont donc pas été conservés pour la suite des expérimentations. En revanche, en utilisant le méthanol ou un mélange méthanol/dichlorométhane (1:1, v/v), nous avons observé la présence de plusieurs pics chromatographiques. Ces deux solvants ont donc servi pour la suite du protocole. A l'issue de ce choix, l'étape suivante a été de définir le temps d'exposition nécessaire à l'extraction du métabolome de surface sans provoquer de lyse cellulaire à la surface de l'algue. Pour cela, les échantillons de thalles traités à différentes durées d'extraction ont été marqués avec plusieurs marqueurs vitaux, en présence d'un témoin positif de lyse cellulaire (cellules traitées au paraformaldéhyde à 4%) et d'un témoin négatif (cellules non traitées). Parmi les fluorochromes utilisés, la FDA (Fluoresceine DiAcétate) est le seul qui soit capable de marquer les cellules vivantes, tandis que les autres (DAPI, iodure de propidium, Sytox® green et bleu de trypan) sont des indicateurs de mortalité cellulaire. Dans ce cas, une fois la cellule lysée ou morte, le fluorochrome peut y pénétrer et colorer le noyau par interaction avec l'ADN, et donc générer une réponse en fluorescence. Nous avons commencé par observer les deux témoins positif et négatif au microscope à épifluorescence. Seul le DAPI utilisé à une concentration de 60 µM a permis d'obtenir des images interprétables et sur les deux témoins : présence de noyaux fluorescents pour le témoin positif indiquant une pénétration du fluorochrome dans les cellules et donc une perméabilisation des membranes, alors que le témoin négatif ne montrait pas de marquage spécifique des noyaux (Figure 72). On note également un marquage aspécifique des membranes cellulaires algales qui cependant n'empêche pas une bonne interprétation de la présence ou de l'absence de perméabilisation membranaire.

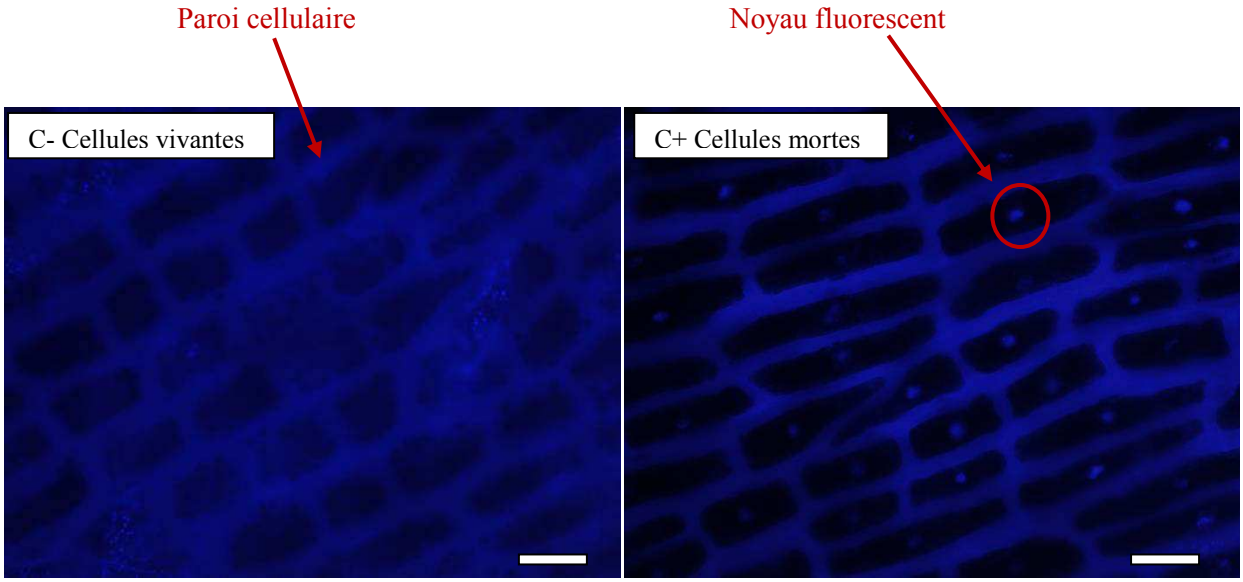


Figure 72 : Cellules vivantes (C-, témoin négatif) et mortes (C+, témoin positif) marquées au DAPI (60 µM) et visualisées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Barre d'échelle = 20 µm).

Pour les autres marqueurs, nous n'avons pas pu visualiser de fluorescence du noyau mais uniquement un important bruit de fond qui rendait impossible l'interprétation des résultats. La détermination du nombre de cellules mortes par rapport aux cellules vivantes a été effectuée par comptage direct au microscope à épifluorescence (cinq champs). Les résultats obtenus montrent que le témoin positif présente un pourcentage moyen de cellules mortes de 87,1 ± 7,1%, alors qu'une moyenne de 24,2 ± 6,8% de cellules mortes est recensée chez le témoin négatif. La perméabilité membranaire notée au niveau des thalles non traités (témoin négatif) pourrait être liée à la collecte ou au rinçage une fois au laboratoire, ou encore à la découpe des morceaux de thalles (utilisation du scalpel). Pour les différents traitements, nous avons remarqué qu'il existe une corrélation positive entre le temps d'exposition au solvant et le nombre de cellules lysées. Par exemple dans le cas du méthanol, les cellules sont restées intactes aux temps d'immersion de 5 et 15s ($p > 0,05$). Cependant, à partir de 20s, ce solvant a commencé à provoquer une lyse cellulaire de surface avec un taux de mortalité de 59.6 ± 10,3% à 20s, 74,6 ± 7,9% à 30s, puis 83 ,3 ± 13,1% à 60s, marquant un effet significatif ($p < 0.001$) (Figures 73 & 74). Dans le cas du mélange méthanol/dichlorométhane, les échantillons exposés pendant 5, 15 et 20s ne sont pas considérés comme significativement différents du témoin négatif ($p > 0,05$), tandis qu'une exposition de 30 et de 60s a entraîné une perméabilisation cellulaire significative (Figure 75). Ainsi, le temps d'extraction optimal

permettant d'obtenir le meilleur rendement d'extraction sans lyse cellulaire a été fixé à 15s pour le méthanol et à 20s pour le mélangeméthanol/dichlorométhane.

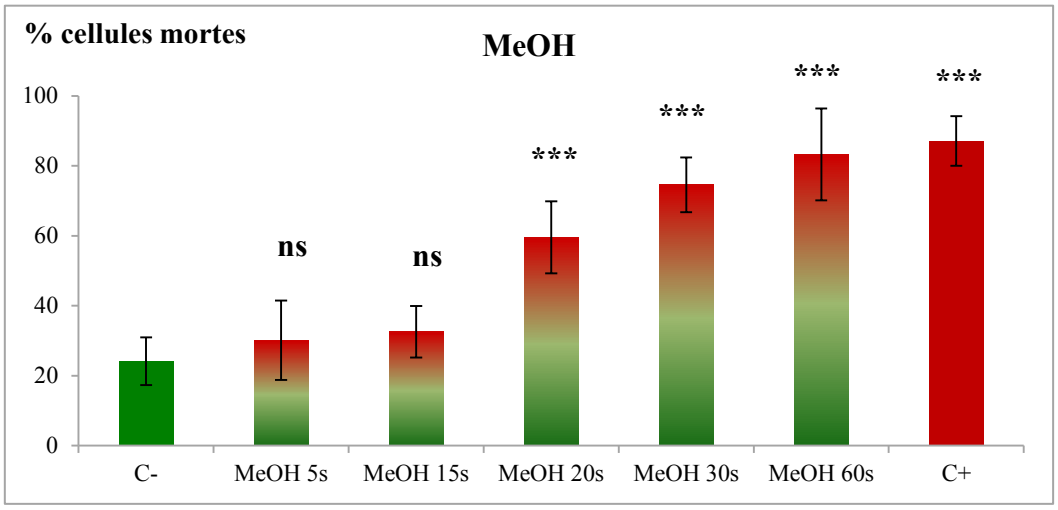


Figure 73 : Lyse cellulaire de surface (en % de cellules mortes) en fonction du temps de trempage des morceaux de thalles de *T. atomaria* dans le méthanol

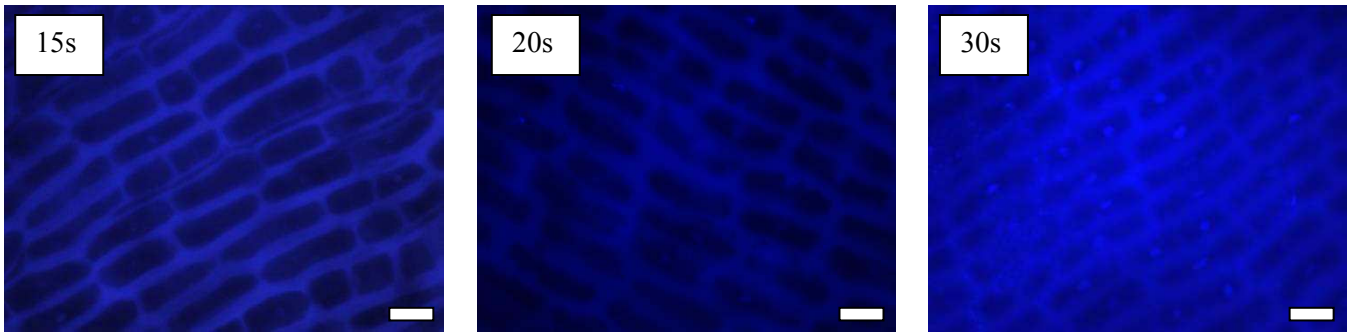


Figure 74 : Visualisation par microscopie à épifluorescence de la lyse cellulaire au niveau des échantillons de *T. atomaria* exposée au méthanol à différents temps (Coloration des noyaux par DAPI) (Barre d'échelle = 20 µm)

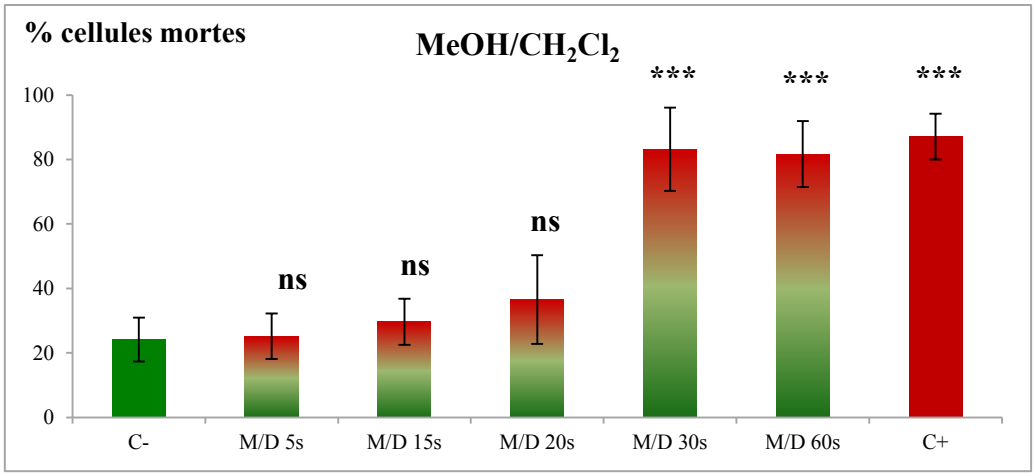


Figure 75 : Lyse cellulaire de surface (en % de cellules mortes) en fonction du temps de trempage des morceaux de thalles de *T. atomaria* dans un mélange MeOH/CH_2Cl_2

Cette technique d'extraction a été inspirée des travaux précurseurs de de Nys et al. (1998) qui ont utilisé l'hexane, le dichlorométhane (CH_2Cl_2), l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle et le méthanol (MeOH) comme solvants d'extraction. Tous ces solvants ont montré un effet destructif sur les cellules de huit espèces d'algues (rouges, vertes et brunes), à l'exception de l'hexane qui avait l'avantage de conserver l'intégrité des cellules membranaires jusqu'à 50s. Les travaux succédant à cette étude ont conduit à l'application de cette même méthode en utilisant soit l'hexane pendant une durée d'extraction inférieure à 40s (Dworjanyn et al., 1999 ; Dworjanyn et al., 2006 ; Thabard et al., 2011), soit des mélanges d'hexane et d'un autre solvant (MeOH ou CH_2Cl_2) enregistrant des lyses cellulaires entre 10 et 40s selon les proportions de solvants (Sudatti et al., 2006 ; Brock et al., 2007 ; Nylund et al., 2007; Lachnit et al., 2010 ; Saha et al., 2011). Nylund et al. (2007) ont également extrait les molécules de surface de trois algues marines avec du dichlorométhane pendant 30s. Ces auteurs estiment que ce solvant, en raison de sa polarité, est plus efficace pour l'extraction d'une grande variété de métabolites de surface que l'hexane. Dans notre cas, le méthanol et le mélange méthanol/dichlorométhane sont plus polaires, et dans le cas de ce dernier notamment, couvrant une plus large gamme de polarité que le dichlorométhane seul. D'autre part, l'explication la plus plausible à l'absence d'extraction avec l'hexane et le dichlorométhane proviendrait du fait que ces solvants, non-miscibles à l'eau et n'étant pas capables de passer la barrière aqueuse qui entoure le thalle humide, ne peuvent pas avoir accès à sa surface et donc aux métabolites qui s'y trouvent.

Concernant les techniques adoptées pour évaluer les effets de l'extraction sur la membrane cellulaire, quelques études ont utilisé la microscopie à épifluorescence et estimé les

lyses cellulaires par rapport à la fluorescence des chloroplastes (Sudatti et al., 2006 ; Brock et al., 2007 ; Nylund et al., 2007; Thabard et al., 2011). En effet, les chloroplastes autofluorescent lorsqu'ils ne sont pas intacts. D'autres auteurs ont utilisé le bleu d'Evans (0,05%) comme marqueur de mortalité pendant 30 min pour visualiser les lyses cellulaires à la surface de l'algue brune *Fucus vesiculosus* (Lachnit et al., 2010 ; Saha et al., 2011). Ce marqueur, agissant par exclusion, ne peut pas pénétrer dans la cellule lorsqu'elle est intacte. Par contre, il colore toute la cellule en cas de présence de lésions membranaires (Weinberger et al., 2005). L'augmentation de l'incorporation de ce colorant dans la cellule indique une lyse de plus en plus intense et se traduit par un changement de couleur par rapport à celle des témoins : négatif (échantillon non traité) et positif [échantillon exposé pendant 60s à un mélange hexane/méthanol (1:1 ; v/v)]. Ces techniques permettent d'estimer la présence ou l'absence de lyses cellulaires grâce à un gradient de couleur mais sans quantification. Il semble donc plus difficile d'analyser la lyse d'un point de vue quantitatif et statistique afin de valider les protocoles d'extraction du métabolome de surface.

C'est pourquoi, à la lecture de ces approches qui nous semblaient insuffisantes, nous avons essayé plusieurs marqueurs vitaux et réussi à mettre au point un protocole de microscopie qui nous a permis d'estimer quantitativement cette lyse.

A l'issue de cette première étape, les extraits de surface étant obtenus. Il a fallu mettre au point des méthodologies pour leur analyse chromatographique.

II.2. Identification des métabolites de surface

Afin d'identifier les métabolites présents à la surface de *T. atomaria*, les extraits surfaciques obtenus à chaque temps d'exposition ont été solubilisés dans le méthanol à une concentration de 10 $mg.ml^{-1}$ et analysés par chromatographie (CPG-MS et CLHP à triple détection). Quelle que soit la technique ou la détection utilisée, les profils chromatographiques qui en résultent ont montré la présence d'un composé majeur, ainsi que de plusieurs métabolites minoritaires. L'intensité des pics chromatographiques observés est directement corrélée avec le temps d'extraction : plus ce temps augmente, plus les aires des pics sont importantes tel que présenté sur la Figure 76. En parallèle, le chromatogramme de l'extrait brut total dans le solvant d'extraction utilisé est donné comme référence afin de comparer l'allure de la signature chromatographique du métabolome total de l'algue avec celle de son métabolome de surface. Les résultats obtenus montrent que le produit majeur des

extraits de surface est également le composé majoritaire dans l'extrait brut et que les autres molécules présentes dans l'extrait total semblent moins exprimées dans ceux de surface. Le même constat est réalisé lors de l'analyse de ces extraits par CPG-SM (Figure 77).

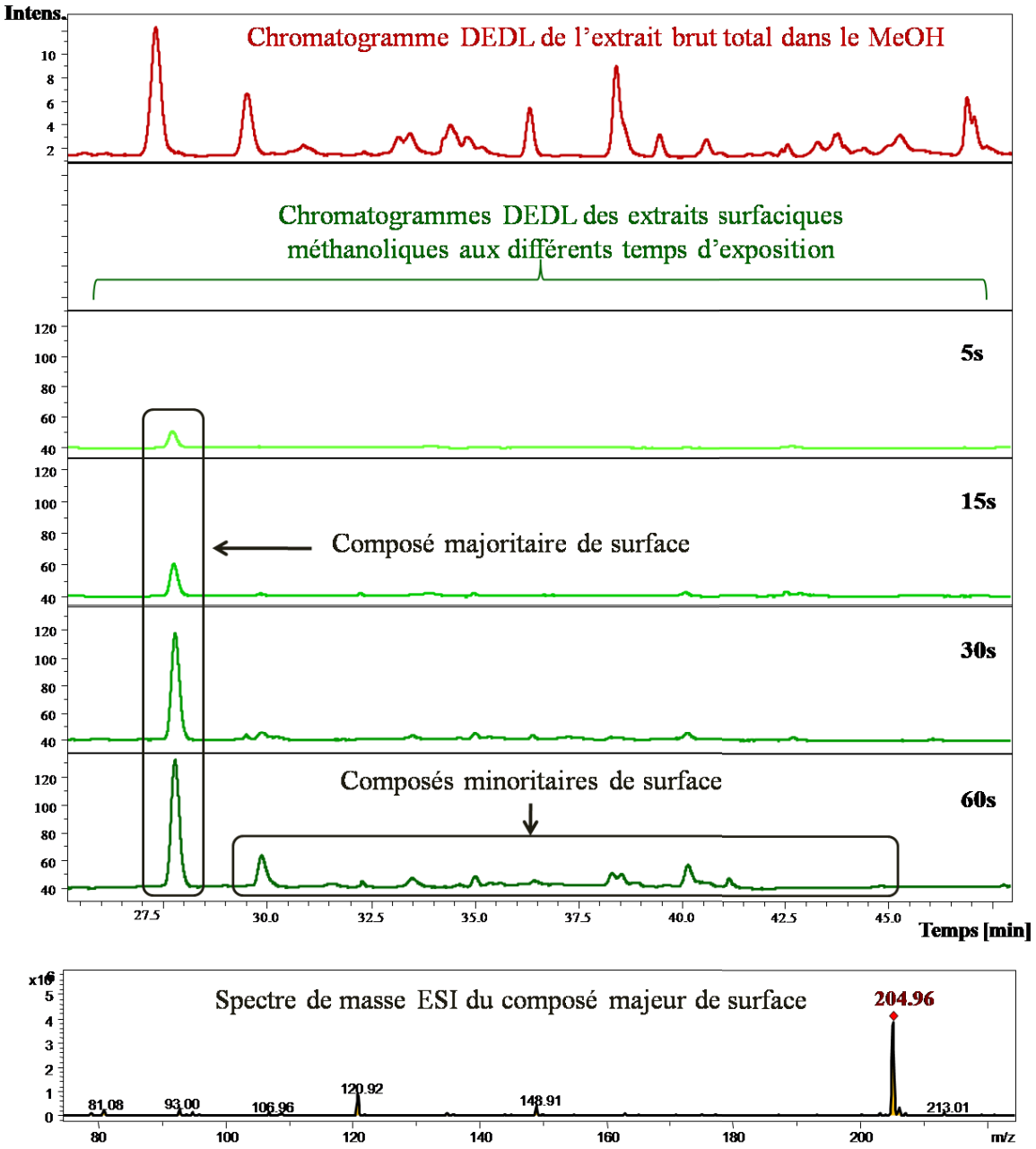


Figure 76 : Analyse par CLHP (détection DEDL : zoom de la zone allant de 25 à 47 min) des extraits surfaciques aux différents temps d'extraction (en bas) et de l'extrait brut total de *T. atomaria* (en haut)

Les faibles quantités d'extraits surfaciques disponibles n'ont pas permis la purification directe de leurs différentes composantes, et notamment du métabolite majeur. Le seul moyen pour identifier les composés de surface a donc été de comparer les profils chromatographiques de surface avec ceux des produits purs préalablement isolés à partir de l'extrait brut total de *T. atomaria*. Les analyses chromatographiques ayant été faites dans les mêmes conditions, nous

nous sommes basés sur le temps de rétention et les données spectroscopiques (spectres (+)-ESI-MS et UV-Vis) pour confirmer l'identité des pics détectés au niveau des extraits de surface. Suite à cette comparaison, il s'est avéré que le composé majoritaire de surface correspondait à la molécule **Ta2** décrite dans le chapitre précédent (Figure 77).

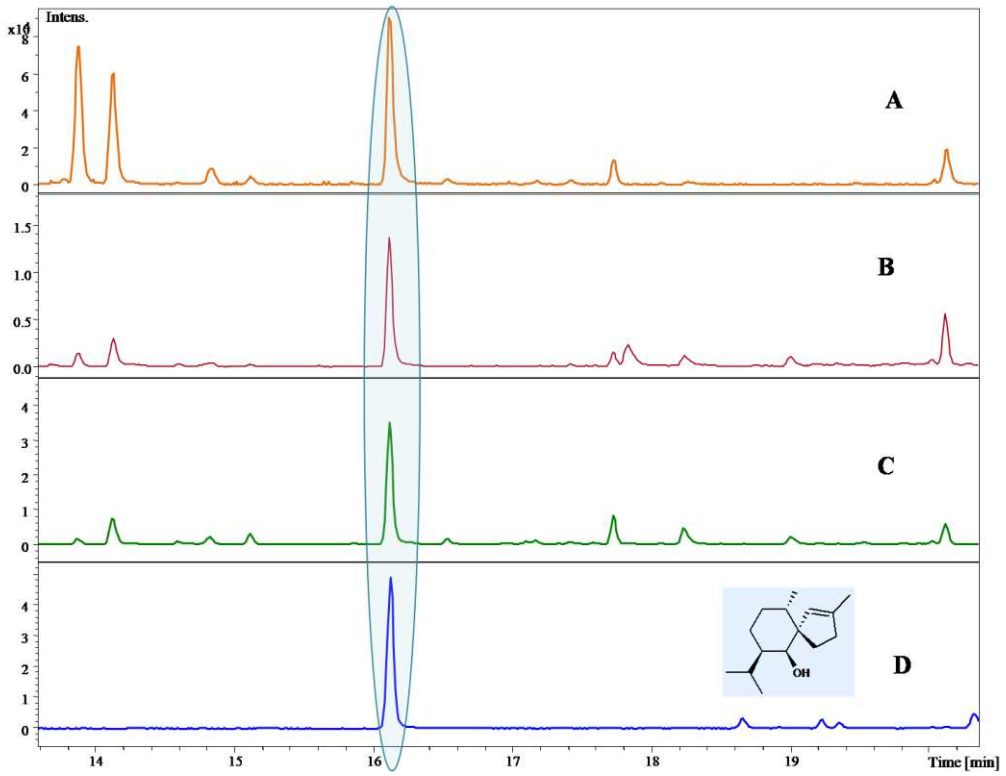


Figure 77 : Identification du composé majoritaire de surface, par comparaison des chromatogrammes CPG-SM de l'extrait brut (**A**) des extraits surfaciques de *T. atomaria* (**B** dans le MeOH et **C** dans un mélange MeOH/CH_2Cl_2, 30s) à ceux du composé **Ta2** pur (**D**)

Le produit majoritaire est un sesquiterpène connu ; il s'agit d'un composé de polarité moyenne. La plupart des molécules de surface identifiées à ce jour sont principalement des composés de polarité faible à moyenne tels que les terpènes de *Dictyota menstrualis* (Schmitt et al., 1995), les furanones de *Delisea pulchra* (De Nys et al., 1998; Maximilien et al., 1998 ; Dworjanyn et al., 1999 ; Steinberg et al., 2001 ; Dworjanyn et al., 2006), l'élatol de *Laurencia obtusa* (Sudatti et al., 2006 ; Sudatti et al., 2008) et la fucoxanthine de *Fucus vesiculosus* (Saha et al., 2011). Ces composés sont caractérisés par une certaine hydrophobicité (Steinberg & de Nys, 2002 ; Harder et al., 2004), ce qui peut leur permettre de moins diffuser dans l'eau de mer et donc de rester proches de la surface de l'organisme producteur. Au contraire, les composés polaires peuvent présenter un taux élevé de diffusion

dans l'eau de mer environnante en l'absence d'interactions ioniques fortes ou de liaisons hydrogène avec la surface de l'algue.

Une des conditions nécessaires pour classifier un composé naturel comme un produit antifouling est qu'il doit être continuellement excrété par l'algue dans le milieu extracellulaire (eau environnante) (Davis et al., 1989 ; Schmitt et al., 1995 ; Clare, 1996 ; Hay, 1996). Pour vérifier cela, nous avons mené des expériences qui consistent à incuber un thalle de *T. atomaria* dans de l'eau de mer pendant 12h et 24h (triplicats) par comparaison à de l'eau de mer seule utilisée comme témoin (blanc, triplicats). La filtration sur SPE de l'eau de ces échantillons, après chaque temps d'incubation, a permis de concentrer les exsudats qui correspondent à un ensemble de molécules émises par l'algue dans le milieu. Ces exsudats ont été analysés par CLHP et les chromatogrammes obtenus ont été comparés à ceux des extraits de surface et des molécules isolées précédemment.

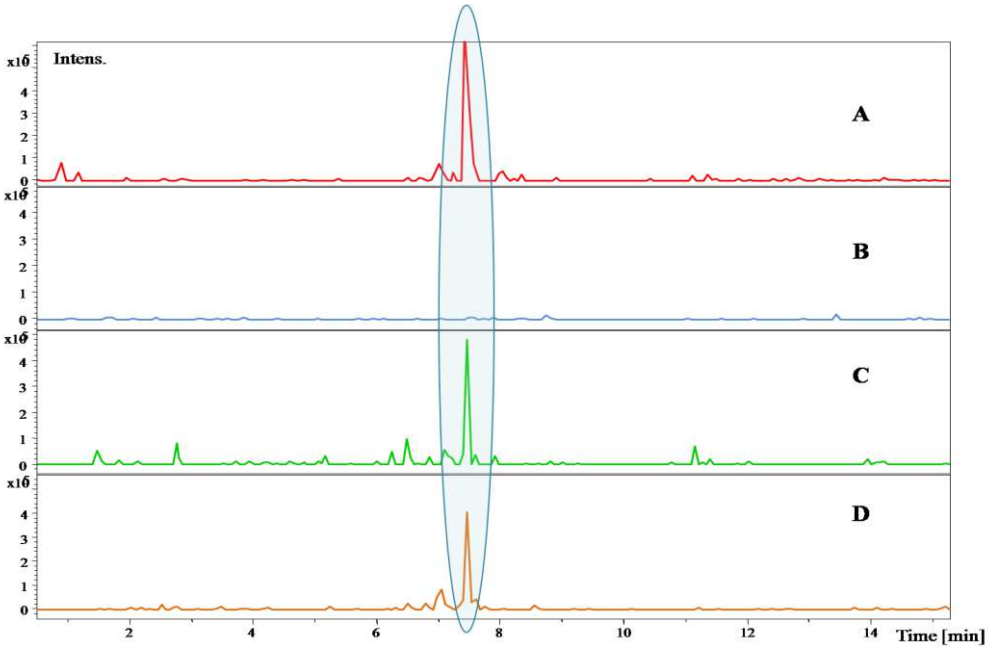


Figure 78 : Exsudation du composé majoritaire de surface par l'algue incubée pendant 12h (**C**) et 24 (**D**) : comparaison de leurs chromatogrammes (HPLC, détection par (+)-ESI/MS ; EIC, *m/z* 205) avec celui d'un extrait de surface ($MeOH/CH_2Cl_2$) (**A**) et l'eau de mer (témoin) (**B**)

Les résultats montrent que ce composé majeur des extraits de surface (**Ta2**) est parfaitement détecté dans les échantillons d'eau de mer dans lesquels l'algue a été incubée à 12 et 24h (Figure 78). Les mêmes analyses démontrent l'absence de composés dans le milieu témoin (eau de mer seule). Ces résultats signifient que le composé majoritaire à la surface de *T. atomaria* est également libéré dans le milieu environnant.

II.3. Développement méthodologique des analyses métabolomiques

Dans cette partie du travail, nous décrivons la réalisation d'une étude destinée à l'analyse du métabolome de surface de *T. atomaria*, dans le but à la fois de valider le protocole d'extraction des métabolites associés à sa surface mais aussi de l'appliquer au suivi saisonnier. Pour cette approche, les extraits surfaciques aux cinq temps d'extraction choisis (5, 15, 20, 30 et 60s) ainsi que les extraits bruts correspondants (tous en triplicats) pour chaque mois ont été traités par métabolomique. Pour cela, plusieurs étapes ont été nécessaires : (i) le développement d'une méthode d'analyse chromatographique adaptée (CLHP-SM), (ii) l'extraction et le prétraitement des données obtenues, et (iii) l'analyse par une approche statistique multivariée de ces données.

II.3.1. Optimisation de la méthode d'analyse chromatographique

Voir p. 78.

II.3.2. Extraction et pré-traitement des données

Après l'obtention des signatures chimiques, les données brutes (fichiers relatifs aux chromatogrammes obtenus avec une détection par spectrométrie de masse (+)-ESI/MS) des différents échantillons (Figure 79) ont été convertis au format .mzXML. Dans un premier temps, le logiciel MZmine-2.10 a été utilisé pour traiter les fichiers convertis. La première étape consiste à détecter automatiquement au sein de chaque chromatogramme les signaux analytiquement pertinents (correction de la ligne de base et du bruit de fond, détection des pics par déconvolution). Dans un second temps, l'étape d'alignement permet de palier aux dérives éventuelles du temps de rétention d'un même composé présent dans plusieurs échantillons. L'ensemble des métabolites détectés est ensuite restitué sous forme d'une matrice où chaque ligne correspond à un signal (variable) défini par un rapport *m/z* et un temps de rétention, et chaque colonne à l'aire de ce signal dans un échantillon donné (observation) (Tableau 21). Entre 1500 et 2000 variables ont été obtenues dans notre cas pour chaque série d'échantillons étudiée.

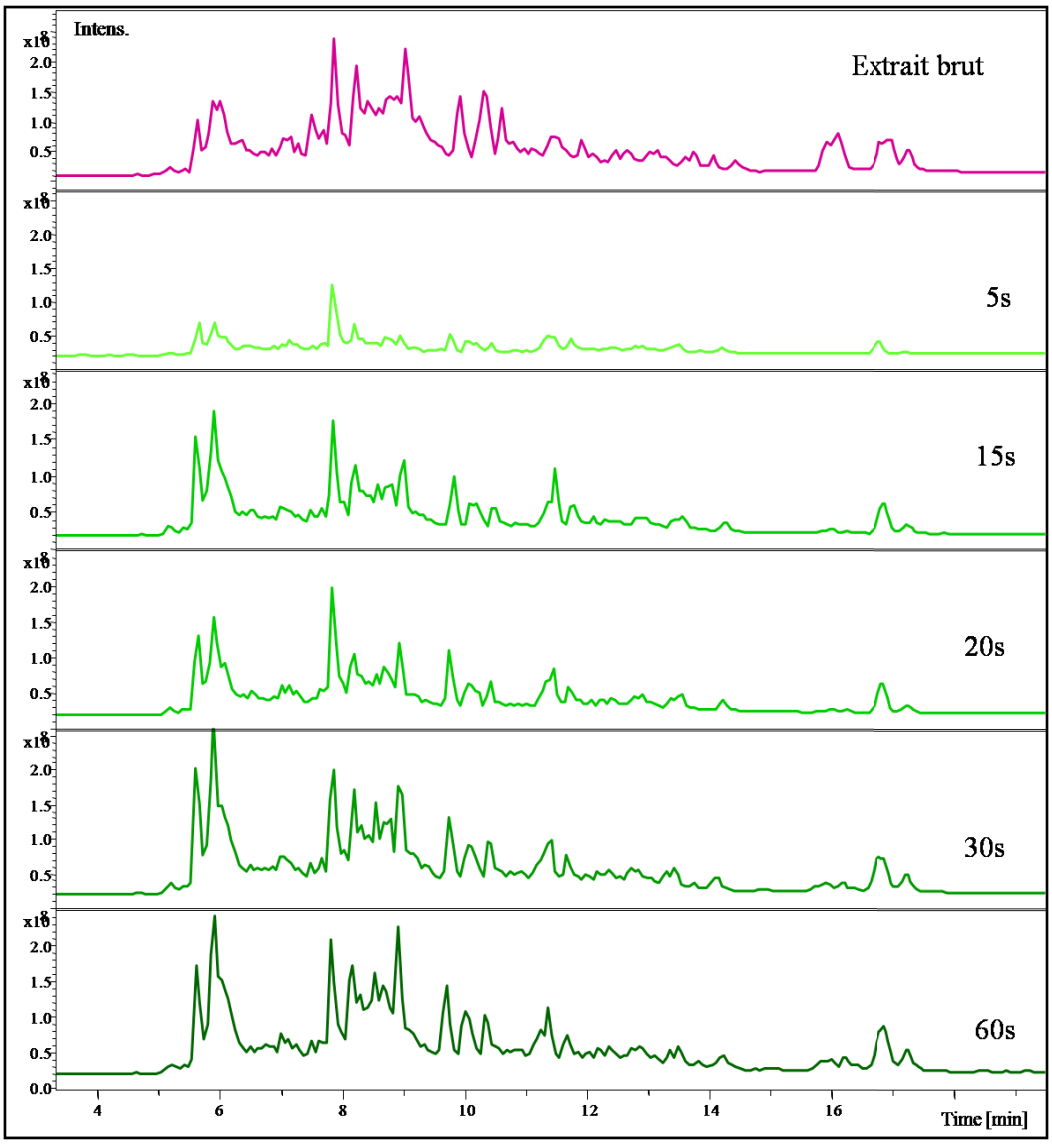


Figure 79 : Chromatogrammes obtenus par CLHP-SM en mode (+)-ESI pour l'extrait brut de *T. atomaria* ainsi que pour ses extraits méthanoliques de surface aux cinq temps d'exposition.

Tableau 21 : Illustration d'une matrice issue du pré-traitement d'analyses par CLHP-SM d'une série d'échantillons de *T. atomaria* (Lignes : variable définie par un temps de rétention et un rapport *m/z*, colonnes : échantillons ; données : aire de la variable dans un échantillon)

N° de la variable	ES1_5s	ES2_5s	ES3_5s	. .	ES1_60s	ES2_ 60s	ES3_ 60s
1	423359,601	416318,272	975399,289	· ·	2158159,8	1188400,47	1193563,97
2	210648,275	156166,595	550456,043	· ·	1,11E+07	0	841744,714
3	1132572,51	1500303,05	441402,372	· ·	892038,839	222819,032	770943,593
4	181897,974	197785,32	189130,032	· ·	637795,512	0	249333,2
5	2,09E+07	2,26E+07	253230,81	· ·	3,16E+07	1619796,82	5217842,07
6	7215087,52	6299956,61	2663593,77	· ·	858988,402	353291,094	0
7	1683322,35	743772,324	449747,324	· ·	6582208,77	333422,94	0
8	887678,019	3101063,74	3795911,13	· ·	8990759,76	0	0
9	360027,121	846157,378	1180394,9	· ·	2980601,42	0	0
10	641780,241	741914,129	1289880,9	· ·	725188,156	0	3218985,55
11	351276,384	233332,902	224692,669	· ·	1059105,94	1178716,89	0
12	1,16E+07	2232375,18	8800894,05	· ·	2904463,88	2,42E+07	0
13	676086,265	201237,312	954022,5	· ·	4953187,78	588590,065	1108304,1
14	703635,884	703134,576	682561,715	· ·	2202920,29	0	714825,41
15	700270,195	1449226,43	0	· ·	726864,198	0	0
.	.	.	.	. .	.	.	.
.	.	.	.	. .	.	.	.
.	.	.	.	. .	.	.	.
.	.	.	.	. .	.	.	.
1996	1456543,8	651480,654	0	· ·	1437884,56	0	0
1997	1463551,86	666121,212	0	· ·	1478672,35	0	2238159,85
1998	2240520,75	702712,771	690722,429	· ·	1490287,96	720057,278	2339922,09
1999	721889,124	697179,265	708117,506	· ·	3075919,66	665979,174	665280,86
2000	668384,484	696521,347	0	· ·	737180,903	706067,46	1468731,45
.	.	.	.	. .	.	.	.

II.3.3. Analyses statistique des données

Pour cette étape, nous avons choisi de travailler avec la méthode la plus classiquement utilisée en métabolomique environnementale, à savoir l'analyse en composantes principales (ACP) (Lankadurai et al., 2013). Elle doit permettre la visualisation des différents extraits dans un espace à deux dimensions afin d'identifier des groupes homogènes. L'ACP calcule une matrice indiquant le degré de similarité entre les variables quantitatives, ici chaque molécule détectée et quantifiée par LC-MS, permettant la projection des variables dans un espace 2D. Nous avons utilisé l'indice de similarité le plus classiquement employé en ACP, le coefficient de corrélation de Pearson. Les ACP sont similaires que l'on travaille sur des jeux

de données normalisées ou pas. Le cercle de corrélation que l'on peut obtenir en projetant les variables sur les deux axes F1 et F2 n'a pas permis de mettre en évidence l'importance de certaines molécules en particulier (Figure 80C). Ces données ne seront donc pas montrées dans ce document.

L'annotation du jeu de données à partir de la base de données spectrales sous forme d'un tableau Excel a permis d'identifier entre 1500 et 2000 pics (variables) selon les mois. Plusieurs éléments ont été testés pour déterminer notre protocole de suivi saisonnier des signatures de surface :

(i) une comparaison entre les extraits surfaciques aux différents temps et l'extrait brut total (correspondant au même thalle) a d'abord été réalisée pour vérifier et visualiser la spécificité de l'extraction de surface et l'évolution de cette extraction en fonction du temps de trempage,

(ii) ensuite, nous avons comparé avec cette approche multivariée les extraits méthanoliques avec ceux obtenus par le mélange méthanol/dichlorométhane afin de sélectionner le solvant d'extraction le plus adapté,

(iii) enfin, nous avons testé la significativité des métabolites mineurs en réduisant le seuil de sensibilité de l'analyse ; ce qui a permis de générer des matrices avec un nombre moins important de variables.

(i) La Figure 80, qui correspond à une ACP sur les extraits méthanoliques de surface ainsi que les extraits bruts d'un même mois (juillet, 2013) montre clairement la descrimination des échantillons en deux groupes. Les trois réplicats d'extraits bruts forment le premier groupe avec des points très dispersés dans l'espace. Le deuxième groupe correspond aux différents extraits surfaciques dont la répartition est beaucoup plus homogène. En comparant les échantillons du deuxième groupe entre eux, nous avons remarqué que, quelque soit le mois de prélèvement, les extraits surfaciques à 5, 15 et 20s sont regroupés tandis que les extraits de surface correspondants à des temps d'extraction plus longs (30 et 60s) forment un autre groupe moins homogène et plus proche de celui des extraits bruts. Cette *clusterisation* se retrouve quel que soit le mois sauf le mois de février (Cf. Annexe 13). Ces observations sont cohérentes avec les données de mortalité cellulaire des algues obtenues en fonction du temps de trempage et qui indiquent qu'un temps de contact des thalles avec le solvant (MeOH) compris entre 15 et 30s provoque un début de perméabilisation membranaire qui induit l'extraction de métabolites intracellulaire. Il est intéressant de noter que les extraits surfaciques semblent beaucoup plus reproductibles que les extraits bruts. Ceci peut être mis

en lien avec la diversité plus importante de molécules extraites mais aussi la difficulté à accéder aux structures intracellulaires dans le cas des extraits bruts.

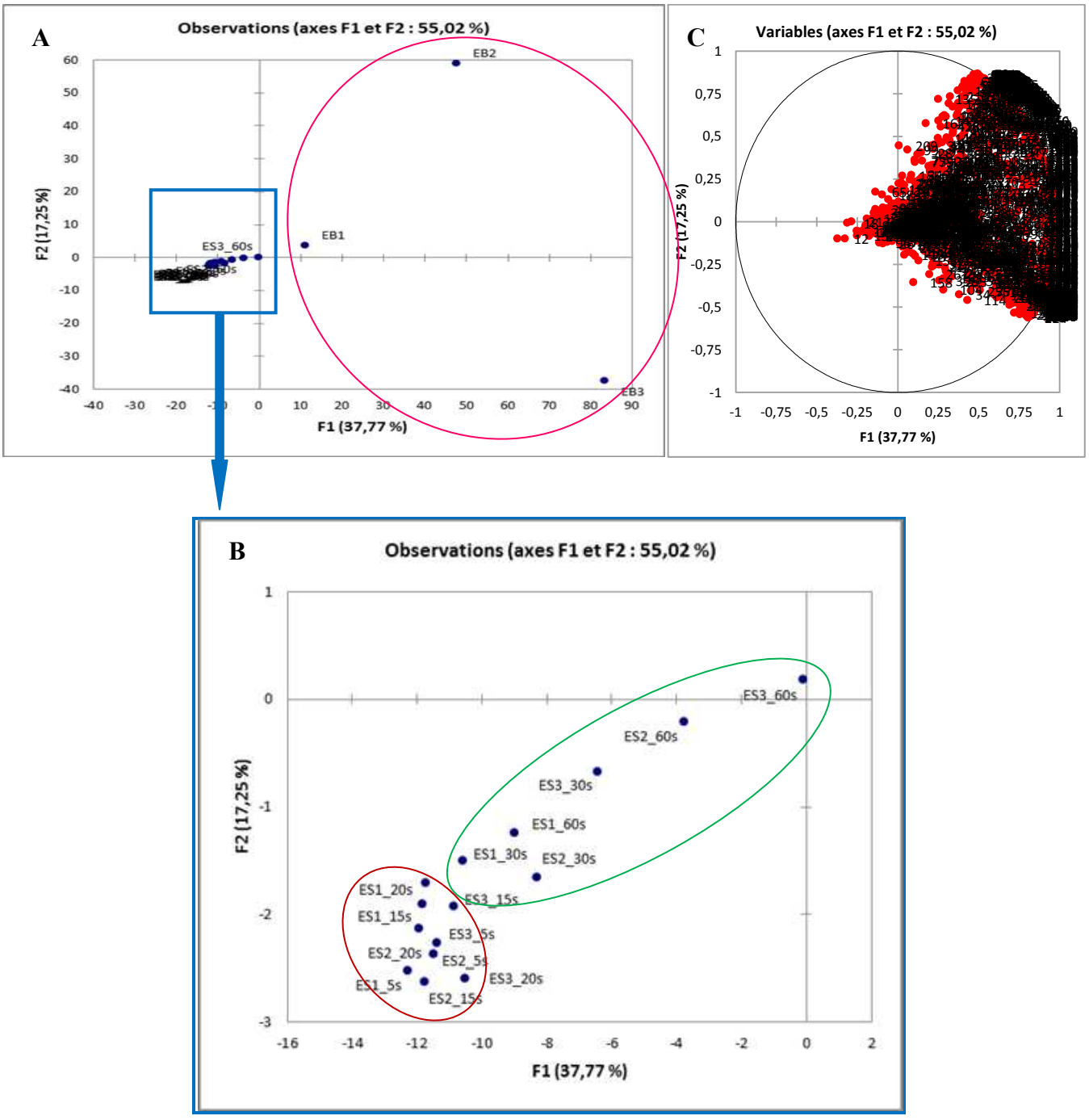


Figure 80 : Analyse par ACP des signatures chimiques obtenues à partir d'échantillons de *T. atomaria* prélevés en juillet 2013. (**A**) Vue générale permettant la discrimination entre l'extrait brut et les extraits surfaciques, (extraction au méthanol), (**B**) Agrandissement de **A** montrant la distinction entre les extraits surfaciques en fonction des différents temps d'extraction, et (**C**) Cercle de corrélation obtenu par projection des variables sur les deux axes F1 et F2.

On peut noter également que le « blanc » solvant d'analyses CLHP-(MeOH) a été inclus dans ces ACP sans qu'elles soient modifiées. Dans un souci de lisibilité, nous n'avons donc pas inclus ces échantillons dans les résultats présentés au niveau de ce chapitre.

(ii) Si on regarde la répartition des extraits surfaciques méthanol/dichlorométhane par ACP (Figure 81), on observe la même différentiation avec les extraits bruts que précédemment. Cependant, les différences entre extraits surfaciques aux différents temps de trempage semblent moins significatives quel que soit le mois observé. Pour certains mois, on observe cependant que les extraits de 60s se dégagent des temps inférieurs de contact, tout en étant plus proches des extraits bruts (mars, avril, mai, mais surtout juin et juillet). Bien qu'au niveau de l'étude de la viabilité cellulaire, une perméabilité membranaire ait été observée entre 20 et 30s de trempage, cela ne semble pas totalement relié avec les métabolites extraits même si la tendance générale reste la même. L'interprétation liée aux extractions par le mélange méthanol/dichlorométhane semble moins claire en ce qui concerne l'extraction de surface, ce qui nous a amené à travailler pour la suite de l'étude uniquement avec les extraits de surface obtenus au MeOH.

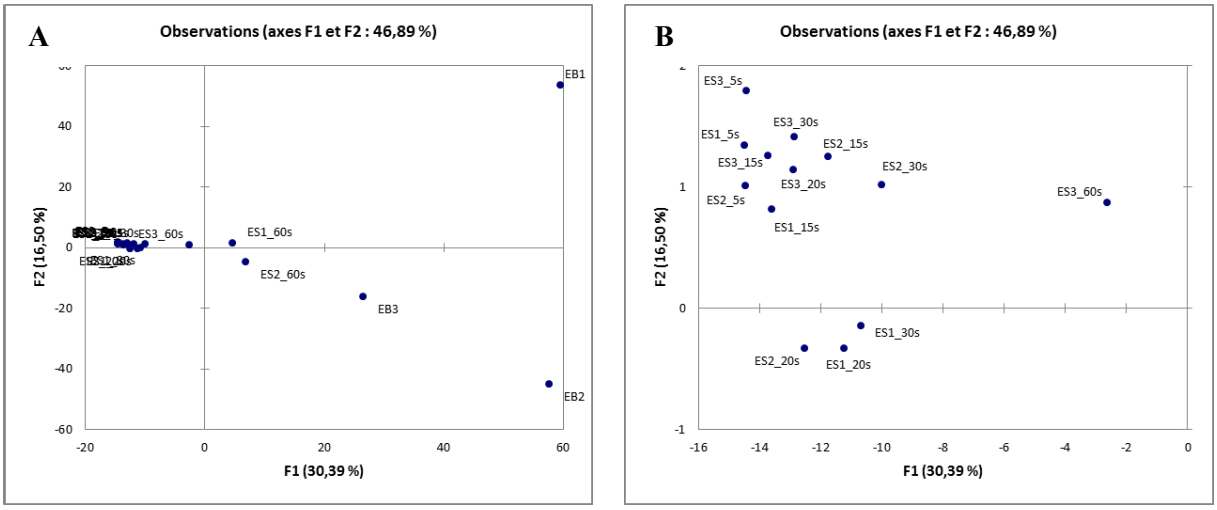


Figure 81 : Représentation par ACP correspondant à (**A**) la discrimination entre extraits bruts et extraits surfaciques MeOH/CH_2Cl_2 et à (**B**) à la différenciation entre ces extraits surfaciques aux différents temps d'extraction (Exemple : juin 2013).

(iii) Enfin, nous avons testé le niveau de sensibilité à choisir pour l'acquisition des molécules par détection SM. L'objectif était notamment de réduire le nombre de variables pour espérer pouvoir interpréter les cercles de corrélation que l'on peut obtenir en projetant les variables sur les deux axes F1 et F2. Ceci nous aurait permis de dégager certaines variables explicatives, donc certaines molécules caractérisant les extraits surfaciques d'intérêt. Nous

avons diminué la sensibilité de la détection analytique afin d'obtenir des jeux de données d'extraits surfaciques constitués seulement d'une trentaine de molécules. Ensuite, nous avons calculé des matrices de distance basées sur l'indice de dissimilarité de Bray & Curtis (1957) pour chacun des deux jeux de données et ce pour chaque mois de l'étude. Nous avons finalement pu calculer un coefficient de corrélation de Pearson (r) entre les deux matrices de dissimilarité pour chaque mois grâce à des tests de Mantel (Tableau 22).

Tableau 22 : Tests de Mantel portant sur la corrélation entre les matrices de dissimilarité des données de métabolomes de surface réduites ou non
(Corrélation significative si p < 0,05)

	r	p	n
Février	0,678	<0,0001	15
Mars	0,700	<0,0001	15
Avril	0,389	<0,0001	15
Mai	0,248	<0,01	15
Juin	0,072	> 0,05	15
Juillet	-0,154	>0,05	15

r : coefficient de corrélation de Pearson
n : nombre d'échantillons analysés

Les matrices semblent très bien corrélées en février et mars mais cette corrélation décroît fortement au printemps et devient non significative en été (juin et juillet). Ces résultats indiquent que nous ne pouvons pas utiliser les jeux de données réduits en nombre de molécules. Par ailleurs, l'évolution saisonnière de la corrélation pourrait aussi montrer que l'expression métabolique évolue vers une plus grande part de molécules présentes à de faibles concentrations au printemps et surtout en été.

En récapitulatif, nous avons mis au point un protocole d'extraction des métabolites de surface avec une bonne conservation de l'intégrité cellulaire de l'algue. Deux paramètres ont été évalués puis optimisés : le solvant et le temps d'extraction. Le solvant organique retenu est le méthanol et la durée d'exposition choisie est de 15s. L'approche métabolomique a, quant à elle, montré une bonne cohérence des résultats avec l'approche microscopique en ce qui concerne la descrimination entre les cellules intactes, d'une part, et celles lysées, d'autre part.

III. Variabilité saisonnière du métabolome de surface et des communautés bactériennes associées à la surface de *T. atomaria*

III.1. Du métabolome de surface

Un suivi mensuel du métabolome de surface de *T. atomaria* a été effectué entre février et juillet 2013 c'est-à-dire pendant la période de présence de l'algue sur notre site d'étude à Carqueiranne (Var). Pour chaque mois étudié, la même répartition des signatures des échantillons analysés a été notée [i) groupe 1 : extraits surfaciques avec t < 20s, ii) groupe 2 : extraits surfaciques avec t > 30s, et iii) groupe 3 : extraits bruts] sauf pour le mois de février. Aucune *clusterisation* n'a été observée, y compris pour les extraits bruts (Figure 82A). Nous avons donc écarté les réplicats de février dans ce suivi mensuel, en suspectant une erreur de manipulation, d'autant plus que ces regroupements aberrants n'étaient pas observés pour l'extraction dihlorométhane/méthanol de ce mois.

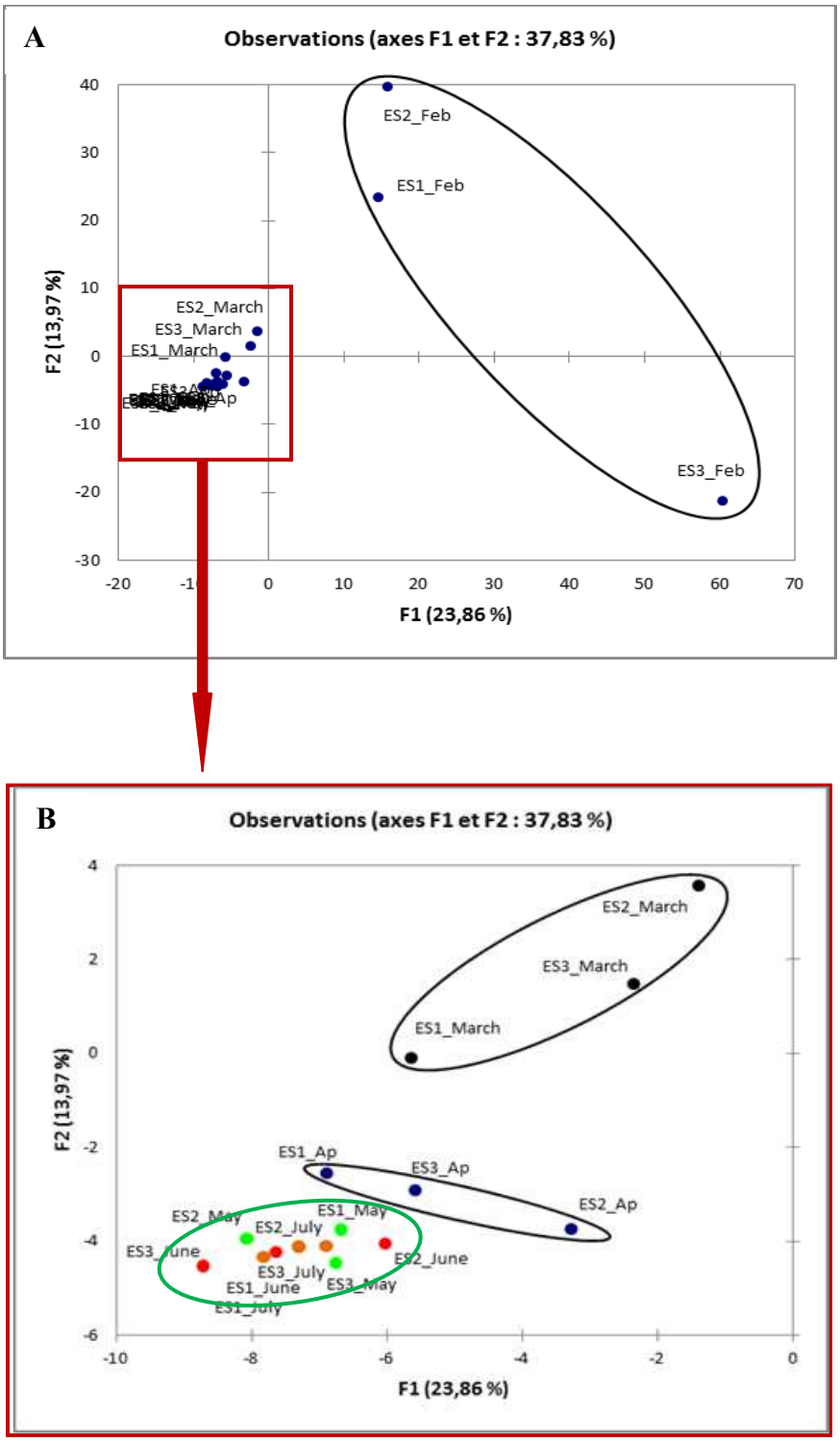


Figure 82 : Analyse par ACP correspondant aux signatures chimiques des extraits surfaciques méthanoliques (15s). (**A**) Vue générale montrant la discrimination du mois de février et (**B**) agrandissement montrant la distinction entre les échantillons prélevés les autres mois

Une vérification de la l'intégrité membrane des cellules pour tous les mois a été effectuée (Tableau 23) à l'exception du mois de février.

Tableau 23 : Suivi de l'intégrité membranaire (échantillons traités au MeOH) de mars à avril par comptage au microscope à épifluorescence. Les valeurs dans le tableau représentent le pourcentage des cellules mortes par rapport à C^- (cellules vivantes) et C^+ (cellules mortes).

	C-	5s	15s	20s	30s	60s	C+
Mars	23 ± 5	26 ±5	31±4	39±9	65±5	96±14	100
Avril	26 ± 6	30±6	34±7	44±6	77±14	86±9	100
Mai	25 ± 8	24±7	29±6	57±8	58± 11	100	100
Juin	29 ± 4	34±13	32±6	42±12	69±23	100	100
Juillet	27 ±12	24±10	37±10	58±12	81±15	100	100

En comparant les extraits surfaciques méthanoliques mensuels obtenus à 15s, trois groupes ont été identifiés : le premier et le deuxième groupes correspondent aux mois de mars et d'avril respectivement, alors que le troisième ensemble regroupe les mois de mai, juin et juillet (Figure 82B).

Une évolution saisonnière du métabolome de surface qui se stabilise en période estivale quand l'algue est à son optimum de croissance est donc observée. La molécule Ta2 isolée à partir des échantillons de 2012 comme majoritaire à la surface de l'algue a été retrouvée dans tous les réplicats du suivi mensuel sauf pour deux des triplicats de juillet. L'analyse des chromatogrammes semble indiquer une prédominance en début de période de croissance (Février-mars) de molécules polaires, qui disparaîssent ensuite progressivement jusqu'à une absence totale de ces molécules en juin et juillet (Zone A colorée sur la figure 83). Les molécules peu polaires tendent aussi à diminuer pendant l'été (Zone B colorée sur la figure 83).

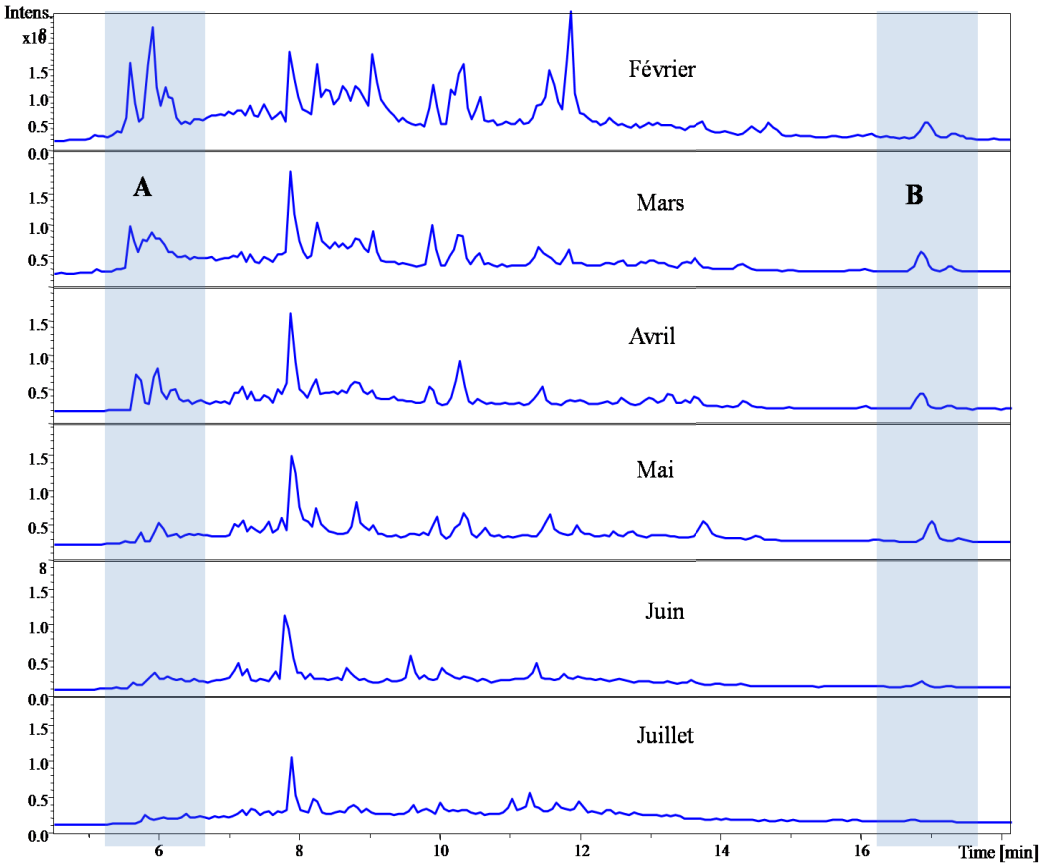


Figure 83 : Variation saisonnière de la signature chimique de l'extrait surfacique méthanolique (15s) selon les chromatogrammes obtenus par CLHP-SM en mode (+)-ESI.

Ce phénomène peut être dû à l'état de développement des thalles ainsi qu'aux variations des conditions du milieu naturel d'un mois à l'autre. Cependant, cette analyse doit être regardée avec précaution étant donné que le pourcentage de variabilité représentée par les deux axes principaux F1 et F2 est relativement faible (37,83%). La représentation de F1 et F3 (ACP non montrée) valide pourtant la ségrégation entre les échantillons prélevés au printemps (mars, avril) et en été (mai, juin, juillet).

III.2. Evolution des communautés bactériennes associées à la surface

En utilisant le Kit Dneasy Blood and tissus Hand book (Qiagen, Courtaboeuf, France), nous avons pu extraire l'ADN bactérien total associé à la surface de *T. atomaria* après grattage. On peut noter que l'utilisation du kit validé pour l'extraction de l'ADN bactérien de biofilms sur surfaces artificielles (Power Soil DNA Isolation kit, MoBio, Briand et al., 2012) n'a pas permis de récupérer d'ADN. Ce kit comprend plusieurs étapes de purification

nécessaires à l'élimination des exopolymères matriciels des biofilms, ce qui induit un rendement d'extraction plus faible. L'absence d'ADN obtenu avec ce kit pourrait indiquer la présence d'une densité plus faible de bactéries et/ou d'une matrice exopolymérique moins importante que pour des biofilms obtenus à partir de surfaces artificielles.

Tous les mois, trois thalles ont servi à l'extraction et trois morceaux égaux de chaque thalle ont été utilisés. La surface moyenne de chaque morceau est d'environ 9 cm^2. Cette surface a permis d'obtenir une matière première suffisante en termes d'ADN total et qui n'est pas significativement différente d'un mois à l'autre ($p > 0,05$) avec des quantités d'ADN comprises entre 20 et 60 $ng.\mu l^{-1}$ (Figure 82).

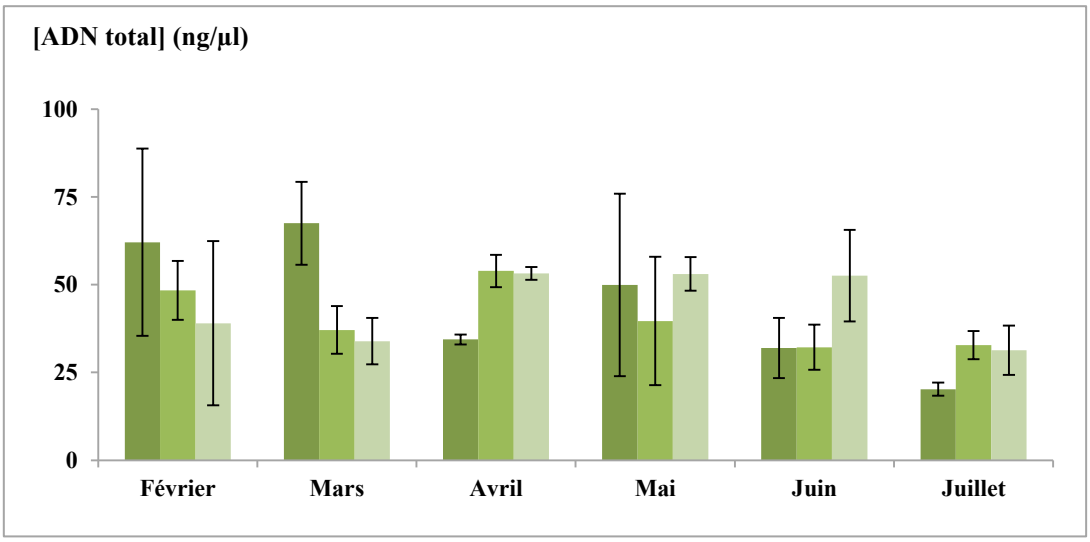


Figure 84 : Quantités mensuelles d'ADN total présent à la surface de *T. atomaria*

Les biofilms bactériens de surface ont été étudiés par DGGE. Préalablement à cette analyse, une étape d'amplification de l'ADN ribosomal 16S (couple d'amorces 907RM–358F) a été réalisée. Cette région est classiquement choisie car l'opéron ribosomal est présent en abondance dans tous les organismes procaryotes : il est constitué d'une région conservée (non variable) et d'une région plus variable permettant l'identification des différentes bactéries. Les amorces ont été choisies car elles ont déjà été utilisées lors de l'identification de bactéries planctoniques en Méditerranée. L'une d'entre-elles (358F) est une amorce universelle spécifique qui contient une queue CG permettant de maintenir la stabilisation de l'ADN lors de sa dénaturation et de réaliser la DGGE (Schauer et al. 2000). Une fois le matériel génétique amplifié, une électrophorèse sur gel d'agarose en gradient dénaturant

(DGGE) a été réalisée à l'INRA de Thonon-les-Bains (B. Leberre, UMR CARRTEL). Cette technique permet de séparer les amplicons par rapport à leurs séquences nucléotidiques et non en fonction de leurs tailles, comme le fait une électrophorèse classique. La DGGE exploite les conditions de rupture de la structure bi-hélicoïdale de l'ADN. En effet, elle va permettre la dénaturation de l'ADN par rupture des liaisons hydrogènes situées entre les bases azotées de chaque brin. Cette dénaturation va donc dépendre de la composition en nucléotides de l'ADN étudié. Plus l'ADN contient de fragment GC, plus celui-ci est stable puisque l'appariement CG se fait par trois liaisons hydrogène alors que l'appariement AT n'en possède que deux. L'altération de la structure de l'ADN peut s'effectuer par la chaleur. Cette température de dénaturation permet de caractériser les fragments d'acides nucléiques, on parle alors de température de fusion. Elle est définie comme la température pour laquelle 50% de l'ADN est sous la forme double brin et 50% sous la forme simple brin. Le principe de séparation se fonde sur le fait que si deux fragments diffèrent d'une seule paire de base, leurs températures de fusion seront distinctes. La dénaturation de l'ADN va se produire sous les effets combinés de la température du bain dans lequel le gel est déposé (généralement 60°C) et de la concentration en substance dénaturante. Cela va entraîner la rupture de la structure bi-hélicoïdale du fragment et affecter sa mobilité sur le gel. Ainsi, tous les fragments présentant des ADN différents vont être représentés par des bandes distinctes sur le gel. Chacune d'entre elle va représenter une espèce ou un groupe d'espèces identiques, c'est pourquoi la dénomination OTU (*Operational Taxonomic Unit*) sera préférentiellement utilisée pour décrire l'analyse de la DGGE en termes de diversité (Figure 85). Chaque OTU va donc être caractérisée par une distance de migration et le nombre de bandes permet d'accéder à la richesse spécifique de la communauté présente dans l'échantillon (Schauer et al., 2000 ; Dorigo et al., 2005).

Une analyse semi-quantitative tenant compte à la fois du nombre de bandes, de leur position mais aussi de leur intensité peut-être réalisée (e.g. Schauer et al., 2000). Cette approche n'est possible que lorsque l'interprétation des gels est effectuée à l'aide d'un logiciel de traitement d'image et qu'elle ne repose pas sur une appréciation visuelle. La démarche qualitative attribue en effet autant d'importance à une OTU peu représentée qu'à une OTU fortement représentée, ce qui limite la portée de l'analyse. Cependant, il faut préciser que l'interprétation quantitative des profils DGGE est à manier avec précaution étant donné les biais méthodologiques possibles (extraction et/ou amplification préférentielle, nombre de copies du gène variable d'une espèce à l'autre).

Cette méthode d'empreinte moléculaire ne permet pas l'identification des espèces de bactéries présentes, mais conduit à l'étude de la richesse spécifique et à la comparaison des structures de communautés bactériennes basée sur les taxons bactériens majoritaires. La richesse spécifique est un critère utilisé pour décrire la diversité spécifique ou la variété en espèces d'une communauté bactérienne. La richesse spécifique de biofilms associés à la surface de l'algue a été déterminée en calculant le nombre d'OTU. Donc, l'OTU désigne soit une espèce, soit un groupe d'espèces identiques, en se référant aux bandes distinctes sur le gel DGGE (Dorigo et al. 2005).

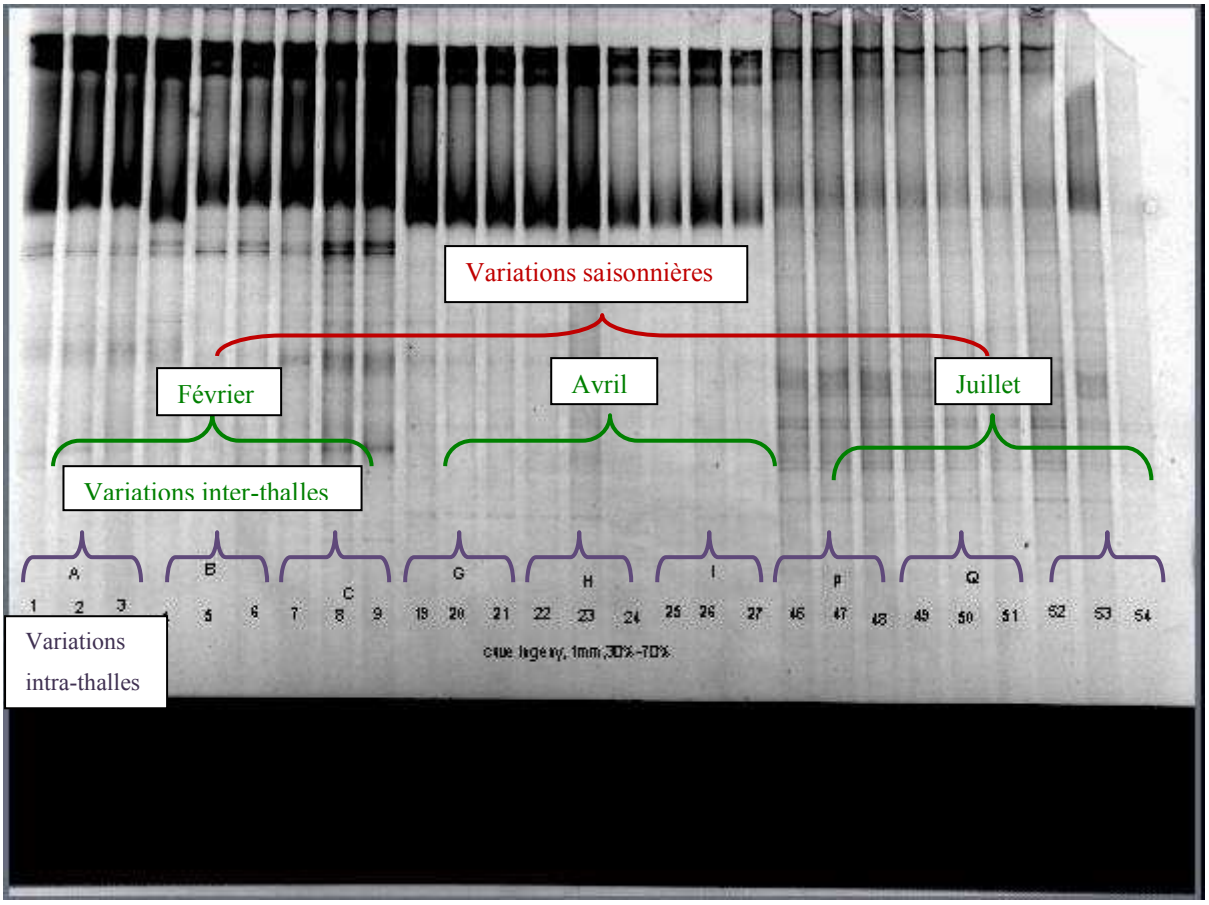


Figure 85: Gel DGGE des produits de PCR des biofilms présents à la surface de *T. atomaria* de tous les mois étudiés

Afin d'étudier les variations saisonnières des communautés bactériennes du biofilm de *T. atomaria*, une étude préliminaire méthodologique a été effectuée. L'objectif était de définir notre stratégie d'échantillonnage, et donc pour cela de vérifier que les variations mensuelles des structures de communautés n'étaient pas inférieures aux variations inter-thalles à un temps donné (entre trois individus différents récoltés au même moment), elles-mêmes pas inférieures aux variations intra-thalles (entre trois parties d'un même thalle). Cette étude a été

menée sur trois morceaux de thalles, pour trois thalles sur trois mois (février, avril et juillet). Les résultats obtenus par MDS (après calcul d'une matrice de dissimilarité basée sur l'indice de Bray & Curtis, Ramette, 2007) montrent que les variations de communautés bactériennes intra-thalles observées par DGGE sont très majoritairement inférieures aux variations inter-thalles. Ces données montrent aussi que la répétabilité à l'échelle mensuelle est bonne entre trois thalles. Par ailleurs, une variation mensuelle significative peut être observée (Figure 86). Ces résultats nous ont permis de valider la récolte et l'analyse d'un échantillon sur trois thalles différents par mois pour le suivi temporel sur le site de Carqueiranne.

Les algues récoltées pendant les mois de février et mars semblent posséder des communautés bactériennes proches, de même que mai, juin et juillet. La structure des ces communautés en avril semble différente des autres. Dans tous les cas, les communautés des réplicats mensuels sont très similaires (Figure 87).

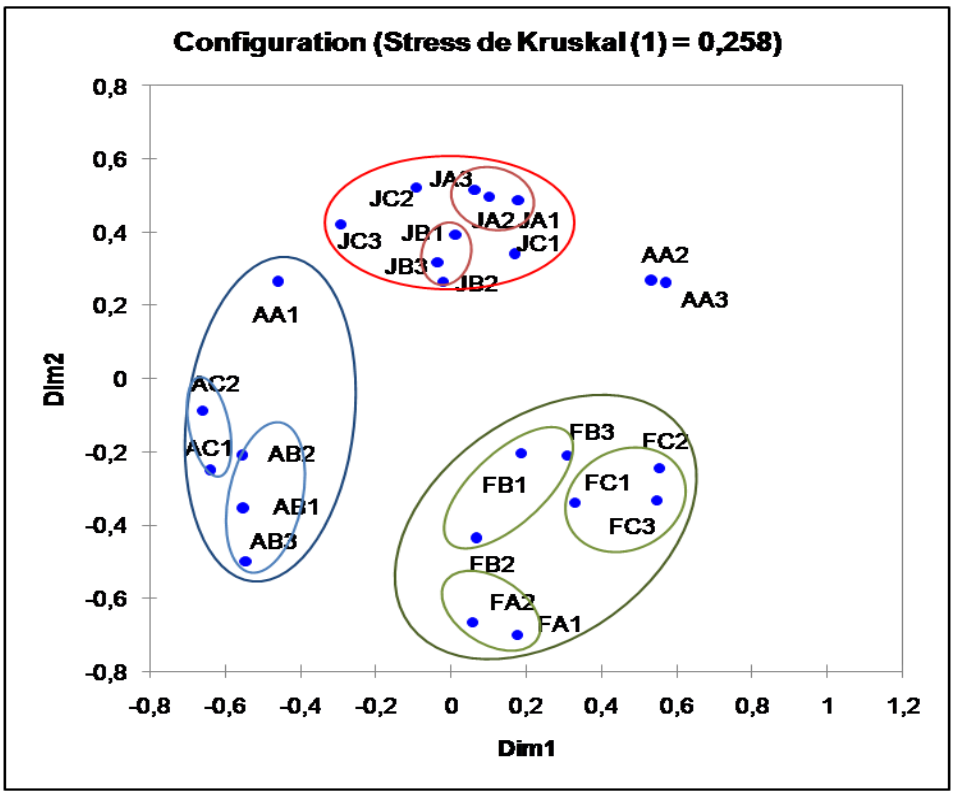


Figure 86 : Représentation par MDS des variations intra-(1,2 et 3), inter-thalles (A,B et C) et mensuelles (février F, avril A et juillet J) des communautés bactériennes de surface de *T. atomaria* prélevée à Carqueiranne.

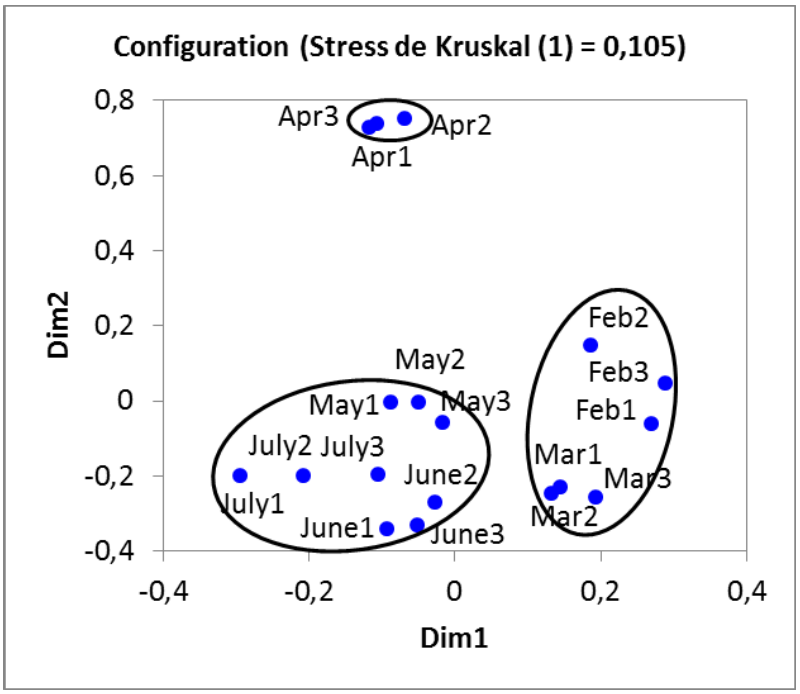


Figure 87 : Représentation par MDS de la matrice de dissimilarité correspondant aux communautés bactériennes présentes à la surface de *T. atomaria* des six mois (février à juillet 2013).

Tableau 24 : Richesse spécifique (nombre d'OTU ± écart-type) sur les thalles de *T. atomaria* de février à juillet 2013 à Carqueiranne

	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet
Richesse (OTU)	7 ± 0	4 ± 1	2 ± 0	10 ± 1	12 ± 0	10 ± 0

L'analyse de la richesse spécifique indique un nombre d'OTU relativement faible par rapport à d'autres études de communauté de surface d'algues basées sur la DGGE (Tujula et al., 2010 ; Nasrolahi et al., 2012 ; Stratil et al., 2013). Seuls Sneed & Pohnert (2011) ont rapporté des richesses similaires pour une algue verte en Floride (*Dictosphaeria* sp.). Dans cette étude, le nombre d'OTU tend à augmenter en période estivale.

Aucune OTU n'est commune à tous les échantillons. Pour le groupe « mai-juin-juillet », 4 OTU sont communes à tous les échantillons et 5 OTU communes à 50% des échantillons. Ces résultats montrent que la richesse bactérienne semble plus importante en période estivale où l'algue est bien établie et que les communautés semblent constituées d'OTU spécifiques pendant cette période, ce qui n'est pas observé sur les communautés moins riches du printemps.

L'étude de Lachnit et al. (2011), révèle que les communautés bactériennes faisant partie des biofilms de trois algues marines étudiées (*Gracilaria vermiculophylla*, *Fucus vesiculosus* et *Ulva intestinalis*) ont des tendances saisonnières et inter-spécifiques distinctes, mais présentent des similitudes intra-spécifiques. D'autres études ont montré que la flore bactérienne des algues varie avec les saisons. La distinction saisonnière des bactéries épiphytes est généralement influencée par des facteurs biotiques et abiotiques tels que les conditions nutritionnelles du milieu, la concentration en certains éléments nutritifs et la température de l'eau (Laycock, 1974 ; Borum, 1985 ; Gil et al., 2006 ; Richardson, 2006 ; Peterson et al., 2007 ; Staufenberger et al., 2008 ; Bengtsson et al., 2010 ; Tujula et al., 2010 ; Duong et al., 2012).

Dans cette étude, il est intéressant de noter que les biofilms qui possèdent la plus grande richesse spécifique sont prélevés sur des thalles d'algues récoltés durant la saison chaude (entre 10 et 12 pour les mois de mai, juin et juillet). En revanche, les biofilms obtenus au printemps (mars et avril) enregistrent les plus faibles nombres d'OTU (entre 2 et 4). Notons que pour tous les mois les écart-types des triplicats sont très faibles (entre 0 et 1), ce qui indique une bonne répétabilité des résultats. Le fait de trouver des richesses spécifiques variables indique qu'il existe des différences saisonnières entre les communautés bactériennes formant le biofilm de *T. atomaria*.

Si on observe la variabilité mensuelle de février à juillet 2013 à partir du métabolome de surface et des communautés de surface de *T. atomaria*, une ségrégation entre hiver-printemps et été semblent émerger. Nous avons testé l'hypothèse d'une corrélation entre les deux jeux de données, d'une part le métabolome et d'autre part les communautés bactériennes. Pour cela, nous avons calculé des matrices de dissimilarité basées sur l'indice de Bray & Curtis, puis nous avons appliqué un test de Mantel qui s'est révélé non significatif ($p > 0,05$). Ceci indique simplement que les variations de l'ensemble du métabolome de surface ne semble pas directement reliées à celles des communautés bactériennes de surface, ce qui n'exclue evidement pas qu'un certain nombre de ces molécules le soit. Ceci indique qu'il serait maintenant nécessaire d'approfondir cette étude par des analyses menées par métabolomique ciblée.

IV. Bactéries associées à la surface de *T. atomaria*

IV.1. Isolement des bactéries associées à la surface

IV.1.1. Isolement, mise en cultures et obtention du souchier bactérien

L'isolement des bactéries a été effectué en juin 2012 à partir de thalles appartenant au lot qui a également servi aux observations par MEB. Deux méthodes d'isolement ainsi que deux milieux gélosés (VNSS-agar et ZoBell-agar) ont été utilisés dans le but de récupérer le plus grand nombre possible d'isolats bactériens distincts. Nous avons remarqué une différence quantitative de colonies formées avec les deux techniques d'isolement. En effet, la première méthode, qui consiste à tremper des thalles dans de l'ASW et à décrocher les bactéries par traitement aux ultrasons a conduit à l'apparition de plusieurs dizaines de colonies sur les boîtes de Pétri contenant du VNSS-agar. Cela nous a amené à sélectionner 23 colonies différentes. La deuxième méthode consistant à frotter des thalles à l'aide d'un coton-tige stérile a également permis d'observer des colonies mais moins nombreuses que celles obtenues avec la première méthode. Ainsi, seulement trois colonies poussant sur du VNSS-agar ont été retenues (Figure 88). Ces choix ont été effectués sur la base de la forme, de la couleur et de la taille des colonies. Sur les boîtes de Pétri contenant du ZoBell-agar, les bactéries qui se sont développées étaient mélangées à des mycélia de champignons. Ces échantillons ont donc été éliminés et seul le milieu gélosé de culture VNSS-agar a été conservé pour la suite de ces travaux. Ce milieu étant considéré comme pauvre en nutriments, ce choix est également justifié par le fait que des études antérieures ont montré que la cultivabilité des bactéries marines est considérablement améliorée par l'utilisation de milieux de culture pauvres parce que provenant d'un milieu riche en éléments nutritifs, elles sont capables de les stocker et les utiliser en cas de déficience (Jensen et al., 1996). Après étalement des 26 colonies choisies sur des boîtes de Pétri contenant du VNSS gélosé, un total de 47 colonies a été obtenu. Ces colonies ont été de nouveau mises en culture sur le même milieu afin de vérifier leur pureté.

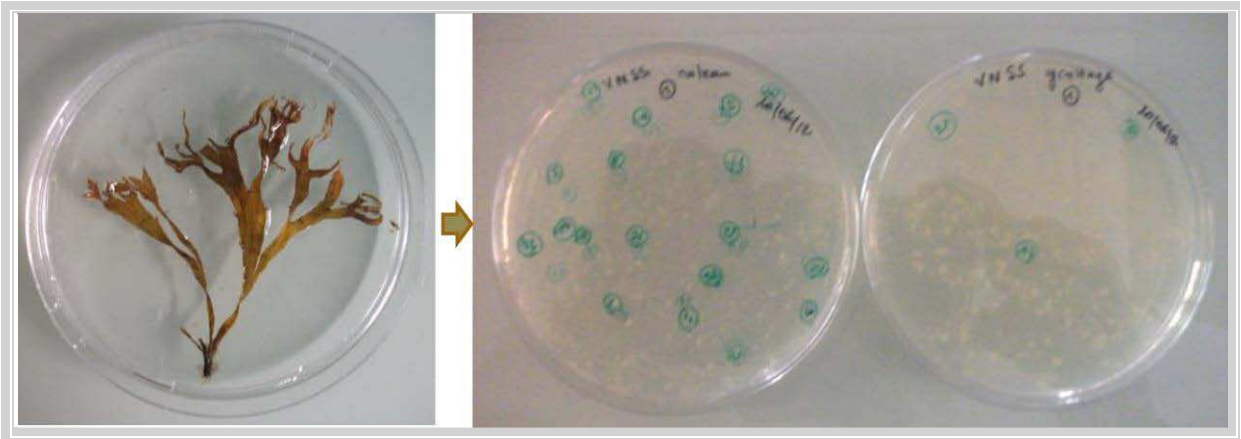


Figure 88 : Isolement de souches bactériennes issues de la surface de *T. atomaria* et mise en culture sur milieux gélosés

Chacune de ces colonies pures a été cultivée en milieu liquide dans 10 ml de VNSS Ces cultures ont été incubées à 20 °C avec une agitation de 120 rpm pendant toute une nuit. Le lendemain, les bactéries en phase exponentielle (en se basant sur le temps moyen de mise en phase exponentielle pour les bactéries marines que nous avons déjà dans la collection de Toulon) ont été conservées par cryogénisation en cinq replicats pour chaque souche. Ces 47 souches bactériennes ont été ajoutées à la Toulon Collection (TC) qui comprenait déjà 15 souches pionnières isolées à partir de substrats artificiels, et sont référencées de TC16 à TC62.

IV.1.2. Sélection des souches pour l'étude

Une première sélection a été effectuée sur la base de la capacité des bactéries à croître en milieu VNSS liquide. Cette condition est primordiale pour la suite de nos travaux (bio-essais anti-adhésion, obtention des extraits bruts bactériens,…etc). Compte tenu de cette condition, cinq souches formant des agrégats dans ce milieu (TC27, TC34, TC35, TC49 et TC58) ont été éliminées. Les souches TC60 et TC62 ont également été exclues car elles présentent, aussi bien en milieu liquide que solide, une croissance très lente (apparition des colonies sur la boîte de Pétri au bout de 4 jours après et absence de turbidité pendant aussi 4 jours pour les cultures liquides). Ensuite, nous avons remarqué qu'il y avait des bactéries semblables à l'échelle des colonies (couleur, forme, taille de la colonie et courbe de croissance). Celles qui présentaient une forte similarité ont été écartées afin d'essayer de travailler sur une diversité maximale de souches. Il s'agit des souches TC25 (≈TC24), TC29 (≈ TC28), TC32 (≈ TC31), TC41 (≈ TC40), TC43 (≈ TC42), TC47 (≈ TC46) et TC51 (≈

TC50). Parmi les 33 souches restantes, cinq d'entre-elles ont été sélectionnées pour leur capacité à adhérer au polystyrène (matériau des microplaques noires 96 puits utilisées dans les bio-essais). Ce test a été effectué deux fois afin de vérifier la reproductibilité de l'adhésion d'une souche. Les bactéries ont été ensemencées à une DO_{600} connue (0,3 dans les puits) et pendant une durée d'incubation de 15h (densité moyenne d'adhésion bactérienne), par référence aux travaux de Camps (2011). L'adhésion des bactéries a été évaluée à travers le calcul d'un ratio d'adhésion qui correspond au ratio entre l'intensité de fluorescence (IF) du témoin bactérien d'adhésion et l'IF du mélange fluorochrome (SYTO® RED 61)/molécule à tester). Ce ratio doit être supérieur à 2,5 pour que l'on considère que qu'il y a suffisamment de bactéries adhérées (Camps et al. 2011). Par conséquent, nous avons choisi les cinq souches qui possèdent les ratios les plus élevés, tout en tenant compte de la différence de critères morphologiques et physiologiques entre les colonies afin d'être sûr de travailler sur des souches distinctes (Figure 89). Les souches finalement retenues sont TC30, TC44, TC48, TC50 et TC55. Cinq souches supplémentaires (TC16, TC23, TC28, TC32 et TC53), ont été choisies afin d'évaluer le potentiel de production de molécules anti-adhésion de la communauté bactérienne associée à la surface algale.

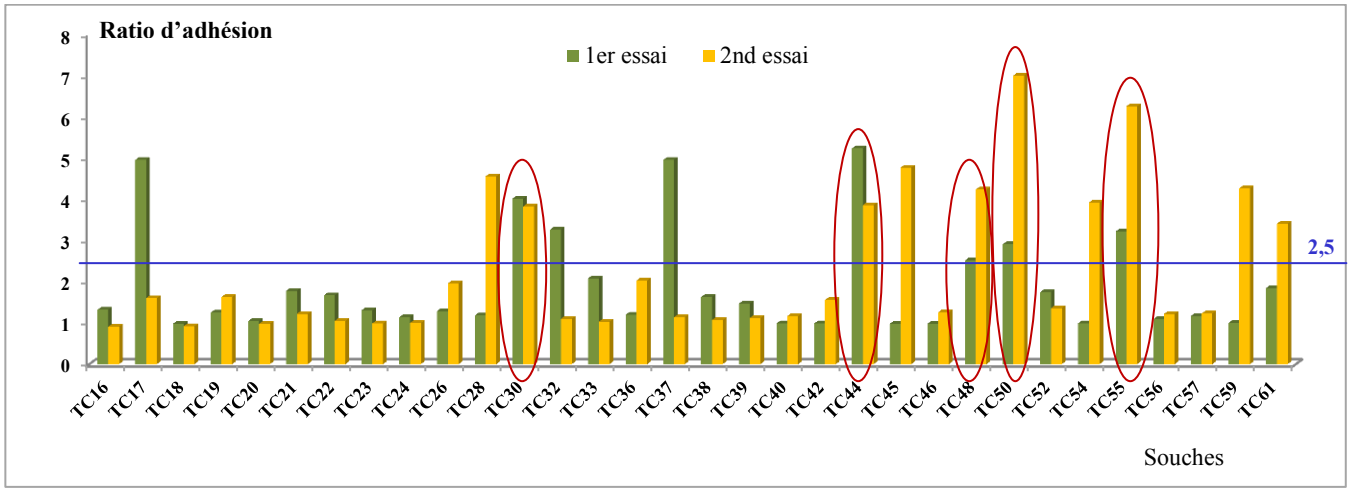


Figure 89 : Capacité d'adhésion au polystyrène des souches de *T. atomaria*
(Ratio d'adhésion = IF bactéries / IF SYTO® RED 61 + ASW)

Les caractéristiques des courbes de croissance ont été l'un des critères qui a permis la sélection des souches pour cette étude. On peut distinguer les quatre phases classiques lors de la croissance microbienne : la phase de latence, la phase de croissance exponentielle, la phase stationnaire et la phase de déclin. Ces phases ont des durées variables en fonction de l'espèce bactérienne. Outre le taux de croissance maximum en phase exponentielle, nous nous sommes

intéressés particulièrement à la phase stationnaire, et ce, pour deux raisons : i) d'une part, pour les souches impliquées dans les bio-essais anti-adhésion puisque l'adhésion bactérienne a été démontrée comme étant maximale durant cette phase (Stepanovic et al., 2000 ; Djordjevic et al., 2002 ; Vesterlund et al., 2005 ; Burton et al., 2007 ; Camps et al., 2011), ii) d'autre part, pour les dix souches sélectionnées afin de tester leur capacité anti-adhésion puisque cette phase est souvent choisie pour la production de métabolites. En effet, durant la phase stationnaire, le taux de croissance est nul en raison d'une déficience du milieu en nutriments. Ces conditions de stress peuvent orienter une bactérie vers d'autres fonctions que la multiplication, à savoir la production de métabolites spécialisés.

Les courbes de croissance pour les dix souches sélectionnées sont données dans la figure 90.

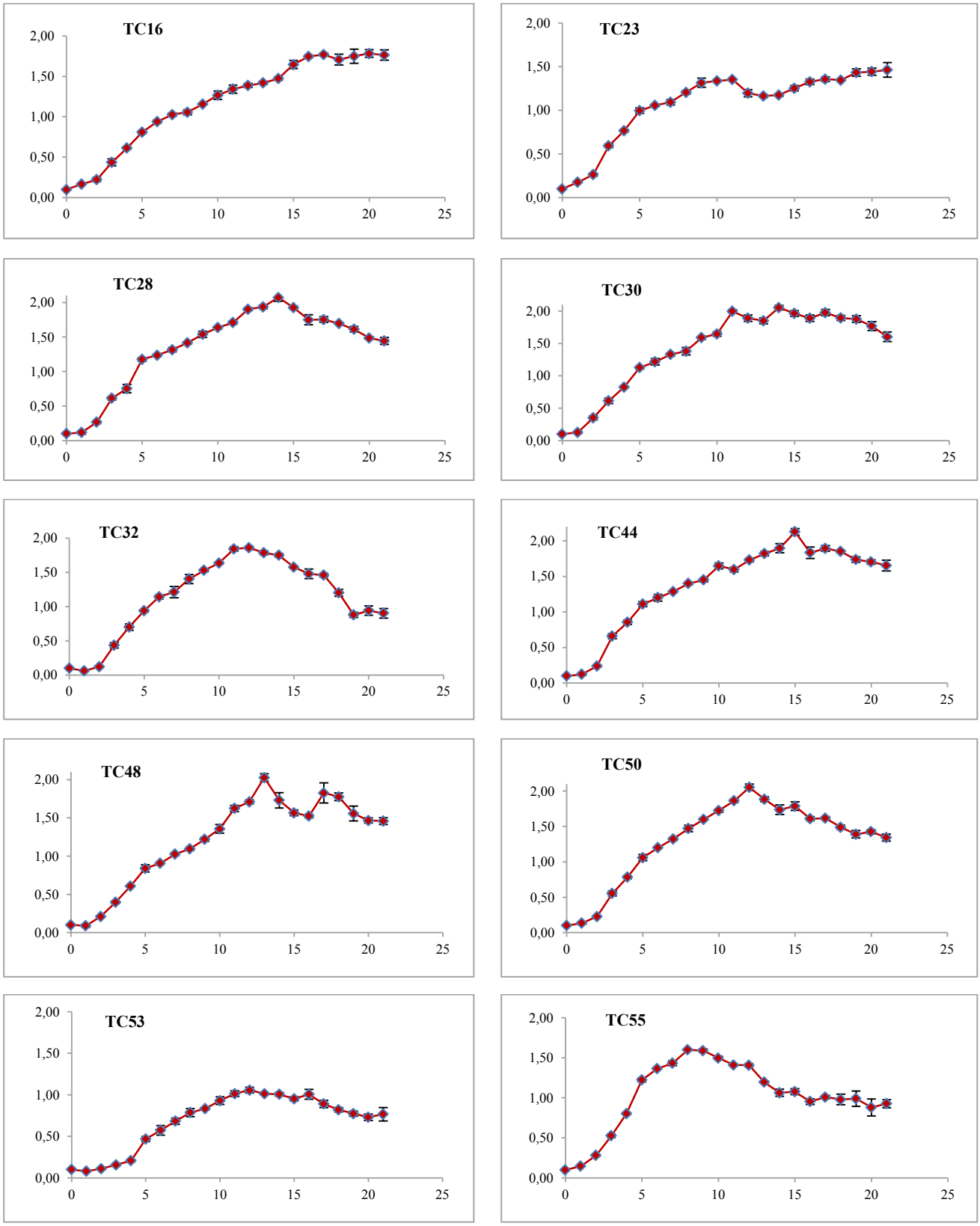


Figure 90 : Courbes de croissance des dix souches isoléesà partir de la surface de *T.atomaria* et sélectionnées pour ce travaux de thèse [DO_{600nm} = f (temps (h))]

Le taux de croissance maximal (μ_{max}) a été calculé durant la phase exponentielle de croissance ; il est caractéristique de chaque bactérie dans des conditions données. Les bactéries TC16, TC28 et TC44 possèdent les μ_{max} les plus faibles, entre 0,120 ± 0,004 et 0,170 ± 0,010 h^{-1}. La souche TC55 présente le taux de croissance le plus élevé avec 0 ,340 ± 0,005 h^{-1} et elle est celle qui atteint la phase stationnaire le plus rapidement (entre 8 et 9h). Les autres souches arrivent en phase stationnaire au bout d'une durée intermédiaire allant de 9 à 13h, avec des taux de croissance compris entre 0,180 ± 0,004 et 0,27 ± 0,004 h^{-1}. Il est intéressant de noter que les souches marines de référence utilisées dans le cadre de ces travaux possèdent une croissance beaucoup plus rapide que celle des bactéries isolées à partir de *T. atomaria*, en particulier pour la souche TC8 qui atteint sa phase stationnaire au bout de 5 à 6h avec un μ_{max} de 0,60 ± 0,01 h^{-1} (Camps et al. 2011). Le temps mis pour atteindre le début de la phase stationnaire ainsi que le taux de croissance maximal (μ_{max}) sont donnés dans le Tableau 25.

Tableau 25 : Détermination des paramètres de croissance des souches isolées à partir de la surface de *T. atomaria* (n = 3)

Souche bactérienne	Début de la phase stationnaire (h)	Taux de croissance maximal (μ_{max}) h^{-1}
TC16	Entre 15 et 17	0,120 ± 0,004
TC23	Entre 9 et 11	0,180 ± 0,004
TC28	Entre 12 et 14	0,170 ± 0,01
TC30	11	0,220 ± 0,008
TC32	Entre 10 et 11	0,270 ± 0,004
TC44	Entre 14 et 15	0,150 ± 0,003
TC48	13	0,210 ± 0,008
TC50	12	0,220 ± 0,005
TC53	Entre 12 et 13	0,240 ± 0,010
TC55	Entre 8 et 9	0,340 ± 0,005

IV.1.3. Optimisation des paramètres d'adhésion en microplaque des cinq souches sélectionnées pour les bio-essais

Les cinq souches ayant le plus de capacité à adhérer aux microplaques ont été choisies comme organismes-cibles pour les tests en anti-adhésion. Les paramètres d'adhésion,

notamment la densité d'ensemencement et la durée d'incubation à 20 °C sous une agitation de 120 rpm, ont été optimisées pour ces bactéries afin d'assurer une adhésion et une sensibilité optimales. Au vu des informations obtenues précédemment dans le cadre des travaux de thèse de Camps (2011) concernant le temps optimal d'adhésion, nous avons choisi de tester les deux valeurs de temps 15 et 24h. Ces deux temps ont été étudiés en combinaison avec six densités optiques à 600 nm, à savoir 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 et 0,6 dans les puits (Figure 91).

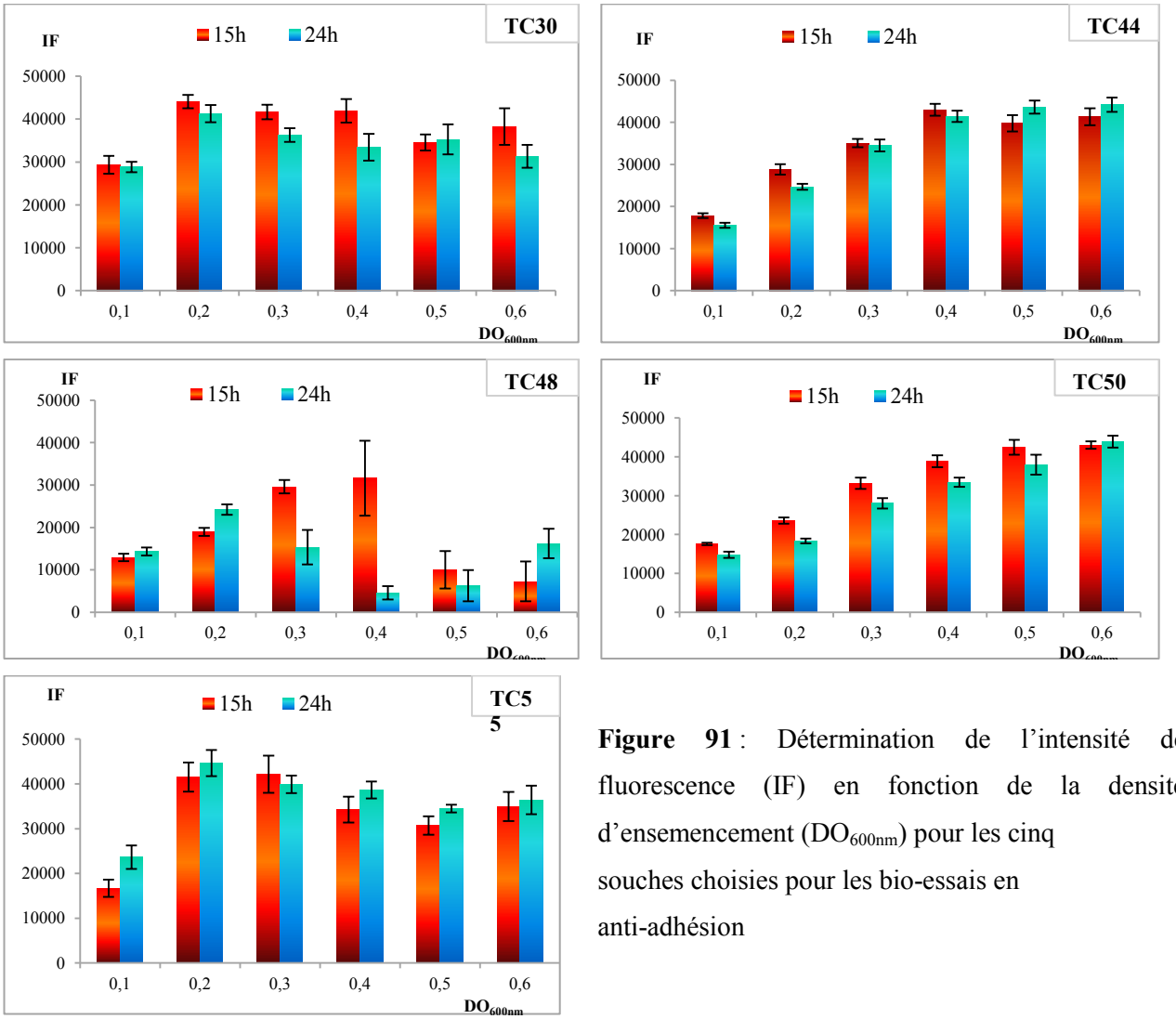


Figure 91 : Détermination de l'intensité de fluorescence (IF) en fonction de la densité d'ensemencement (DO_{600nm}) pour les cinq souches choisies pour les bio-essais en anti-adhésion

La densité d'ensemencement optimale correspond à la quantité de bactéries qu'il faut introduire dans les puits afin d'avoir un recouvrement maximum et de garder une relation linéaire entre le nombre de bactéries inoculées (DO) et l'intensité de fluorescence (IF). L'augmentation de l'IF avec les densités d'ensemencement mène à un plateau de saturation qui correspond à une impossibilité de quantification des bactéries pour deux raisons : i) à ce stade, le tapis bactérien devient trop dense et le fluorochrome ne peut donc pas rentrer dans

toutes les cellules, ainsi l'excitation devient difficile au moment de la lecture, et ii) une perte d'informations est engendrée lorsque le recouvrement maximal empêche toutes les bactéries d'adhérer parce qu'il n'y a plus de place dans les puits. Ces problèmes entraînent une perte de la proportionnalité entre l'IF et les densités d'ensemencement. Ainsi pour une quantification optimum, il faut considérer le début du plateau de saturation afin d'obtenir le plus grand recouvrement du puits tout en ayant une « monocouche » de bactéries et garder la proportionnalité entre l'IF et les densités d'ensemencement.

Pour toutes les souches, la durée optimale pour l'adhésion bactérienne a été définie à 15h, à l'exception de la bactérie TC44 qui présente une meilleure adhésion après un temps d'incubation de 24h. En effet, la souche TC30 connait ses meilleurs taux d'adhésion dans deux cas : soit entre 15 et 24h à une densité de 0,2, soit au bout de 15h à une densité de 0,3. Les deux cas donnent de FI similaires ($p > 0,05$). Une adhésion maximale a été obtenue avec la souche TC44 aux densités d'ensemencement de 0,5 et 0,6 sans différence significative entre elles après 24h d'incubation ($p > 0,05$). L'adhésion à 24h par contre est significativement différente de celle obtenue à 15h ($p < 0,001$ dans le cas d'une densité de 0,5 et $p < 0,01$ dans le cas d'une densité de 0,6). La souche TC48 présente son optimum d'adhésion dans les puits lorsqu'elle est ensemencée à une densité comprise entre 0,3 et 0,4 durant 15h, alors que la TC_{50} possède les meilleurs ratios d'adhésion à une densité optimale d'ensemencement de 0,4 à 0,6 ($p > 0,05$). Concernant la souche TC55, visiblement, elle adhère mieux après une incubation de 24h à une densité de 0,2, mais la différence n'a pas été significative statistiquement par comparaison à une incubation de 15h à la même densité d'ensemencement ($p > 0,05$). Par conséquent, nous avons choisi le temps d'adhésion le plus court (15h) afin de gagner du temps pour le reste des expérimentations. Parmi les cinq souches étudiées, la TC48 possède les plus faibles intensités de fluorescence, ce qui indique que même si toutes les bactéries n'ont pas le même taux d'incorporation du fluorochrome, et donc pas la même IF par cellule (Camps et al., 2011), on peut penser qu'elle adhère moins bien que les autres bactéries.

Concernant les souches bactériennes de référence, des travaux antérieurs réalisés au laboratoire avaient montré que la TC5 ne pouvait pas être marquée avec le SYTO® RED 61. L'utilisation d'un autre fluorochrome, le DAPI, avait permis le marquage de cette bactérie (Camps et al. 2011) mais avec l'inconvénient d'effectuer plus d'étapes lors de la procédure de marquage (étapes de perméabilisation et d'extraction) qui sont fastidieuses et peuvent engendrer des biais lors de la lecture des microplaques. De plus, ce marqueur ne permettait

pas d'obtenir des ratio d'adhésion supérieurs à 4-5 quand le SYTO® RED 61 permet lui d'obtenir des ratio de l'ordre de 15-20. Il a donc été nécessaire de sélectionner un autre fluorochrome. Etant utilisé classiquement pour le marquage des bactéries, notamment pour les analyses de viabilité (« live-dead » backlight™), le SYTO® 9 s'est avéré être un marqueur adapté pour la TC5 avec de bons ratios d'adhésion (de l'ordre de 10-15).

IV.2. Caractérisation et identification d'une sélection de souches isolées à la surface de *T.atomaria*

IV.2.1. Caractérisation morphologique

Seules dix bactéries sélectionnées à partir de la surface de *T. atomaria* ont été caractérisées et identifiées. La description macroscopique des colonies constitue la première étape lors de l'identification de souches bactériennes. La souche TC16 se distingue par sa couleur rouge foncée au centre de la colonie et plus claire autour. Les deux souches TC23 et TC32 sont de couleur jaune, un peu moins foncée pour la TC32. Les deux isolats bactériens TC53 et TC55 ont une couleur beige. Quant aux autres souches, elles sont caractérisées par une couleur blanche à transparente. Sur les boites de Pétri, la forme des colonies est ronde (Figure 92).

Les analyses microscopiques ont permis la caractérisation complémentaire des différentes souches. L'observation des cultures bactériennes sous microscope optique a montré que ces bactéries sont majoritairement en forme de bacilles. Avec les deux techniques microscopiques [microscope optique et MEB (Figure 93)], nous avons observé que ces bacilles sont plus ou moins allongés avec des tailles variables d'une souche à l'autre. Par exemple, la TC50 est le bacille qui possède la plus petite taille avec environ 0,7 à 0,8 µm, contrairement à la TC23 qui présente la taille la plus grande atteignant 2 µm. Le reste des souches présente des dimensions très similaires comprises entre 0,8 et 1,5 µm. Quelques photos prises par MEB montrent que certaines bactéries (TC16, TC32 et TC53) forment des amas structurés qui pourraient être des biofilms avec la présence des filaments sous forme de tubes qui pourraient être des substances exopolymériques.

La coloration de Gram a montré que les bactéries sélectionnées sont toutes des Gram négatives. Ce résultat est en accord avec la littérature où la majorité des bactéries marines, et en particulier celles cultivables, sont des Gram négatives (Chelossi et al., 2004 ; Barott et al., 2011 ; Camps et al., 2011)

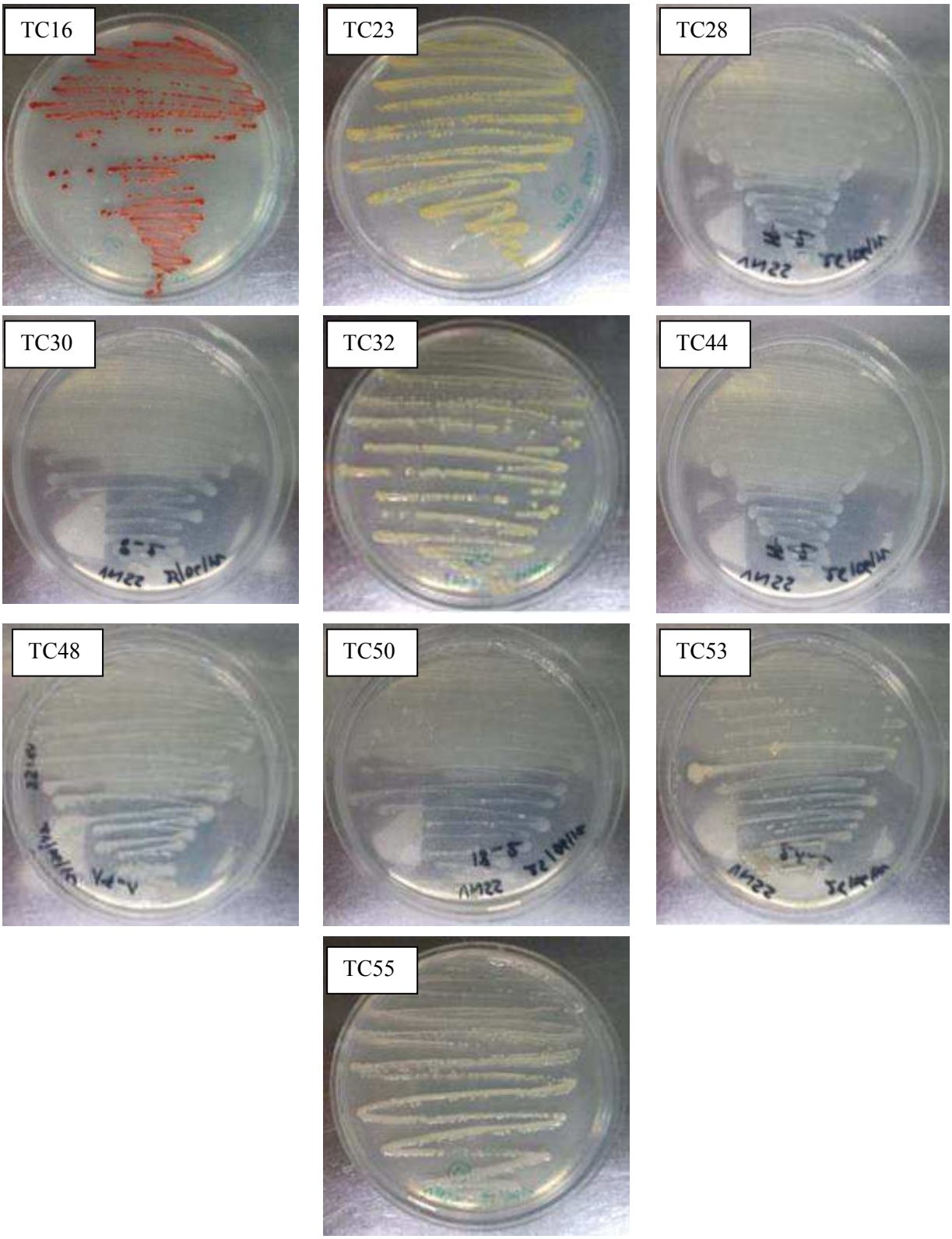


Figure 92 : Détermination des critères morphologiques macroscopiques (Boîtes de Pétri) des dix souches sélectionnées pour l'étude

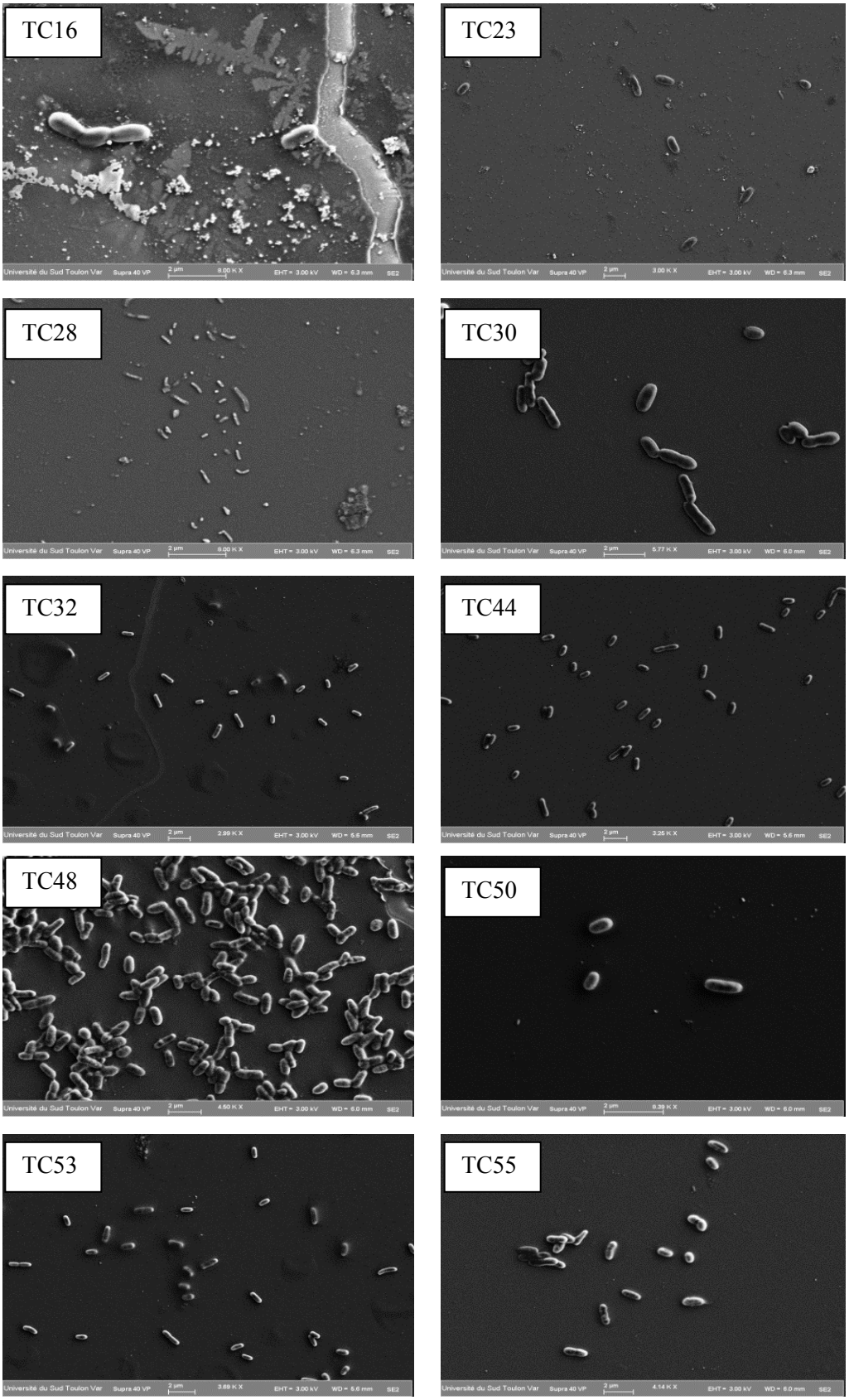


Figure 93 : Détermination des critères morphologiques microscopiques (MEB) des dix souches sélectionnées pour l'étude

IV.3. Caractérisation des extraits bruts des souches sélectionnées

IV.3.1. Obtention des extraits bruts

Dans le but d'évaluer l'implication potentielle d'une sélection de souches de *T. atomaria* dans l'inhibition de l'attachement d'autres bactéries à sa surface, nous avons voulu analyser leurs extraits bruts. L'extraction a été effectuée une fois la phase stationnaire des bactéries (culture en milieu liquide VNSS) atteinte. Elle a concerné les deux types de phases de cultures bactériennes obtenus après centrifugation: le culot contenant les bactéries elles-mêmes [extrait par un mélange CH_2Cl_2/MeOH (1:2 ; v/v)] et la phase organique du surnageant contenant les molécules excrétées par ces bactéries [extraite à l'AcOEt (1:1 ; v/v par rapport au volume du surnageant)]. Une seule extraction pour chaque souche [300 ml (100 ml × 3) de culture bactérienne] a permis d'avoir des quantités d'extraits suffisantes pour mener une première évaluation du métabolome bactérien et pour réaliser les bio-essais en anti-adhésion. En conséquence, nous n'avons pas effectué d'analyses statistiques pour comparer les rendements d'extraction entre les différentes souches bactériennes. Globalement, les meilleurs rendements d'extraction ont été obtenus sur les culots avec une moyenne de 21% [(masse d'extrait / masse de matière extraite) × 100], contre une moyenne de 12% pour la phase organique des surnageants (Figure 94). Cependant, ces rendements fluctuent largement d'une souche à l'autre. En effet, les meilleurs rendements d'extraction des culots ont été enregistrés pour les souches TC23, TC53 et TC55, et les rendements les plus faibles pour TC28, TC44 et TC50. Concernant la phase organique des surnageants, les souches TC16, TC23, TC28 et TC44 seraient les meilleures productrices de métabolites, suivies de TC53 et TC55.

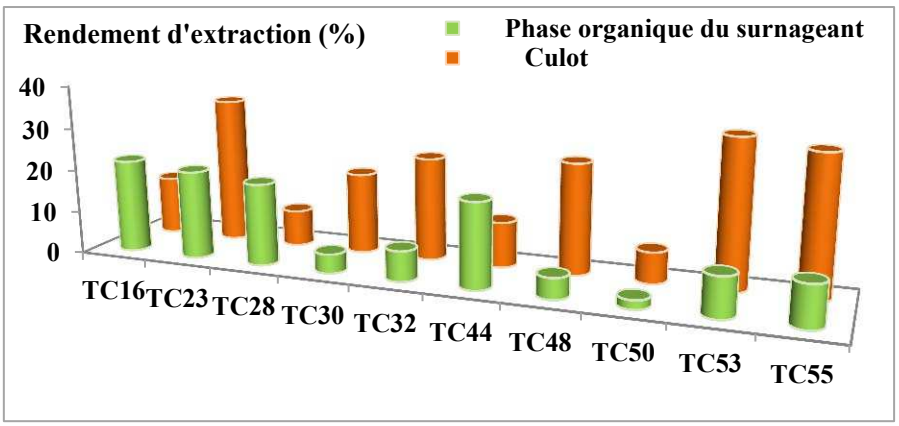


Figure 94 : Rendements d'extraction pour les dix souches de bactéries isolées à la surface de *T. atomaria*

IV.3.2. Analyses chromatographiques et spectrales des extraits bactériens

L'ensemble des extraits bactériens (culots et phases organiques du surnageant) a été analysé par LC-MS. Nous avons constaté une grande similitude entre les données obtenues (chromatogrammes et spectres de masse) pour ces dix bactéries. Comme il est difficile de comparer visuellement l'ensemble de ces empreintes chimiques, une approche multivariée a été utilisée afin de mettre en évidence leurs différences. Sur l'ensemble des 20 extraits (observations), 2149 molécules (variables) ont été mises en évidence et utilisées pour constituer la matrice de données. La représentation des deux axes les plus explicatifs (F1 et F2) correspond à un pourcentage de variabilité de 65,83% relativement élevé, ce qui indique une bonne représentation de l'ensemble de la variabilité (Figure 13). On note que l'axe F1 représente à lui seul plus de la moitié de la variabilité (56,53%). La figure 95 donne une vue d'ensemble de l'analyse par ACP. On observe que les profils des phases organiques (PO) de deux souches (TC48 et TC50) ressortent dans l'espace de façon très importante par rapport au reste des C et des PO issus des autres souches [TC16, TC23, TC28, TC30, TC32, TC44, TC53, TC55 (les culots de TC30 et TC44 n'ont pas pu être analysés)], mais également par rapport au milieu VNSS. Bien qu'elles soient distantes dans l'espace, selon les profils LC-MS obtenus, ces deux souches (TC48 et TC50) semblent avoir des compositions chimiques proches (PO en Figure 96 et les C en Figure 97). L'aspect quantitatif participe aussi certainement à cette ségrégation.

Lorsqu'on agrandit la zone où la plupart des extraits sont rassemblés (Figure 95), nous remarquons que les empreintes des souches sont dispersées dans l'espace sans *clusterisation* significative, toutefois, les profils métaboliques des extraits VNSS apparaîssent, de façon assez logique, plus proches de ceux des PO que ceux des culots. On peut expliquer ce résultat par le fait que les molécules exsudées par les bactéries sont généralement moins concentrées que les métabolites cellulaires. De plus, l'expression métabolique des culots de TC16, TC32, TC50, TC53 et TC55, d'une part, et de la PO de TC16, TC48 et TC50, d'autre part, semble se distinguer réellement des autres. On observe aussi deux souches (TC23 et TC28) qui sont proches dans l'espace (pour les deux types d'extraits : PO et C) et semblent avoir une composition chimique proche (PO en Figure 98 et les C en Figure 99). Par contre leurs signatures chimiques sont bien différentes de deux autres souches (TC48 et TC50). L'interprétation de ces résultats est complexe et des travaux complémentaires seront nécessaires pour savoir si des souches proches dans l'espace ou ayant des profils chromatographiques similaires sont forcément les mêmes.

L'avantage de cette analyse multivariée est qu'elle rend possible la prise en compte d'un grand nombre de données, notamment les molécules minoritaires qui ne le sont pas lors d'études ne portent que sur les métabolites majoritaires identifiables. Cependant, le cercle de corrélation que l'on peut obtenir en projetant les variables sur les deux axes F1 et F2 n'a pas permis de mettre en évidence l'importance de certaines molécules en particulier. Le très grand nombre de variables constitue d'ailleurs une difficulté dans l'analyse de ce graphique.

Ces données vont être mises en perspective avec les activités anti-adhésion de ces extraits qui seront analysées en **IV.2**.

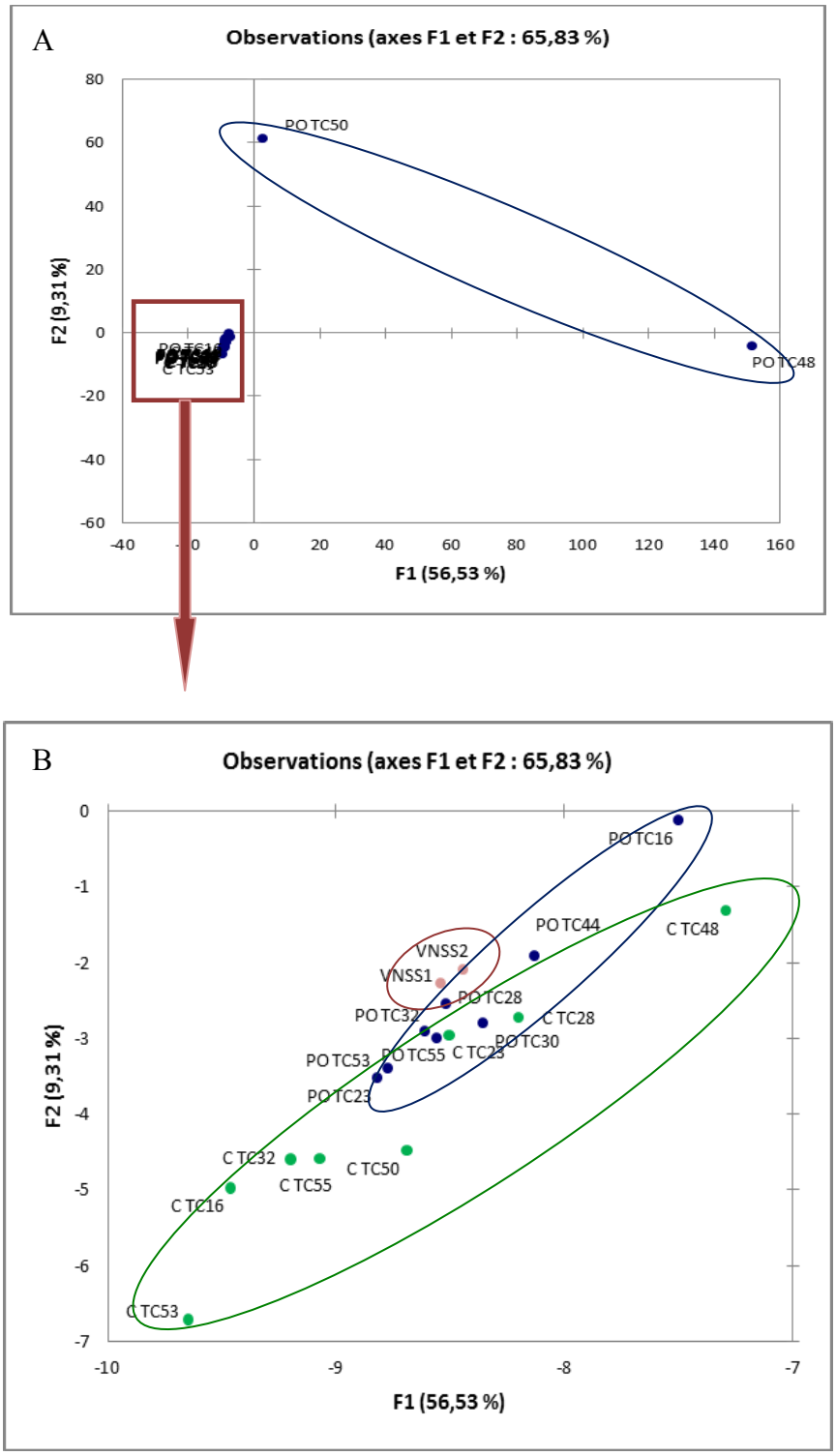


Figure 95 : Analyse par ACP correspondant aux extraits bactériens de dix souches isolées de la surface de *T. atomaria* (PO : phase organique et C : culot) en présence du milieu de culture (VNSS)

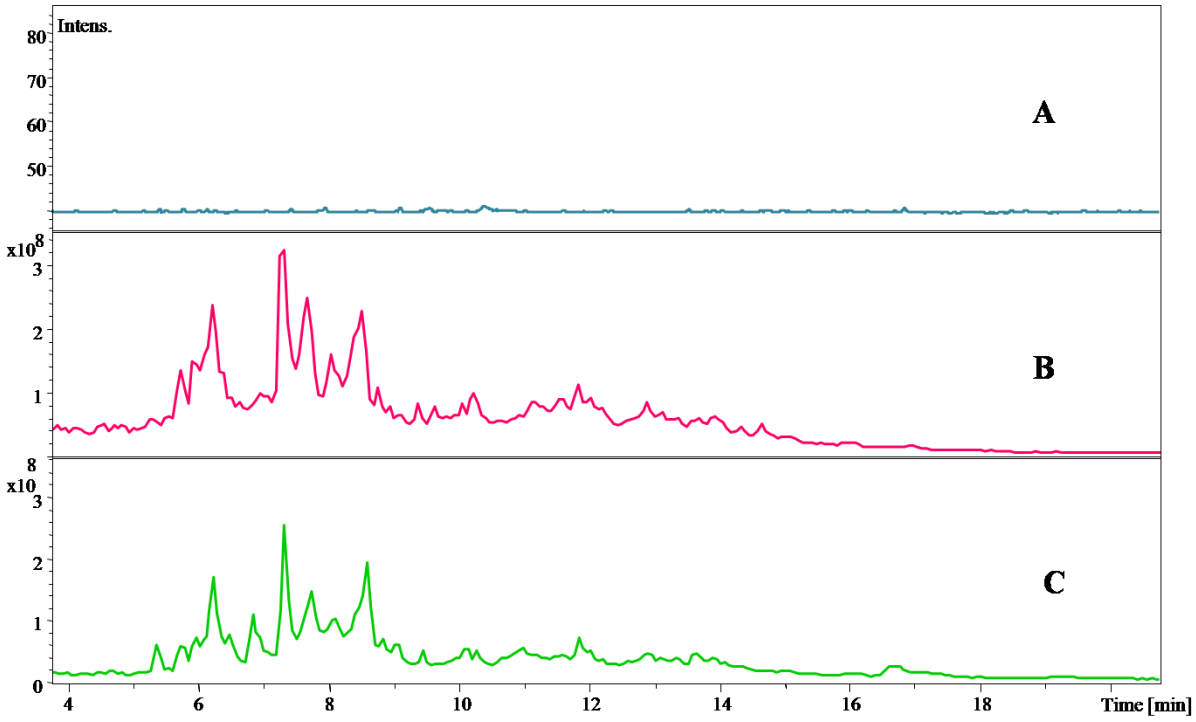


Figure 96 : Chromatogrammes obtenus par LC-MS en mode (+)-ESI pour le VNSS (**A**), les surnageants (PO) de TC48 (**B**) et TC50 (**C**).

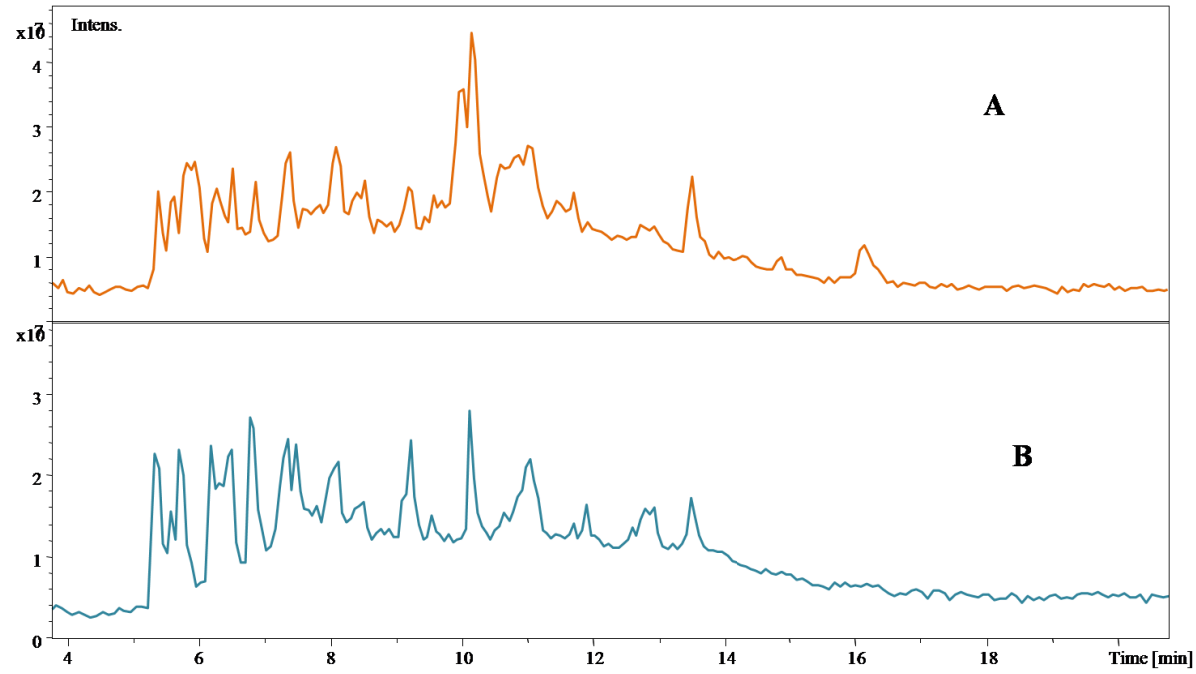


Figure 97 : Chromatogrammes obtenus par LC-MS en mode (+)-ESI pour les surnageants (PO) de TC32 (**A**) et TC55 (**B**).

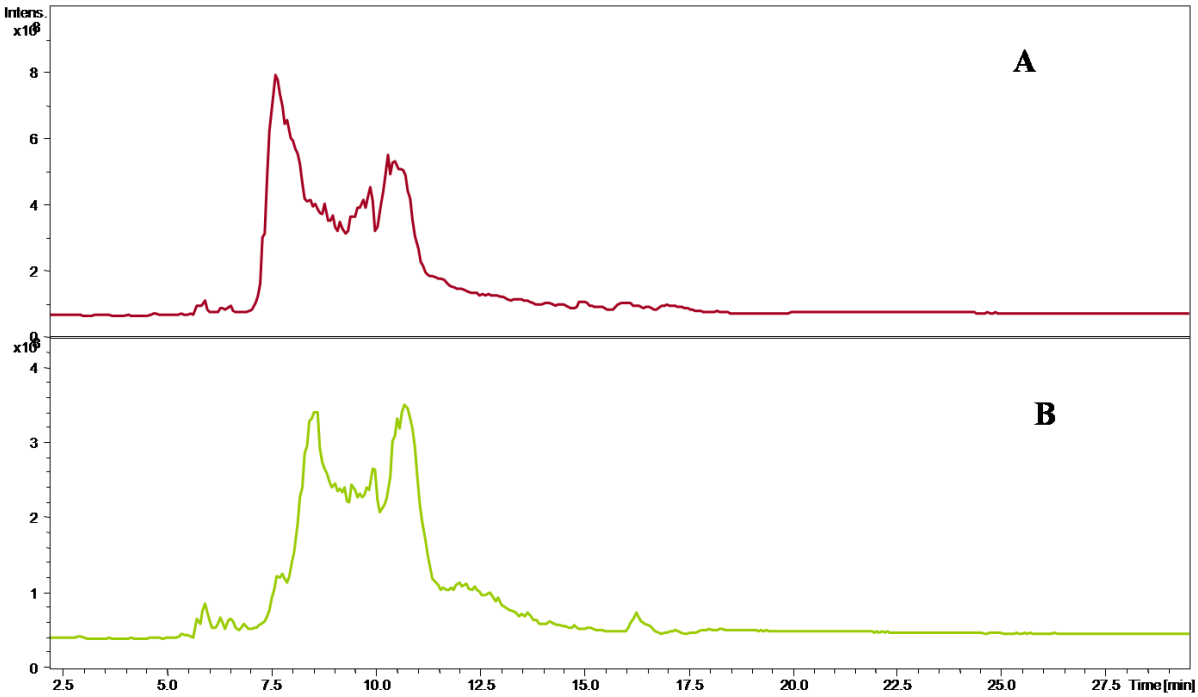


Figure 98 : Chromatogrammes obtenus par LC-MS en mode (+)-ESI pour les culots (C) de TC48 (**A**) et TC50 (**B**).

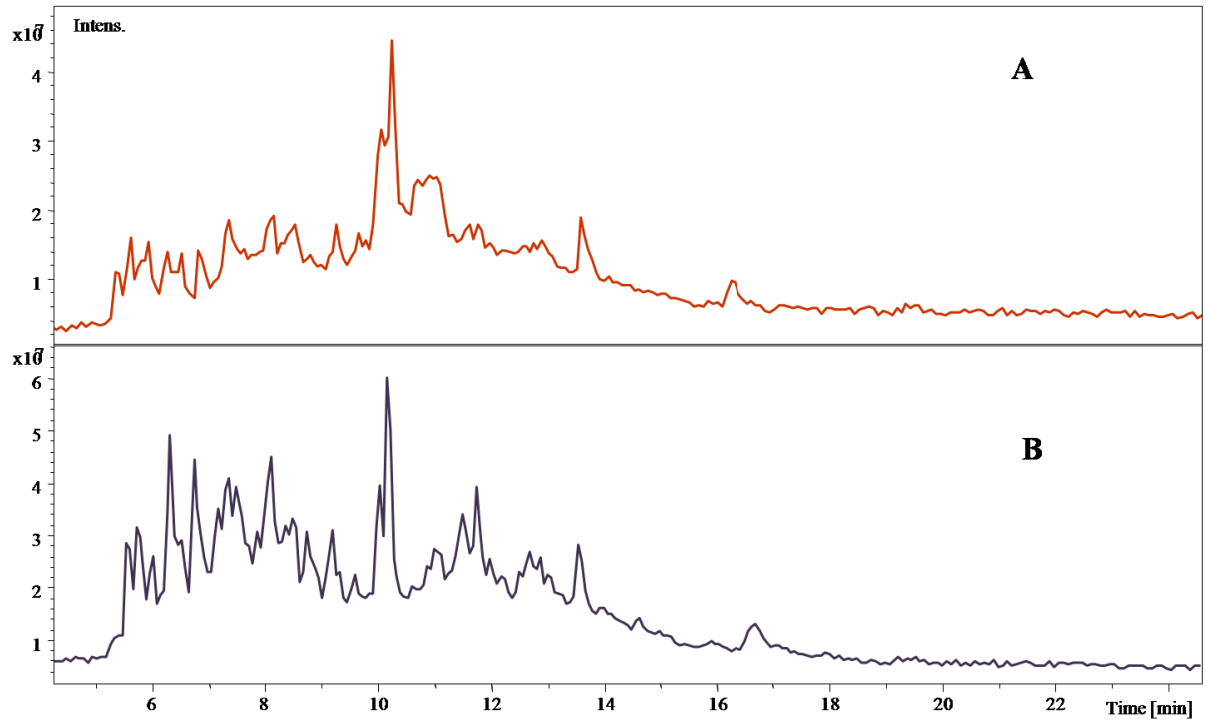


Figure 99 : Chromatogrammes obtenus par LC-MS en mode (+)-ESI pour les culots (C) de TC32 (**A**) et TC55 (**B**).

V. Contrôle du biofilm bactérien chez *T. atomaria*

L'objectif de cette partie était d'utiliser les souches bactériennes isolées de la surface de *T. atomaria* pour répondre à deux interrogations sur la sélection du biofilm de surface de l'algue : (i) est-ce que ces souches possèdent une sensibilité particulière, notamment par rapport aux molécules exsudées en surface par l'algue ? et (ii) est-ce que ces souches produisent des composés qui pourraient inhiber l'adhésion d'autres bactéries ?

V.1. Rôle écologique des molécules de surface *vs* molécules de l'extrait brut total

Dans un premier temps, l'ensemble des molécules isolées à partir de *T. atomaria* ont été testées pour leur action anti-adhésion vis-à-vis de deux groupes de souches bactériennes : i) les souches de référence (D41, 4M6, TC5, TC8 et TC11) et ii) les souches isolées à partir du biofilm de l'algue (TC30, TC44, TC48, TC50 et TC55). L'un des objectifs de cette étude étant d'évaluer la capacité de *T. atomaria* à contrôler les communautés bactériennes associées à sa surface.

Selon les résultats présentés sur la Figure 100, nous remarquons que parmi les molécules testées, la plupart (biocides commerciaux et composés **Ta5**, **Ta6** et **Ta8** isolés de *T. atomaria*) présentent un effet similaire sur les deux catégories de bactéries. Leurs effets sur les bactéries de référence sont détaillés en chapitre **III** (métabolome total des algues). A l'inverse, la molécule **Ta2** trouvée comme étant l'une des composantes majeures du métabolome de surface de *T. atomaria* montre un effet sélectif vis-à-vis des bactéries. En effet, elle inhibe l'adhésion des bactéries provenant des substrats artificiels avec des valeurs de CE_{50} se situant aux alentours de 100 µM, mais aucun effet n'a été observé pour **Ta2** sur l'adhésion de toutes les bactéries associées à la surface de l'algue. Concernant les autres molécules extraites de *T. atomaria*, le composé **Ta4** présente un comportement intermédiaire en ne semblant pas non plus affecter deux (TC30 et TC50) des cinq souches isolées à partir de la surface de l'algue et en ne présentant qu'un effet anti-adhésion très faible envers l'une d'entre elles (TC44, avec une $CE_{50} > 230$ µM). Il faut également noter l'absence d'activité du composé **Ta5** vis-à-vis d'une des souches associée à l'algue (TC50).

Ces résultats tendent à montrer que la molécule **Ta2** pourrait avoir un rôle écologique majeur en prenant part à la défense chimique de l'algue contre les colonisateurs et en permettant à *T. atomaria* de moduler ou sélectionner les micro-organismes associés à sa surface, même si cinq souches ne sont pas représentatives des communautés bactériennes associées à l'algue. Ceci est en accord avec de précédentes études portant sur cette problématique. Par exemple, dans les travaux de (Sneed & Pohnert, 2011), les extraits surfaciques de l'algue verte *Dictyosphaeria ocellata* n'avaient aucun effet significatif sur la communauté bactérienne de surface. Les expériences de Sälaun et al. (2012) ont montré que les exsudats des thalles de l'algue brune *Laminaria digitata*, exposés aux conditions de stress oxydatif, n'empêchent pas l'adhésion des bactéries indigènes de l'algue, mais modulent l'attachement des bactéries exogènes, soit en l'augmentant soit en le diminuant. D'autres auteurs ont émis l'hypothèse de cette régulation de surface suite à leurs observations écologiques. En effet, Lachnit et al. (2009) ont trouvé que les communautés bactériennes rencontrées sur les surfaces de diverses macro-algues marines collectées sur le même site (*Fucus serratus*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria saccharina*, *Ulva compressa*, *Delesseria sanguinea* et *Phycodrys rubens*) sont différentes significativement d'une espèce d'algue à l'autre. Selon eux, ce phénomène ferait intervenir entre-autres des métabolites de surface en tant qu'agents sélectifs de la colonisation bactérienne. Ne se limitant pas aux bactéries, ces mêmes auteurs ont démontré par la suite que la fraction polaire des extraits de surface de l'algue brune *Fucus vesiculosus* permettait d'inhiber significativement la fixation de larves de balanes (Lachnit et al., 2010). Lam et al. (2008), pour leur part, ont incubé des micro-organismes planctoniques en présence de macro-algues notamment *Ceramium rubrum*, *Mastocarpus stellatus* et *Laminaria digitata*. Les trois algues ne sélectionnaient pas de la même manière la communauté de bactéries incubées, indiquant que la sensibilité des bactéries planctoniques est variable selon les dérivés antimicrobiens produits par chaque espèce d'algue. Dans le cadre d'une étude de Saha et al. (2011), la fucoxanthine, un caroténoïde courant chez les algues brunes, isolée de la surface de *Fucus vesiculosus*, a montré un effet modulateur des bactéries épiphytes à des concentrations écologiquement réalistes.

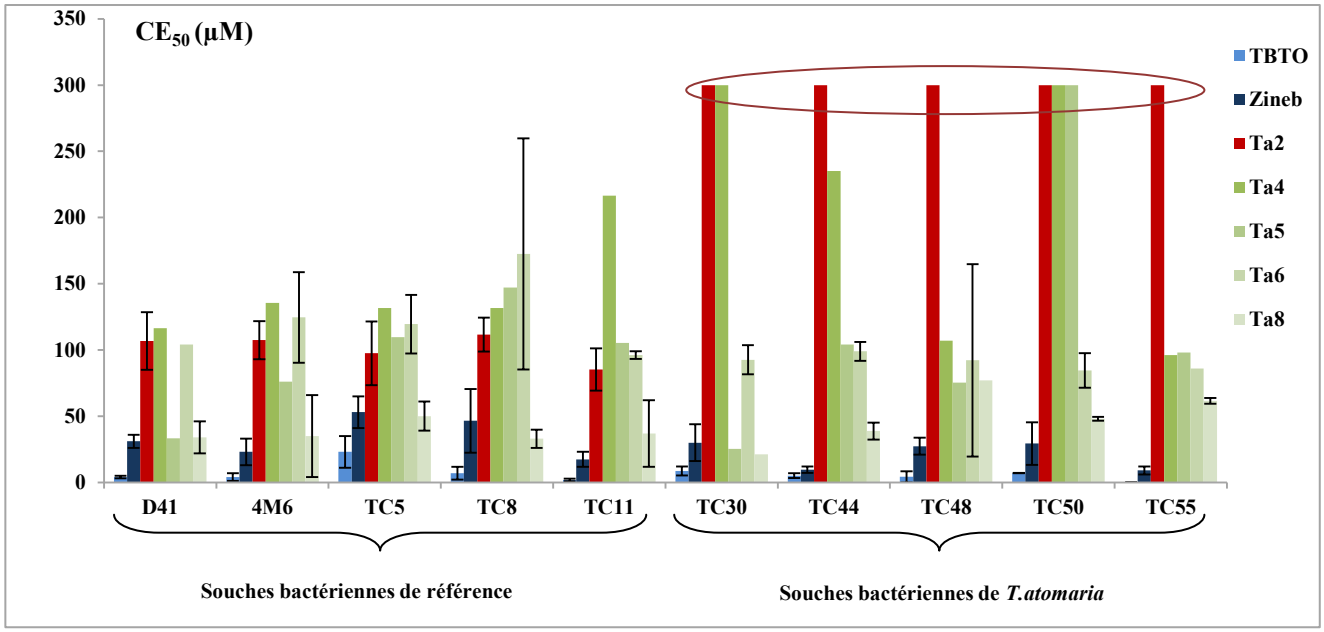


Figure 100 : Activité anti-adhésion (CE_{50}) de biocides de référence (TBTO et Zineb) et de composés de *T. atomaria* (**Ta2**, **Ta4**-**Ta6** et **Ta8**) vis-à-vis deux groupes de souches bactériennes marines

V.2. Rôle écologique des molécules des extraits bactériens isolés des souches associées à la surface de l'algue

Afin d'évaluer l'implication des bactéries de surface dans la régulation du biofilm chez *T. atomaria*, les propriétés anti-adhésion de dix souches faisant partie de la communauté microbienne de surface (TC16, TC23, TC28, TC30, TC32, TC44, TC48, TC50, TC53 et TC55) ont été évaluées vis-à-vis des souches bactériennes utilisées de référence (TC5, TC8 et TC11). Dans le cadre de cette étude, pour chaque bactérie deux extraits ont été testés : l'un correspond aux molécules obtenues par extraction liquide/liquide à partir du surnageant (noté PO) tandis que l'autre résulte d'une extraction du matériel bactérien concentré au niveau du culot (noté C).

Les résultats obtenus sont donnés au niveau de la Figure 101. Nous observons des réponses très variées des souches cibles lorsqu'elles sont exposées aux différents extraits bactériens. Une large gamme de CE_{50} allant de 30 à 170 $\mu g.ml^{-1}$ a été enregistrée. En moyenne, on remarque que les extraits issus des surnageants sont plus actifs que ceux du culot ; ce qui d'un point de vue écologique est conforme au fait que dans ce cas de figure ce sont préférentiellement les composés excrétés qui sont susceptibles d'être actifs.

Parmi les trois souches de référence testées, TC8 est la plus résistante. En particulier, la majorité des extraits de culot bactériens (7 sur un total de 10) sont totalement inefficaces

vis-à-vis de l'adhésion de cette bactérie. Les bactéries TC5 et TC11 ne sont pas affectées par le culot de TC53. Ces résultats montrent que certaines bactéries de surface sont capables d'affecter efficacement l'adhésion des trois souches de référence en produisant des métabolites actifs

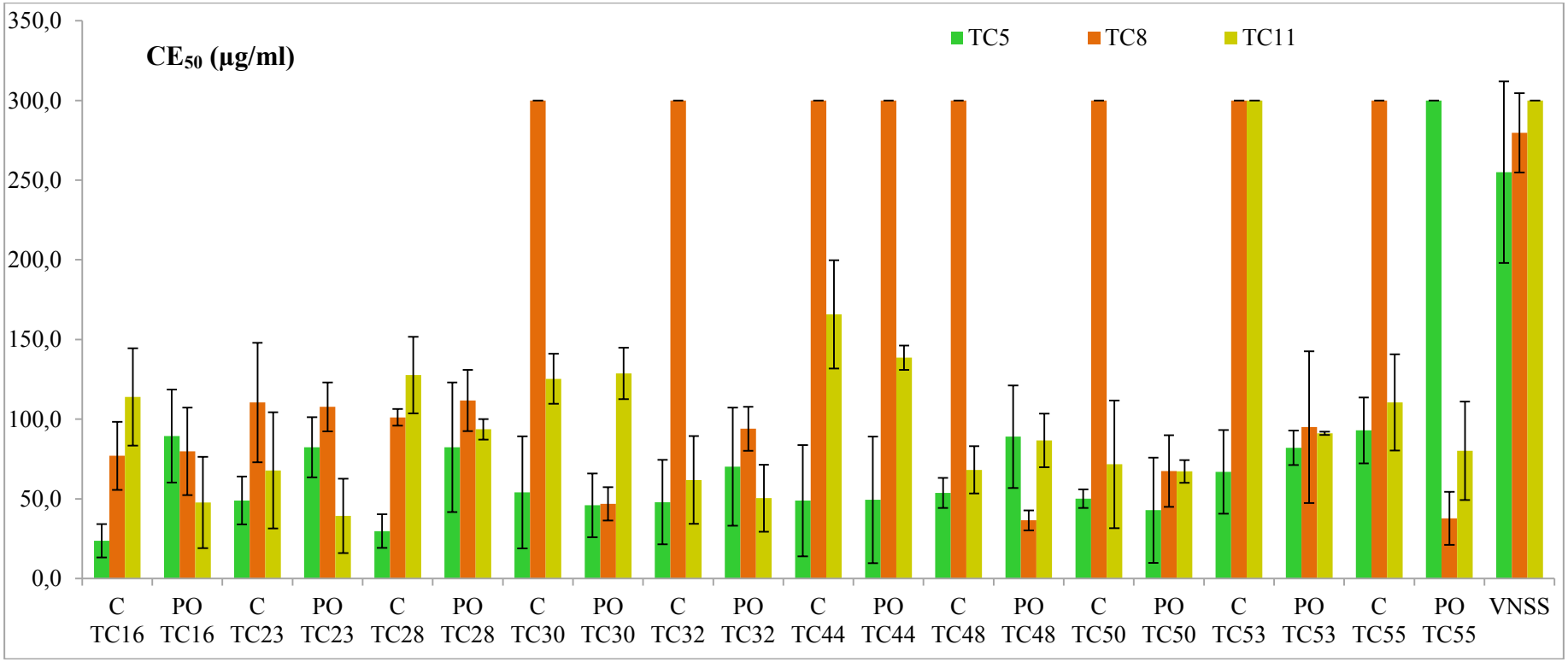


Figure 101 : Capacités anti-adhésion (CE_{50}) d'extraits (C : culot et PO surnageant) de dix souches bactériennes isolées à partir de la surface de *T. atomaria* vis-à-vis de trois bactéries marines de référence (TC5, TC8 et TC11)

Plusieurs études ont montré que les bactéries épiphytes de certaines algues marines sont capables de réguler le biofilm associé à ces algues. Cette régulation se traduit par leur effet antifouling contre plusieurs micro-organismes rentrant dans la composition d'un biofilm. Par exemple, la flore microbienne de l'algue verte *Enteromorpha intestinalis* (Lemos et al 1985), de la phéophycée *Laminaria saccharina* (Wiese et al., 2009) ainsi que de plusieurs autres algues (*Sargassum serratifolium*, *S. fusiforme*, *S. filicinum*, *Padina arborescens*, *Undaria pinnatifida*, *Petalonia fascia*, *Colpomenia sinuosa*, *Scytosiphon lomentaria* et *Ecklonia cava*) ont montré une activité antibactérienne intéressante (Kanagasabhapathy et al., 2006). En plus de l'effet antibactérien, l'activité anti-adhésion vis-à-vis de diatomées, de larves d'invertébrés et de champignons marins ainsi que l'inhibition de germination de spores d'algues ont été recensées chez des bactéries épiphytes d'*Ulva lactuca* (Egan et al., 2000 ; Egan et al., 2001 ; Kumar et al., 2011) et d'*U. australis* (Rao et al., 2007).

L'écologie chimique est un domaine d'investigation récent qui vise à appréhender les relations entre les organismes et leurs écosystèmes à travers l'implication de substances chimiques naturelles. Le milieu marin est un environnement riche et diversifié qui mérite une attention plus particulière. Dans ce cadre, plusieurs études ont montré que les organismes sessiles marins (macro-algues et invertébrés) sont capables de contrôler la colonisation microbienne de leurs surfaces à travers la libération de métabolites secondaires pouvant être anti-adhésifs ou toxiques pour des micro-organismes formant le biofilm (e.g. Engel et al., 2002 ; Goecke et al., 2010 et Egan et al., 2013). D'autre part, la colonisation de ces surfaces par d'autres types d'organismes semble dans certains cas être liée aux biofilms eux-mêmes. Ces biofilms ont pu être décrits comme « inductifs », favorisant l'adhésion d'autres colonisateurs, ou « non-inductifs », les défavorisant. Dans le cas des macro-algues, de précédents travaux ont montré que les biofilms associés peuvent inhiber la colonisation ultérieure et que de bactéries isolées à partir de la surface de ces organismes renferment des composés à propriétés antimicrobiennes. L'étude de ces aspects constitue ainsi un domaine d'intérêt non seulement pour la compréhension des mécanismes de colonisation et pour l'interprétation des rôles écologiques de médiateurs chimiques produits par les organismes colonisateurs ainsi que par leurs hôtes, mais également pour le développement de solutions destinées à évaluer ou à développer des revêtements antifouling de nouvelle génération.

Conclusion générale

Les macro-algues, avec leur très longue histoire évolutive et leur production métabolique, à la fois riche et diversifiée, constituent des modèles de choix pour des travaux en écologie chimique. En effet, outre leur potentiel biotechnologique et économique, les métabolites des algues possèdent des fonctions écologiques qui restent encore à explorer pour la plupart d'entre-eux. L'étude de la médiation chimique entre certaines macro-algues et leurs micro-organismes associés représente ainsi un champ d'investigation à développer et qui, en termes d'applications, permettrait d'inspirer des solutions originales aux problèmes liés au biofouling marin.

Dans ce contexte, l'étude décrite dans ce manuscrit porte sur l'analyse phytochimique de deux algues brunes méditerranéennes *Dictyota* spp. et *Taonia atomaria* en utilisant des approches multidisciplinaires. Nous avons exploré dans un premier temps le métabolome total de ces algues en caractérisant leurs constituants chimiques majeurs, puis nous avons évalué les activités antifouling (anti-adhésion) des composés isolés. Le métabolome de surface a été étudié dans un second temps afin d'essayer de mieux comprendre les stratégies de contrôle par voie chimique du biofilm bactérien chez l'une des espèces étudiées (*T. atomaria*).

Métabolites secondaires de l'extrait brut total

L'étude de la composition chimique des deux algues modèles a été réalisée. Les extraits bruts obtenus par macération dans un mélange de solvants organiques ont été fractionnés et soumis à des purifications successives à l'aide de différentes techniques chromatographiques (chromatographie "flash" et CLHP semi-préparative). Les structures chimiques des composés ainsi purifiés ont ensuite été caractérisées par le biais des techniques spectroscopiques usuelles (principalement RMN 1D et 2D, et SM). Nous avons ainsi pu identifier un total de onze molécules : quatre ont été décrites à partir de *Dictyota* spp. et huit à partir de *T. atomaria*, avec un composé commun (**Ds1** = **Ta8**) entre les deux espèces. *Dictyota* spp. a fourni majoritairement des composés diterpéniques, parmi lesquels **Ds4** [(1*R**, 3*E*, 7*E*, 11*S**, 12*S**) 9-acétoxy-3,7,18-dolabellatrién-17-al], un diterpène de type dolabellane, s'est avéré être original. Le composé **Ds1** [sn-3-*O*-(géranylgéranyl)glycérol] est un glycéroditerpène décrit ici pour la première fois à partir d'une algue appartenant au genre *Dictyota*. Les composés **Ds2** (acétoxycrénulide), **Ds3** (3,4-époxy-14-oxo-7,18-dolabelladiène) et **Ds5** (dictyol E) sont trois diterpènes cycliques qui ont précédemment été isolés à partir de plusieurs espèces de *Dictyota* : le composé **Ds5** est notamment un métabolite très courant au sein de ce genre d'algues brunes. Quant à *T. atomaria*, elle produit majoritairement des

sesquiterpènes. Au total, six sesquiterpènes, un dérivé de glycérol (**Ta8**) et un acide gras [**Ta7** = (5*Z*, 8*Z*, 11*Z*, 14*Z*, 17*Z*)eicosa-5,8,11,14,17-pentaénoïque] ont été isolés à partir d'échantillons de cette algue. Parmi les six sesquiterpènes identifiés, le germacrane **Ta5** (germacra-4(15),5,10(14)-trién-9-ol) est considéré comme original. Concernant les autres sesquiterpènes, le spiroaxane **Ta2 [**(+)-gleenol] avait déjà été reporté chez *T. atomaria* tandis que le germacrane **Ta1** [(1*S*, 5*E*, 7*S*)1-acétoxygermacra-4(15),5,10(14)-triène)], le cadinane **Ta3**, le calaménane **Ta4** [(+)-*trans*-calaménène] et le muurolane **Ta6** sont isolés pour la première fois à partir de cette espèce.

Suite à leur identification, huit de ces molécules (**Ds1**-**Ds3**, **Ds5**, **Ta2**, **Ta4**-**Ta6** et **Ta8**), isolées en quantités suffisantes, ont été évaluées pour leurs activités anti-adhésion vis-à-vis de trois souches bactériennes, dites « souches de référence » (D41, 4M6 et TC5), provenant de biofilms marins. Des biocides commerciaux standards (TBTO, Zineb, PtZn et PtCu) ont été utilisés comme référence. **Ds1** (= **Ta8**) s'est avéré être le composé le plus actif avec des valeurs de CE_{50} (entre 30 et 50 µM) très proches de celles obtenues avec le Zineb, mais néanmoins de 3 à 8 fois plus faibles (selon la souche) que celles obtenues avec les biocides commerciaux les plus efficaces. Le composé **Ta5** a montré également un effet anti-adhésion intéressant avec une CE_{50} de l'ordre de 33 µM contre une seule des souches testées. L'activité anti-microfouling la plus faible enregistrée a été celle manifestée par le composé **Ds3** ($CE_{50} > 150$ µM). Les autres molécules ont été capables d'empêcher l'adhésion bactérienne avec des activités moyennes à bonnes ($50\ \mu M < CE_{50} < 150\ \mu M$). Enfin, la toxicité des produits les plus actifs (notamment **Ds1** et **Ta5**) a été évaluée. Ces deux composés se sont avérés moins toxiques que les biocides de références, ce qui les rend intéressants par rapport aux biocides commerciaux très toxiques.

Métabolome de surface

Pour cette partie du travail, l'espèce Dictyota *spp. a été éliminée en raison des difficultés rencontrées pour l'identification du matériel algal à l'échelle spécifique.*

Dans cette partie, le but étant de mieux appréhender les interactions chimiques entre l'algue modèle *T. atomaria* et les bactéries associées à sa surface. La première étape a permis de mettre au point un protocole permettant l'extraction spécifique des molécules de surface. Nous nous sommes basés sur la technique de trempage des thalles d'algues dans des solvants organiques. Nous avons sélectionné le méthanol et le mélange dichlorométhane/méthanol

(1:1 ; v/v) comme les solvants les plus appropriés pour cette extraction. Ces extraits ont été étudiés par une approche métabolomique (ACP). Un protocole complémentaire, permettant de contrôler l'intégrité membranaire de l'algue, a également été développé. Ce protocole basé sur l'emploi d'une solution de DAPI permet de détecter les lyses cellulaires au niveau de la surface des thalles. Les résultats obtenus pour les échantillons traités (immergés dans le solvant pendant différentes durées) ont été comparés à ceux de deux témoins : un témoin positif correspondant aux cellules mortes déterminées suite à l'apparition d'une fluorescence bleue des noyaux et un témoin négatif correspondant aux cellules vivantes. L'ensemble de ces travaux a mené à la détermination du temps d'extraction optimal pour les deux solvants choisis : 15s pour le méthanol et 20s pour le mélange dichlorométhane/méthanol (1:1 ; v/v).

Suite à la mise au point de ce protocole, les analyses chromatographiques des extraits surfaciques obtenus ont permis de détecter une molécule majoritaire, identifiée comme étant le sesquiterpène **Ta2** par comparaison de ses données spectrales avec celles des composés déjà purifiés à partir de l'extrait brut total.

Une expérience complémentaire en laboratoire nous a permis en outre de montrer que *T. atomaria* est capable d'exsuder cette molécule dans le milieu environnant.

Interactions algues / bactéries

Dans cette approche d'écologie chimique et dans le but d'identifier l'impact du métabolome de surface de *T. atomaria* sur le contrôle de son biofilm associé, la première étape a été d'isoler des bactéries associées à sa surface. Nous avons ainsi pu obtenir, à travers deux techniques d'isolement, 47 souches bactériennes dont 33 ont été cultivables en milieu de culture liquide (VNSS). Parmi les souches cultivables, cinq ont été sélectionnées pour leur capacité à adhérer en microplaque (polystyrène) afin de pouvoir les utiliser dans le cadre des bio-essais en anti-adhésion.

D'un point de vue méthodologique, nous avons ensuite employé une approche métabolomique dans le but d'établir une relation entre la production métabolique à la surface de l'algue et la nature de son biofilm associé. Pour cela, nous avons mené un suivi saisonnier du métabolome de surface ainsi que des communautés bactériennes associées durant la période allant de février à juillet 2013. L'analyse de l'expression métabolique de surface a été réalisée à travers l'étude des profils chromatographiques (LC-MS) des extraits surfaciques. Les résultats obtenus ont permis de visualiser une nette variation saisonnière de la

composition en métabolites secondaires à la surface de *T. atomaria* ainsi que de la communauté bactérienne associée (DGGE). Cependant, aucune corrélation directe n'a pu être mise en évidence entre les deux paramètres suivis. Dans ce cas, il n'est donc pas possible de conclure quant à l'implication du métabolome de surface à une échelle globale dans la régulation du biofilm bactérien pour l'algue brune *T. atomaria*.

Une autre approche permettant de tester la capacité de *T. atomaria* à réguler son biofilm bactérien a été menée. Les différents métabolites (en plus des biocides standards) ont été testés en anti-adhésion vis-à-vis des souches de référence mais aussi des souches associées. Nous avons observé un effet sélectif du composé majeur de surface (**Ta2**) qui inhibe l'adhésion des souches bactériennes de référence mais ne présente aucun effet significatif sur celles isolées à partir de la surface de l'algue. Par contre, les biocides commerciaux ainsi que les autres molécules isolées à partir des extraits bruts totaux ont affecté d'une manière similaire l'adhésion de deux groupes de bactéries. A travers ces résultats, l'hypothèse d'une sélection chimique des bactéries au niveau de la surface par *T. atomaria* semble pertinente.

Pour rester dans ce contexte écologique, nous avons voulu évaluer l'implication des bactéries de surface elles-mêmes dans la régulation du biofilm bactérien à la surface de l'algue. Pour cela, deux types d'extraits (culots et surnageants) issus de 10 souches associées à l'algue, ont été testés en anti-adhésion vis-à-vis des cinq bactéries de référence. Nous avons noté que les extraits avaient des activités très variables selon la souche mais en règle générale, ceux issus des surnageants étaient plus actifs que ceux provenant des culots. Cette observation est en accord avec le fait que les bactéries associées à la surface de *T. atomaria* puissent avoir un impact, elles aussi, via un phénomène de médiation chimique, sur les autres bactéries présentes dans le milieu naturel.

Perspectives

A propos de l'analyse des métabolites secondaires de T. atomaria

A l'issue des travaux portant sur l'isolement et l'élucidation structurale des principaux constituants phytochimiques des espèces *Dictyota* spp. et *Taonia atomaria,* plusieurs actions restent encore à entreprendre. Tout d'abord la stéréochimie de plusieurs composés isolés de *T. atomaria* doit être encore déterminée en certains points :

- Pour **Ta3** la stéréochimie en C-10 pourrait être déterminée, après re-purification de ce composé, par comparaison de la valeur de son pouvoir rotatoire avec celles issues de la littérature pour des molécules structuralement proches.

- L'utilisation de la méthode de Mosher modifiée devrait conduire, pour le composé **Ta5**, à la détermination de sa configuration absolue en C-9 puis une analyse fine de son spectre NOESY ^{1}H-^{1}H devrait permettre de déduire celle en C-7.

- Concernant le composé **Ta6**, une approche de modélisation moléculaire basée sur les données obtenues à partir des spectres RMN ^{1}H (valeurs des constantes de couplage au niveau de $H_{a,b}$-2 et $H_{a,b}$-3) et NOESY ^{1}H-^{1}H pourrait conduire à la détermination de la configuration absolue en C-1 et C-4, celles en C-7 et C-10 ayant été déterminées par comparaison avec la littérature.

Parallèlement, les composés **Ta3** et **Ta7** doivent être purifiés en quantités plus importantes afin que leur activité en anti-adhésion puisse être évaluée et, plus généralement, plusieurs fractions issues des extraits bruts de *T. atomaria* et contenant des composés minoritaires doivent également être analysées afin d'augmenter notre connaissance du métabolome global de cette espèce.

Enfin, *T. atomaria* ayant été choisie comme espèce-modèle au sein de notre laboratoire, une caractérisation à plus grande échelle des variations temporelles et spatiales de son métabolome pourrait être entreprise.

A propos du métabolome de surface de T. atomaria

Le protocole d'extraction des métabolites de surface élaboré dans le cadre de ces travaux et basé sur le trempage de morceaux de thalles dans des solvants organiques a conduit au choix du méthanol et du mélange dichlorométhane/méthanol comme solvants les plus

efficaces lors de l'extraction, alors que dans la plupart des autres études (de Nys et al. 1998 ; Dworjanyn et al. 1999, 2006 ; Steinberg et de Nys 2002; Sudatti et al. 2006 ; Brock et al. 2007 ; Nylund et al. 2007 ; Lachnit et al. 2010 ; Thabard et al. 2011 ; Saha et al. 2011), l'hexane a été le solvant le plus souvent utilisé. Nous devrons donc chercher les limites de notre méthodologie en trouvant un moyen de sécher les thalles avant leur traitement sans endommager les cellules, ni modifier le métabolome de surface.

Une autre alternative à l'extraction permettant de conforter nos résultats serait l'analyse directe des molécules de surface à partir d'échantillons non-traités par le biais de techniques d'imagerie couplées à la spectrométrie de masse (DART) ou à la spectroscopie Raman (NanoRaman). Le fait d'avoir déjà à disposition plusieurs métabolites de *T. atomaria* en tant que standards est un atout indéniable pour la mise en œuvre de telles expérimentations.

*A propos du métabolite majoritaire de surface (**Ta2**) de* T. atomaria

- *Localisation* : afin de comprendre comment agit ce métabolite de surface vis-à-vis des bactéries épiphytes, il serait nécessaire de connaître sa localisation au sein du thalle. En effet, il est majoritaire à la surface mais également dans l'extrait brut total : il serait intéressant de déterminer au sein de quelle structure anatomique cette molécule est synthétisée (au niveau de la surface et à l'intérieur du thalle). Si la synthèse s'effectue à l'intérieur des cellules, alors par quel mécanisme cette molécule est-elle transportée à la surface ?
- *Quantification* : la quantification du métabolite actif de surface est d'une importance cruciale pour valider son activité à des concentrations naturellement efficaces dans le milieu. Le développement d'une méthodologie de quantification par dosage chromatographique est ainsi envisagé. La cinétique d'exsudation pourrait également être étudiée.
- *Rôle antifouling* : dans le cadre des bio-essais en anti-adhésion, nous avons testé cinq souches pionnières de référence. En dépit de leur différence taxinomique et géographique, et même si cela représente déjà un important travail, elles ne sont pas forcément représentatives des communautés naturelles de surface. Il pourrait alors être intéressant d'incorporer les extraits de surface, ou encore certaines molécules de surface purifiées dans des gels qui permettent leur diffusion, et d'immerger *in situ* ces gels. Cela permettrait d'évaluer les effets du métabolome de surface sur les communautés naturelles. Il serait également envisageable d'élargir la gamme d'organismes colonisateurs à d'autres cibles allant des micro- aux macro-organismes, telles que des diatomées, des larves d'invertébrés ou des spores d'algues, et de les tester à la fois *in vitro* et *in situ*.

A propos des interactions entre T. atomaria *et ses bactéries épiphytes*

Une perspective immédiate sera d'identifier les souches bactériennes isolées de *T. atomaria* par séquençage de leur ADNr 16S. Ceci permettra aussi, d'une part, d'élargir la souchothèque de notre laboratoire et d'autre part, d'utiliser de nouveaux modèles de bactéries dans les bio-essais anti-adhésion.

Par ailleurs, l'approche de la diversité des communautés bactériennes de surface par une technique d'empreinte constituait une première étape exploratoire et nous avons conservé assez d'ADN correspondant à la succession mensuelle pour pousser cette étude plus loin. Il est donc prévu d'approfondir l'étude de la diversité des communautés bactériennes de surface par le biais d'outils moléculaires plus performants faisant partie des NGS (*next-generation sequencing* ou séquençage de nouvelle génération). Etant donné les données actuelles contradictoires de la littérature, il sera notamment très intéressant d'explorer la structure de ces communautés en termes de spécificité des micro-organismes. Il faudrait aussi envisager d'étudier les autres micro-organismes constitutifs des communautés de surface, principalement les diatomées.

Les caractéristiques physiques de la surface de notre modèle (hydrophobicité, rugosité, nano- et/ou micro-texturation) seraient d'autres paramètres importants à analyser pour la compréhension des mécanismes de sélection des micro-organismes.

Enfin, dans la mesure où plusieurs modèle d'algues ont été décrits individuellement à l'échelle mondiale mais avec des données pas toujours comparables directement, il serait pertinent de proposer une étude comparative multi-sites avec les mêmes approches méthodologiques (métabolomique globale puis ciblée, métagénomique, …).

A propos des interactions entre T. atomaria *et ses bactéries épiphytes*

L'approche métabolomique constitue une méthode de choix pour appréhender plus globalement les interactions entre le fonctionnement d'un organisme et son environnement. Ici, les analyses menées sur le métabolome de surface et les communautés bactériennes épiphytes ont permis un début de compréhension des interactions pouvant exister, au niveau de la surface, entre l'algue et son biofilm. Des expériences supplémentaires doivent être conduites en milieu contrôlé, elles permettraient de déterminer les conditions écologiques dans lesquelles l'algue est susceptible de se défendre chimiquement.

Enfin, l'approche métabolomique devrait fournir des pistes en écologie chimique marine pour une meilleure compréhension des interactions qui exsistent dans la nature entre eucaryotes et procaryotes, tout en évitant d'évaluer seulement des activités ciblées (antibactérienne, anti-adhésion, toxicité,…etc), qui n'expliquent pas forcément le rôle écologique des molécules testées.

Références bibliographiques

Abarzua S et Jakubowski S (**1995**) Biotechnological investigation for the prevention of biofouling. I. Biological and biochemical principles for the prevention of biofouling. *Marine Ecology Progress Series* 123: 301-312

Abatis D, Vagias C, Galanakis D, Norris JN, Moreau D, Roussakis C et Roussis V (**2005**) Atomarianones A and B: two cytotoxic meroditerpenes from the brown alga *Taonia atomaria*. *Tetrahedron Letters* 46 (49): 8525

Acord J, Maskell J et Sefton A (**2005**) A rapid microplate method for quantifying inhibition of bacterial adhesion to eukaryotic cells. *Journal of Microbiological Methods* 60: 55-62

Allen HL (**1971**) Primary productivity, chemo-organotrophy, and nutritional interactions of epiphytic algae and bacteria on macrophytes in the littoral of a lake. *Ecological Monographs* 41 (2): 97-127

Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM et Wilson M (**2000**) Community structure and co-operation in biofilms, No 59. Cambridge University Press Cambridge

Almeida C, Azevedo NF, Cerqueira L, Keevil CW et Vieira MJ (**2007**) RT-PCR and PNA-FISH as novel methods for the detection of specific microorganisms in heterotrophic biofilm communities. *Biofilm Club*: 207-216

Almeida C, Azevedo NF, Santos S, Keevil CW et Vieira MJ (**2011**) Discriminating multi-species populations in biofilms with peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA FISH). *PLoS One* 6 (3): e14786

Amico V, Oriente G, Piattelli M, Tringali C, Fattorusso E, Magno S et Mayol L (**1977**) (-)-(*R*)-1-*O*-Geranylgeranylglycerol from the brown alga *Dilophus fasciola*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 33 (8): 989-990

Amico V, Oriente G, Piattelli M, Tringali C, Fattorusso E, Magno S et Mayol L (**1980**) Diterpenes based on the dolabellane skeleton from *Dictyota dichotoma Tetrahedron* 36 (10): 1409-1414

Amin SA, Green DH, Hart MC, Küpper FC, Sunda WG et Carrano CJ (**2009**) Photolysis of iron–siderophore chelates promotes bacterial–algal mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (40): 17071-17076

Andrade LR, Farina M et Amado Filho GM (**2004**) Effects of copper on *Enteromorpha flexuosa* (Chlorophyta) in vitro. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58: 117-125

Andras T, Alexander T, Gahlena A, Parry RM, Fernandez F, Kubanek J, Wang M et Hay M (**2012**) Seaweed allelopathy against coral: Surface distribution of a seaweed secondary metabolite by imaging mass spectrometry. *Journal of Chemical Ecology* 38 (10): 1203-1214

Andrews JH (**1977**) Observations on the pathology of seaweeds in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Botany* 55 (8): 1019-1027

Ar Gall E, Cornec L et Deslandes E (**2008**) Oligocarrageenans and tissue-dependant oxidative burst in *Solieria chordalis* (Rhodophyceae, Gigartinales). *Phycological Research* 56: 7-12

Areche C, San-Martín A, Rovirosa J, Soto-Delgado J et Contreras R (**2009**) An unusual halogenated meroditerpenoid from *Stypopodium flabelliforme*: Studies by NMR spectroscopic and computational methods. *Phytochemistry* 70 (10): 1315-1320

Ariosa Y, Quesada A, Aburto J, Carrasco D, Carreres R, Leganés F et Valiente EF (**2004**) Epiphytic cyanobacteria on *Chara vulgaris* are the main contributors to N_2 fixation in rice fields. *Applied and environmental microbiology* 70 (9): 5391-5397

Armstrong E, Boyd KG et Burgess JG (**2000**) Prevention of marine biofouling using natural compounds from marine organisms. In: El-Gewely MR (ed) *Biotechnology Annual Review*, vol 6. Elsevier, pp 221-241

Armstrong E, Yan L, Boyd KG, Wright PC et Burgess JG (**2001**) The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia* 461: 37-40

Azhaguraj R, Arokia Lenin E, Viswanathan C, Sangeetha B et Selvanayagam M (**2010**) Predication of biological activity of algal antitumor drugs using pass. *Pharmacologyonline* 3: 22-34

Ballard TE, Richards Justin J, Wolfe Amanda L et Melander C (**2008**) Synthesis and antibiofilm activity of a second-gteneration reverse-amide oroidin library: a structure-activity relationship study. *Chemistry - A European Journal* 14 (34): 10745-10761

Barbosa JP, Fleury BG, da Gama BAP, Teixeira VL et Pereira RC (**2007**) Natural products as antifoulants in the Brazilian brown alga *Dictyota pfaffii* (Phaeophyta, Dictyotales). *Biochemical Systematics and Ecology* 35: 549-553

Barott KL, Rodriguez-Brito B, Janouškovec J, Marhaver KL, Smith JE, Keeling P et Rohwer FL (**2011**) Microbial diversity associated with four functional groups of benthic reef algae and the reef-building coral *Montastraea annularis*. *Environmental Microbiology* 13 (5): 1192-1204

Barrios CA, Xu Q, Cutright T et Newby BmZ (**2005**) Incorporating zosteric acid into silicone coatings to achieve its slow release while reducing fresh water bacterial attachment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 41: 83-93

Barrow C, Blunt J et Munro M (**1988**) Sesquiterpenes from a New Zealand sponge of the genus *Eurypon*. *Australian Journal of Chemistry* 41 (11): 1755-1761

Bazes A, Silkina A, Douzenel P, Faÿ F, Kervarec N, Morin Dl, Berge J-P et Bourgougnon N (**2009**) Investigation of the antifouling constituents from the brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *Journal of Applied Phycology* 21 (4): 395-403

Becerro MA, Lopez NI, Turon X et Uriz MJ (**1994**) Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 179 (2): 195-205

Becker K (**1996**) Epibionts on carapaces of some malacostracans from the Gulf of Thailand. *Journal of Crustacean Biology*: 92-104

Beech IB et Sunner J (**2004**) Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology* 15: 181-186

Beleneva IA et Zhukova NV (**2006**) Bacterial communities of brown and red algae from Peter the Great Bay, the Sea of Japan. *Mikrobiologiia* 75 (3): 410

Bengtsson M et Ovreas L (**2010**) Planctomycetes dominate biofilms on surfaces of the kelp *Laminaria hyperborea*. *BMC Microbiology* 10 (1): 261

Bengtsson MM, Sjøtun K et Øvreås L (**2010**) Seasonal dynamics of bacterial biofilms on the kelp *Laminaria hyperborea*. *Aquatic MicrobioI Ecology* 60: 71-83

Bhadury P et Wright PC (**2004**) Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. *Planta* 219 (4): 561-578

Bhattarai H, Ganti V, Paudel B, Lee Y, Lee H, Hong Y-K et Shin H (**2007**) Isolation of antifouling compounds from the marine bacterium, *Shewanella oneidensis* SCH0402. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23 (2): 243-249

Bhosale SH, Nagle VL et Jagtap TG (**2002**) Antifouling potential of some marine organisms from India against species of *Bacillus* and *Pseudomonas*. *Marine Biotechnology* 4 (2): 111-118

Bianco ÉM, Rogers R, Teixeira VL et Pereira RC (**2009**) Antifoulant diterpenes produced by the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis*. *Journal of Applied Phycology* 21 (3): 341-346

Blay G, Collado AM, García B et Pedro JR (**2005**) Silicon guided rearrangement of epoxydecalines to spirocyclic compounds. Synthesis of gleenol and axenol from carvone. *Tetrahedron* 61 (46): 10853-10860

Blom JF, Brüsch T, Barbaras D, Bethuel Y, Locher HH, Hubschwerlen C et Gademann K (**2006**) Potent algicides based on the cyanobacterial alkaloid nostocarboline. *Organic Letters* 8 (4): 737-740

Blount JF, Dunlop RW, Erickson KL et Wells RJ (**1982**) Two diterpenes with new carbocyclic ring systems from an australian collection of the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Australian Journal of Chemistry* 35 (1): 145-163

Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT et Prinsep MR (**2005**) Marine natural products. *Natural Product Reports* 22: 15-61

Bodammer JE et Sawyer TK (**1981**) Aufwuchs protozoa and bacteria on the gills of the rock crab, *cancer irroratus* say: A survey by light and electron microscopy. *Journal of Protozoology* 28 (1): 35-46

Bolinches J, Lemos M et Barja J (**1988**) Population dynamics of heterotrophic bacterial communities associated with *Fucus vesiculosus* and *Ulva rigida* in an estuary. *Microbial Ecology* 15 (3): 345-357

Borchardt SA, Allain EJ, Michels JJ, Stearns GW, Kelly RF et McCoy WF (**2001**) Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (7): 3174-3179

Borg-Karlson A-K, Norin T et Talvitie A (**1981**) Configurations and conformations of torreyol (*δ*-cadinol), *α*-cadinol, *T*-muurolol and *T*-cadinol. *Tetrahedron* 37 (2): 425-430

Borum J (**1985**) Development of epiphytic communities on eelgrass (*Zostera marina*) along a nutrient gradient in a Danish estuary. *Marine Biology* 87 (2): 211-218

Bouaicha N, Pesando D, Puel D et Tringali C (**1993**) Cytotoxic diterpenoids from the brown alga *Dilophus ligulatus*. *Journal of Natural Products* 56 (10): 1747-1752

Bourne D, Iida Y, Uthicke S et Smith-Keune C (**2007**) Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. *The ISME journal* 2 (4): 350-363

Bourne DG, Garren M, Work TM, Rosenberg E, Smith GW et Harvell CD (**2009**) Microbial disease and the coral holobiont. *Trends in Microbiology* 17 (12): 554-562

Boyd KG, Adams DR et Burgess JG (**1999**) Antibacterial and repellent activities of marine bacteria associated with algal surfaces. *Biofouling* 14 (3): 227-236

Boyd KG, Mearns-Spragg A, Brindley G, Hatzidimitriou K, Rennie A, Bregu M, Hubble MO et Burgess JG (**1998**) Antifouling potential of epiphytic marine bacteria from the surfaces of marine algae. In: Y. Le Gal, A. Muller-Feuga (eds). *Marine Microorganisms for Industry*: Plouzané, France, pp 128-136.

Brian-Jaisson F, Ortalo-Magné A, Guentas-Dombrowsky L, Armougom F, Blache Y et Molmeret M (**2013**) Identification of bacterial strains isolated from Mediterranean Sea exhibiting different abilities of biofilm formation. *Microbiol Ecology*: DOI 10.1007/s00248-013-0342-9

Briand J-F (**2009**) Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity. *Biofouling* 25 (4): 297-311

Briand J-F, Djeridi I, Jamet D, Coupé S, Bressy C, Molmeret M, Le Berre B, Rimet F, Bouchez A et Blache Y (**2012**) Pioneer marine biofilms on artificial surfaces including antifouling coatings immersed in two contrasting French Mediterranean coast sites. *Biofouling* 28 (5): 453-463

Brock E, Nylund GM et Pavia H (**2007**) Chemical inhibition of barnacle larval settlement by the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Marine Ecology Progress Series* 337: 165-174

Brock TD et Clyne J (**1984**) Significance of algal excretory products for growth of epilimnetic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 47 (4): 731-734

Brown GD, Wong HF, Hutchinson N, Lee SC, Chan BKK et Williams GA (**2004**) Chemistry and biology of maculalactone A from the marine cyanobacterium *Kyrtuthrix maculans*. *Phytochemistry Reviews* 3 (3): 381-400

Burgess JG, Boyd KG, Armstrong E, Jiang Z, Yan L, Berggren M, May U, Pisacane T, Granmo A et Adams DR (**2003**) The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling* 19: 197-205

Burja A et Hill R (**2001**) Microbial symbionts of the Australian great barrier reef sponge, *Candidaspongia flabellata*. *Hydrobiologia* 461 (1-3): 41-47

Burke C, Thomas T, Lewis M, Steinberg P et Kjelleberg S (**2011**) Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. *ISME Journal* 5 (4): 590-600

Burton E, Yakandawala N, LoVetri K et Madhyastha MS (**2007**) A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 34 (1): 1-4

Buschmann AH, Correa JA, Beltrán J et Retamales CA (**1997**) Determinants of disease expression and survival of infected individual fronds in wild populations of *Mazzaella laminarioides* (Rhodophyta) in central and southern Chile. *Marine Ecology Progress Series* 154: 269-280

Caldwell D, Korber D et Lawrence J (1992) Confocal laser microscopy and digital image analysis in microbial ecology. In: *Advances in Microbial Ecology*, vol 12. Springer US, pp 1-67

Callow JA et Callow ME (2006) Biofilms. In: Fusetani N, Clare AS (eds) Antifouling compounds, vol 42. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New-York, pp 141-169

Callow M (**1986**) A word-wide survey of slime formation on antifouling paints. In *Algal biofouling* (*Studies in environmental science*) ed. Hoagland, K. D. pp. 1-20. New-York.

Camps M, Briand J-F, Guentas-Dombrowsky L, Culioli G, Bazire A et Blache Y (**2011**) Antifouling activity of commercial biocides vs. natural and natural-derived products assessed by marine bacteria adhesion bioassay. *Marine Pollution Bulletin* 62 (5): 1032-1040

Capone DG, Taylor DL et Taylor BF (**1977**) Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with macroalgae in a coral-reef community in the Bahamas. *Mar Biol* 40 (1): 29-32

Carpenter EJ (**1972**) Nitrogen fixation by a blue-green epiphyte on pelagic *Sargassum*. *Science of The Total Environment* 178 (4066): 1207-1209

Chakraborty K, Lipton AP, Paul Raj R et Vijayan KK (**2010**) Antibacterial labdane diterpenoids of *Ulva fasciata* Delile from southwestern coast of the Indian Peninsula. *Food Chemistry* 119 (4): 1399-1408

Characklis WC et Marshall KC (**1990**) Biofilms: a basis for interdisciplinary approach. In *Biofilms* ed. Marshall, W. G. C. pp. 3-17. New York: John Wiley and Sons.

Characklis WG et Cooksey KE (**1983**) Biofilms and microbial fouling. *Advances in Applied Microbiology* 29: 93-138

Chelossi E, Milanese M, Milano A, Pronzato R et Riccardi G (**2004**) Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 309 (1): 21-33

Cheng S-Y, Huang Y-C, Wen Z-H, Chiou S-F, Wang S-K, Hsu C-H, Dai C-F et Duh C-Y (**2009**) Novel sesquiterpenes and norergosterol from the soft corals *Nephthea erecta* and *Nephthea chabroli*. *Tetrahedron Letters* 50 (7): 802-806

Chisholm JRM, Dauga C, Ageron E, Grimont PAD et Jaubert JM (**1996**) 'Roots' in mixotrophic algae. *Nature*: 381-382

Cho J-Y, Choi J-S, Kang S-E, Kim J-K, Shin H-W et Hong Y-K (**2005**) Isolation of antifouling active pyroglutamic acid, triethyl citrate and di-n-octylphthalate from the brown seaweed *Ishige okamurae*. *Journal of Applied Phycology* 17 (5): 431-435

Cho J (**2013**) Antifouling chromanols isolated from brown alga *Sargassum horneri*. *Journal of Applied Phycology* 25 (1): 299-309

Choi B, Lee H, Lee K et Lee B (**2011**) Isolation of diacyl glycerol acyl transferase (DGAT) inhibitors from *Pachydictyon coriaceum*. *Phytotherapy Research* 25: 1041-1045

Clare AS (**1996**) Marine natural product antifoulants: status and potential. *Biofouling* 9 (3): 211-229

Clare AS (**1998**) Towards nontoxic antifouling. *Journal of Marine Biotechnology* 6 (1): 3-6

Cole JJ (**1982**) Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 291-314

Colin C, Leblanc C, Wagner E, Delage L, Leize-Wagner E, Van Dorsselaer A, Kloareg B et Potin P (**2003**) The brown algal kelp *Laminaria digitata* features distinct bromoperoxidase and Iodoperoxidase Activities. *Journal of Biological Chemistry* 278 (26): 23545-23552

Corre S et Prieur D (**1990**) Density and morphology of epiphytic bacteria on the kelp *Laminaria digitata*. *Botanica marina* 33 (6): 515-524

Correa J et Flores V (**1995**) Whitening, thallus decay and fragmentation in *Gracilaria chilensis* associated with an endophytic *amoeba*. *Journal of Applied Phycology* 7 (4): 421-425

Correa JA, Flores V et Garrido J (**1994**) Green patch disease in *Iridaea laminarioides* (Rhodophyta) caused by *Endophyton* sp. (Chlorophyta). *Diseases of aquatic organisms* 19 (3): 203-213

Correa JA, González P, Sánchez P, Muñoz J et Orellana MC (**1996**) Copper-algae interactions: Inheritance or adaptation? *Environmental Monitoring and Assessment* 40 (1): 41-54

Costerton JW (**2007**) The biofilm primer. *Springer*: 199 p

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR et Lappin-Scott HM (**1995**) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49: 711-745

Costerton JW, Stewart PS et Greenberg EP (**1999**) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections *Science* 284 (5418): 1318-1322

Cronin G, Lindquist N, Hay ME et Fenical W (**1995**) Effects of storage and extraction procedures on yields of lipophilic metabolites from the brown seaweeds *Dictyota ciliolata* and *D. menstrualis*. *Marine Ecology Progress Series* 119: 265-273

Culioli G, Ortalo-Magné A, Valls R, Hellio C, Clare AS et Piovetti L (**2008**) Antifouling activity of meroditerpenoids from the marine brown alga *Halidrys siliquosa*. *Journal of Natural Products* 71 (7): 1121-1126

Cundell AM, Sleeter TD et Mitchell R (**1977**) Microbial populations associated with the surface of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Microbial Ecology* 4 (1): 81-91

Currie D et Kalff J (**1984**) Can bacteria outcompete phytoplankton for phosphorus? a chemostat test. *Microbial Ecology* 10 (3): 205-216

Danise B, Minale L, Riccio R, Amico V, Oriente G, Piattelli M, Tringali C, Fattorusso E, Magno S et Mayol L (**1977**) Further perhydroazulene diterpenes from marine organisms. *Experientia* 33 (4): 413-415

Dash S, Jin C, Lee O, Xu Y et Qian P-Y (**2009**) Antibacterial and antilarval-settlement potential and metabolite profiles of novel sponge-associated marine bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36 (8): 1047-1056

Davis A, Targett N, McConnell O et Young C (1989) Epibiosis of marine algae and benthic invertebrates: natural products chemistry and other mechanisms inhibiting settlement and overgrowth. In: Bioorganic Marine Chemistry, vol 3. *Bioorganic Marine Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, pp 85-114

De-Paula JC, Cavalcanti DN, Yoneshigue-Valentin Y et Teixeira VL (**2012**) Diterpenes from marine brown alga *Dictyota guineensis* (Dictyotaceae, Phaeophyceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22 (4): 36-40

de Beer D, Stoodley P et Lewandowski Z (**1997**) Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnology and Bioengineering* 53 (2): 151-158

De Clerck O, Leliaert F, Verbruggen H, Lane CE, De Paula JC, Payo DA et Coppejans E (**2006**) A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, Phaeophyceae) based on *rbc* and 26S ribosomal DNA sequences analyses. *Journal of Phycology* 42 (6): 1271-1288

de Nys R, Dworjanyn SA et Steinberg PD (**1998**) A new method for determining surface concentrations of marine natural products on seaweeds. *Marine Ecology Progress Series* 162: 79-87

de Nys R, Steinberg PD, Rogers CN, Charlton TS et Duncan MW (**1996**) Quantitative variation of secondary metabolites in the sea hare *Aplysia parvula* and its host plant, *Delisea pulchra*. *Marine ecology progress series* 130: 135-146

de Nys R, Steinberg PD, Willemsen P, Dworjanyn SA, Gabelish CL et King RJ (**1995**) Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. *Biofouling* 8: 259

de Oliveira L, Gregoracci G, Silva GG, Salgado L, Filho G, Alves-Ferreira M, Pereira R et Thompson F (**2012**) Transcriptomic analysis of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Florideophyceae, Rhodophyta) and its microbiome. *BMC Genomics* 13 (1): 487

De Rosa S, De Giulio A, Iodice C et Zavodink N (**1994**) Sesquiterpenes from the brown alga *Taonia atomaria*. *Phytochemistry* 37 (5): 1327-1330

Dige I, Nilsson H, Kilian M et Nyvad B (**2007**) In situ identification of *streptococci* and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence *in situ* hybridization. *European Journal of Oral Sciences* 115 (6): 459-467

Dimitrieva GY, Crawford RL et Yüksel GÜ (**2006**) The nature of plant growth-promoting effects of a *Pseudoalteromonas* associated with the marine algae *Laminaria japonica* and linked to catalase excretion. *Journal of Applied Microbiology* 100 (5): 1159-1169

Djordjevic D, Wiedmann M et McLandsborough LA (**2002**) Microtiter plate assay for assessment of *Listeria* monocytogenes biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (6): 2950-2958

Dobretsov S (**2005**) Suppression of settlement of larvae of fouling organism by water-soluble substances from epibiotic bacteria. *Russian Journal of Marine Biology* 31 (6): 367-372

Dobretsov S (**2010**) Marine biofilms. *Biofouling*. 123-136

Dobretsov S, Abed RMM et Teplitski M (**2013**) Mini-review: Inhibition of biofouling by marine microorganisms. *Biofouling* 29 (4): 423-441

Dobretsov S, Dahms H-U, Harder T et Qian P-Y (**2006a**) Allelochemical defense against epibiosis in the macroalga *Caulerpa racemosa* var. *turbinata*. *Marine Ecology Progress Series* 318: 165-175

Dobretsov S, Dahms H-U et Qian P-Y (**2006b**) Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling* 22 (1): 43 - 54

Dobretsov S, Xiong H, Xu Y, Levin L et Qian P-Y (**2007**) Novel antifoulants: inhibition of larval attachment by proteases. *Marine Biotechnology* 9 (3): 388-397

Domart-Coulon I, Auzoux-Bordenave S, Doumenc D et Khalanski M (**2000**) Cytotoxicity assessment of antibiofouling compounds and by-products in marine bivalve cell cultures. *Toxicology in Vitro* 14 (3): 245-251

Donlan RM (**2002**) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases* 8 (9): 881-890

Dorigo U, Volatier L et Humbert J-F (**2005**) Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research* 39 (11): 2207-2218

Doucette GJ (**1995**) Interactions between bacteria and harmful algae: a review. *Natural Toxins* 3 (2): 65-74

Doyle RJ (**2001**) Microbial growth in biofilms. *Academic Press*: 469 p

Dromgoole FI, Silvester WB et Hicks BJ (**1978**) Nitrogenase activity associated with *Codium* species from New Zealand marine habitats. *New Zealand journal of marine and freshwater research* 12 (1): 17-22

Duong T, Le T, Dao T-S, Pflugmacher S, Rochelle-Newall E, Hoang T, Vu T, Ho C et Dang D (**2012**) Seasonal variation of Cyanobacteria and microcystins in the Nui Coc Reservoir, Northern Vietnam. *Journal of Applied Phycology*: 1-11

Dupré S, Grenz M, Jakupovic J, Bohlmann F et Niemeyer HM (**1991**) Eremophilane, germacrane and shikimic acid derivatives from chilean *Senecio* species. *Phytochemistry* 30 (4): 1211-1220

Dworjanyn SA, De Nys R et Steinberg PD (**1999**) Localisation and surface quantification of secondary metabolites in the red alga *Delisea pulchra*. *Marine Biology* 133 (4): 727-736

Dworjanyn SA, Nys Rd et Steinberg PD (**2006**) Chemically mediated antifouling in the red alga *Delisea pulchra*. *Marine Ecology Progress Series* 318: 153-163

Egan S, Harder T, Burke C, Steinberg P, Kjelleberg S et Thomas T (**2013**) The seaweed holobiont: understanding seaweed–bacteria interactions. *FEMS Microbiology Reviews* 37 (3): 462-476

Egan S, Holmström C et Kjelleberg S (**2001**) *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51 (4): 1499-1504

Egan S, Thomas T, Holmström C et Kjelleberg S (**2000**) Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environmental Microbiology* 2 (3): 343-347

El Hattab M, Bouzidi N, Ortalo-Magné A, Daghbouche Y, Richou M, Chitour SE, de Reviers B et Piovetti L (**2009**) Eicosapentaenoic acid: possible precursor of the phloroglucinol derivatives isolated from the brown alga *Zonaria tournefortii* (J.V. Lamouroux) Montagne. *Biochemical Systematics and Ecology* 37 (1): 55-58

Faimali M, Sepcic K, Turk T et Geraci S (**2003**) Non-toxic Antifouling Activity of Polymeric 3-alkylpyridinium Salts from the Mediterranean Sponge *Reniera sarai* (Pulitzer-Finali). *Biofouling* 19 (1): 47-56

Fattorusso E, Magno S et Mayol L (**1978**) Isolation of (2R, 8R)-germacra-1 (11), 5 (12), E6-trien-2-ol acetate from the brown alga *dilophus fasciola*. *Tetrahedron Letters* 43: 4149 - 4152

Feller M, Rudi A, Berer N, Goldberg I, Stein Z, Benayahu Y, Schleyer M et Kashman Y (**2004**) Isoprenoids of the soft coral *Sarcophyton glaucum*: nyalolide, a new biscembranoid, and other terpenoids. *Journal of Natural Products* 67 (8): 1303-1308

Fernandes N, Case RJ, Longford SR, Seyedsayamdost MR, Steinberg PD, Kjelleberg S et Thomas T (**2011**) Genomes and virulence factors of novel bacterial pathogens causing bleaching disease in the marine red alga *Delisea pulchra*. *PloS one* 6 (12): e27387

Fiehn O (**2002**) Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48 (1-2): 155-171

Filion-Myklebust C et Norton TA (**1981**) Epidermis shedding in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis and its ecological significance. *Marine Biology Letters* 2: 45-51

Filloux A et Vallet I (**2003**) Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *médecine sciences* 19 (1): 77-83

Fisher MM, Wilcox LW et Graham LE (**1998**) Molecular characterization of epiphytic bacterial communities on charophycean green algae. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (11): 4384-4389

Franks A, Egan S, Holmström C, James S, Lappin-Scott H et Kjelleberg S (**2006**) Inhibition of fungal colonization by *Pseudoalteromonas tunicata* provides a competitive advantage during surface colonization. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (9): 6079-6087

Fries L et Āberg S (**1978**) Morphogenetic effects of phenylacetic and p-OH-phenylacetic acid on the green alga *Enteromorpha compressa* (L.) GREV. in Axenic Culture. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 88 (5): 383-388

Fusetani N (**2004**) Biofouling and antifouling. *Natural Product Reports* 21 (1): 94-104

Fusetani N (**2011**) Antifouling marine natural products. *Natural Product Reports* 28 (2): 400-410

Ganti VS, Kim KH, Bhattarai HD et Shin HW (**2006**) Isolation and characterisation of some antifouling agents from the brown alga *Sargassum confusum*. *Biofouling* 8 (4): 309-315

Gayral P et Cosson J (**1986**) Connaître et reconnaître les algues marines. *Connaitre et reconnaitre*: 220 p

Gentry MK et Dalrymple JM (**1980**) Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella toxin*. *Journal of Clinical Microbiology* 12 (3): 361-366

Geraci S, Faimali M, Piovetti L et Cimino G Antifouling from nature: laboratory test with *Balanus amphitrite* darwin on algae and sponges. In: 10th International Congress on Marine Corrosion and Fouling, Melbourne, 2001. University of Melbourne, pp 88-97

Gil-Turnes MS et Fenical W (**1992**) Embryos of *Homarus americanus* are protected by epibiotic bacteria. *Biology Bulletin* 182 (1): 105-108

Gil M, Armitage A et Fourqurean J (**2006**) Nutrient impacts on epifaunal density and species composition in a subtropical seagrass bed. *Hydrobiologia* 569 (1): 437-447

Goecke F, Labes A, Wiese J et Imhoff JF (**2010**) Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Marine Ecology Progress Series* 409: 267-300

Goez CE, Wright AD, König GM et Sticher O (**1994**) Diterpenes from the brown alga *Dilophus mediterraneus*. *Phytochemical Analysis* 5 (2): 68-73

Gonzalez AG, Alvarez MA, Darias J et Martin JD (**1973**) Marine natural products of the atlantic zone.VI.Base-catalysed rearrangement of taondiol. *JCSPerkin I*: 2637

Gonzalez AG, Darias J et Martin JD (**1971**) Taondiol, a new component from *Taonia atomaria*. *Tetrahedron Letters* 12 (29): 2729-2732

Gonzalez AG, Darias J, Martin JD et Norte M (**1974**) Atomaric acid, a new component from *Taonia atomaria*. *Tetrahedron Letters* 15 (45): 3951-3954

Goulitquer S, Potin P et Tonon T (**2012**) Mass spectrometry-based metabolomics to elucidate functions in marine organisms and ecosystems. *Marine Drugs* 10: 849-880

Grasland B, Mitalane J, Briandet R, Quémener E, Meylheuc T, Linossier I, Vallée-Réhel K et Haras D (**2003**) Bacterial biofilm in seawater: cell surface properties of early-attached marine bacteria. *Biofouling* 19 (5): 307 - 313

Gritti F et Guiochon G (**2010**) Performance of columns packed with the new shell Kinetex-C18 particles in gradient elution chromatography. *Journal of Chromatography A* 1217 (10): 1604-1615

Grossart H-P (**2010**) Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: changes in concepts are needed. *Environmental Microbiology Reports* 2 (6): 706-714

Hall-Stoodley L et Stoodley P (**2005**) Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends in Microbiology* 13 (1): 7-10

Haras D (**2005**) Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Mater Tech* 93 (Hors Série): s.27-s.41

Harder T (2009) Marine epibiosis: Concepts, ecological consequences and host defence. In: Flemming H-C, Murthy PS, Venkatesan R, Cooksey K (eds) Marine and Industrial Biofouling, vol 4. Springer Series on Biofilms. Springer Berlin Heidelberg, pp 219-231

Harder T, Dobretsov S et Qian PY (**2004**) Waterborne polar macromolecules act as algal antifoulants in the seaweed *Ulva reticulata*. *Marine Ecology Progress Series* 274: 133-141

Harshey RM (**2003**) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Reviews in Microbiology* 57 (1): 249-273

Hay ME, Duffy JE, Pfister CA et Fenical W (**1987**) Chemical defense against different marine herbivores: are amphipods insect equivalents? *Ecology* 68 (6): 1567

Head WD et Carpenter EJ (**1975**) Nitrogen fixation associated with the marine macroalga *Codium fragile*. *Limnology and Oceanography*: 815-823

Hellio C, Maréchal J-P, Véron B, Bremer G, Clare AS et Le Gal Y (**2004**) Seasonal variation of antifouling activities of marine algae from the Brittany coast (France). *Marine Biotechnology* 6 (1): 67-82

Hellio C, Thomas-Guyon H, Culioli G, Piovetti L, Bourgougnon N et Le Gal Y (**2001**) Marine antifoulants from *Bifurcaria bifurcata* (Phaeophyceae, Cystoseiraceae) and other brown macroalgae. *Biofouling* 17: 189-201

Hemmi A, Mäkinen A, Jormalainen V et Honkanen T (**2005**) Responses of growth and phlorotannins in *Fucus vesiculosus* to nutrient enrichment and herbivory. *Aquatic Ecology* 39 (2): 201-211

Hempel M, Blume M, Blindow I et Gross E (**2008**) Epiphytic bacterial community composition on two common submerged macrophytes in brackish water and freshwater. *BMC Microbiology* 8 (1): 58

Hentschel U, Fieseler L, Wehrl M, Gernert C, Steinert M, Hacker J et Horn M (2003) Microbial diversity of marine sponges. In: Müller WG (ed) Sponges (*Porifera*), vol 37. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Springer Berlin Heidelberg, pp 59-88

Hirota H, Tomono Y et Fusetani N (**1996**) Terpenoids with antifouling activity against barnacle larvae from the marine sponge *Acanthella cavernosa*. *Tetrahedron* 52 (7): 2359-2368

Hollants J, Decleyre H, Leliaert F, De Clerck O et Willems A (**2011a**) Life without a cell membrane: Challenging the specificity of bacterial endophytes within *Bryopsis* (Bryopsidales, Chlorophyta). *BMC Microbiology* 11 (1): 255

Hollants J, Leliaert F, De Clerck O et Willems A (**2012**) What we can learn from sushi: a review on seaweed–bacterial associations. *FEMS Microbiology Ecology* 83 (1): 1-16

Hollants J, Leroux O, Leliaert F, Decleyre H, De Clerck O et Willems A (**2011b**) Who is in there? Exploration of endophytic bacteria within the siphonous green seaweed *Bryopsis* (Bryopsidales, Chlorophyta). *PLoS One* 6 (10): e26458

Holmström C, Egan S, Franks A, McCloy S et Kjelleberg S (**2002**) Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology Ecology* 41 (1): 47-58

Honkanen T et Jormalainen V (**2005**) Genotypic variation in tolerance and resistance to fouling in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Oecologia* 144 (2): 196-205

Huggett M, Williamson J, Nys R, Kjelleberg S et Steinberg P (**2006**) Larval settlement of the common Australian sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* in response to bacteria from the surface of coralline algae. *Oecologia* 149 (4): 604-619

Hultgren K et Stachowicz JJ (**2011**) Camouflage in decorator crabs: integrating ecological, behavioural and evolutionary approaches. *Animal Camouflage*: 214-229

Ioannou E, Quesada A, Rahman MM, Gibbons S, Vagias C et Roussis V (**2011**) Dolabellanes with antibacterial activity from the brown alga *Dilophus spiralis*. *Journal of Natural Products* 74 (2): 213-222

Ioannou E, Zervou M, Ismail A, Ktari L, Vagias C et Roussis V (**2009**) 2,6-Cyclo-xenicanes from the brown algae *Dilophus fasciola* and *Dilophus spiralis*. *Tetrahedron* 65 (51): 10565-10572

Ishitsuka MO, Kusumi T, Ichikawa A et Kakisawa H (**1990**) Bicyclic diterpenes from two species of brown algae of the Dictyotaceae. *Phytochemistry* 29 (8): 2605-2610

Ivanova EP, Bakunina, I. Y., Sawabe, T., Hayashi K, Alexeeva YV, Zhukova NV et Mikhailov VV (**2002a**) Two species of culturable bacteria associated with degradation of brown algae *Fucus evanescens*. *Microbial ecology* 43 (2): 242-249

Ivanova EP, Christen R, Sawabe T, Alexeeva YV, Lysenko AM, Chelomin VP et Mikhailov VV (**2005**) Presence of ecophysiologically diverse populations within *Cobetia marina* strains isolated from marine invertebrate, algae and the environments. *Microbes and environments* 20 (4): 200-207

Ivanova EP, Sawabe T, Alexeeva YV, Lysenko AM, Gorshkova NM, Hayashi K, Zukova NV, Christen R et Mikhailov VV (**2002b**) *Pseudoalteromonas issachenkonii* sp. nov., a bacterium that degrades the thallus of the brown alga *Fucus evanescens*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 52 (1): 229-234

Iwasaki H (**1979**) Physiological ecology of red tide flagellates. *Biochemistry and physiology of protozoa* 1: 357-393

Jensen PR, Kauffman CA et Fenical W (**1996**) High recovery of culturable bacteria from the surfaces of marine algae. *Mar Biol* 126 (1): 1-7

Jiang J, Ma Y, Zhang Z et Xu H (**1997**) The histopathological study on "green decay diseases" of *Undaria pinnatifida* in Dalian. *Journal of Dalian Fisheries University/Dalian Shuichan Xueyuan Xuebao* 12: 7-12.

Johnson CR, Muir DG et Reysenbach AL (**1991**) Characteristic bacteria associated with surfaces of coralline algae: a hypothesis for bacterial induction of marine invertebrate larvae. *Marine Ecology Progress Series* 74 (2-3): 281-294

Joint I, Tait K, Callow ME, Callow JA, Milton D, Williams P et Cámara M (**2002**) Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary. *Science* 298 (5596): 1207-1207

Joint I, Tait K et Wheeler G (**2007**) Cross-kingdom signalling: exploitation of bacterial quorum sensing molecules by the green seaweed *Ulva*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362 (1483): 1223-1233

Kanagasabhapathy M, Sasaki H, Haldar S, Yamasaki S et Nagata S (**2006**) Antibacterial activities of marine epibiotic bacteria isolated from brown algae of Japan. *Annals of Microbiology* 56 (2): 167-173

Kaplan JB (**2010**) Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research* 89 (3): 205-218

Karez R, Engelbert S et Sommer U (**2000**) 'Co-consumption' and 'protective coating': two new proposed effects of epiphytes on their macroalgal hosts in mesograzer-epiphyte-host interactions. *Marine ecology Progress series* 205: 85-93

Katajamaa M, Miettinen J et Orešič M (**2006**) MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics* 22 (5): 634-636

Katsuoka M, Ogura C, Etoh H et Sakata K (**1990**) 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* 54 (ll): 3043-3044

Kerr A, Cowling MJ, Beveridge CM, Smith MJ, Parr ACS, Head RM, Davenport J et Hodgkiess T (**1998**) The early stages of marine biofouling and its effect on two types of optical sensors. *Environment International* 24: 331-343

Keshtacher-Liebso E, Hadar Y et Chen Y (**1995**) Oligotrophic bacteria enhance algal growth under Iron-deficient conditions. *Applied and environmental microbiology* 61 (6): 2439-2441

Kim JY, Alamsjah MA, Hamada A, Fujita Y et Ishibashi F (**2006**) Algicidal diterpenes from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70 (10): 2571-2574

Kittelmann S et Harder T (**2005**) Species- and site-specific bacterial communities associated with four encrusting bryozoans from the North Sea, Germany. *Journal of experimental marine biology and ecology* 327 (2): 201-209

Klausen M, Aaes-Jørgensen A, Molin S et Tolker-Nielsen T (**2003**) Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology* 50 (1): 61-68

Koh EL (**1997**) Do scleractinian corals engage in chemical warfare against microbes? *Journal of Chemical Ecology* 23 (2): 379-398

Kohlmeyer J et Volkmann-Kohlmeyer B (**2003**) Marine ascomycetes from algae and animal hosts. *Botanica marina* 46 (3): 285-306

Kolesnikova SA, Lyakhova EG, Kalinovsky AI, Dmitrenok PS, Dyshlovoy SA et Stonik VA (**2009**) Diterpenoid hydroperoxides from the far-eastern brown alga *Dictyota dichotoma*. *Australian Journal of Chemistry* 62 (9): 1185-1188

Kolter R et Greenberg EP (**2006**) Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature* 441: 300-302

Kong MK et Chan KY (**1979**) A study on the bacterial flora isolated from marine algae. *Botanica Marina* 22 (2): 83-98

König GM et Wright AD (**1997**) *Laurencia rigida*: chemical investigations of its antifouling dichloromethane extract. *Journal of Natural Products* 60 (10): 967-970

König GM, Wright AD et de Nys R (**1999**) Halogenated monoterpenes from *Plocamium costatum* and their biological activity. *Journal of Natural Products* 62 (2): 383-385

Koren O et Rosenberg E (**2006**) Bacteria associated with mucus and tissues of the coral *Oculina patagonica* in summer and winter. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (8): 5254-5259

Kubanek J, Jensen PR, Keifer PA, Sullards MC, Collins DO et Fenical W (**2003**) Seaweed resistance to microbial attack: a targeted chemical defense against marine fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (12): 6916-6921

Kumar V, Rao D, Thomas T, Kjellerberg S et Egan S (**2011**) Antidiatom and antibacterial activity of epiphytic bacteria isolated from *Ulva lactuca* in tropical waters. *Journal of Micorobiology and Biotechnology* 27 (7): 1543-1549

Küpper FC, Kloareg B, Guern J et Potin P (**2001**) Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiology* 125 (1): 278-291

La Barre S et Haras D (**2007**) Rencontres avec les bactéries marines. *Journal de la Société de Biologie* 201 (3): 281-289

La Barre S, Potin P, Leblanc C et Delage L (**2010**) The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. *Marine Drugs* 8 (4): 988-1010

Lachnit T, Blümel M, Imhoff JF et Wahl M (**2009**) Specific epibacterial communities on macroalgae: phylogeny matters more than habitat. *Aquatic Biology* 5: 181–186

Lachnit T, Meske D, Wahl M, Harder T et Schmitz R (**2011**) Epibacterial community patterns on marine macroalgae are host-specific but temporally variable. *Environmental microbiology* 13 (3): 655 - 665

Lachnit T, Wahl M et Harder T (**2010**) Isolated thallus-associated compounds from the macroalga *Fucus vesiculosus* mediate bacterial surface colonization in the field similar to that on the natural alga. *Biofouling* 26 (3): 247 - 255

Lahaye É (**2006**) Rôle structurant des exopolysaccharides dans un biofilm bactérien. *Thèse de l'Université de Bretagne-Sud*:

Lakshmanaperumalsamy P et Purushothaman A (**1982**) Heterotrophic bacteria associated with seaweed. *Proceedings: plant sciences* 91 (6): 487-493

Lam C, Stang A et Harder T (**2008**) Planktonic bacteria and fungi are selectively eliminated by exposure to marine macroalgae in close proximity. *FEMS Microbiology Ecology* 63 (3): 283-291

Lane AL et Kubanek J (**2008**) Secondary metabolite defenses against pathogens and biofoulers. *Algal Chemical Ecology*: 229-243

Lane AL, Nyadong L, Galhena AS, Shearer TL, Stout EP, Parry RM, Kwasnik M, Wang MD, Hay ME, Fernandez FM et Kubanek J (**2009**) Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals surface-mediated antifungal chemical defense of a tropical seaweed. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (18): 7314-7319

Lankadurai BP, Wolfe DM, Whitfield Âslund ML, Simpson AJ et Simpson MJ (**2013**) ^{1}H NMR-based metabolomic analysis of polar and non-polar earthworm metabolites after sub-lethal exposure to phenanthrene *Metabolomics* 9 (1): 44-56

Lavilla-Pitogo CR (**1992**) Agar-digesting bacteria associated with "rotten thallus syndrome" of *Gracilaria* sp. *Aquaculture* 102 (1-2): 1-7

Laycock RA (**1974**) The detrital food chain based on seaweeds. I. Bacteria associated with the surface of *Laminaria* fronds. *Marine Biology* 25 (3): 223-231

Lee CE (**2002**) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution* 17 (8): 386-391

Lemos M, Toranzo A et Barja J (**1985**) Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microbial Ecology* 11 (2): 149-163

Leroy C, Delbarre-Ladrat C, Ghillebaert F, Rochet MJ, Compère C et Combes D (**2007**) A marine bacterial adhesion microplate test using the DAPI fluorescent dye: a new method to screen antifouling agents. *Letters in Applied Microbiology* 44 (4): 372-378

Li X, Dobretsov S, Xu Y, Xiao X, Hung OS et Qian PY (**2006**) Antifouling diketopiperazines produced by a deep-sea bacterium, *Streptomyces fungicidicus*. *Biofouling* 22 (3): 201-208

Lindon JC et Nicholson JK (**2008**) Spectroscopic and statistical techniques for Information recovery in metabonomics and metabolomics. *Annual Review of Analytical Chemistry* 1 (1): 45-69

Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Antti H, Bollard ME, Keun H, Beckonert O, Ebbels TM, Reily MD, Robertson D, Stevens GJ, Luke P, Breau AP, Cantor GH, Bible RH, Niederhauser U, Senn H, Schlotterbeck G, Sidelmann UG, Laursen SM, Tymiak A, Car BD, Lehman-McKeeman L, Colet J-M, Loukaci A et Thomas C (**2003**) Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxicology and Applied Pharmacology* 187 (3): 137-146

Liu M, Dong Y, Zhao Y, Zhang G, Zhang W et Xiao T (**2011**) Structures of bacterial communities on the surface of *Ulva prolifera* and in seawaters in an *Ulva* blooming region in Jiaozhou Bay, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (7): 1703-1712

Lobban CS, Harrison PJ et Duncan MJ (**1985**) The physiological ecology of seaweeds. *Cambridge: Cambridge University Press*: 237 p

Longford SR, Tujula NA, Crocetti GR, Holmes AJ, Holmström C, Kjelleberg S et Taylor MW (**2007**) Comparisons of diversity of bacterial communities associated with three sessile marine eukaryotes. *Aquatic microbial ecology* 48 (3): 217-229

Mann KH (**1973**) Seaweeds: their productivity and strategy for growth: the role of large marine algae in coastal productivity is far more important than has been suspected. *Science* 182 (4116): 975-981

Manzo E, Ciavatta ML, Bakkas S, Villani G, Varcamonti M, Zanfardino A et Gavagnin M (**2009**) Diterpene content of the alga *Dictyota ciliolata* from a Moroccan lagoon. *Phytochemistry Letters* 2 (4): 211-215

Maréchal J-P, Culioli G, Hellio C, Thomas-Guyon H, Callow ME, Clare AS et Ortalo-Magné A (**2004**) 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* 313 (1): 47-62

MarinLit (**2013**) MarinLit Database, Version 17.3, Department of Chemistry, University of Canterbury, Christchurch, New Zealand. http://www.chem.canterbury.ac.nz/marinlit/marinlit.shtml. Accessed 9 Aug 2013.

Marshall K, Joint I, Callow M et Callow J (**2006**) Effect of marine bacterial isolates on the growth and morphology of axenic plantlets of the green alga *Ulva linza*. *Microbial Ecology* 52 (2): 302-310

Maruyama A, Maeda M et Shimidu U (**1990**) Distribution and classification of marine bacteria with the ability of cytokinin and auxin production. *Bulletin of Japanese society of microbial ecology* 5 (1): 1-8

Maruyama A, Maeda M et Simidu U (**1986**) Occurrence of plant hormone (cytokinin)-producing bacteria in the sea. *Journal of Applied Microbiology* 61 (6): 569-574

Matsuo Y, Suzuki M, Kasai H, Shizuri Y et Harayama S (**2003**) Isolation and phylogenetic characterization of bacteria capable of inducing differentiation in the green alga *Monostroma oxyspermum*. *Environmental Microbiology* 5 (1): 25-35

Maximilien R, Nys Rd, Holmström C, Gram L, Givskov M, Crass K, Kjelleberg S et Steinberg PD (**1998**) Chemical mediation of bacterial surface colonisation by secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra*. *Aquatic Microbial Ecology* 15 (3): 233-246

Meusnier I, Olsen J, Stam W, Destombe C et Valero M (**2001**) Phylogenetic analyses of *Caulerpa taxifolia* (Chlorophyta) and of its associated bacterial microflora provide clues to the origin of the Mediterranean introduction. *Molecular Ecology* 10 (4): 931 - 946

Midland SL, Wing RM et Sims JJ (**1983**) New crenulides from the sea hare, *Aplysia vaccaria*. *Journal of Organic Chemistry* 48 (11): 1906-1909

Mokrini R, Mesaoud MB, Daoudi M, Hellio C, Marechal J-P, El Hattab M, Ortalo-Magné A, Piovetti L et Culioli G (**2008**) Meroditerpenoids and derivatives from the brown alga *Cystoseira baccata* and their antifouling properties. *Journal of Natural Products* 71 (11): 1806-1811

Moss BL (**1982**) The control of epiphytes by *Halidrys siliquosa* (L.) Lyngb. (Phaeophyta, Cystoseiraceae). *Phycologia* 21 (2): 185-188

Mow-Robinson JM et Rheinheimer G (**1985**) Comparison of bacterial populations from the Kiel Fjord in relation to the presence or absence of benthic vegetation. *Botanica marina* 28 (1): 29-40

Myers JH, Gunthorpe L, Allinson G et Duda S (**2006**) Effects of antifouling biocides to the germination and growth of the marine macroalga, *Hormosira banksii* (Turner) Desicaine. *Marine Pollution Bulletin* 52 (9): 1048-1055

Nagashima F et Asakawa Y (**2001**) Sesqui- and diterpenoids from two Japanese and three European liverworts. *Phytochemistry* 56 (4): 347-352

Nagashima F, Toyota M et Asakawa Y (**1990**) Terpenoids from some Japanese liverworts. *Phytochemistry* 29 (7): 2169-2174

Nahas R, Abatis D, Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Vagias C et Roussis V (**2007**) Radical-scavenging activity of Aegean Sea marine algae. *Food Chemistry* 102 (3): 577-581

Nakanishi K, Nishijima M, Nishimura M, Kuwano K et Saga N (**1996**) Bacteria that induce morphogenesis in *Ulva pertusa* (Chlorophyta) grown under axenic conditions. *Journal of Phycology* 32 (3): 479-482

Nakanishi K, Nishijima M, Nomoto AM, Yamazaki A et Saga N (**1999**) Requisite morphologic interaction for attachment between *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and symbiotic bacteria. *Marine Biotechnology* 1 (1): 107-111

Nakashima K, Imoto M, Sono M, Tori M, Nagashima F et Asakawa Y (**2002**) Total synthesis of (-)-(7S,10R)-calamenene and (-)-(7S,10R)-2-hydroxycalamenene by use of a ring-closing metathesis reaction. A comparison of the cis- and trans-Isomers. *Molecules* 7 (7): 517-527

Nakazaki A, Era T et Kobayashi S (**2007**) Total Synthesis of (±)-Gleenol and (±)-Axenol via a Functionalized Spiro[4.5]decane. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 55 (11): 1606-1609

Namba A, Shigenobu Y, Kobayashi M, Kobayashi T et Oohara I (**2010**) A new primer for 16S rDNA analysis of microbial communities associated with *Porphyra yezoensis*. *Fisheries Science* 76 (5): 873-878

Nasrolahi A, Stratil SB, Jacob KJ et Wahl M (**2012**) A protective coat of microorganisms on macroalgae: inhibitory effects of bacterial biofilms and epibiotic microbial assemblages on barnacle attachment. *FEMS Microbiology Ecology* 81 (3): 583-595

Nguyen XC, Longeon A, Pham VC, Urvois F, Bressy C, Trinh TTV, Nguyen HN, Phan VK, Chau VM, Briand J-F et Bourguet-Kondracki M-L (**2013**) Antifouling 26,27-Cyclosterols from the Vietnamese Marine Sponge *Xestospongia testudinaria*. *Journal of Natural Products* 76 (7): 1313-1318

Nizamuddin M et Godeh M (**1993**) Observations on *Taonia atomaria F. Ciliata* (Lamour.). *Pakistan Journal of Botany* 25 (2): 199-207

Nylund GM, Cervin G, Hermansson M et Pavia H (**2005**) Chemical inhibition of bacterial colonization by the red alga *Bonnemaisonia hamifera*. *Marine Ecology-Progress Series* 302: 27-36

Nylund GM, Cervin G, Persson F, Hermansson M, Steinberg PD et Pavia H (**2008**) Seaweed defence against bacteria: a poly-brominated 2-heptanone from the red alga *Bonnemaisonia hamifera* inhibits bacterial colonisation. *Marine Ecology-Progress Series* 369: 39-50

Nylund GM, Gribben PE, De Nys R, Steinberg PD et Pavia H (**2007**) Surface chemistry versus whole-cell extracts: antifouling tests with seaweed metabolites. *Marine Ecology - Progress Series* 329: 73-84

Nylund GM et Pavia H (**2003**) Inhibitory effects of red algal extracts on larval settlement of the barnacle *Balanus improvisus*. *Marine Biology* 143 (5): 875-882

Nylund GM, Persson F, Lindegarth M, Cervin G, Malte H et Pavia H (**2010**) The red alga *Bonnemaisonia asparagoides* regulates epiphytic bacterial abundance and community composition by chemical defence. *FEMS Microbiol Ecology* 71: 84–93

Nylund GrM, Weinberger F, Rempt M et Pohnert G (**2011**) Metabolomic assessment of induced and activated chemical defence in the invasive red alga *Gracilaria vermiculophylla*. *PLoS One* 6 (12): e29359

O'Toole GA et Kolter R (**1998**) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 30 (2): 295-304

Okino T, Yoshimura E, Hirota H et Fusetani N (**1996**) New antifouling kalihipyrans from the marine sponge *Acanthella cavernosa*. *Journal of Natural Products* 59 (11): 1081-1083

Olguin-Uribe G, Abou-Mansour E, Boulander A, Débard H, Francisco C et Combaut G (**1997**) 6-bromoindole-3-carbaldehyde, from an *Acinetobacter* Sp. bacterium associated with the ascidian *Stomozoa murrayi*. *Journal of Chemical Ecology* 23 (11): 2507-2521

Oliver SG, Winson MK, Kell DB et Baganz F (**1998**) Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology* 16 (9): 373-378

Othmani A, Bouzidi N, Viano Y, Alliche Z, Seridi H, Blache Y, Hattab M, Briand J-F et Culioli G (**2013**) Anti-microfouling properties of compounds isolated from several Mediterranean *Dictyota* spp. *Journal of Applied Phycology*: DOI 10.1007/s10811-10013-10185-10812

Ott JA (**1980**) Growth and production in *Posidonia Oceanica* (L.) Delile. *Marine Ecology* 1 (1): 47-64

Ovenden SPB, Nielson JL, Liptrot CH, Willis RH, Tapiolas DM, Wright AD et Motti CA (**2012**) Update of spectroscopic data for 4-hydroxydictyolactone and Ddctyol E isolated from a *Halimeda stuposa — Dictyota* sp. assemblage. *Molecules* 17 (3): 2929-2938

Paul NA, Nys Rd et Steinberg PD (**2006**) Chemical defence against bacteria in the red alga *Asparagopsis armata*: linking structure with function. *Marine Ecology Progress Series* 306: 87-101.

Paul VJ et Fenical W (**1986**) Chemical defense in tropical green algae, order Caulerpales *Marine Ecology Progress Series* 34: 157-169

Paul VJ et Puglisi MP (**2004**) Chemical mediation of interactions among marine organisms. *Natural Product Reports* 21 (1): 189-209

Paula JCD, Vallim MA et Teixeira VL (**2011**) What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21: 216-228

Pénez N, Culioli G, Pérez T, Briand J-F, Thomas OP et Blache Y (**2011**) Antifouling properties of simple indole and purine alkaloids from the mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*. *Journal of Natural Products* 74 (10): 2304-2308

Percot A, Yalçin A, Aysel V, Erdugan H, Dural B et Güven KC (**2009**) Loliolide in marine algae. *Natural Product Research* 23 (5): 460-465

Persson F, Svensson R, Nylund GM, Fredriksson NJ, Pavia H et Hermansson M (**2011**) Ecological role of a seaweed secondary metabolite for a colonizing bacterial community. *Biofouling* 27 (6): 579-588

Peterson BJ, Frankovich TA et Zieman JC (**2007**) Response of seagrass epiphyte loading to field manipulations of fertilization, gastropod grazing and leaf turnover rates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 349 (1): 61-72

Piattelli M, Tringali C, Neri P et Rocco C (**1995**) Stereochemistry and conformation of dolabellane diterpenes: an NMR and molecular mechanics study. *Journal of Natural Products* 58 (5): 697-704

Piola RF, Dafforn KA et Johnston EL (**2009**) The influence of antifouling practices on marine invasions. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 25 (7): 633 - 644

Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A et Oresic M (**2010**) MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11 (1): 395

Potin P (**2008**) Oxidative burst and related responses in biotic interactions of algae. *In Algal chemical ecology (pp 245-271) Springer Berlin Heidelberg*

Potin P, Bouarab K, Küpper F et Kloareg B (**1999**) Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. *Current Opinion in Microbiology* 2 (3): 276-283

Potin P, Bouarab K, Salaün J-P, Pohnert G et Kloareg B (**2002**) Biotic interactions of marine algae. *Current Opinion in Plant Biology* 5 (4): 308-317

Prieur D, Gaill F et Corre S (**1993**) Complex epibiotic bacterial communities on marine organisms: fouling or interactions. *Trends in microbial ecology*: 207-212

Provasoli L (**1980**) Effect of plant hormones on *Ulva. The Biological Bulletin* 114 (3): 375-384

Provasoli L et Pintner IJ (**1972**) Effect of bacteria on seaweed morphology. *Journal of Phycology* 8 (10)

Purcaro R, Schrader KK, Burandt C, DellaGreca M et Meepagala KM (**2009**) Algicide constituents from *swinglea glutinosa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (22): 10632-10635

Qian P-Y, Xu Y et Fusetani N (**2010**) Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. *Biofouling* 26 (2): 223-234

Ramaiah N et Chandramohan D (**1992**) Densities, cellulases, alginate and pectin lyases of luminous and other heterotrophic bacteria associated with marine algae. *Aquatic botany* 44 (1): 71-81

Rao D, Webb JS, Holmström C, Case R, Low A, Steinberg P et Kjelleberg S (**2007**) Low densities of epiphytic bacteria from the marine alga *Ulva australis* inhibit settlement of fouling organisms. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (24): 7844-7852

Reise K, Gollasch S et Wolff WJ (**1999**) Introduced marine species of the north sea costs. *Helgolander meeresunters* (52): 219-234

Richardson SL (**2006**) Response of epiphytic foraminiferal communities to natural eutrophication in seagrass habitats off Man O'War Cay, Belize. *Marine Ecology* 27: 404-416

Riquelme C, Rojas A, Flores Vn et Correa JA (**1997**) Epiphytic bacteria in a copper-enriched environment in northern Chile. *Marine Pollution Bulletin* 34 (10): 816-820

Roberts SK, Wei GX et Wu CD (**2002**) Evaluating biofilm growth of two oral pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 35 (6): 552-556

Romeo T, Lemon KP, Earl AM, Vlamakis HC, Aguilar C et Kolter R (2008) Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. In: Bacterial Biofilms, vol 322. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, pp 1-16

Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R et Zilber-Rosenberg I (**2007**) The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology* 5: 355–362

Rosenberg G et Paerl HW (**1981**) Nitrogen fixation by blue-green algae associated with the siphonous green seaweed *Codium decorticatum*: effects on ammonium uptake. *Mar Biol* 61 (2-3): 151-158

Roux A, Lison D, Junot C et Heilier J-F (**2011**) Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clinical Biochemistry* 44 (1): 119-135

Rubio C (**2002**) Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. *thèse de doctorat, spécialité Métallurgie et Matériaux, Université Paris 6*:

Rudney JD et Staikov RK (**2002**) Simultaneous measurement of the viability, aggregation, and live and dead adherence of *Streptococcus crista*, *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human saliva in relation to indices of caries, dental plaque and periodontal disease. *Archives of Oral Biology* 47 (5): 347-359

Ruzicka L (**1959**) History of the isoprene rule. *Proceedings of the Chemical Society* 341:

Saha M, Rempt M, Grosser K, Pohnert G et Weinberger F (**2011**) Surface-associated fucoxanthin mediates settlement of bacterial epiphytes on the rockweed *Fucus vesiculosus*. *Biofouling* 27 (4): 423-433

Salaün S (**2009**) Interactions entre la macroalgue brune *Laminaria digitata* et ses épibiontes bactériens: Etude moléculaire et spectroscopiques, et capacité d'adhésion et de formation de biofilm. *Thèse de doctorat, Université de Bretagne Sud: 240 p*:

Salaün S, La Barre S, Santos-Goncalvez MD, Potin P, Haras D et Bazire A (**2012**) Influence of exudates of the kelp *Laminaria Digitata* on biofilm formation of associated and exogenous bacterial epiphytes. *Microbiol Ecology* 64: 359–369

Salta M, Wharton JA, Blache Y, Stokes KR et Briand J-F (**2013**) Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environmental Microbiology* 15 (11): 2879-2893

Sandberg M, Määttänen A, Peltonen J, Vuorela PM et Fallarero A (**2008**) Automating a 96-well microtitre plate model for *Staphylococcus aureus* biofilms: an approach to screening of natural antimicrobial compounds. *International Journal of Antimicrobial Agents* 32 (3): 233-240

Santavy DL et Colwell RR (**1990**) Comparison of bacterial communities associated with the Caribbean sclerosponge *Ceratoporella nicholsoni* and ambient seawater. *Marine ecology progress series* 67 (1): 73-82

Sardans J, Penuelas J et Rivas-Ubach A (**2011**) Ecological metabolomics: overview of current developments and future challenges. *Chemoecology* 21: 191-225

Sawabe T, Makino H, Tatsumi M, Nakano K, Tajima K, Iqbal MM et Christen R (**1998**) *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*. *International journal of systematic bacteriology* 48 (3): 769-774

Sawabe T, Tanaka R, Iqbal MM, Tajima K, Ezura Y, Ivanova EP et Christen R (**2000**) Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162T and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 50 (1): 265-271

Schauer M, Massana R et Pedro-alio C (**2000**) Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. . *FEMS Microbiology ecology* 33: 51-99

Schlenk D et Gerwick WH (**1987**) Dilophic acid, a diterpenoid from the tropical brown seaweed *Dilophus guineensis*. *Phytochemistry* 26 (4): 1081-1084

Schmitt TM, Hay ME et Lindquist N (**1995**) Constraints on chemically mediated coevolution: multiple functions for seaweed secondary metabolites. *Ecology* 76 (1): 107-123

Schmitt TM, Lindquist N et Hay ME (**1998**) Seaweed secondary metabolites as antifoulants: effects of *Dictyota* spp. diterpenes on survivorship, settlement, and development of marine invertebrate larvae. *Chemoecology* 8 (3): 125-131

Schoenwaelder MEA (**2002**) The occurrence and cellular significance of physodes in brown algae. *Phycologia* 41 (2): 125-139

Schultz MP, Bendick JA, Holm ER et Hertel WM (**2011**) Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 27 (1): 87 - 98

Semenova EV, Shlykova DS, Semenov AM, Ivanov MN, Shelyakov OV et Netrusov AI (**2009**) Bacteria-epiphytes of brown macro alga in oil utilization in north sea ecosystems. *Moscow University Biological Sciences Bulletin* 64 (3): 107-110

Sera Y, Adachi K, Nishida F et Shizuri Y (**1999**) A new sesquiterpene as an antifouling substance from a palauan marine sponge, *Dysidea herbacea*. *journal of Natural Products* 62 (2): 395-396

Shaker KH, Müller M, Abdel Ghani M, Dahse H-M et Seifert K (**2010**) Terpenes from the soft corals *Litophyton arboreum* and *Sarcophyton ehrenbergi*. *Chemistry & biodiversity* 7 (8): 2007-2015

Shakeri S, Kermanshahi RK, Moghaddam MM et Emtiazi G (**2007**) Assessment of biofilm cell removal and killing and biocide efficacy using the microtiter plate test. *Biofouling* 23 (2): 79-86

Sharp KH, Eam B, Faulkner DJ et Haygood MG (**2007**) Vertical transmission of diverse microbes in the tropical sponge *Corticium* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (2): 622-629

Siamopoulou P, Bimplakis A, Iliopoulou D, Vagias C, Cos P, Vanden Berghe D et Roussis V (**2004**) Diterpenes from the brown algae *Dictyota dichotoma* and *Dictyota linearis*. *Phytochemistry* 65 (14): 2025-2030

Silva-Aciares F et Riquelme C (**2007**) Inhibition of attachment of some fouling diatoms and settlement of *Ulva lactuca* zoospores by film-forming bacterium and their extracellular products isolated from biofouled substrata in Northern Chile. *Electronic Journal of Biotechnology* 11 (1): 1-11

Simeonidis D (**1995**) Guide sous-marin du bassin méditerranéen : faune et flore. *Delachaux et Niestlé* 1: 160 p

Singh RP, Mantri VA, Reddy CRK et Jha B (**2011**) Isolation of seaweed-associated bacteria and their morphogenesis-inducing capability in axenic cultures of the green alga *Ulva fasciata*. *Aquatic Biology* 12 (1): 13-21

Sneed JM et Pohnert G (**2011**) The green alga *Dicytosphaeria ocellata* and its organic extracts alter natural bacterial biofilm communities. *Biofouling* 27 (4): 347-356

Soares A, da Gama B, da Cunha A, Teixeira V et Pereira R (**2008**) Induction of attachment of the mussel *perna perna* by natural products from the brown seaweed *Stypopodium zonale*. *Marine Biotechnology* 10 (2): 158-165

Soares AR, Teixeira VL, Pereira RC et Villaça R (**2003**) Variation on diterpene production by the Brazilian alga *Stypopodium zonale* (Dictyotales, Phaeophyta). *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 1347–1350

Spoerner M, Wichard T, Bachhuber T, Stratmann J et Oertel W (**2012**) Growth and thallus morphogenesis of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) depends on a combination of two bacterial species excreting regulatory factors. *Journal of Phycology* 48 (6): 1433-1447

Stafslien S, Bah J, Daniels J, Wal L, Nevins J, Smith J, Schiele K, Chisholm B (**2007a**) Combinatorial materials research applied to the development of new surface coatings VI: An automated spinning water jet apparatus for the high-throughput characterization of fouling-release marine coatings. *Review of Scientific Instrume* 78 (7): 1-6

Stafslien S, Daniels J, Chisholm B et D C (**2007**) Combinatorial materials research applied to the development of new surface coatings III. Utilisation of a high-throughput multiwell plate screening method to rapidly assess bacterial biofilm retention on antifouling surfaces. *Biofouling* 23 (1): 37-44

Stafslien S, Daniels J, Mayo B, Christianson D, Chisholm B, Ekin A, Webster D, Swain G (**2007b**) Combinatorial materials research applied to the development of new surface coatings IV. A high-throughput bacterial biofilm retention and retraction assay for screening fouling-release performance of coatings. *Biofouling* 23 (1): 45-54

Stafslien SJ, Bahr J A., Feser J M, Weisz J C, Chisholm B J, Ready T E, Boudjouk P (**2006**) Combinatorial materials research applied to the development of new surface coatings I, a multiwell plate screening method for the high-throughput assessment of bacterial biofilm retention on surfaces. *Journal of combinatorial chemistry* 8 (2): 156-162

Staufenberger T, Thiel V, Wiese J et Imhoff JF (**2008**) Phylogenetic analysis of bacteria associated with *Laminaria saccharina*. *FEMS Microbiology Ecology* 64 (1): 65-77

Steinberg P, Schneider R et Kjelleberg S (**1997**) Chemical defenses of seaweeds against microbial colonization. *Biodegradation* 8 (3): 211-220

Steinberg PD et de Nys R (**2002**) Chemical mediation of colonization of seaweed surfaces. *Journal of Phycology* 38 (4): 621-629

Steinberg PD, de Nys R et Kjelleberg S (**1998**) Chemical inhibition of epibiota by Australian seaweeds. *Biofouling* 12 (1-3): 227-244

Steinberg PD, de Nys R et Kjelleberg S (**2001**) Chemical mediation of surface colonization. *Marine chemical ecology* CRC Press, Boca Raton, FL: 355-387

Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B et Å vabic-Vlahovic M (**2000**) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 40 (2): 175-179

Stewart PS et Franklin MJ (**2008**) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 6 (3): 199-210

Stoodley P, Lewandowski Z, Boyle JD et Lappin-Scott HM (**1999**) Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: An in situ investigation of biofilm rheology. *Biotechnology and Bioengineering* 65 (1): 83-92

Stoodley P, Sauer K, Davies DG et Costerton JW (**2002**) Biofilms as complex differentiated communities *Annual Review of Microbiology* 56 (1): 187-209

Stratil SB, Neulinger SC, Knecht H, Friedrichs AK et Wahl M (**2013**) Temperature-driven shifts in the epibiotic bacterial community composition of the brown macroalga *Fucus vesiculosus*. *MicrobiologyOpen* 2 (2): 338-349

Sudatti D, Rodrigues S et Pereira R (**2006**) Quantitative GC-ECD analysis of halogenated metabolites: determination of surface and within-thallus elatol of *Laurencia obtusa*. *Journal of Chemical Ecology* 32 (4): 835-843

Sudatti DB, Rodrigues SV, Coutinho R, Da Gama BAP, Salgado LT, Amado Filho GM et Pereira RC (**2008**) Transport and defensive role of elatol at the surface of the red seaweed *Laurencia obtusa* (Ceramiales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 44 (3): 584-591

Sun HH et Fenical W (**1979**) Diterpenoids of the brown seaweed *Glossophora galapagensis*. *Phytochemistry* 18 (2): 340-341

Sun HH, McEnroe FJ et Fenical W (**1983**) Acetoxycrenulide, a new bicyclic cyclopropane-containing diterpenoid from the brown seaweed *Dictyota crenulata*. *Journal of Organic Chemistry* 48 (11): 1903-1906

Suzuki Y, Takabayashi T, Kawaguchi T et Matsunaga K (**1998**) Isolation of an allelopathic substance from the crustose coralline algae, *Lithophyllum* spp., and its effect on the brown alga, *Laminaria religiosa* Miyabe (Phaeophyta). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 225 (1): 69-77

Taniguchi K, Shiraishi K, Kurata K et Suzuki M (**1989**) 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 of Scientific Fisheries* 55 (7): 1133-1137

Tatewaki M, Provasoli L et Pintner IJ (**1983**) Morphognesis of *Monostroma oxyspermum* (Kütz.) Doty (Chlorophyceae) in axenic culture,especially in bialgal culture *Journal of Phycology* 19 (4): 409-416

Teixeira VL, Cavalcanti DN et Pereira RC (**2001**) Chemotaxonomic study of the diterpenes from the brown alga *Dictyota menstrualis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 313-316

Teixeira VL et Kelecom A (**1988**) A chemotaxonomic study of diterpenes from marine brown algae of the genus *Dictyota*. *Science of The Total Environment* 75 (2-3): 271-283

Thabard M, Gros O, Hellio C et Mare´chal J-P (**2011**) *Sargassum polyceratium* (Phaeophyceae, Fucaceae) surface molecule activity towards fouling organisms and embryonic development of benthic species. *Botanica Marina* 54: 147–157

Thakur N et Anil AC (**2000**) Antibacterial activity of the sponge *Ircinia Ramosa*: importance of its surface-associated bacteria. *Journal of Chemical Ecology* 26 (1): 57-71

Thakur NL, Anil AC et Müller WE (**2004**) Culturable epibacteria of the marine sponge *Ircinia fusca*: temporal variations and their possible role in the epibacterial defense of the host. *Aquatic microbial ecology* 37 (3): 295-304

Thomas KV et Brooks S (**2010**) The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling* 26 (1): 73-88

Thomas R et Allsopp D (**1983**) The effects of certain periphytic marine bacteria upon the settlement and growth of *Enteromorpha*, a fouling alga. *Biodeterioration* 5 (3): 48-357

Trias R, García-Lledó A, Sánchez N, López-Jurado JL, Hallin S et Bañeras L (**2012**) Abundance and composition of epiphytic bacterial and archaeal ammonia oxidizers of marine red and brown macroalgae. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (2): 318-325

Tringali C, Piattelli M et Spatafora C (**1995**) Sesquiterpenes and geranylgeranylglycerol from the brown algae *Taonia lacheana* and *Taonia atomaria f. ciliata* : their chemotaxonomic significance. *Phytochemistry* 40 (3): 827-831

Tsukidate JI (**1983**) On the symbiotic relationship between *Porphyra* species and attached bacteria, and a bacterial pathogen in white rot. *Bulletin of Nansei National Fisheries Research Institute* 15: 29-96

Tujula NA (**2006**) Analysis of the epiphytic bacterial community associated with the green alga *Ulva australis*. *Thèse de doctorat, University of New South Wales*: 178 p

Tujula NA, Crocetti GR, Burke C, Thomas T, Holmstrom C et Kjelleberg S (**2010**) Variability and abundance of the epiphytic bacterial community associated with a green marine *Ulvacean alga*. *International Society for Microbial Ecology* 4 (2): 301–311

Tziveleka L-A, Abatis D, Paulus K, Bauer R, Vagias C et Roussis V (**2005**) Marine polyprenylated hydroquinones, quinones, and chromenols with inhibitory effects on leukotriene formation. *Chemistry & Biodiversity* 2: 901-909

Vairappan C, Suzuki M, Ishii T, Okino T, Abe T et Masuda M (**2008**) Antibacterial activity of halogenated sesquiterpenes from Malaysian *Laurencia* spp. *Phytochemistry* 69 (13): 2490 - 2494

Vallim MA, Barbosa JE, Cavalcanti DN, De-Paula JC, Silva VAGGd, Teixeira VL et Paixão aICNdP (**2010**) In vitro antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian

brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. *Journal of Medicinal Plants Research* 4 (22): 2379-2382

Vallim MA, Teixeira VL et Pereira RC (**2007**) Feeding-deterrent properties of diterpenes of *Dictyota mertensii* (Phaeophyceae, Dictyotales). *Brazilian Journal of Oceanography* 55 (3): 223-229

Van Alstyne KL, Nelson AV, Vyvyan JR et Cancilla DA (**2006**) Dopamine functions as an antiherbivore defense in the temperate green alga *Ulvaria obscura*. *Oecologia* 148: 304-311

Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaer J, Vermant J et Michiels J (**2008**) Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology* 16 (10): 496-506

Vesterlund S, Paltta J, Karp M et Ouwehand AC (**2005**) Measurement of bacterial adhesion--in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods* 60 (2): 225-233

Viano Y, Bonhomme D, Camps M, Briand J-F, Ortalo-Magné A, Blache Y, Piovetti L et Culioli G (**2009**) Diterpenoids from the mediterranean brown alga *Dictyota* sp. evaluated as antifouling substances against a marine bacterial biofilm. *Journal of Natural Products* 72 (7): 1299-1304

Volk R-B et Furkert FH (**2006**) Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiological Research* 161 (2): 180-186

Wahl M (**1989**) Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series* 58: 175

Wahl M, Goecke F, Labes A, Dobretsov S et Weinberger F (**2012**) The second skin: ecological role of epibiotic biofilms on marine organisms. *Frontiers in Mocrobiology* 3: 21 p

Wahl M et Hay M (**1995**) Associational resistance and shared doom: effects of epibiosis on herbivory. *Oecologia* 102 (3): 329-340

Wahl M, Hay ME et Enderlein P (**1997**) Effects of epibiosis on consumer-prey interactions. *Hydrobiologia* 355: 49-59

Wahl M, Jensen PR et Fenical W (**1994**) Chemical control of bacterial epibiosis on ascidians. *Marine Ecology Progress Series* 110: 7-199

Wahl M et Lafargue F (**1990**) Marine epibiosis. *Oecologia* 82 (2): 275-282

Wahl M et Mark O (**1999**) The predominantly facultative nature of epibiosis: experimental and observational evidence. *Marine Ecology Progress Series* 187 (1): 59-66

Wahl M, Shahnaz L, Dobretsov S, Saha M, Symanowski F, David K, Lachnit T, Vasel M et Weinberger F (**2010**) Ecology of antifouling resistance in the bladder wrack *Fucus*

vesiculosus: patterns of microfouling and antimicrobial protection. *Marine Ecology Progress Series* 411: 33–48

Wang H, Ooi E et Ang P (**2008**) Antiviral activities of extracts from Hong Kong seaweeds. *Journal of Zhejiang University - Science B* 9 (12): 969-976

Wang J, Shi T, Yang X, Han W et Zhou Y (**2013**) Environmental risk assessment on capsaicin used as active substance for antifouling system on ships. *Chemosphere*:

Watnick P et Kolter R (**2000**) Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology* 182 (10): 2675-2679

Webster NS et Taylor MW (**2012**) Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environmental Microbiology* 14 (2): 335-346

Weinberger F, Coquempot B, Forner S, Morin P, Kloareg B et Potin P (**2007**) Different regulation of haloperoxidation during agar oligosaccharide-activated defence mechanisms in two related red algae, *Gracilaria* sp. and *Gracilaria chilensis*. *Journal of Experimental Botany* 58 (15-16): 4365 - 4372

Weinberger F et Friedlander M (**2000**) Response of *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) to oligoagars results in defense against agar-degrading epiphytes. *Journal of Phycology* 36 (6): 1079-1086

Weinberger F, Pohnert G, Berndt M-L, Bouarab K, Kloareg B et Potin P (**2005**) Apoplastic oxidation of L-asparagine is involved in the control of the green algal endophyte *Acrochaete operculata* Correa & Nielsen by the red seaweed *Chondrus crispus* Stackhouse. *Journal of Experimental Botany* 56 (415): 1317-1326

Wheeler GL, Tait K, Taylor A, Brownlee C et Joint IAN (**2006**) Acyl-homoserine lactones modulate the settlement rate of zoospores of the marine alga *Ulva intestinalis* via a novel chemokinetic mechanism. *Plant, Cell & Environment* 29 (4): 608-618

Wiese J, Thiel V, Nagel K, Staufenberger T et Imhoff J (**2009**) Diversity of antibiotic-active bacteria associated with the brown alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea. *Marine Biotechnology* 11 (2): 287-300

Wimpenny J, Manz W et Szewzyk U (**2000**) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* 24 (5): 661-671

Wisespongpand P et Kuniyoshi M (**2003**) Bioactive phloroglucinols from the brown alga *Zonaria diesingiana*. *Journal of Applied Phycology* 15 (2): 225-228

Wright AD, K"nig GM et Sticher O (**1993**) New and highly oxidised hydroazulenoid diterpenes from the tropical marine brown alga *Dictyota volubilis*. *Tetrahedron* 49 (3): 571-580

Xu Q, Barrios C, Cutright T et Newby B-mZ (**2005**) Assessment of antifouling effectiveness of two natural product antifoulants by attachment study with freshwater bacteria. *Environmental Science and Pollution Research* 12 (5): 278-284

Xu Y, He H, Schultz S, Liu X, Fusetani N, Xiong H, Xiao X et Qian P-Y (**2010**) Potent antifouling compounds produced by marine *Streptomyces*. *Bioresource Technology* 101 (4): 1331-1336

Xu Y, Li H, Li X, Xiao X et Qian P-Y (**2009**) Inhibitory effects of a branched-chain fatty acid on larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. *Marine Biotechnology* 11 (4): 495-504

Yebra DM, Kiil S et Dam-Johansen K (**2004**) Antifouling technology Past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* 50 (2): 75-104

Yumoto I, Yamaguchi K, Yamada K, Ezora Y et Kimura T (**1989**) Relationship between bacterial flora and occurrence of the *Alteromonas* sp., the causative agent of red-spots on the culture bed of makonbu *Laminaria japonica*, in the coastal area of Funka Bay [Japan]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 55

Yurkov VV et Beatty JT (**1998**) Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3): 695-724

Zargiel KA, Coogan JS et Swain GW (**2011**) Diatom community structure on commercially available ship hull coatings. *Biofouling* 27 (9): 955-965

Zhou X, Okamura H et Nagata S (**2006**) Remarkable synergistic effects in antifouling chemicals against *Vibrio fischeri* in a bioluminescent assay. *Journal of Health Science* 52 (3): 243-251

Zobell CE (**1943**) The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of bacteriology* 46 (1): 39 p

Zobell CE et Allen EC (**1933**) Attachment of marine bacteria to submerged slides. *Experimental biology and medicine* 30 (9): 1409-1411

Zobell CE et Allen EC (**1935**) The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *Journal of Bacteriology* 29 (3): 239–251

Annexes

Annexe1 : RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **Ds1**

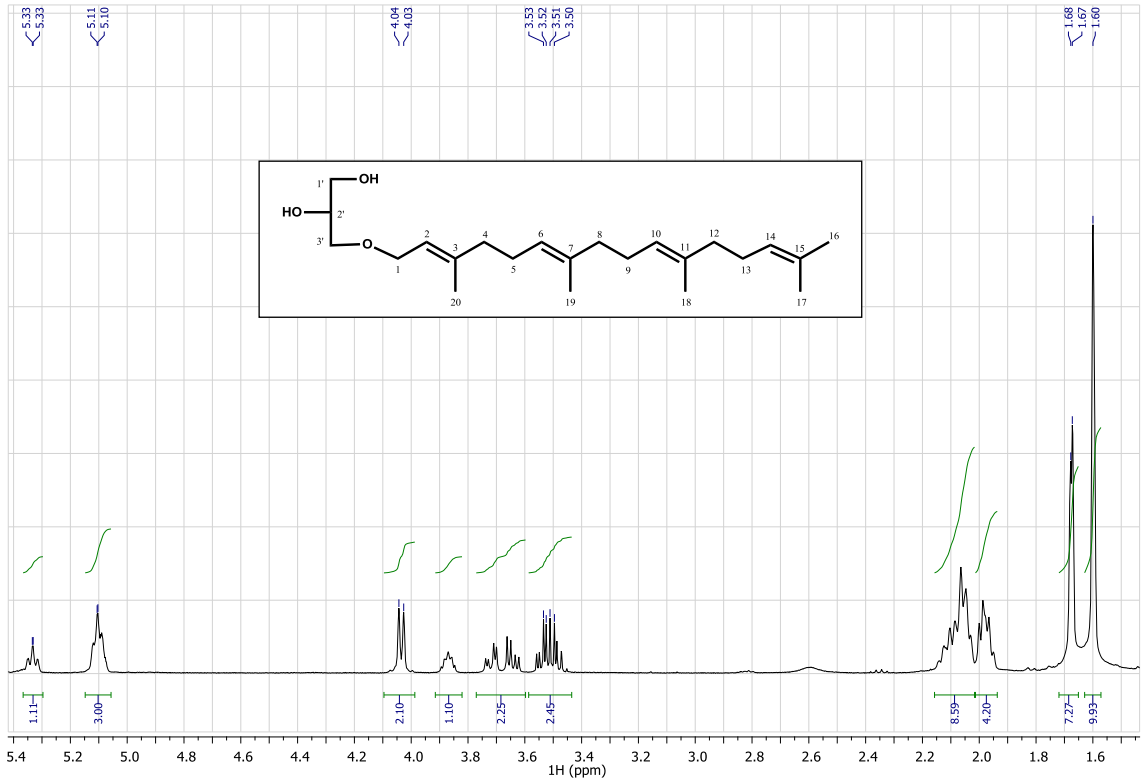


Figure 1A : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ds1** ($CDCl_3$, 400MHz)

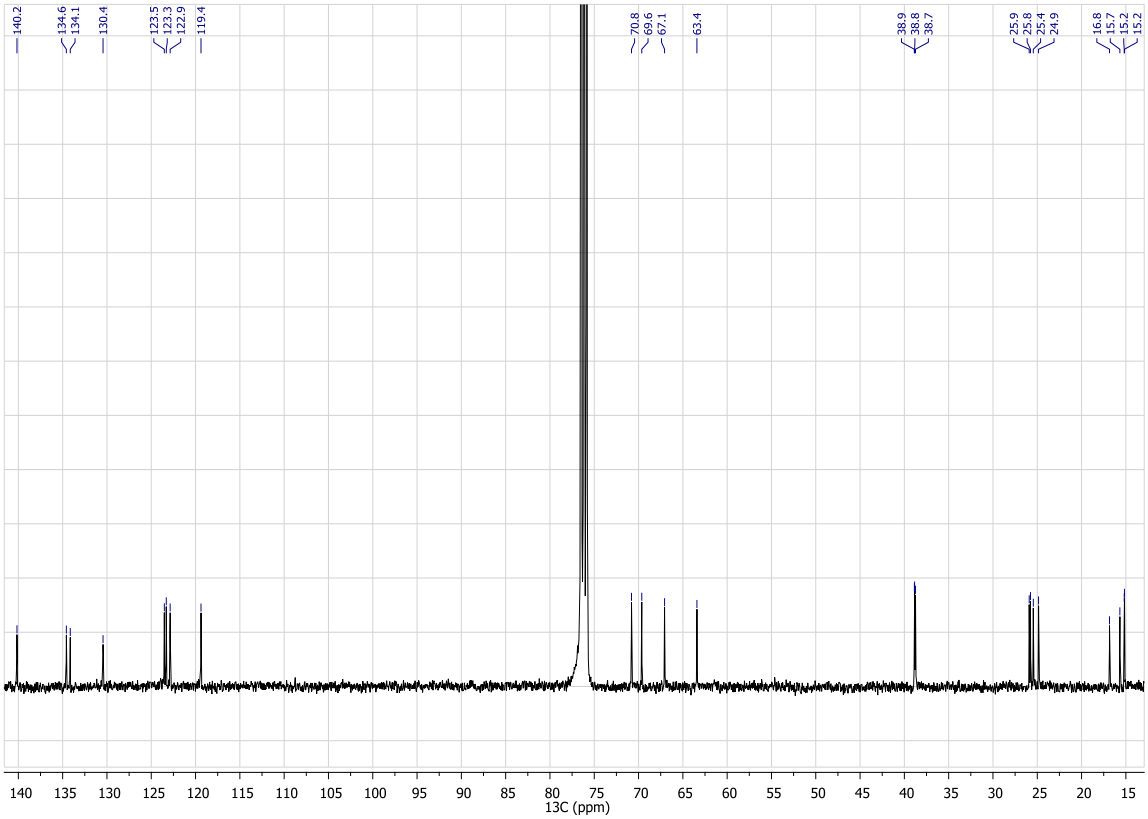


Figure 1B : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ds1** ($CDCl_3$, 100MHz)

Tableau 1C : Données RMN 1D et 2D ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ds1**

$C_{23}H_{40}O_3$

MM = 364 $g.mol^{-1}$

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^1H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélation HMBC	COSY ^1H-^1H
1	67,1	CH_2	4,03 *d* (7,0 Hz)	C-1', C-2, C-3	H-2, H_3-20
2	119,4	CH	5,33 *br t* (7,0 Hz)	C-4, C-20	H_2-1, H_3-20
3	140,2	C			
4	38,7	CH_2	2,06 *m*	C-2, C-3, C-5	H-6, H_3-20
5	25,4	CH_2	2,10 *m*	C-4, C-6, C-7	H_2-8
6	122,9	CH	5,10 *m*	C-4, C-8, C-19	H_2-4, H_3-19
7	134,6	C			
8	38,8	CH_2	1,98 *m*	C-6, C-7, C-9, C-10, C-19	H_2-5
9	25,9	CH_2	2,06 *m*	C-7, C-8, C-10	H-10
10	123,3	CH	5,10 *m*	C-8, C-12, C-18	H_2-9, H_3-18
11	134,1	C			
12	38,9	CH_2	1,98 *m*	C-10, C-11, C-13, C-14, C-18	
13	25,8	CH_2	2,06 *m*	C-12	H-14
14	123,5	CH	5,10 *m*	C-12, C-16?, C-17?	H_2-13, H_3-17
15	130,4	C			
16	24,9	CH_3	1,68 *s*	C-14, C-15, C-17	
17	16,8	CH_3	1,60 *s*	C-14, C-15, C-16	H-14
18	15,2	CH_3	1,60 *s*	C-10, C-11, C-12	H-10
19	15,2	CH_3	1,60 *s*	C-6, C-7, C-8	H-6
20	15,7	CH_3	1,67 *s*	C-2, C-3, C-4	H_2-1, H-2, H_2-4
3’	70,8	CH_2	a: 3,49 *dd* (9,5; 6,0 Hz) b: 3,54 *dd* (9,5; 4,0 Hz)	C-1	H-2’
2’	69,6	CH	3,87 *ddt* (6,0; 5,0; 4,0 Hz)		H_2-1’, H_2-3’
1’	63,4	CH_2	a: 3,64 *dd* (11,5; 5,0 Hz) b: 3,72 *dd* (11,5; 4,0 Hz)		H-2’

Annexe 2 : RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **Ds2**

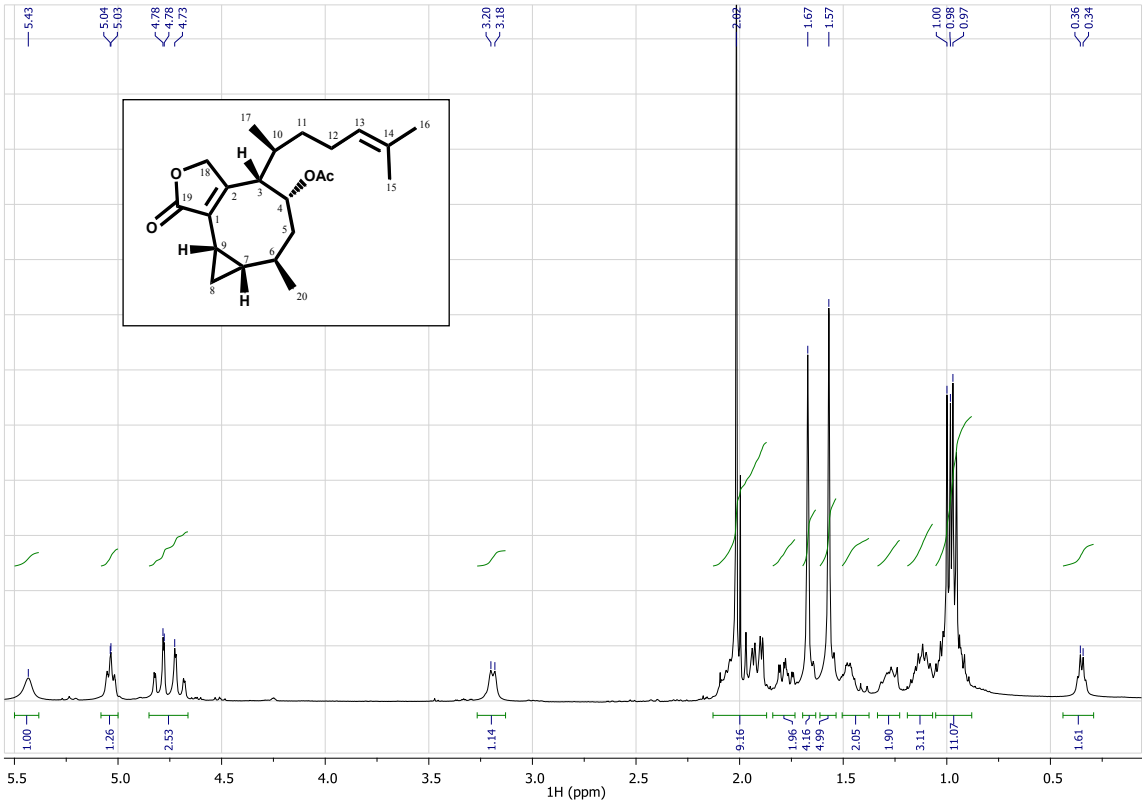


Figure 2A : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ds2** ($CDCl_3$, 400MHz)

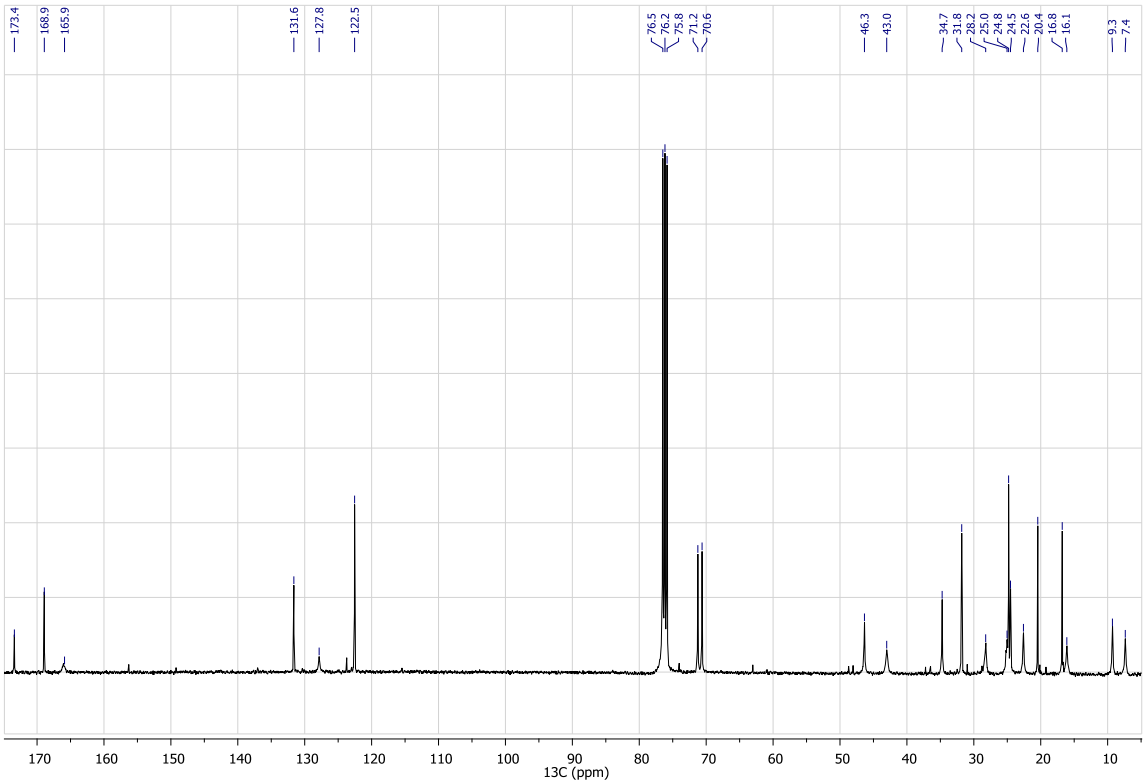


Figure 2B : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ds2** ($CDCl_3$, 100MHz)

Tableau 2C : Données RMN 1D et 2D ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ds2**

$C_{22}H_{32}O_4$

MM = 360 $g.mol^{-1}$

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^1H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélation HMBC	COSY ^1H-^1H
1	127,8	C			
2	165,9	C			
3	46,3	CH	3,19 *d* (8,0 Hz)	C-4, C-10, C-11	H-10, H_3-15
4	71,2	CH	5,43 *br s*		H_b-5, H_a-9
5	43,0	CH_2	a : 1,77 *dd* (15,0 ; 3,0 Hz) b : 1,92 *dd* (15,0 ; 3,0 Hz)	a : C-12, C-13, C-14, C-15 b : C-3, C-4, C-10, C-13, C-14, C-21	a : H_b-5, H-6 b : H-4, H_a-5, H_b-9, H-13
6	28,2	CH	1,09 *m*	C-3, C-5, C-10, C-11, C-12	H_b-11, H-10, H_3-15, H_3-17
7	9,3	CH	1,48 *m*	C-12	$H_{a,b}$-8, H_3-16, H-18
8	7,4	CH_2	a : 0,36 *q* (5,0 Hz) b : 1,04 *m*	a : C-1, C-7 b : C-3, C-5, C-6, C-10, C-11, C-16	a : H-7, H_a-8 b : H-7, H_b-8
9	24,5	CH	a : 1,92 *dd* (15,0 ; 3,0 Hz) b : 2,06 *m*	a : C-3, C-4, C-10, C-13, C-14, C-21 b : C-11, C-13, C-14, C-15, C-22	a : H-4, H_a-5, H_b-9, H-13 b : $H_{a,b}$-5, H_a-9, H-13
10	31,8	CH	1,57 *s*	C-13, C-14, C-16	H-13
11	34,7	CH_2	a : 1,12 *m* b : 1,27 *m*	a : C-3, C-5, C-10, C-13, C-16 b : C-3, C-10, C-16	a : H_b-5, H_a-9, H_b-11, H-10, H_3-15, H_3-17 b : $H_{a,b}$-5, $H_{a,b}$-9, H_a-11
12	24,8	CH_2	a : 0,92 *m* b : 1,67 *s*	a : C-3, C-10, C-11 b : C-13, C-14, C-15, C-16	a : H_a-8, H-6, H-10, H_3-15 b :
13	122,5	CH	5,04 *t* (7,0 Hz)	C-15, C-16	H-10, H_3-15, H_3-16, H_3-21
14	131,6	C			
15	16,8	CH_3	1,57 *s*	C--13, C-14, C-16	H-13
16	25,0	CH_3	1,67 *s*	C-13, C-14, C-15	H-13
17	16,1	CH_3	0,99 *d* (7,0 Hz)	C-3, C-5, C-6, C-10, C-11, C-12	H-6, H_a-11
18	70,5	CH	a : 4,72 dd (17,0 ; 3,0 Hz) b : 4,82 dd (17,0 ; 3,0 Hz)	a : C-1, C-2 b : C-1, C-2	a : H-7, H_b-18 b : H-7, H_a-18
19	173,4	C			
20	22,6	CH_3	0,96 *d* (7,0 Hz)	C-5, C-6, C-9	H_a-11
21	20,4	CH_3	2,02 *s*	C-22	H-13
22	168,9	C			

Annexe 3 : RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **Ds3**

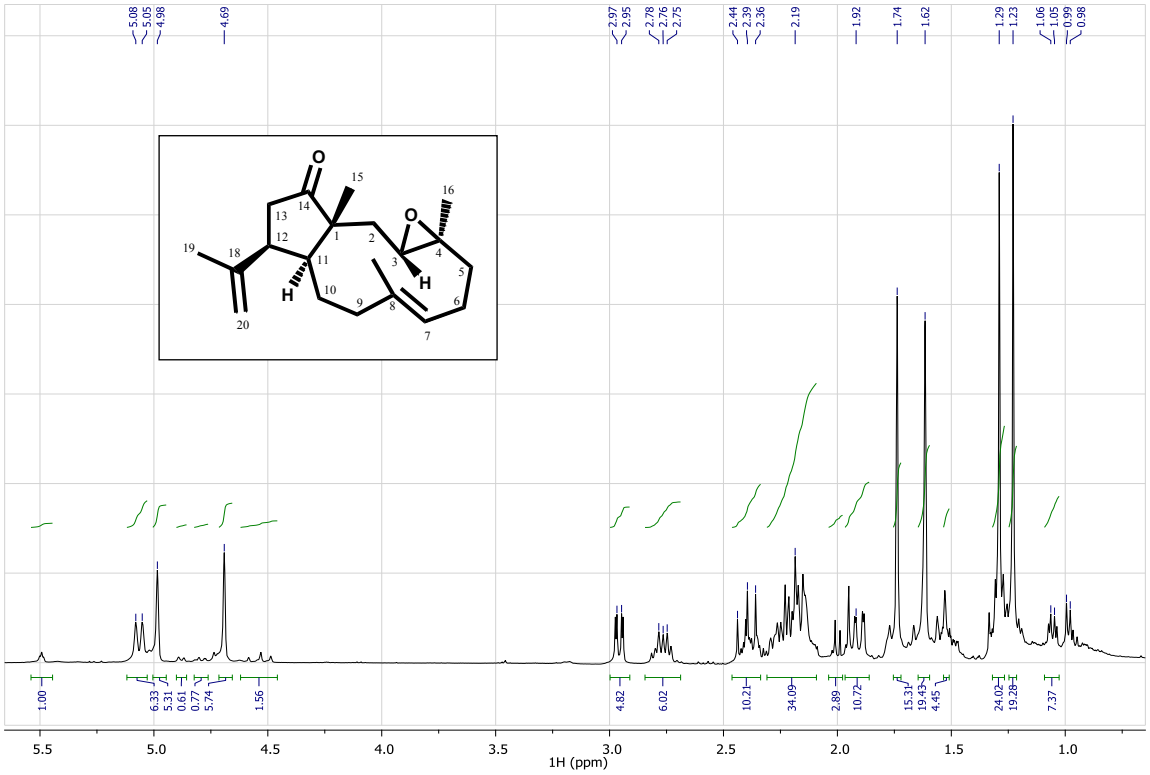


Figure 3A : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ds3** ($CDCl_3$, 400MHz)

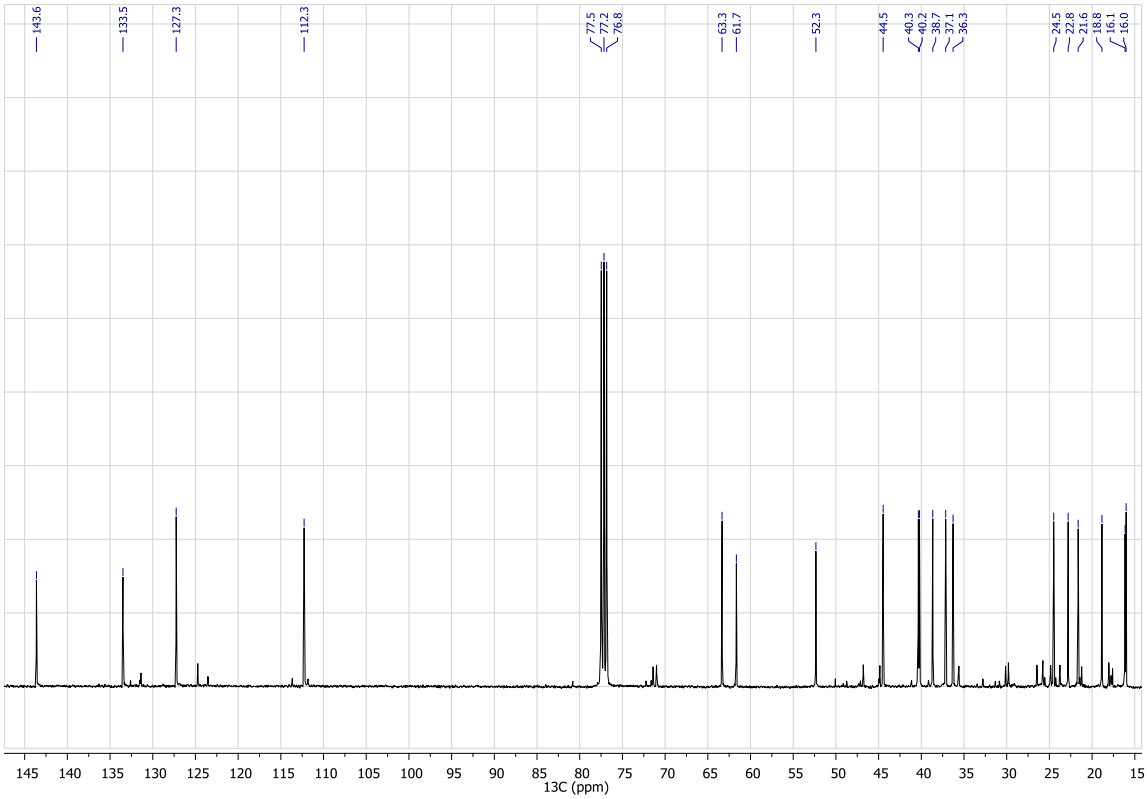


Figure 3B : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ds3** ($CDCl_3$, 100MHz)

Tableau 3C : Données RMN 1D et 2D ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ds3**

$C_{20}H_{30}O_2$

MM = 302 $g.mol^{-1}$

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélation HMBC	COSY ^{1}H-^{1}H
1	52,3	C			
2	36,3	CH_2	a: 1,31 *m* b: 1,90 *dd* (14,0 ; 3,0 Hz)	a: C-1, C-11 b: C-1, C-3, C-4, C-11	a: H_b-2, H-3 b: H_a-2, H-3
3	63,3	CH	2,96 *dd* (11,0 ; 3,0 Hz)	C-2, C-5	$H_{a,b}$-2
4	61,7	C			
5	38,7	CH_2	a: 1,21 *m* b: 2,16 *m*	a: C-3, C-4, C-16 b: C-3, C-4	a: H_b-5 b: H_a-5
6	24,5	CH_2	a: 2,19 *m* b: 2,38 *m*	a: C-11 b: C-7, C-8, C-9	a: H_b-6 b: H_a-6, H-7
7	127,3	CH	5,06 *br d* (11,0 Hz)	C-9, C-17	$H_{a,b}$-6, H_3-17
8	133,5	C			
9	37,1	CH_2	a: 2,15 *m* b: 2,23 *m*	a: C-7, C-8 b: C-1, C-7, C-8, C-10, C-11, C-17	a: H_2-5, H_b-9, H_b-10 b: H_3-15, H_a-9, H_b-10
10	21,6	CH_2	a: 1,33 *m* b: 1,53 *s*	a: C-1, C-2, C-3, C-4, C-11, C-18 b: C-1, C-9, C-11, C-12	a: H_b-2, H_b-10 b: H_b-9, H_a-10
11	40,2	CH_2	a: 2,36 *m* b: 2,44 *m*	a: C-12, C-13, C-18 b: C-12, C-13, C-18	
12	44,5	CH	2,76 *dt* (13,0 ; 7,0 Hz)	C-10, C-11, C-13, C-18	H_b-9, H-13, H_a-20
13	40,3	CH	2,40 *m*	C-11, C-12, C-18	H-12
14	**ND**				
15	18,8	CH_3	1,29 *s*	C-1, C-2, C-11	H_b-9, H_b-10
16	16,0	CH_3	1,23 *s*	C-3, C-4, C-5, C-6	
17	16,1	CH_3	1,62 *s*	C-7, C-8, C-9	H-7
18	143,6	C			
19	22,8	CH_3	1,74 *s*	C-12, C-18, C-20	$H_{a,b}$-20
20	112,3	CH_2	a: 4,69 *m* b: 4,98 *m*	a: C-12, C-19 b: C-12, C-19	a: H_3-19, H_b-20 b: H_3-19, H_a-20

Annexe 4 : RMN 1D et 2D du composé **Ds4**

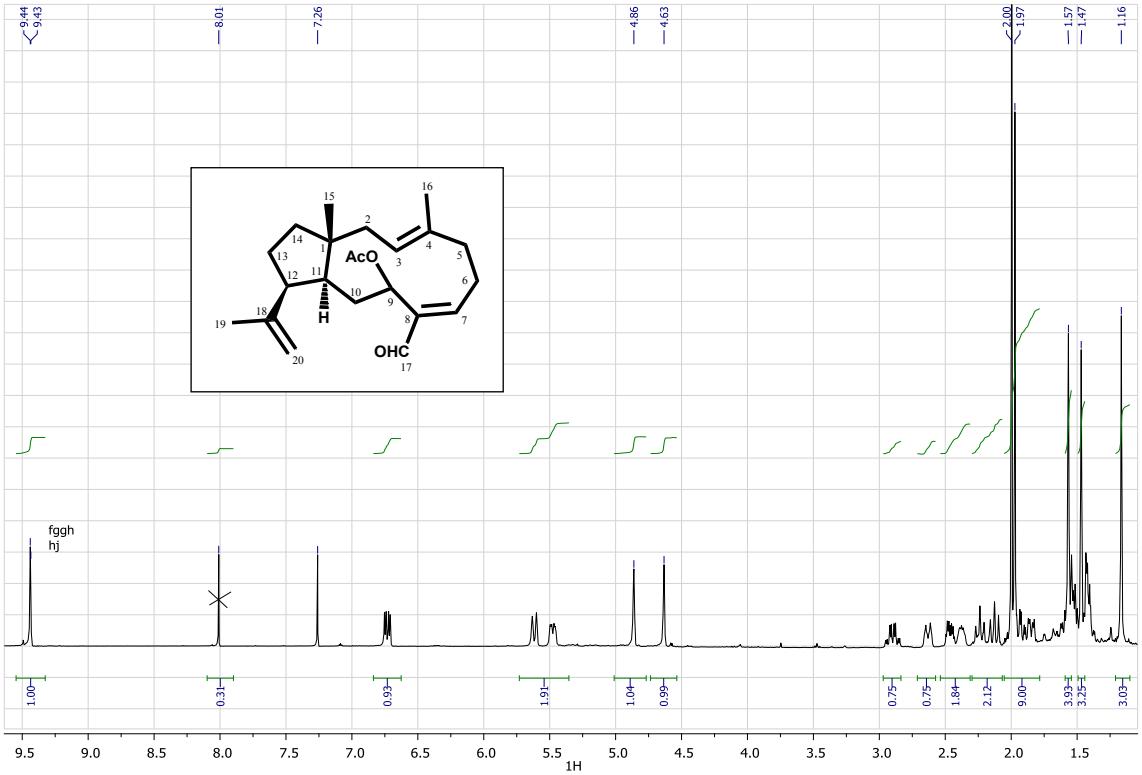


Figure 4A : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ds4** ($CDCl_3$, 400MHz)

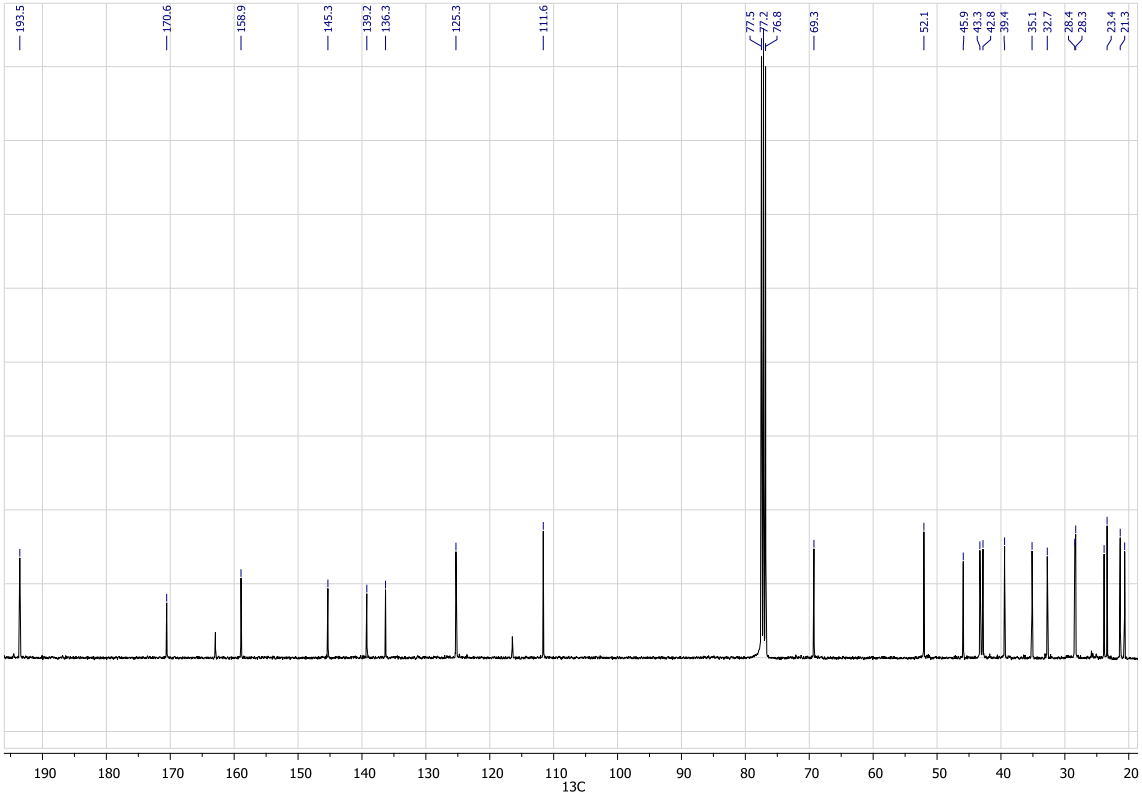


Figure 4B : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ds4** ($CDCl_3$, 100MHz)

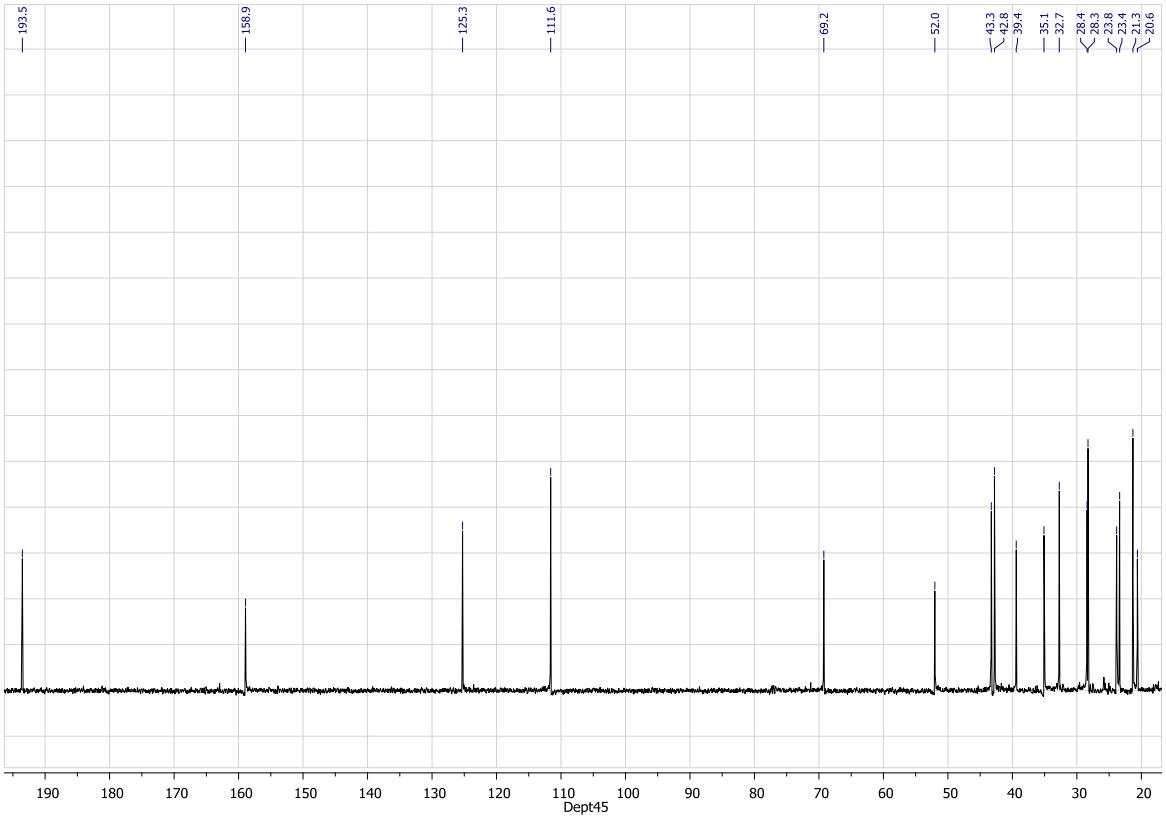


Figure 4C : Spectre RMN DEPT45 du composé **Ds4** ($CDCl_3$, 100MHz)

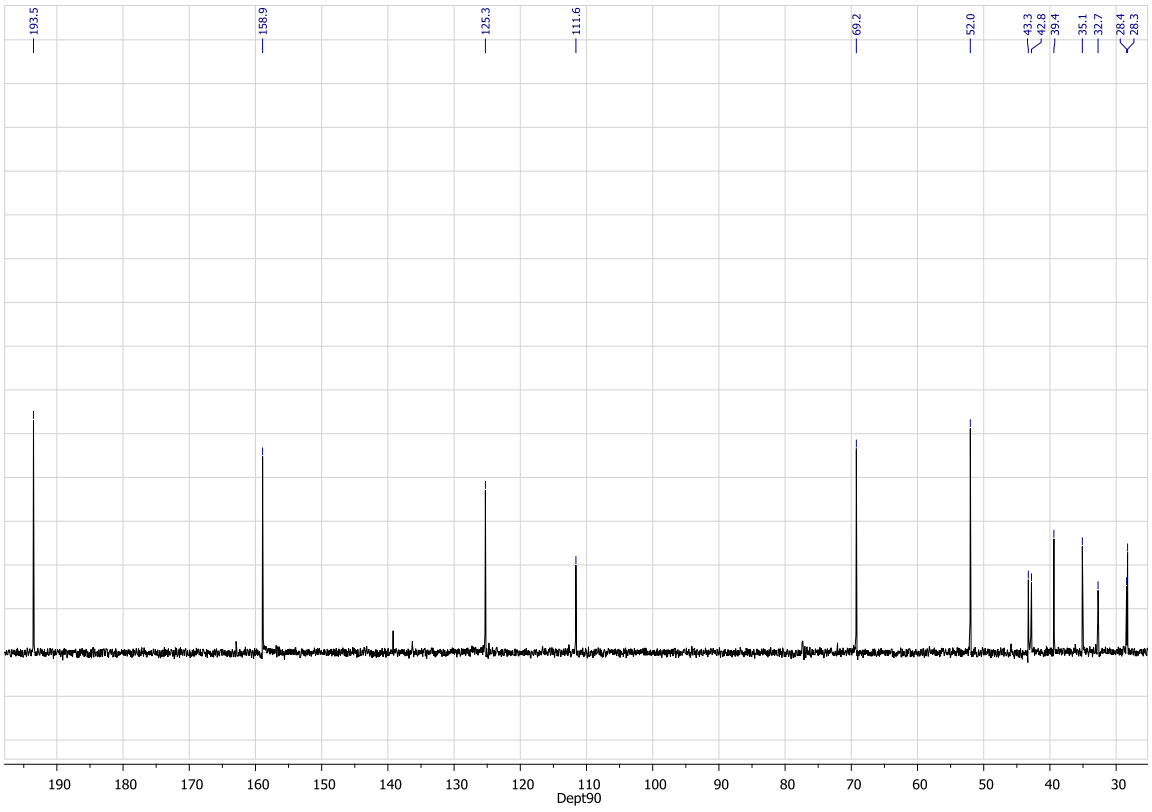


Figure 4D : Spectre RMN DEPT90 du composé **Ds4** ($CDCl_3$, 100MHz)

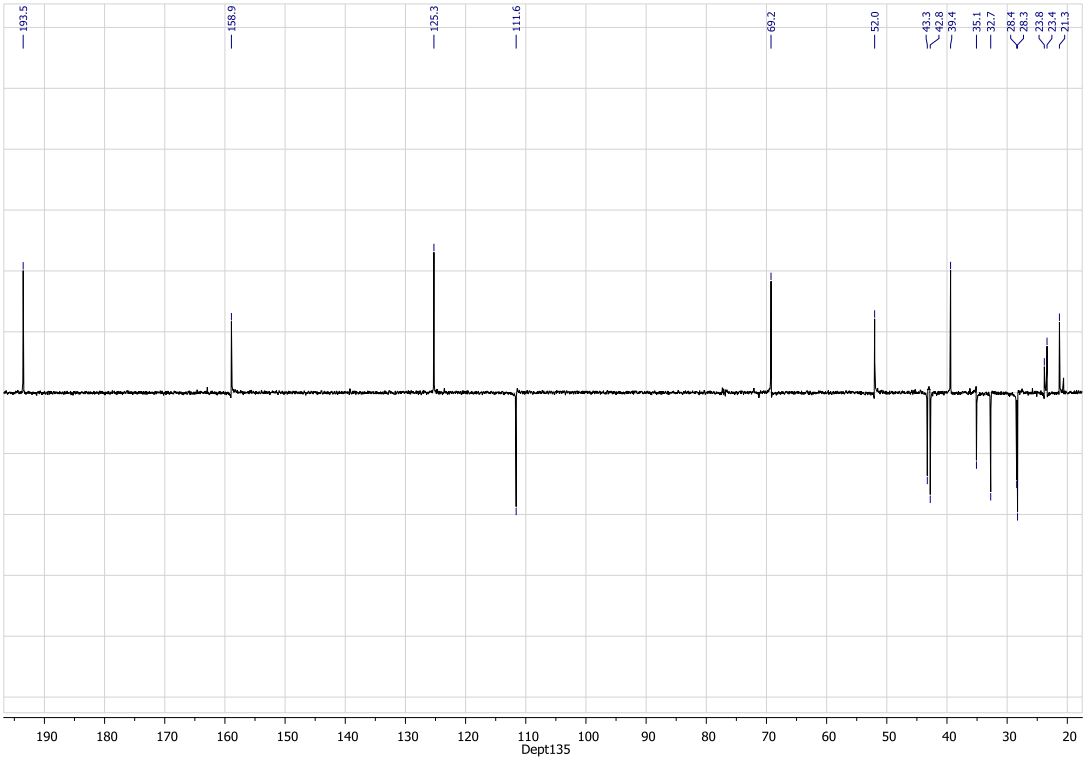


Figure 4E : Spectre RMN DEPT135 du composé **Ds4** ($CDCl_3$, 100MHz)

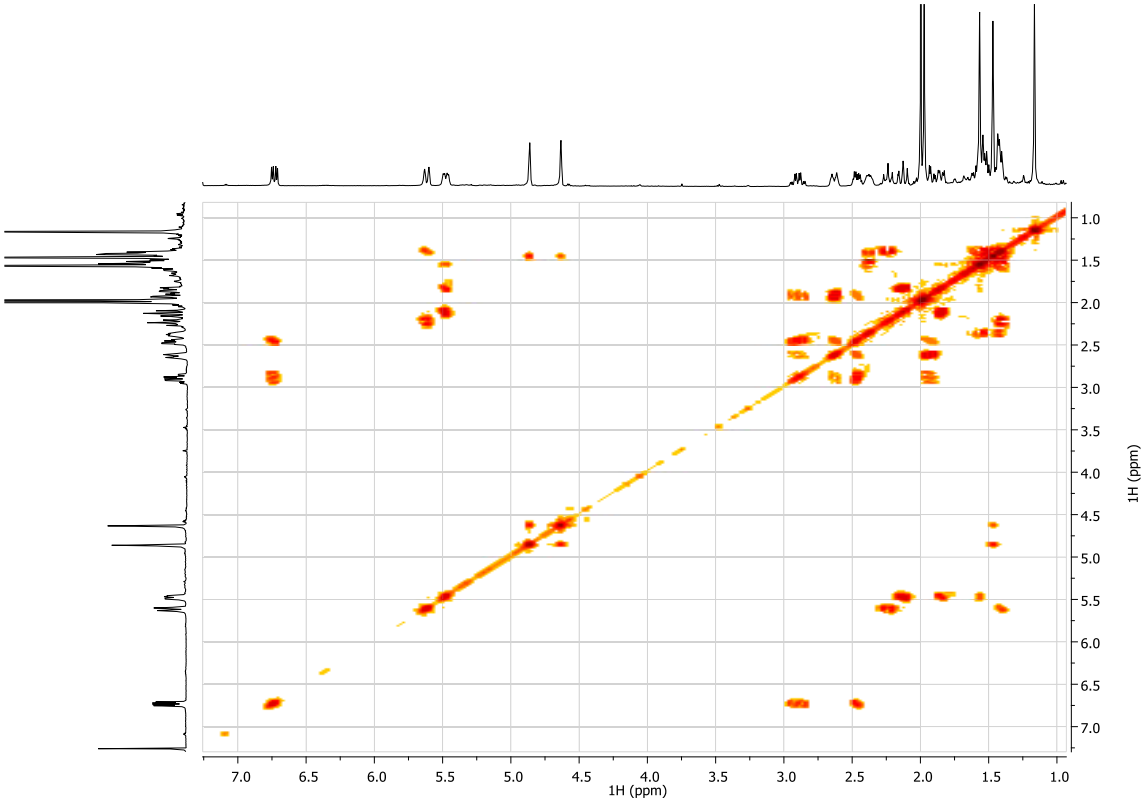


Figure 4F : Spectre RMN COSY ^{1}H-^{1}H du composé **Ds4** ($CDCl_3$, 100MHz)

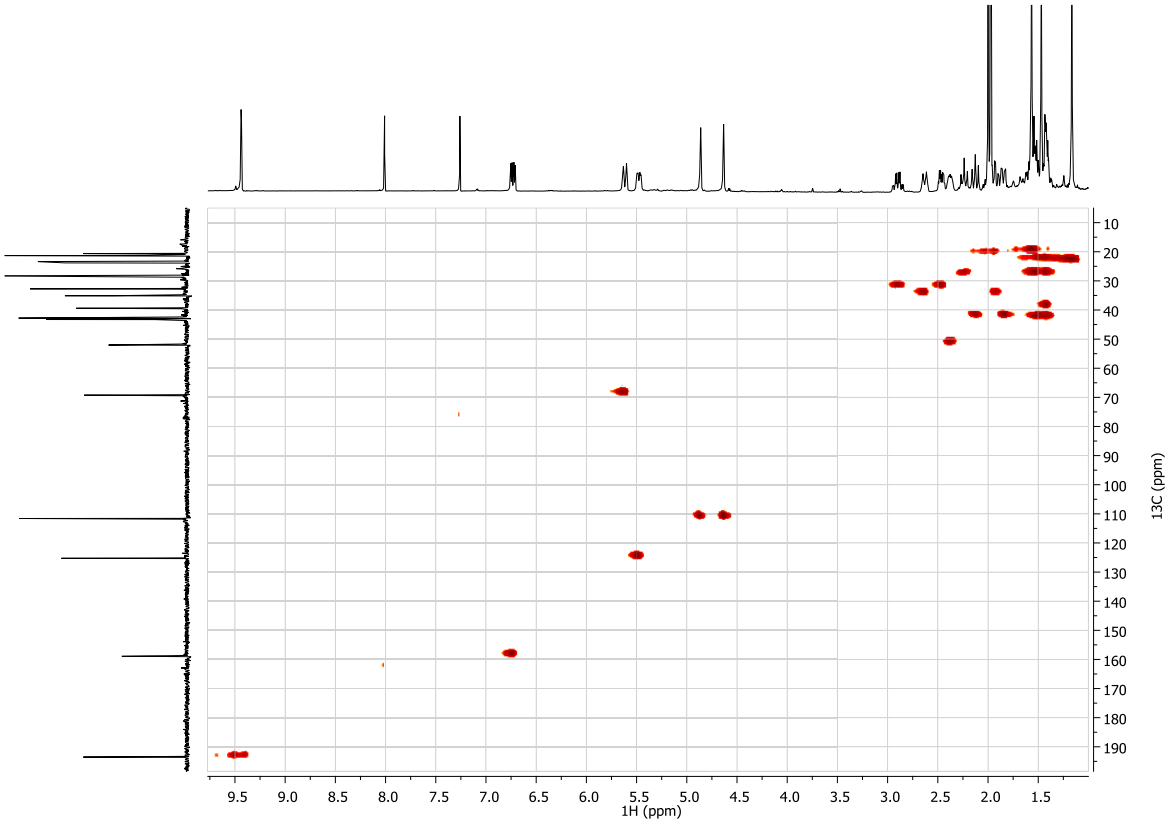


Figure 4G : Spectre RMN HSQC du composé **Ds4** ($CDCl_3$, 100MHz)

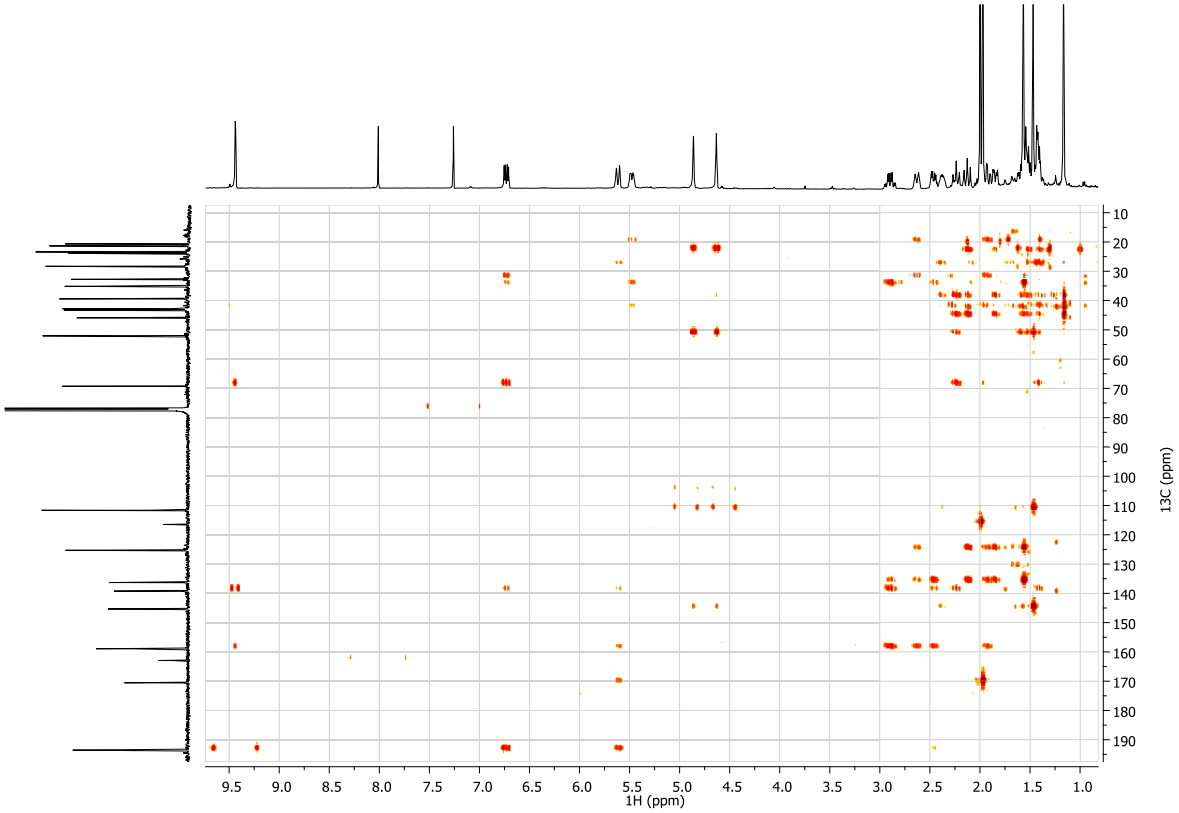


Figure 4H : Spectre RMN HMBC du composé **Ds4** ($CDCl_3$, 100MHz)

Annexe 5 : RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **Ds5**

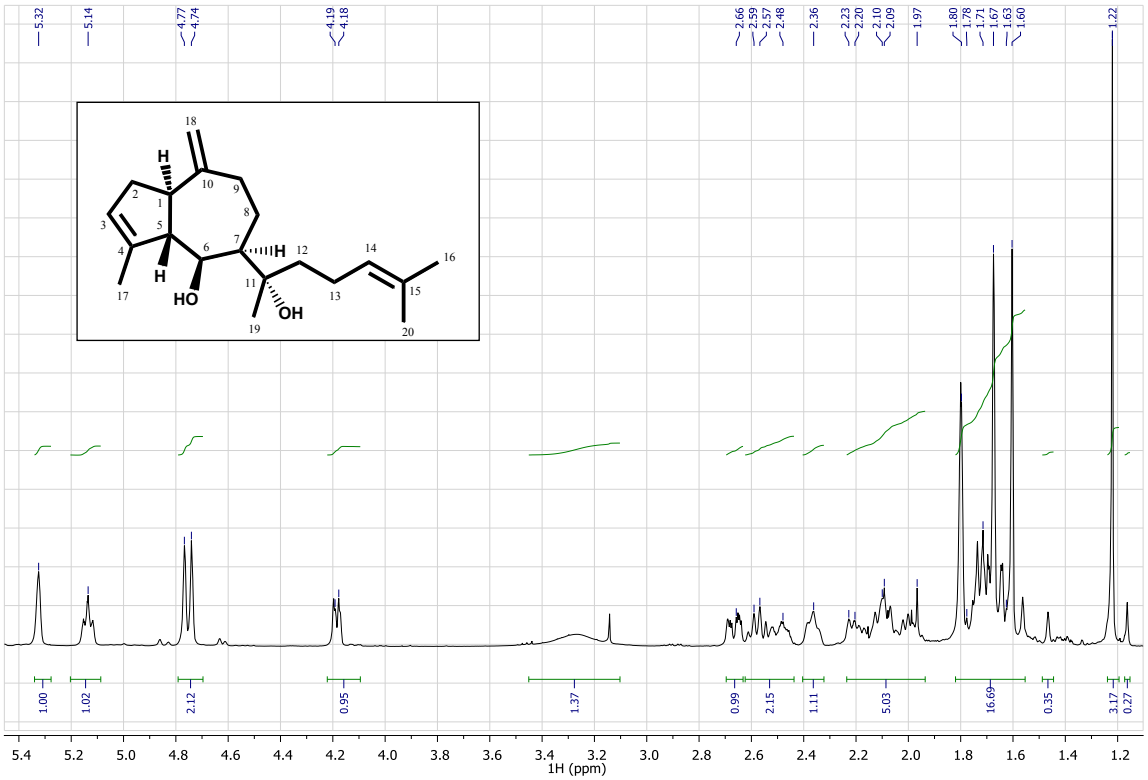


Figure 5A : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ds5** ($CDCl_3$, 400MHz)

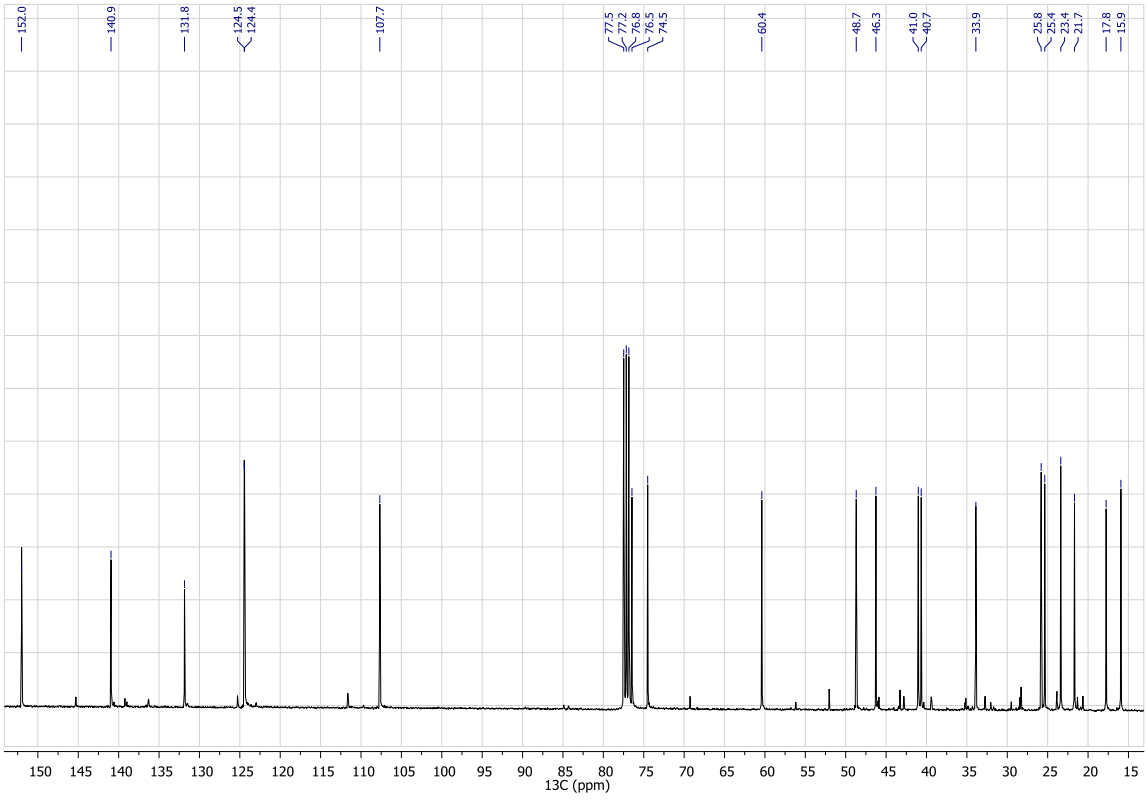


Figure 5B : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ds5** ($CDCl_3$, 100MHz)

Tableau 5C : Données RMN 1D et 2D ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ds5**

$C_{20}H_{32}O_2$

MM = 304 $g.mol^{-1}$

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^1H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélation HMBC	COSY ^1H-^1H
1	46,3	CH	2,58 *q* (9,0 Hz)	C-2, C-6, C-10	$H_{a,b}$-2, H-5
2	33,9	CH_2	a : 2,21 *m* b : 2,48 *m*	a : C-1, C-3, C-4, C-5 b : C-1, C-3, C-4, C-5	a : H-1, H_b-2, H-3, H_3-17 b : H-1, H_a-2, H_3-17
3	124,4	CH	5,32 *s*	C-1, C-2, C-5	H_a-2, H-5, H_3-17
4	140,9	C			
5	60,4	CH	2,36 *t* (8,0 Hz)		H-1, H-3, H-6, H_3-17
6	74,5	CH	4,18 *dd* (8,0 ; 2,0 Hz)	C-4, C-8	H-5, H-7
7	48,7	CH	1,63 *s*		H-6, $H_{a,b}$-9, H-14
8	21,7	CH_2	a : 1,67 *s* b : 1,78 *m*	a : C-14, C-15, C-20 b : C-8	a : H_b-9, H-14, $H_{a,b}$-13 b : H-7, H_b-9
9	40,7	CH_2	a : 2,10 *m* b : 2,66 *ddd* (15,0 ; 5,0 ; 3,0 Hz)	a : b : C-1, C-7, C-10, C-18	a : $H_{a,b}$-8, H_b-9, H_3-16 b : H-7, $H_{a,b}$-8, H_a-9
10	152,0	C			
11	76,5	C			
12	41,0	CH_2	1,72 *m*	C-7, C-11, C-13, C-19	H_b-9, $H_{a,b}$-13
13	23,4	CH_2	a : 1,97 *s* b : 2,09 *m*	a : C-12, C-14, C-15 b : C-12, C-14, C-15	a : H-6, H_2-12, H_b-13, H-14 b : H_a-8, H_2-12, H_b-13, H-14, H_3-16
14	124,5	CH	5,14 *t* (7,0 Hz)	C-13, C-16, C-20	$H_{a,b}$-13, H_3-16, H_3-20
15	131,8	C			
16	25,8	CH_3	1,67 *s*	C-14, C-15, C-20	H_a-9, H_b-13, H-14
17	15,9	CH_3	1,80 *s*	C-3, C-4, C-5	$H_{a,b}$-2, H-3, H-5
18	107,7	CH_2	a : 4,74 *d* (10,0 Hz) b : 4,77 *s*	a : C-1, C-9 b : C-1, C-9	
19	25,4	CH_3	1,22 *s*	C-7, C-11, C-12	
20	17,8	CH_3	1,60 *s*	C-14, C-15, C-16	H-14

Annexe 6 : RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **Ta1**

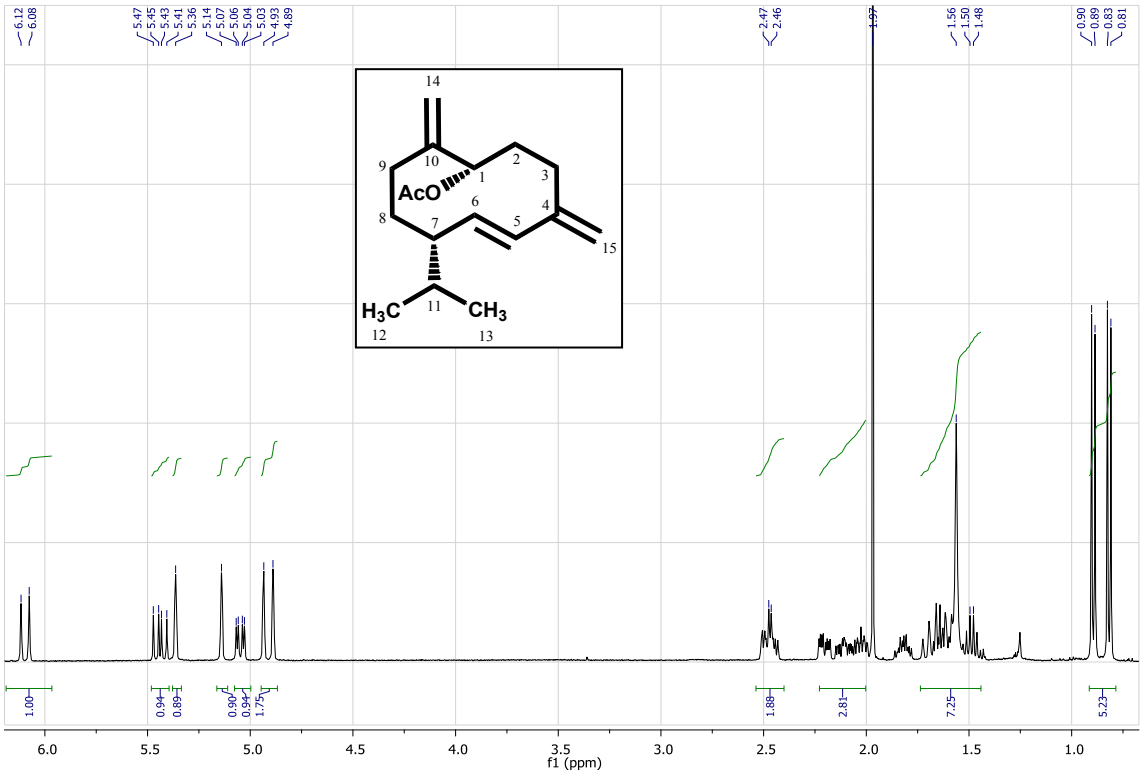


Figure 6A : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ta1** ($CDCl_3$, 400MHz)

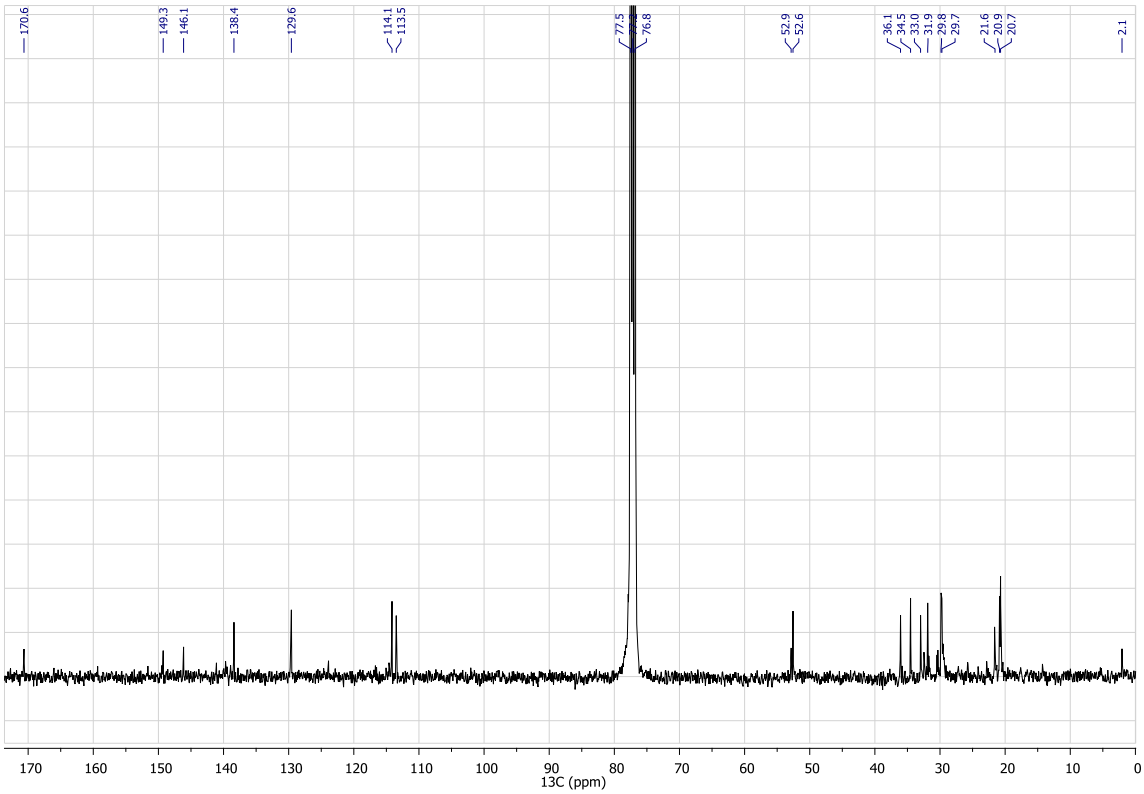


Figure 6B : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ta1** ($CDCl_3$, 100MHz)

Tableau 6C : Données RMN 1D et 2D ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ta1**

$C_{17}H_{26}O_2$

M = 262 g/mol ; *m/z* 203 $[M\text{-}AcOH+H]^+$

IR : 3068, 2950, 2933, 2871, 1735, 1644, 1608, 1456, 1441, 1373, 1236, 1016, 976, 953, 867 cm^{-1}.

$[\alpha]_D^{25}$ =-104° (MeOH, 0,005 mg/100ml)

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^1H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélation HMBC	COSY ^1H-^1H	NOESY ^1H-^1H
1	77,6	CH	5,05 *dd* (13,0 ; 4,0 Hz)	C-3, C-9	$H_{a,b}$-2	H_a-2
2	33,0	CH_2	a : 2,10 *m* b : 1,63 *m*	a : C-4 b :	a : H-1, H_b-2 b : H-1, H_a-2	a : H-1 b :
3	29,8	CH_2	a : 2,48 *m* b : 2,20 *dq* (13,5; 6,0 ; 3,0 Hz)	a : C-2, C-4, C-15 b : C-15	a : H_b-3 b : H_a-3	a : H_b-3 b : H_a-3
4	146,1	C	-	-	-	-
5	129,6	CH	6,10 *d* (16,0 Hz)		H-6	
6	138,4	CH	5,44 *dd* (16,0 ; 10,5 Hz)	C-4	H-5, H-7	H-7
7	52,6	CH	1,82 *m*		H-6, H_b-8	H-6
8	36,1	CH_2	a : 2,03 *m* b : 1,60 *m*	a : C-10 b :	a : H_b-8, H_a-9 b : H-7, H_a-8	a : H_b-8 b : H_a-8
9	34,5	CH_2	a : 2,48 *m* b : 1,70 *m*	a : b : C-10	a : H_a-8, H_b-9, $H_{a,b}$-14 b : H_a-9	a : H_b-9 b : H_a-9
10	149,3	C	-	-	-	-
11	32,0	CH	1,50 *t* (14,0 ; 7,0 Hz)	C-12, C-13	H_3-12, H_3-13	H_3-12, H_3-13
12	20,7	CH_3	0,82 *d* (7,0 Hz)	C-7, C-11, C-13	H-11	H-11
13	20,9	CH_3	0,90 *d* (7,0 Hz)	C-7, C-11, C-12	H-11	H-11
14	114,1	CH_2	a : 5,36 *s* b : 5,14 *s*	a : C-1, C-9 b : C-1, C-9	a : H_a-9 b : H_a-9	a : b :
15	113,4	CH_2	a : 4,93 *s* b : 4,89 *s*	a : C-3, C-5 b : C-3, C-5	a : b :	a : b :
16	170,6	C	-	-	-	-
17	21,6	CH_3	1,97 *s*	C-16		

Annexe 7 : RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **Ta2**

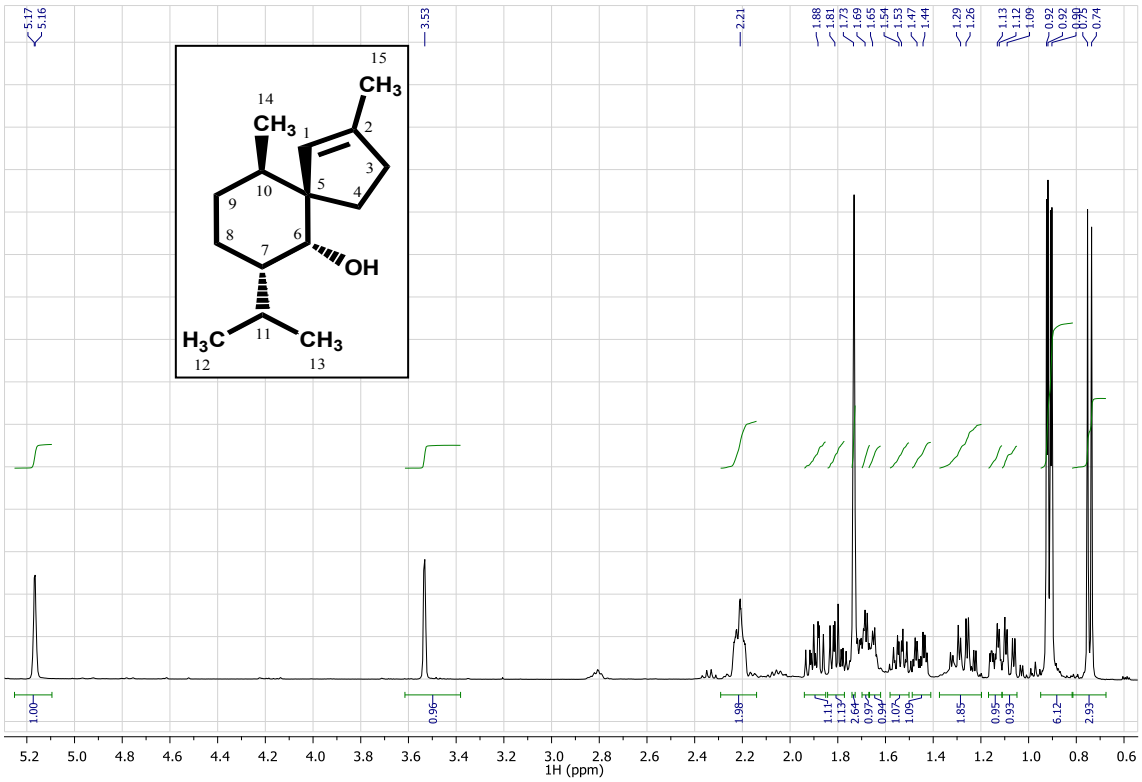


Figure 7A : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ta2** ($CDCl_3$, 400MHz)

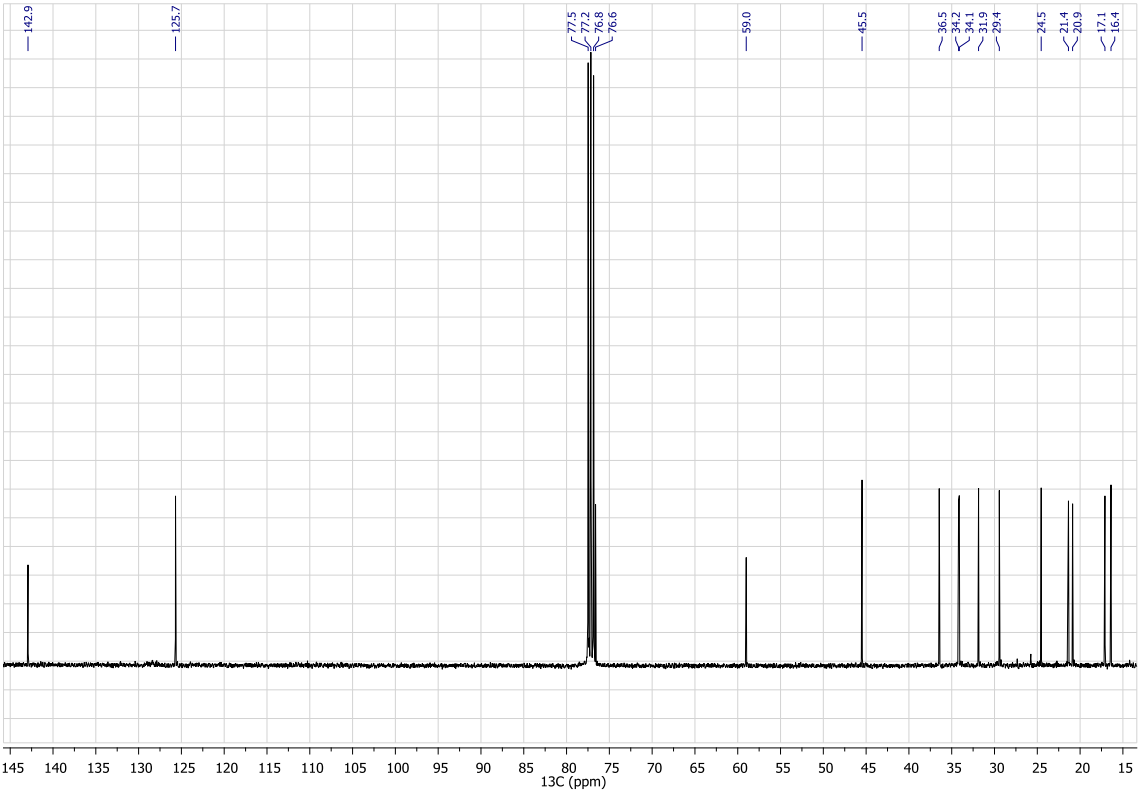


Figure 7B : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ta2** ($CDCl_3$, 100MHz)

Tableau 7C : Données RMN 1D et 2D ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ta2**

$C_{15}H_{26}O$

MM = 222 g/mol; *m/z* 205 $[M-H_2O+H]^+$

IR : 3462, 3039, 2952, 2923, 2871, 2850, 1652, 1608, 1460, 1444, 1379, 1132, 1047, 928 cm^{-1}.

$[\alpha]_D^{25}$ = -22° (MeOH, 0.01 mg/100 ml)

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^1H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélation HMBC	COSY ^1H-^1H	NOESY ^1H-^1H
1	125,7	CH	5,17 *br sext* (1,5 Hz)	C-2, C-3, C-4, C-5, C-15,	H_2-3, H_3-15	H-6, H-7, H_b-9, H_3-15
2	142,9	C	-	-	-	
3	36,5	CH_2	2,21 *m*	C-1, C-2, C-4, C-5,	H-1, $H_{a,b}$-4	H-6, H_3-14, H_3-15
4	34,1	CH_2	a : 1,88 *ddd* (13,5 ; 9,5 ; 7,0 Hz) b : 1,81 *ddd* (13,5 ; 8,0 ; 5,5 Hz)	a: C-1, C-2, C-3, C-5, C-10, C-6, b: C-1, C-2, C-3, C-5, C-10, C-6,	a: H_2-3, H_b-4 b: H_2-3, H_a-4	a: H-6, H_3-15 b: H_3-14, H_3-15
5	59,0	C	-	-	-	
6	76,6	CH	3,53 *br d* (1,5 Hz)	C-1, C-5, C-7, C-8, C-10, C-11	H-7	H-1, H_2-3, H_a-4, H-7, H_b-9, H-11, H_3-12, H_3-13
7	45,5	CH	1,14 *m*	C-5, C-8,	H-6, $H_{a,b}$-8, H-11	H-1, H-6, $H_{a,b}$-8, H_3-12, H_3-13
8	24,5	CH_2	a : 1,65 *m* b : 1,28 *qd* (13,0 ; 4,0 Hz)	a: C-6, C-7, C-9, C-10, C-11, b: C-6, C-7, C-9, C-10, C-11	a: H-7, H_b-8, $H_{a,b}$-9 b: H-7, H_a-8, H_a-9	a: H-7, H_b-8, H_3-12, H_3-13 b: H-7, H_a-8
9	31,9	CH_2	a : 1,45 *dq* (13,0 ; 3,5 Hz) b : 1,08 *qd* (13,0 ; 4,0 Hz)	a: C-5, C-7, C-8, C-10, C-14 b: C-5, C-7, C-8, C-10, C-14	a: $H_{a,b}$-8, H_b-9, H-10 b: H_a-8, H_a-9, H-10	a: H_b-9, H_3-14 b: H-1, H-6, H_a-9, H_3-14
10	34,2	CH	1,69 *m*	C-1, C-5, C-6, C-8, C-9, C-14	$H_{a,b}$-9, H_3-14	H_3-14
11	29,4	CH	1,54 *hept. d* (7,0 ; 2,5 Hz)	C-6, C-7, C-8, C-12, C-13	H-7, H_3-12, H_3-13	H-6, H_3-12, H_3-13
12	20,9	CH_3	0,91 *d* (7,0 Hz)	C-7, C-11, C-13	H-11	H-6, H-7, H_a-8, H-11
13	21,4	CH_3	0,92 *d* (7,0 Hz)	C-7, C-11, C-12	H-11	H-6, H-7, H_a-8, H-11
14	16,4	CH_3	0,74 *d* (7,0 Hz)	C-5, C-9, C-10	H-10	H_2-3, H_b-4, $H_{a,b}$-9, H-10
15	17,1	CH_3	1,73 *d* (1,0 Hz)	C-1, C-2, C-3	H-1	H-1, H_2-3, $H_{a,b}$-4

Annexe 8 : RMN 1D et 2D du composé **Ta3**

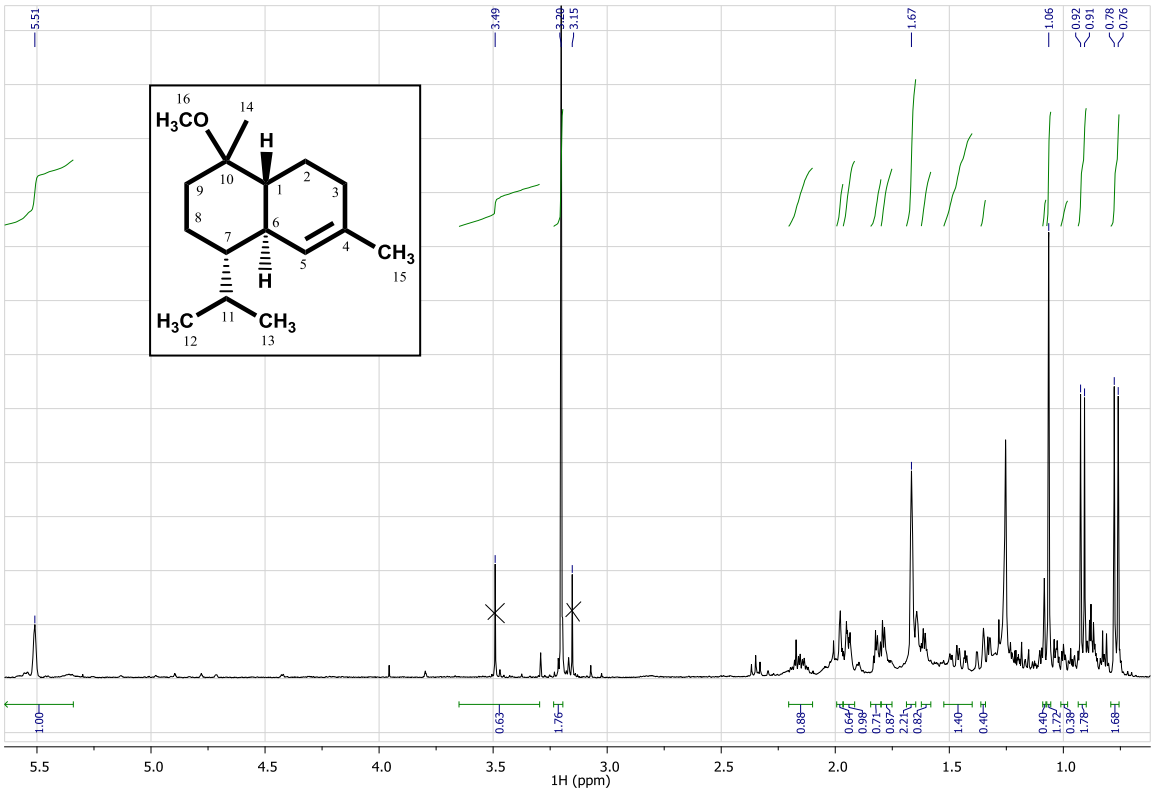


Figure 8A : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ta3** ($CDCl_3$, 400MHz)

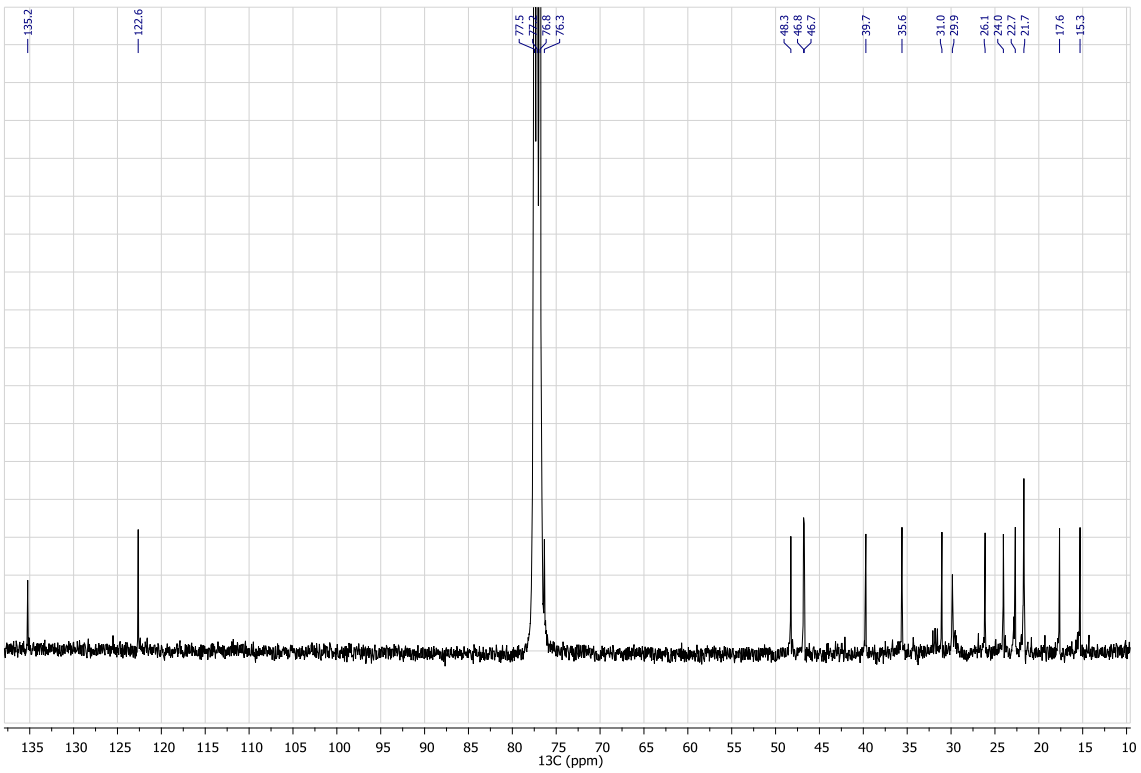


Figure 8B : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ta3** ($CDCl_3$, 100MHz)

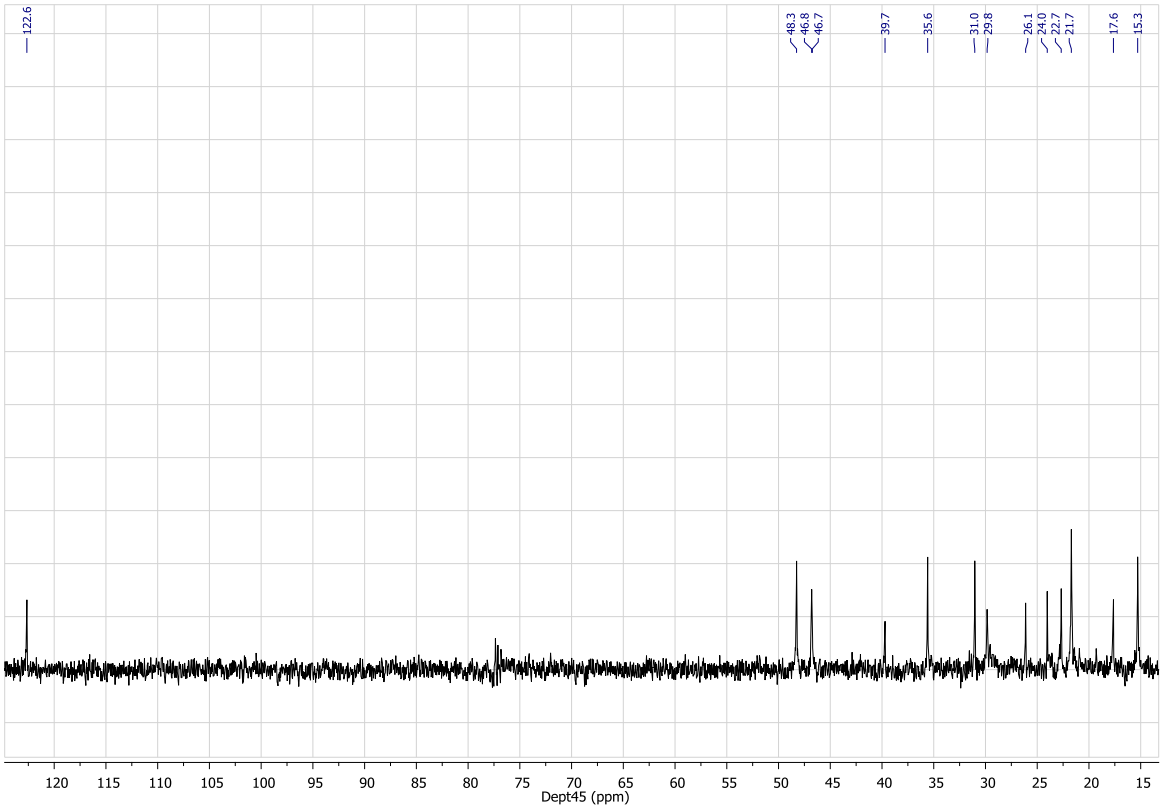


Figure 8C : Spectre RMN DEPT45 du composé **Ta3** ($CDCl_3$, 100MHz)

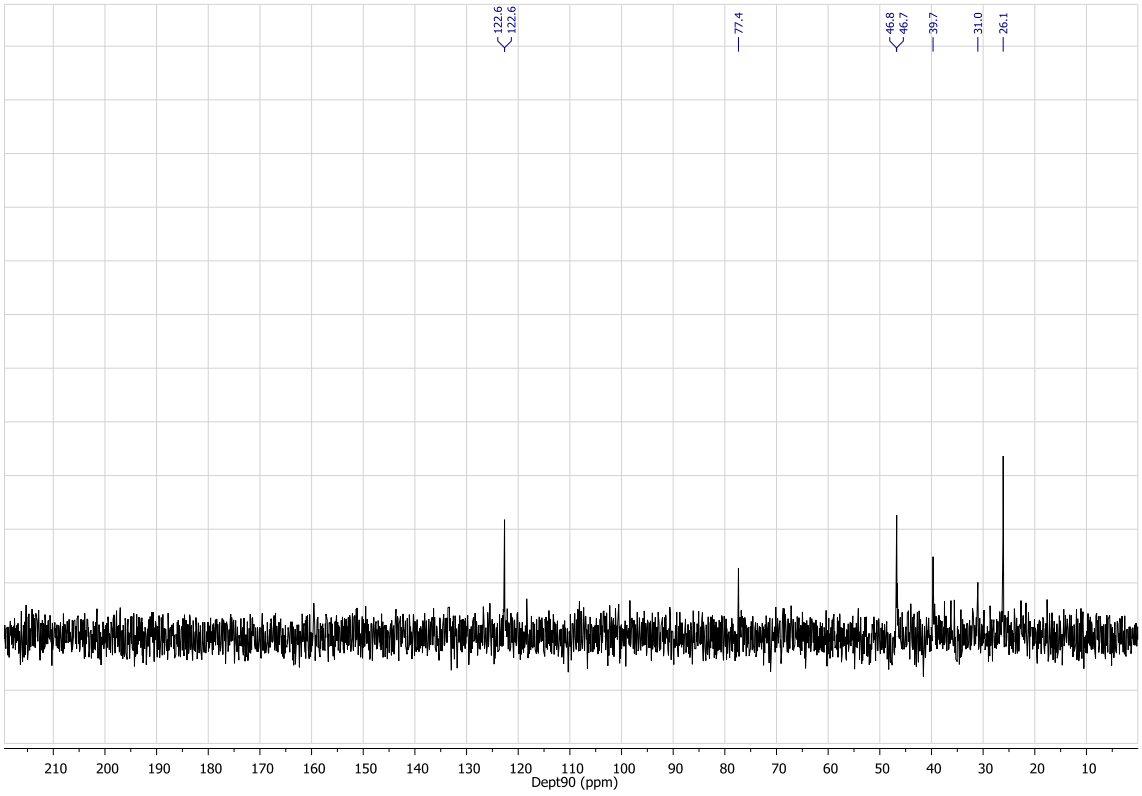


Figure 8D : Spectre RMN DEPT90 du composé **Ta3** ($CDCl_3$, 100MHz)

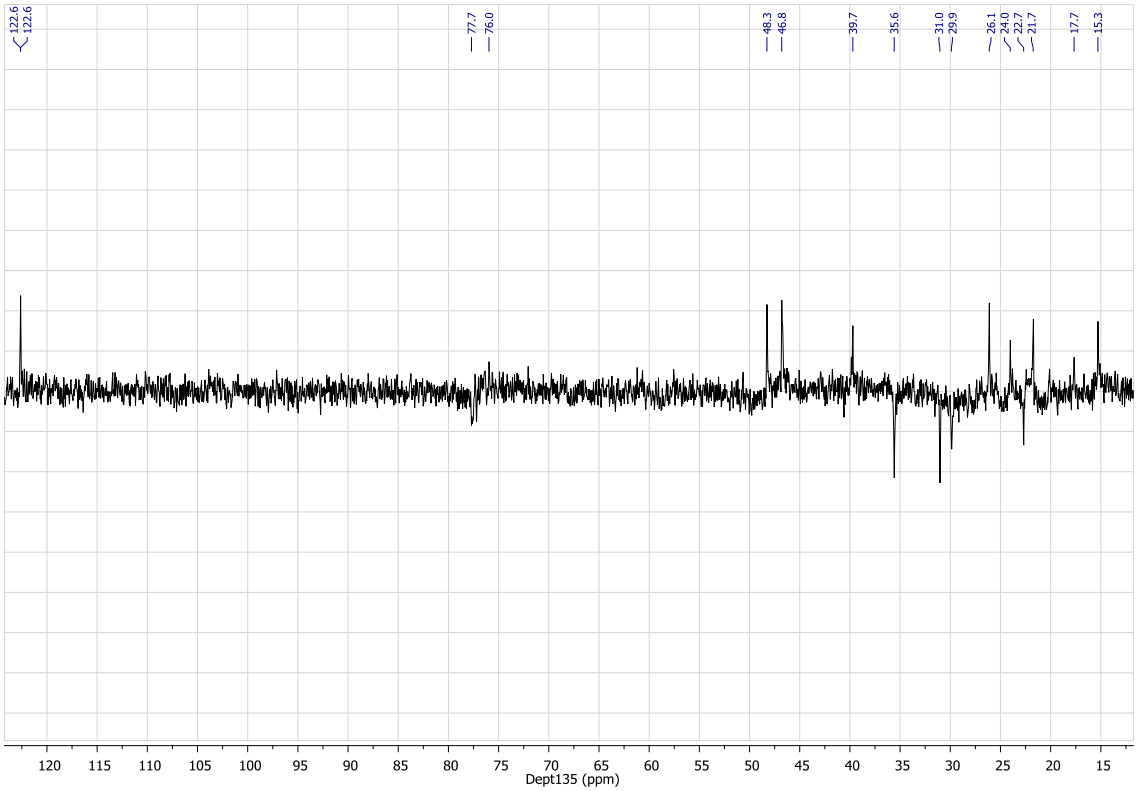


Figure 8E : Spectre RMN DEPT135 du composé **Ta3** ($CDCl_3$, 100MHz)

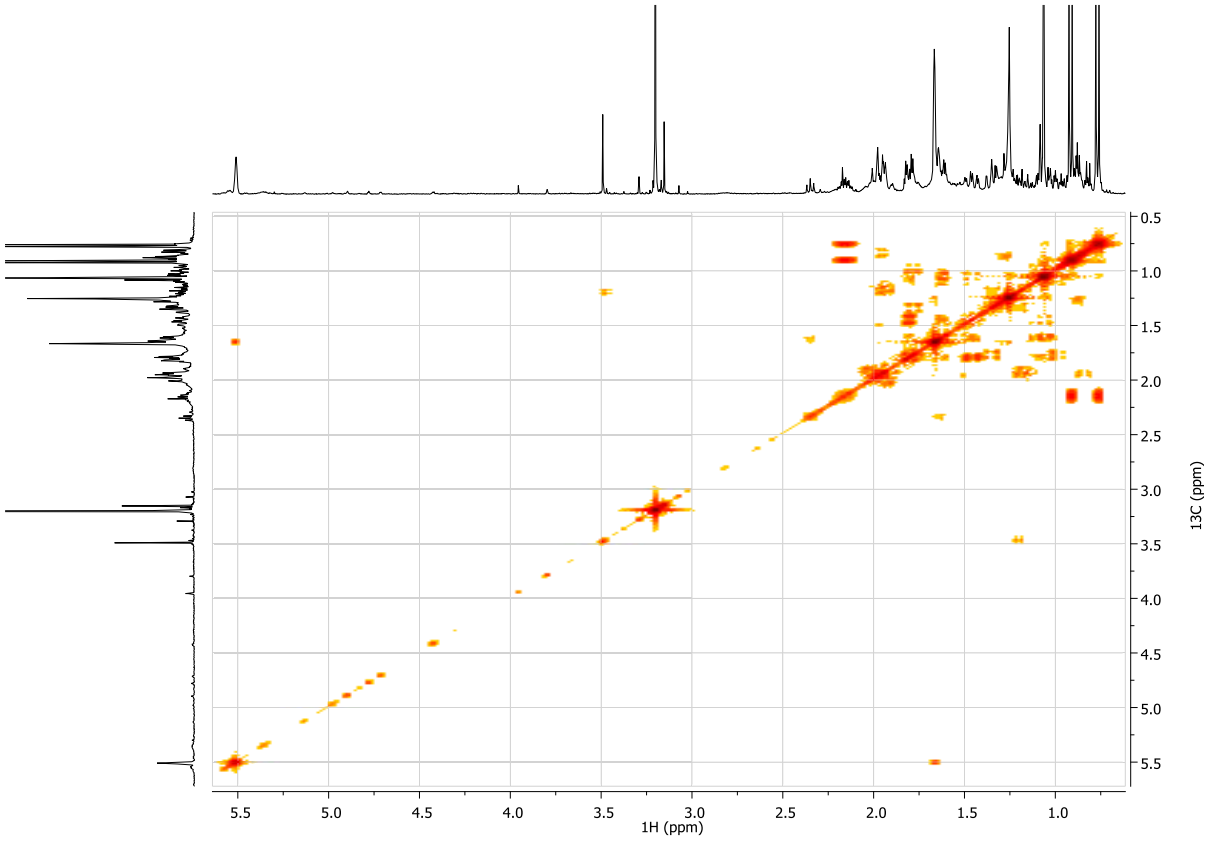


Figure 8F : Spectre RMN COSY ^{1}H-^{1}H du composé **Ta3** ($CDCl_3$, 100MHz)

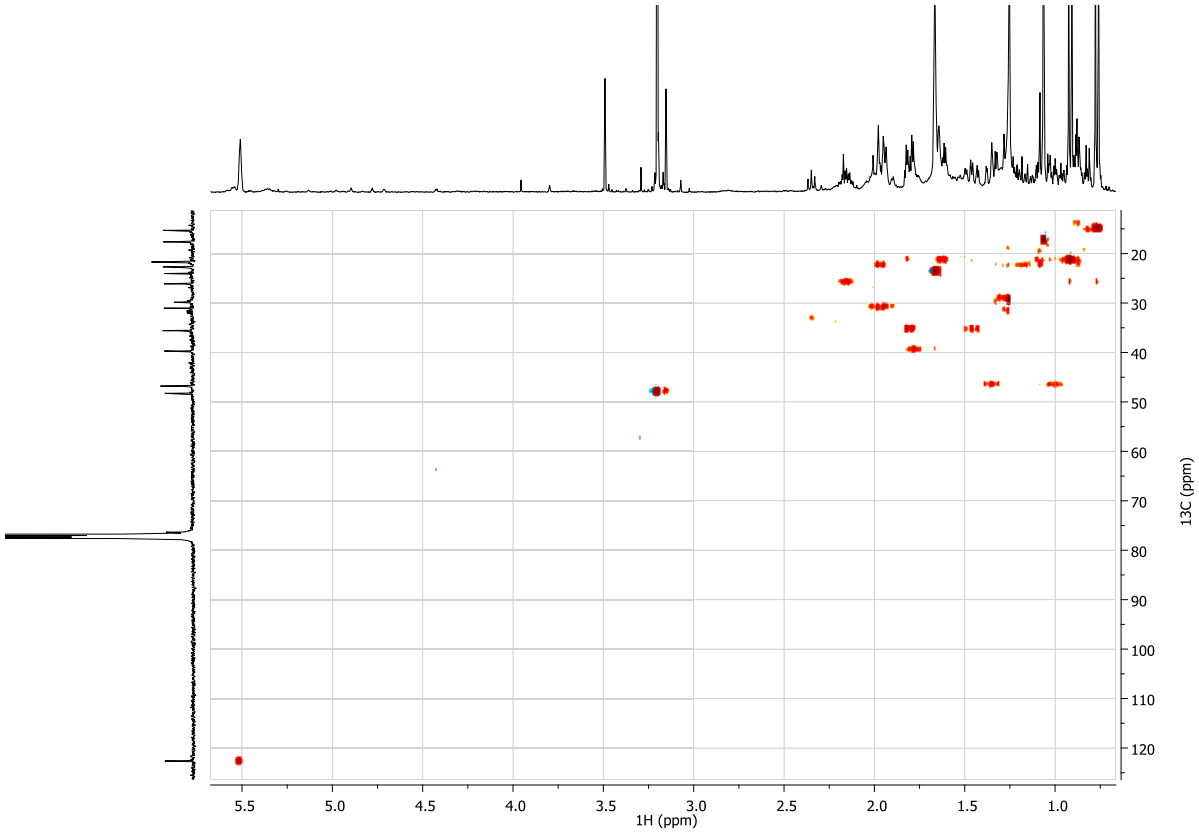


Figure 8G : Spectre RMN HSQC du composé **Ta3** ($CDCl_3$, 100MHz)

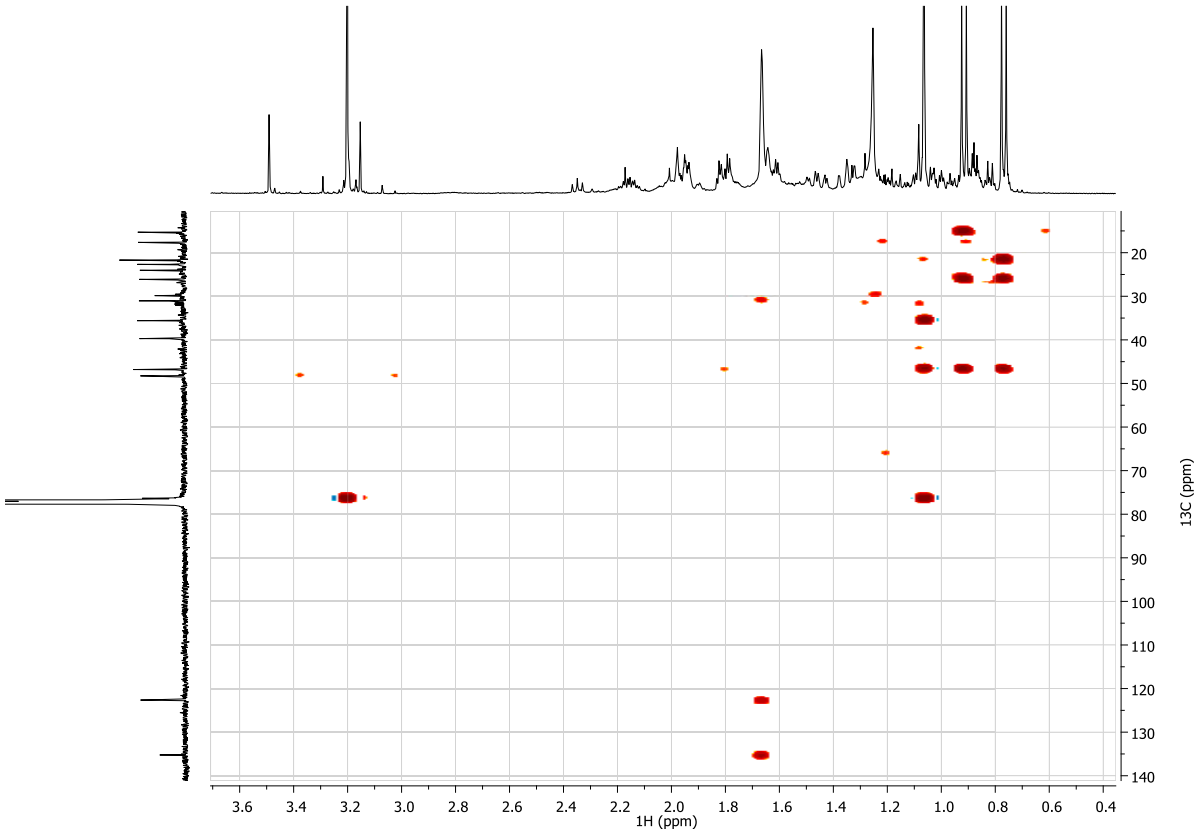


Figure 8H : Spectre RMN HMBC du composé **Ta3** ($CDCl_3$, 100MHz)

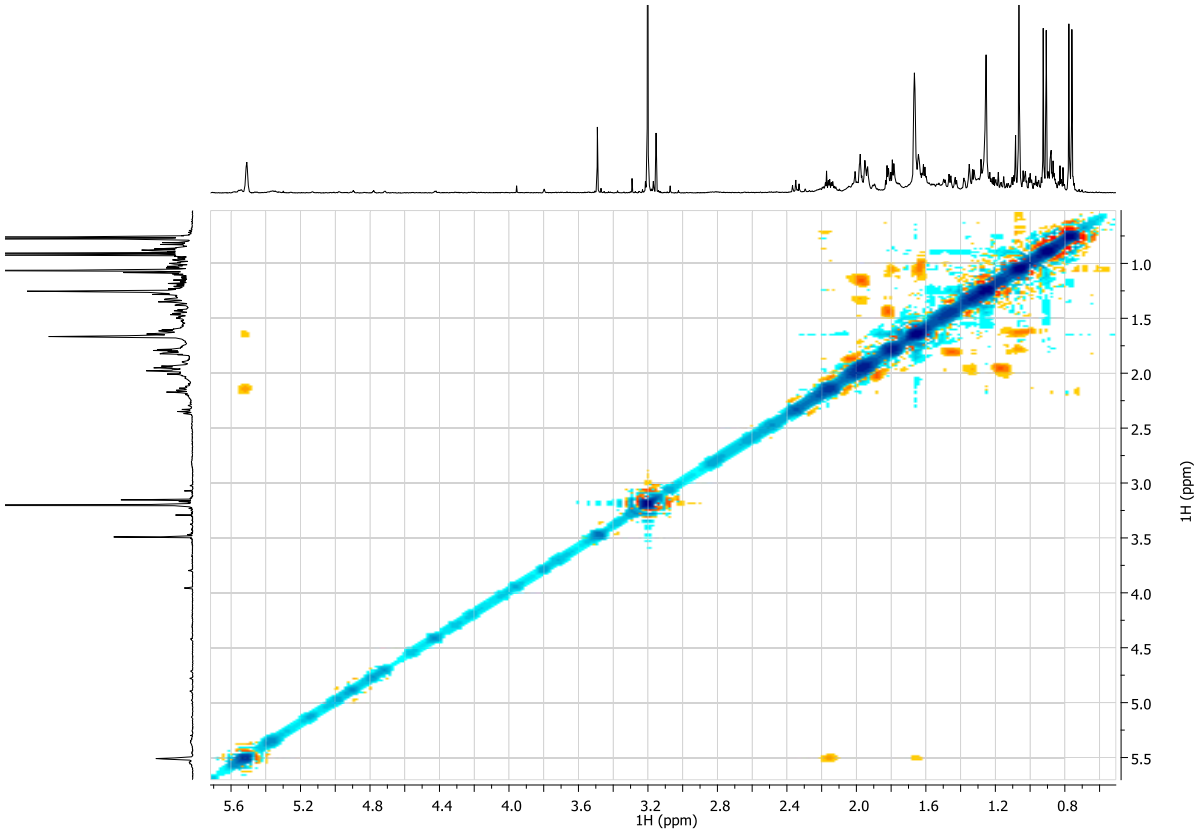


Figure 8I : Spectre RMN NOESY ^{1}H-^{1}H du composé **Ta3** ($CDCl_3$, 100MHz)

Annexe 9 : RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **Ta4**

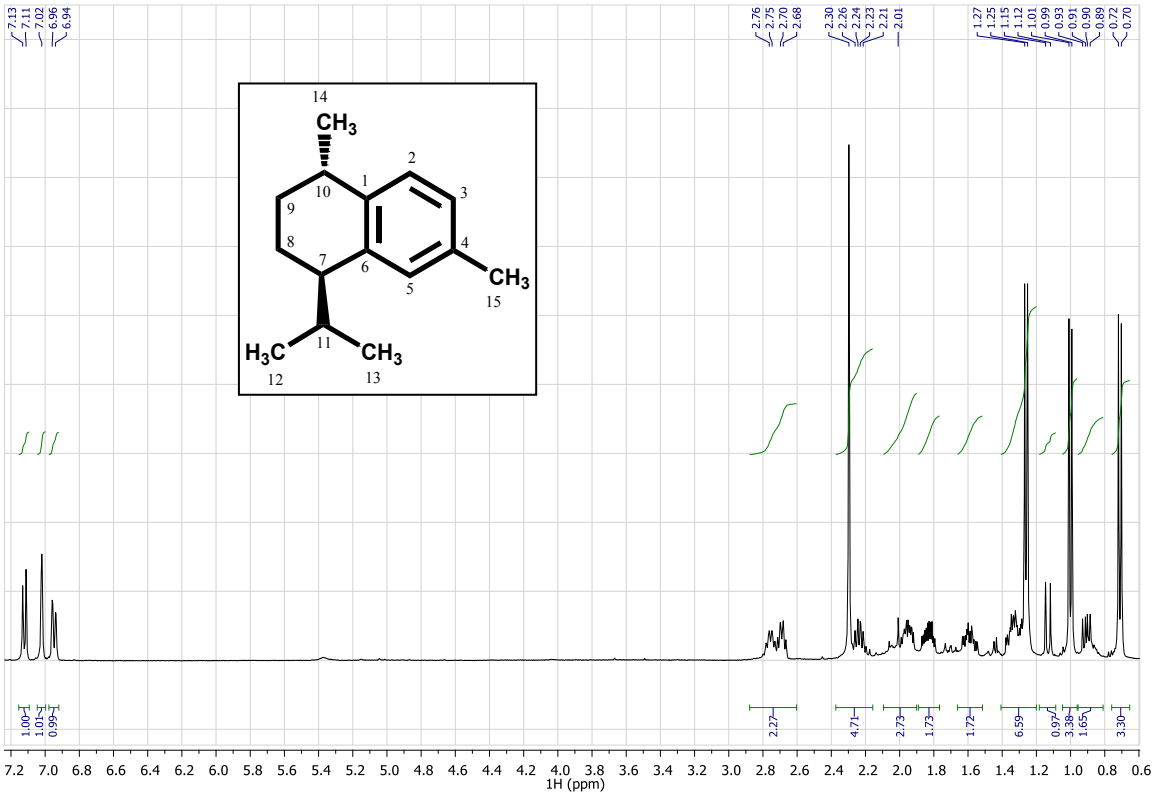


Figure 9A : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ta4** ($CDCl_3$, 400MHz)

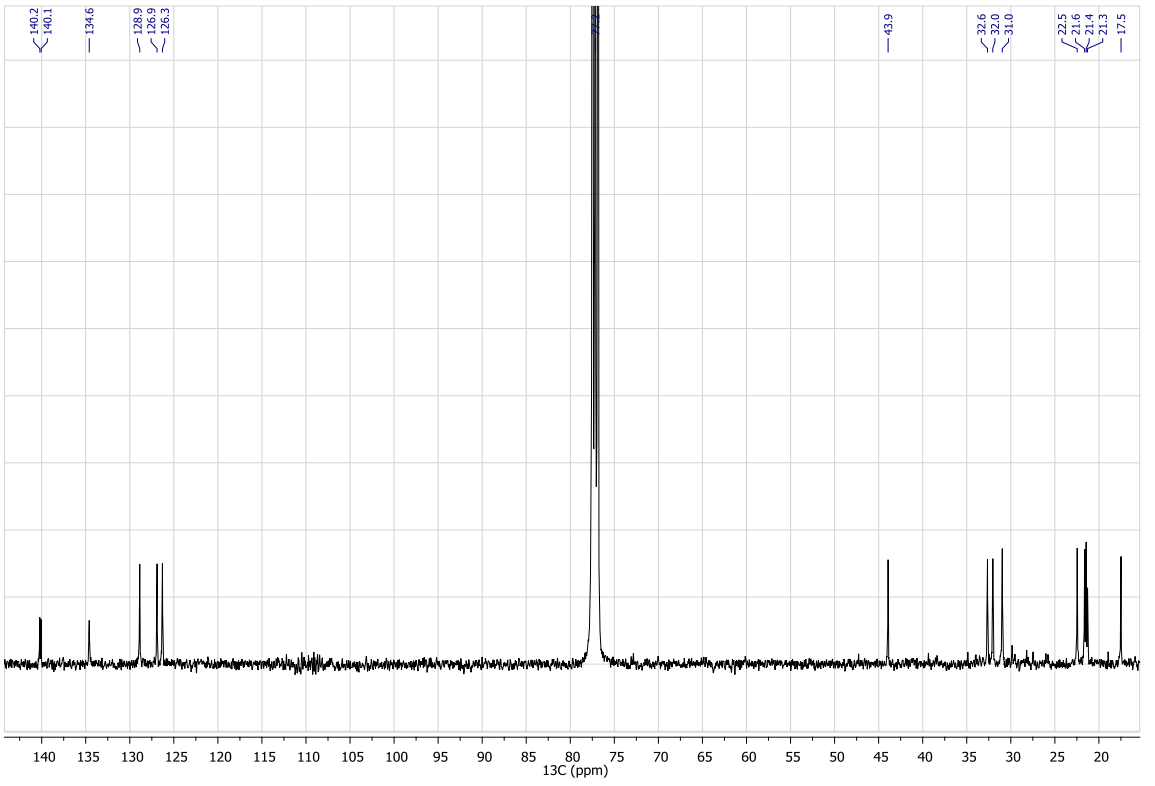


Figure 9B : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ta4** ($CDCl_3$, 100MHz)

Tableau 9C : Données RMN 1D et 2D ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ta4**

$C_{15}H_{22}$

MM = 202 g/mol, *m/z* 203 $[M+H]^+$

IR : ND

$[\alpha]_D^{25}$= +8° (MeOH, 0.01 mg/100 ml)

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^1H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélation HMBC	COSY ^1H-^1H	NOESY ^1H-^1H
1	140,2	C	-	-	-	-
2	126,9	CH	7,12 *d* (8,0 Hz)	C-4, C-6, C-10	H-3	H_3-14
3	126,3	CH	6,95 *br d* (8,0 Hz)	C-1, C-5, C-15	H-2, H_3-15	H_3-15
4	134,6	C	-	-	-	-
5	128,9	CH	7,02 *br s*	C-1, C-3, C-7, C-15	H_3-15	H-7, H-11, H_3-15
6	140,1	C	-	-	-	-
7	43,9	CH	2,69 *q* (6,5 Hz)	C-1, C-8, C-11, C-12, C-13	$H_{a,b}$-8, H-11	H-5, $H_{a,b}$-8, H_b-9, H-11
8	21,6	CH_2	a : 1,83 *m* b : 1,60 *m*	n.o.	a : H_b-8, H-7 b : H_a-8, H-7	a : H-7, H_b-8, H_3-12 b : H-7, H_a-8
9	31,0	CH_2	a : 1,95 *m* b : 1,34 *m*	n.o.	a : H_b-9, H-10 b : H_a-9, H-10	a : H_b-9, H-10, H_3-14 b : H-7, H_a-9, H-10
10	32,6	CH	2,76 *sext* (7,0 Hz)	n.o.	$H_{a,b}$-9, H_3-14	$H_{a,b}$-9, H_3-14
11	32,0	CH	2,24 *oct.* (7,0 Hz)	C-7, C-12, C-13	H-7, H_3-12, H_3-13	H-5, H-7, H_3-13, H_3-12
12	17,5	CH_3	0,71 *d* (7,0 Hz)	C7, C-11, C-13	H-11	H_a-8, H-11, H_3-13
13	21,4	CH_3	1,00 *d* (7,0 Hz)	C-7, C-11, C-12	H-11	H-11, H_3-12
14	22,5	CH_3	1,26 *d* (7,0 Hz)	C-1, C-9, C-10	H-10	H-2, H-10, H_a-9
15	21,3	CH_3	2,30 *s*	C-3, C-4, C-5	H-3, H-5	H-3, H-5

Annexe10 : RMN 1D et 2D du composé **Ta5**

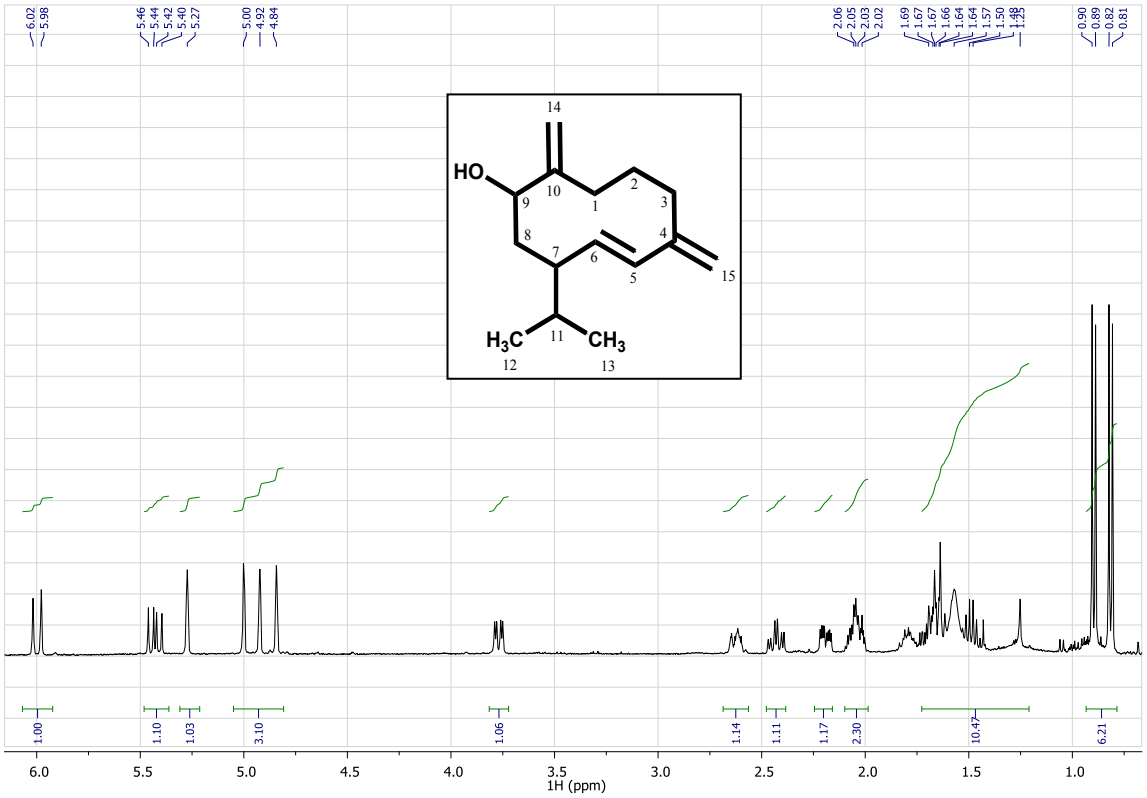


Figure 10A : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ta5** ($CDCl_3$, 400MHz)

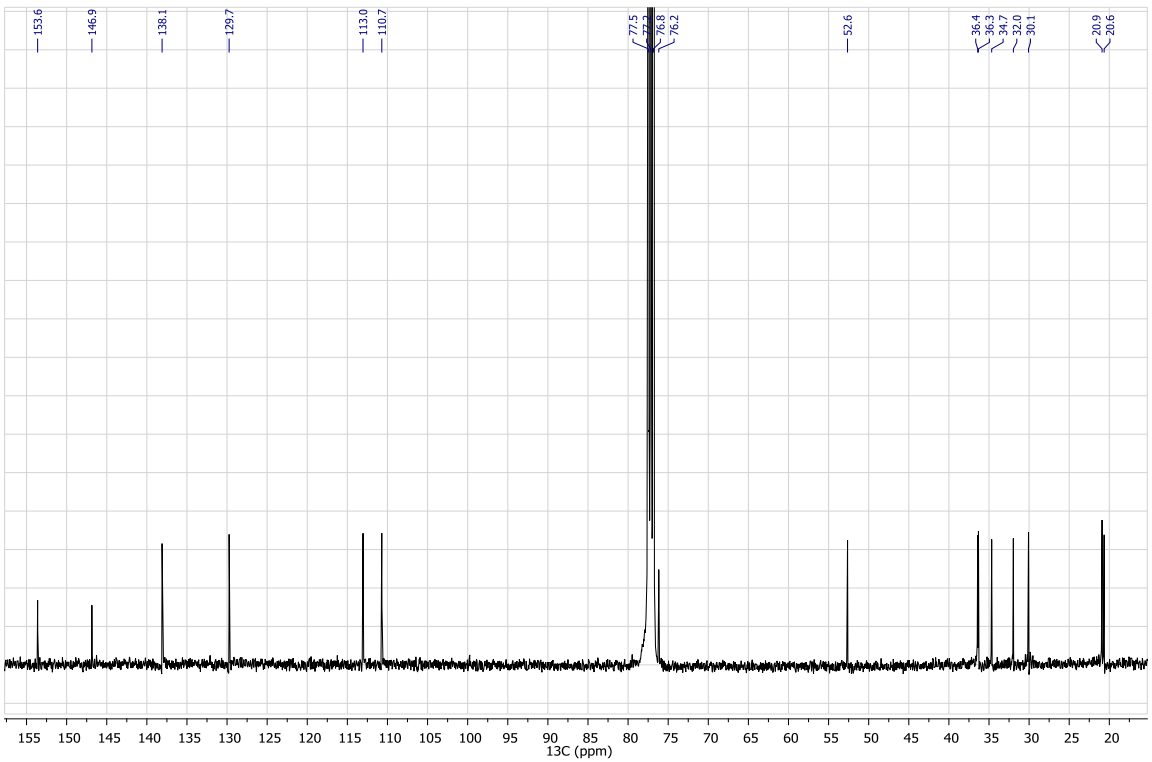


Figure 10B : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ta5** ($CDCl_3$, 100MHz)

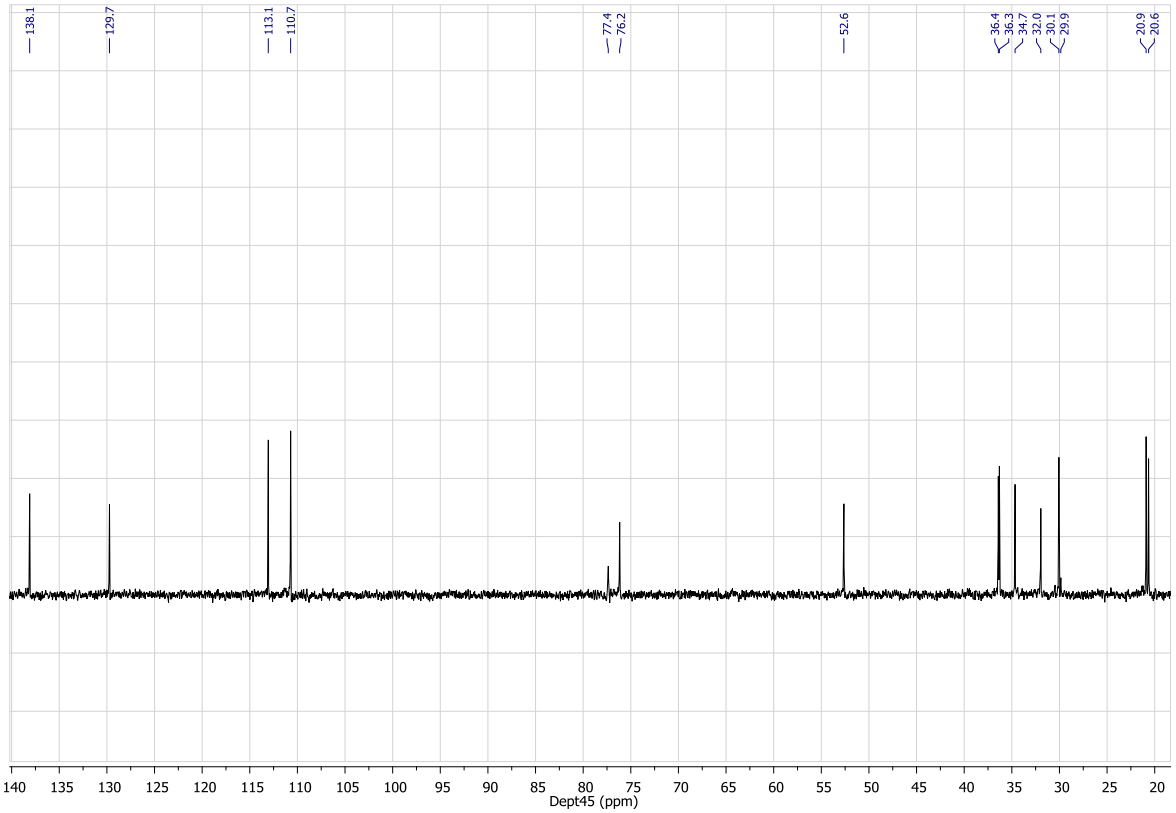


Figure 10C : Spectre RMN DEPT45 du composé **Ta5** ($CDCl_3$, 100MHz)

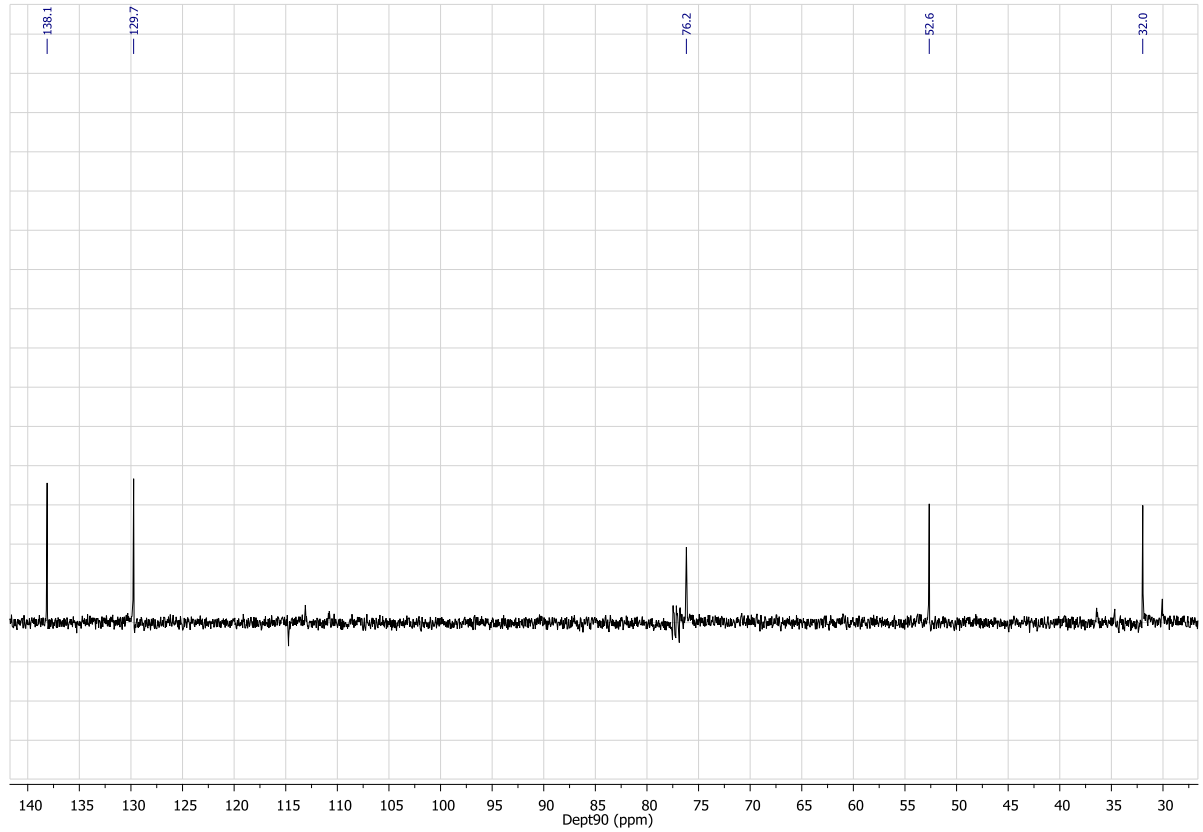


Figure 10D : Spectre RMN DEPT90 du composé **Ta5** ($CDCl_3$, 100MHz)

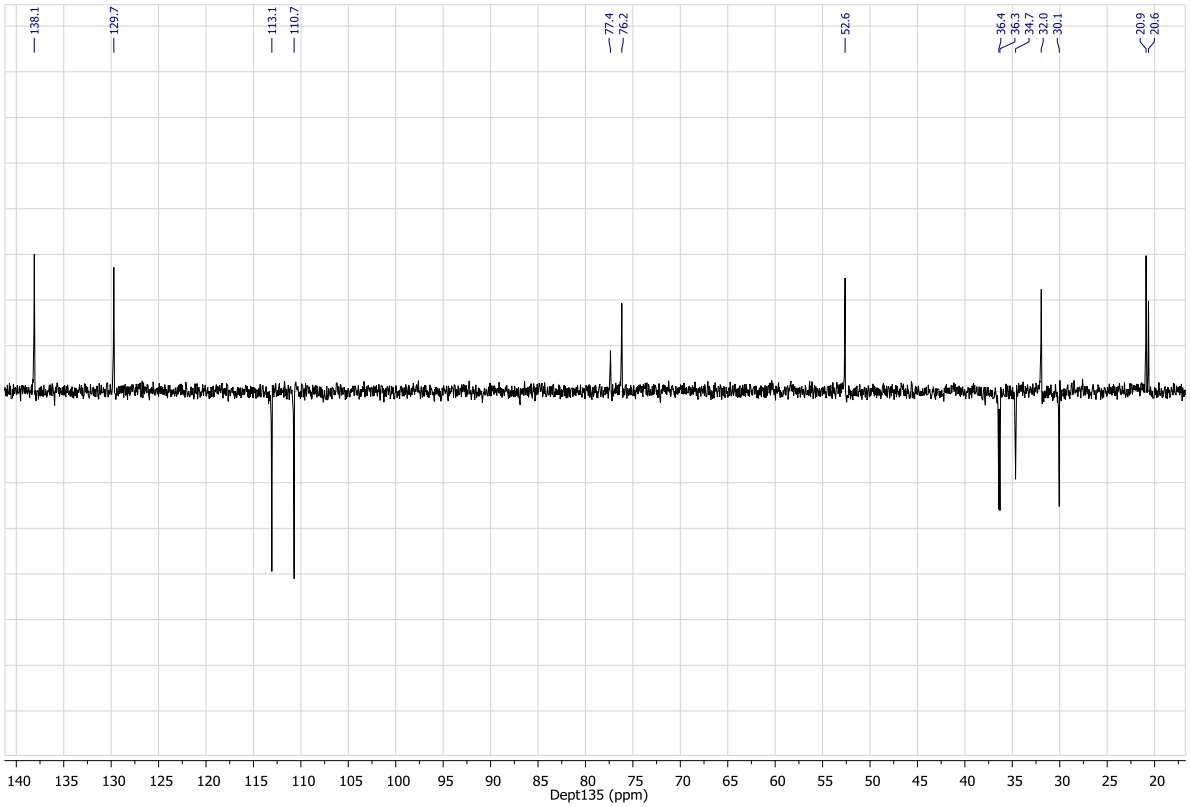


Figure 10E : Spectre RMN DEPT135 du composé **Ta5** ($CDCl_3$, 100MHz)

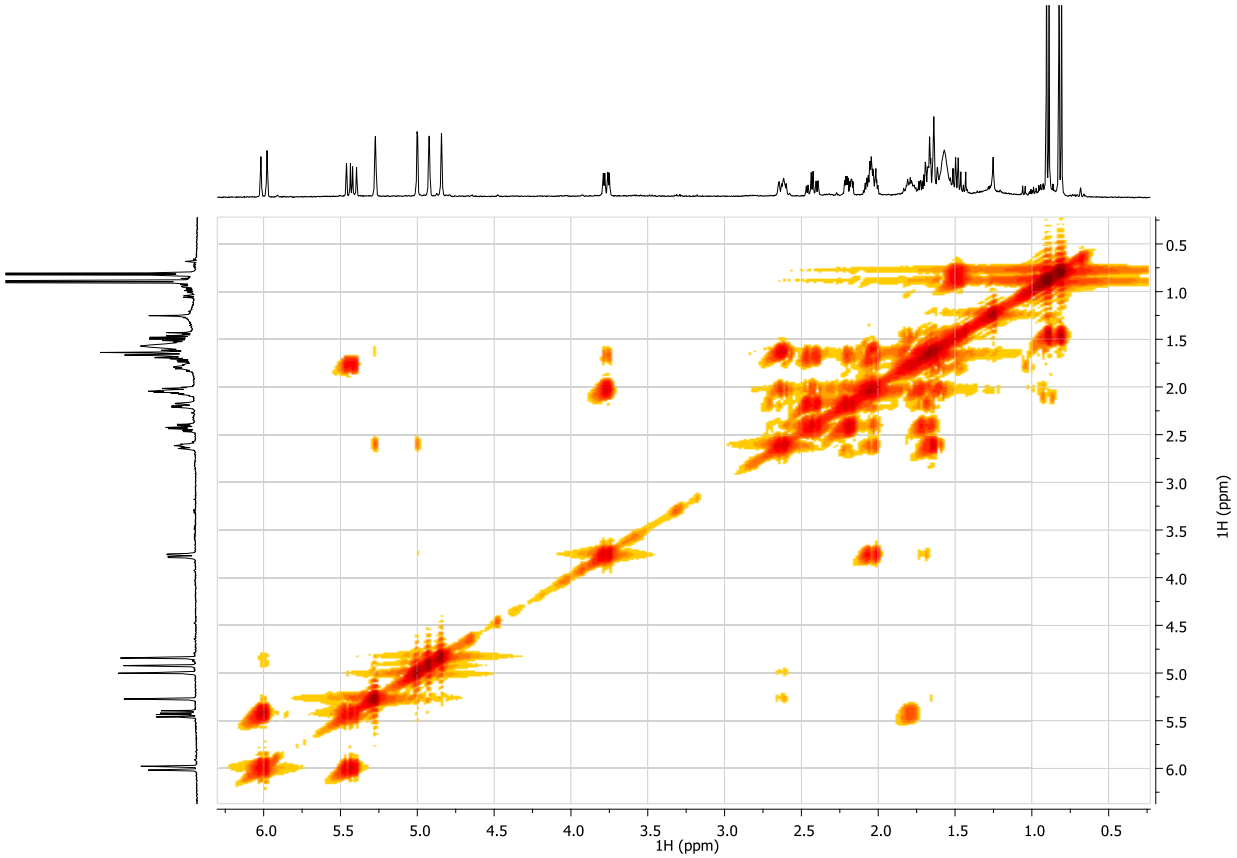


Figure 10F : Spectre RMN COSY ^1H-^1H du composé **Ta5** ($CDCl_3$, 100MHz)

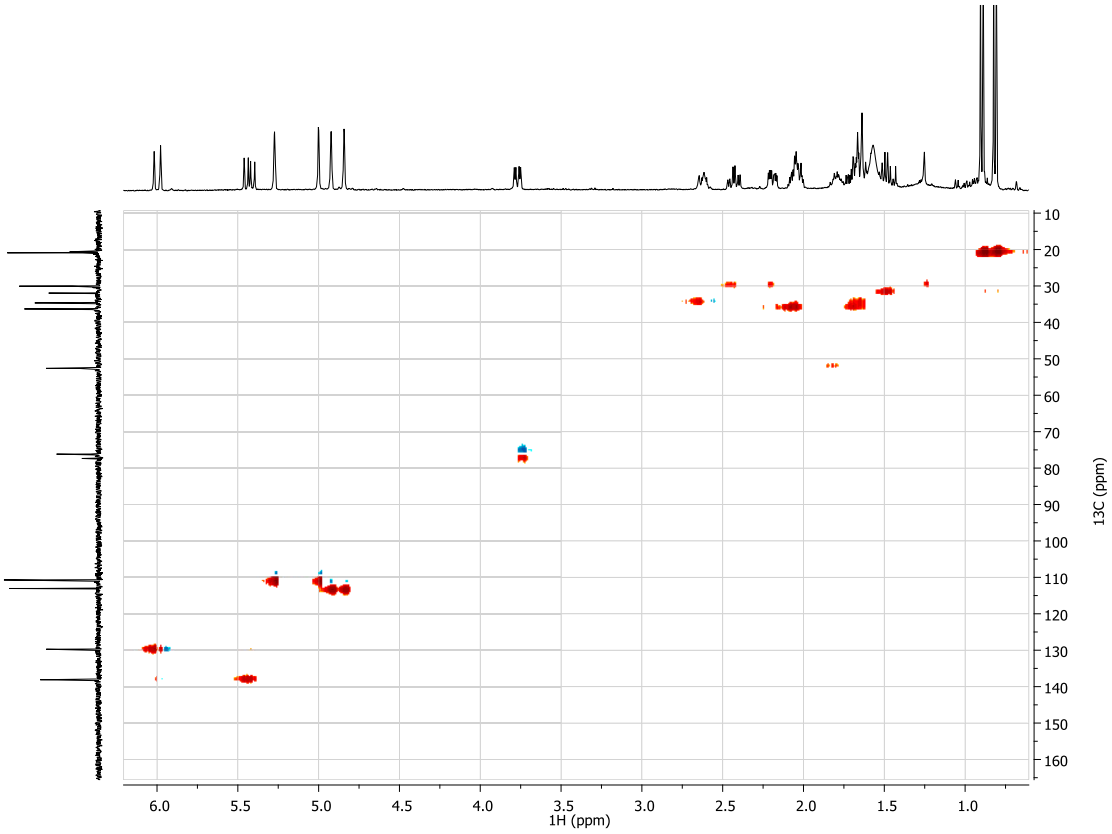


Figure 10E : Spectre RMN HSQC du composé **Ta5** ($CDCl_3$, 100MHz)

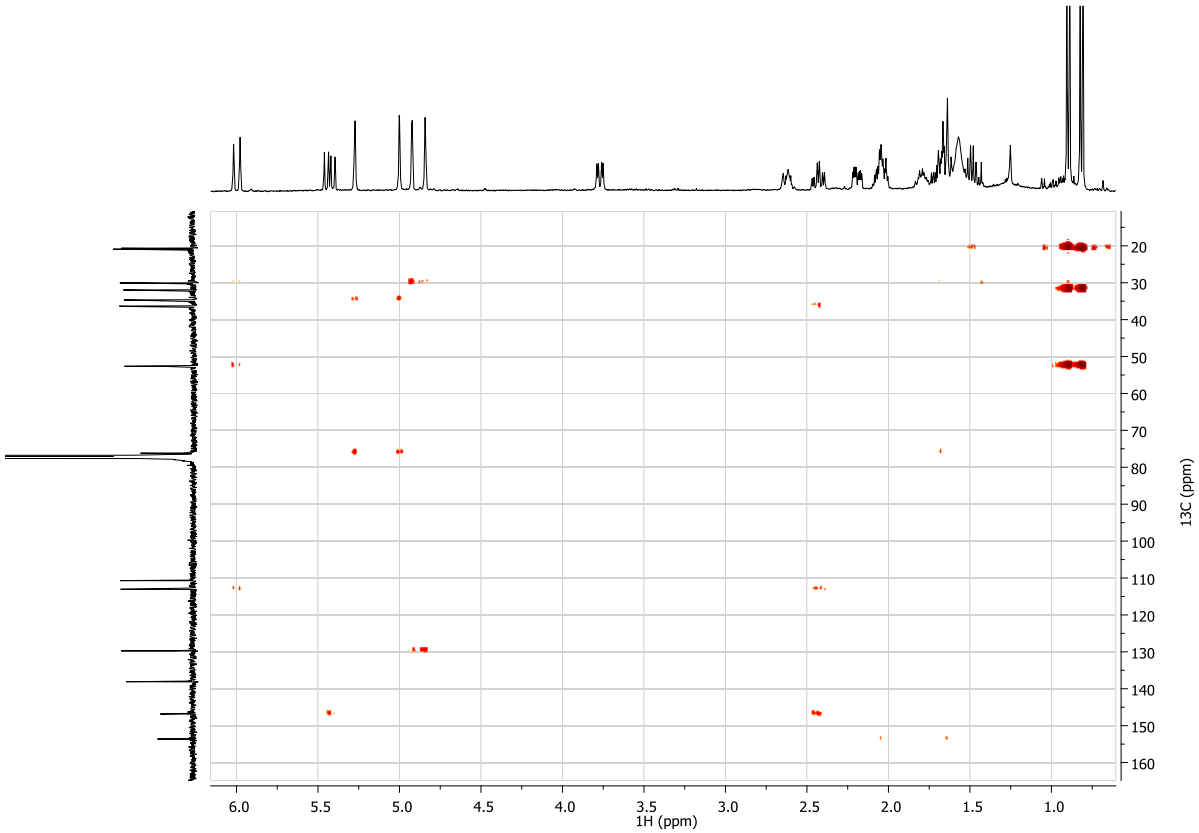


Figure 10G : Spectre RMN HMBC du composé **Ta5** ($CDCl_3$, 100MHz)

Annexe 11 : RMN 1D et 2D du composé **Ta6**

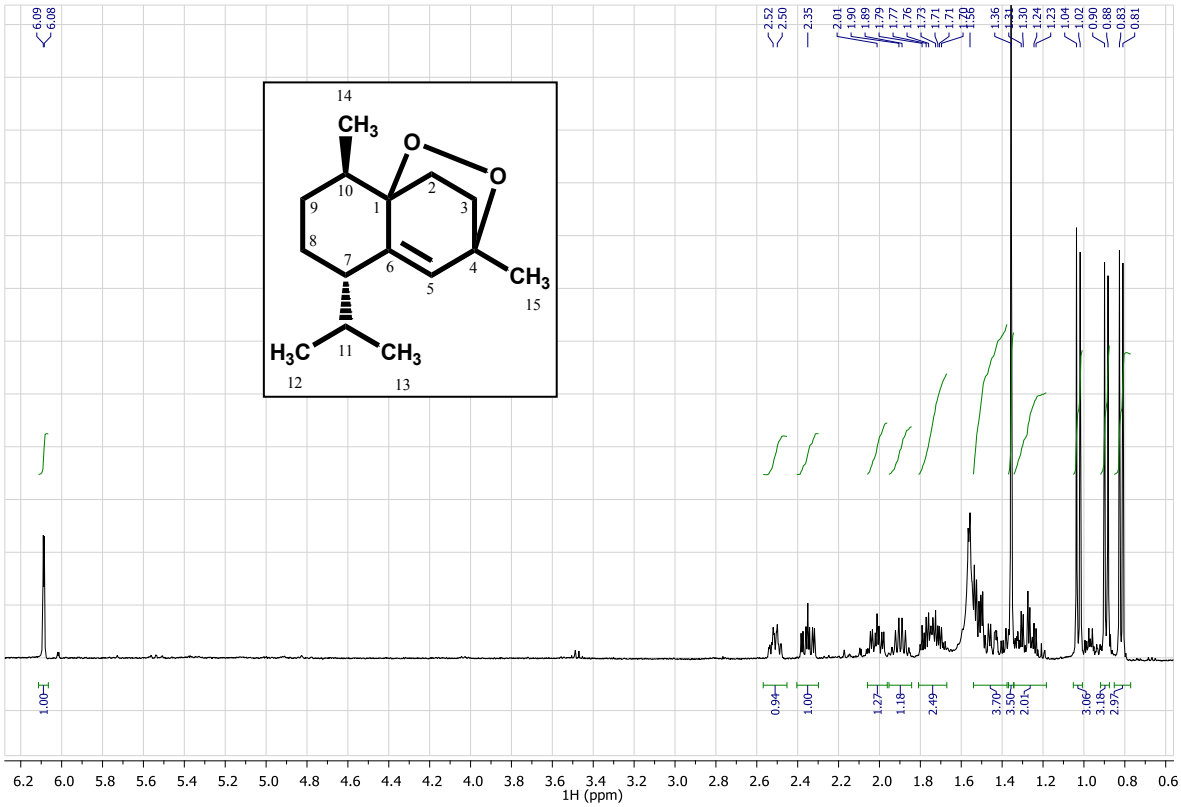


Figure 11A : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ta6** ($CDCl_3$, 400MHz)

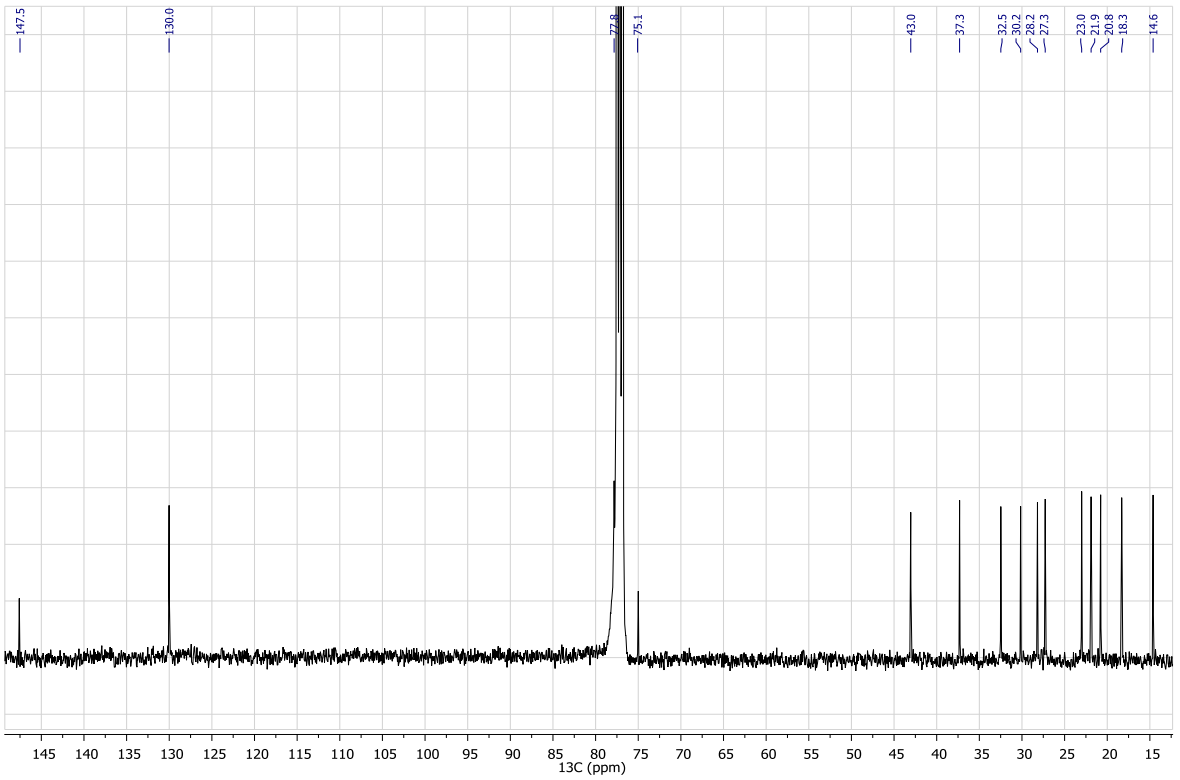


Figure 11B : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ta6** ($CDCl_3$, 100MHz)

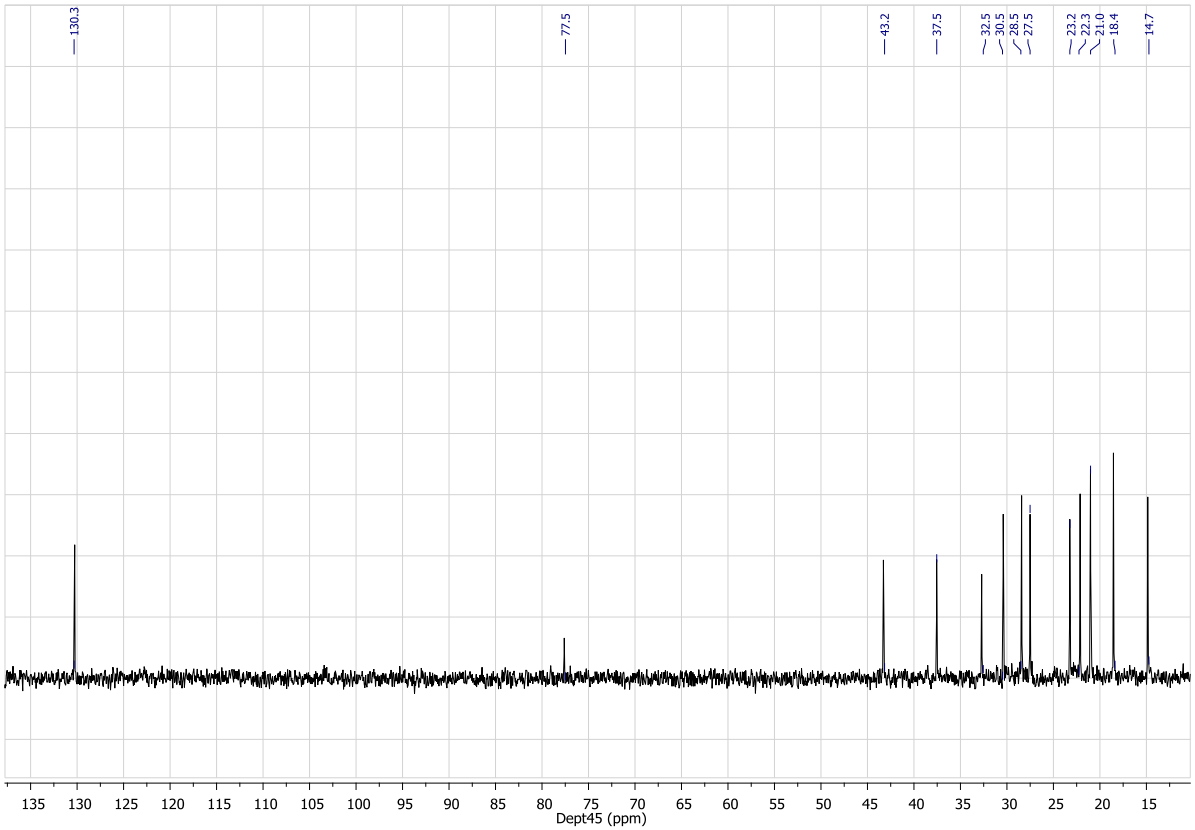


Figure 11C : Spectre RMN DEPT45 du composé **Ta6** ($CDCl_3$, 100MHz)

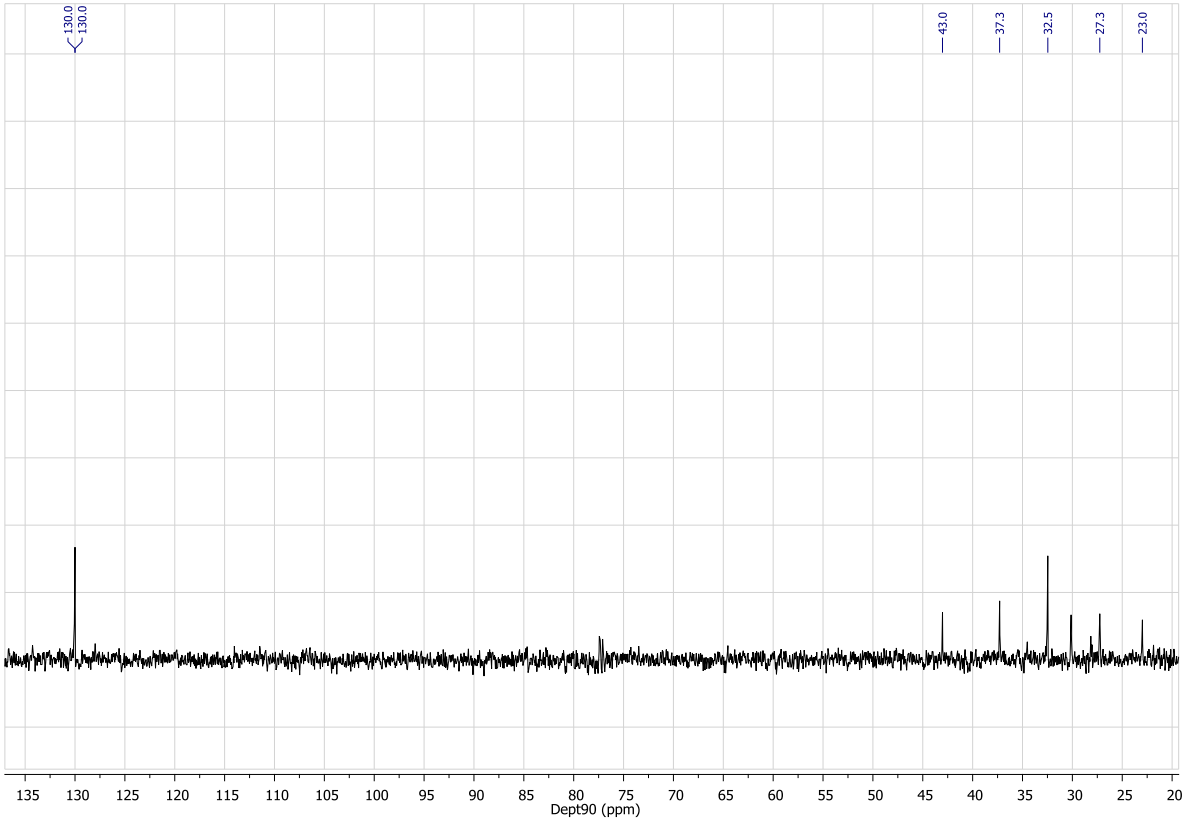


Figure 11D : Spectre RMN DEPT90 du composé **Ta6** ($CDCl_3$, 100MHz)

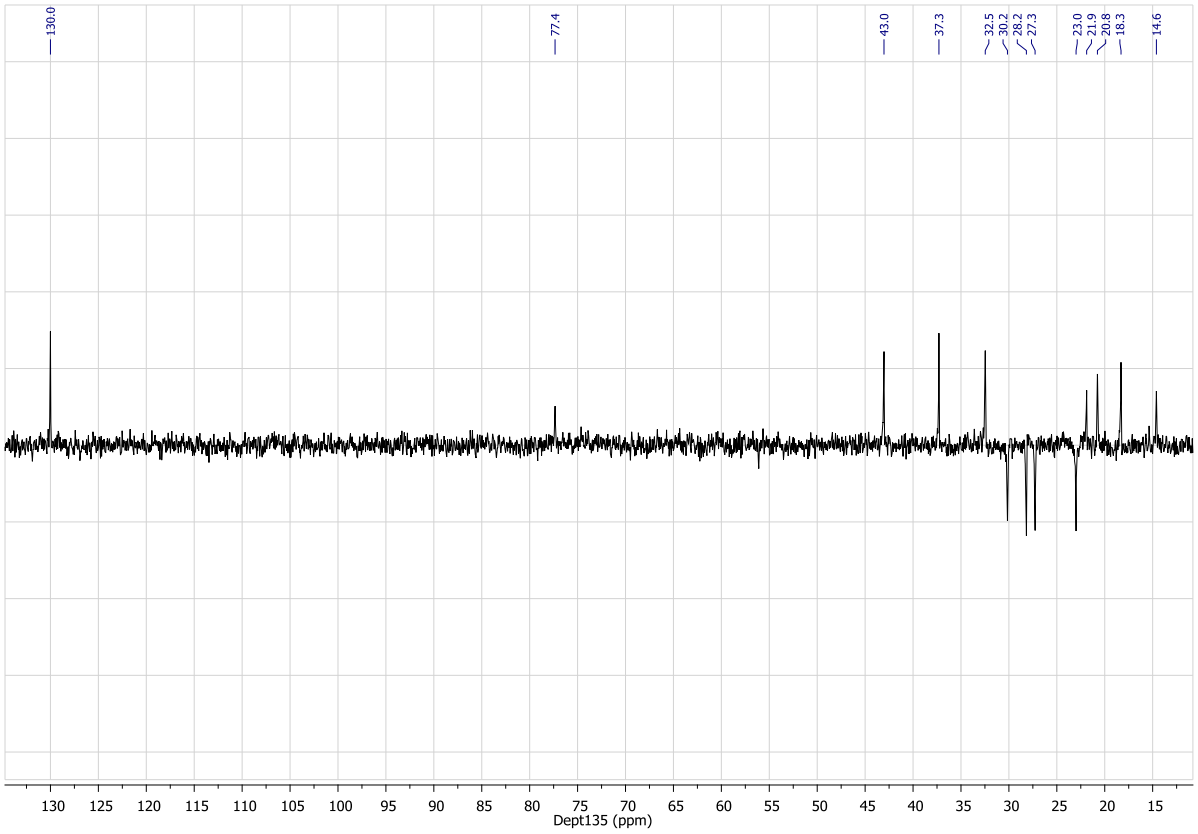


Figure 11E : Spectre RMN DEPT90 du composé **Ta6** ($CDCl_3$, 100MHz)

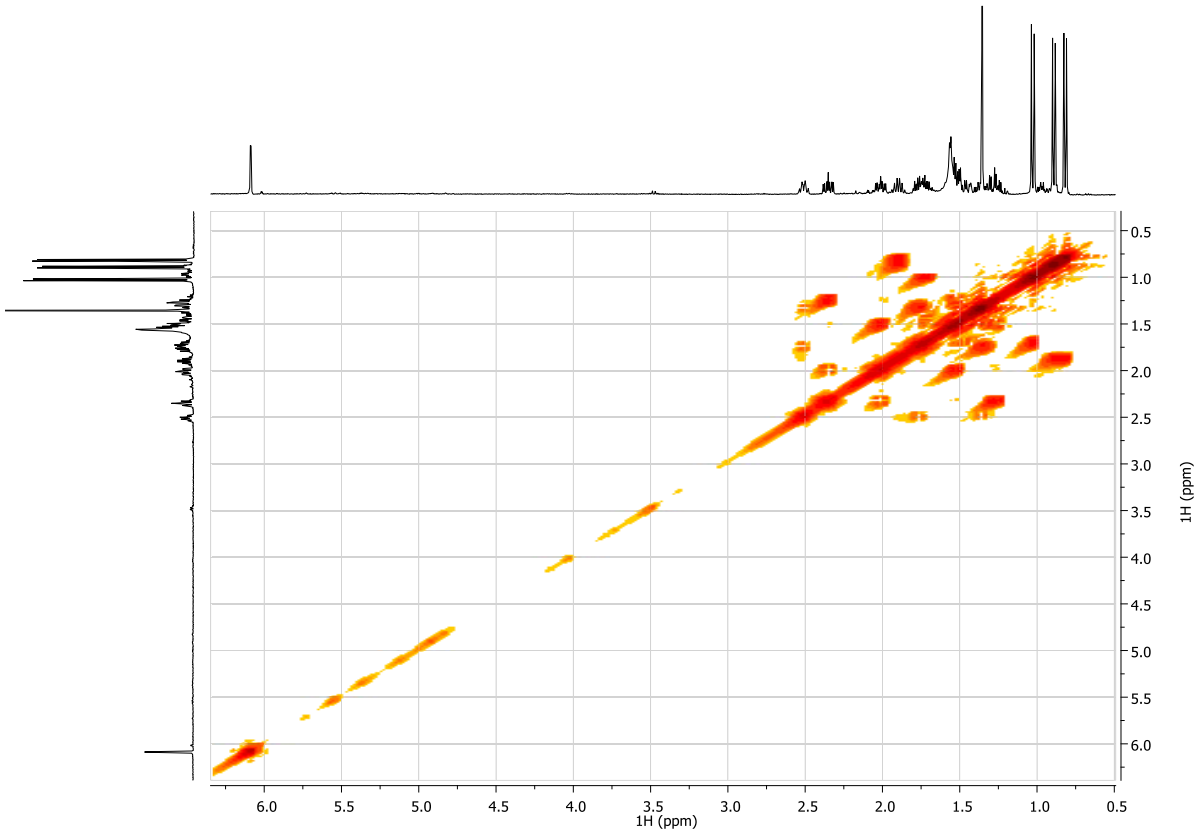


Figure 11F : Spectre RMN COSY ^{1}H-^{1}H du composé **Ta6** ($CDCl_3$, 100MHz)

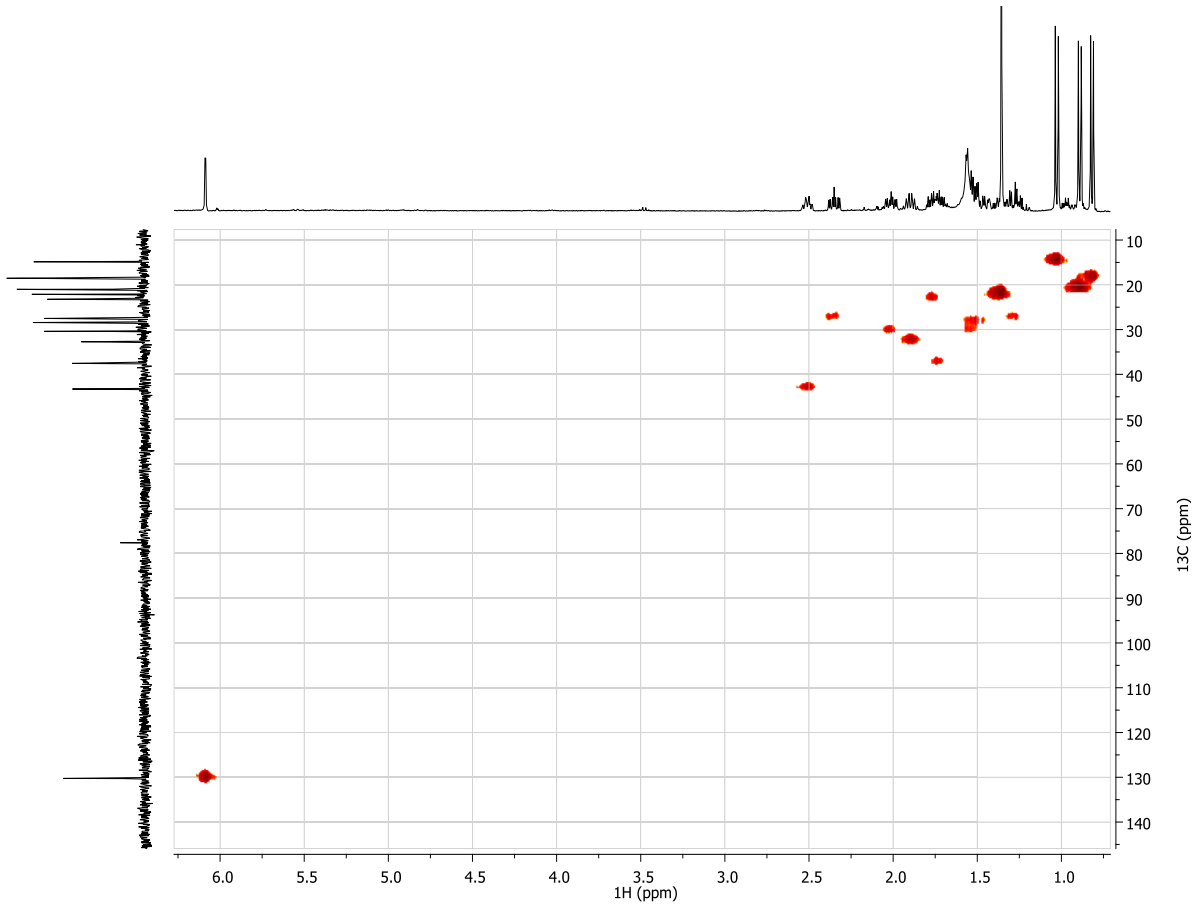


Figure 11G : Spectre RMN HSQC du composé **Ta6** ($CDCl_3$, 100MHz)

Annexe12 : RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **Ta7**

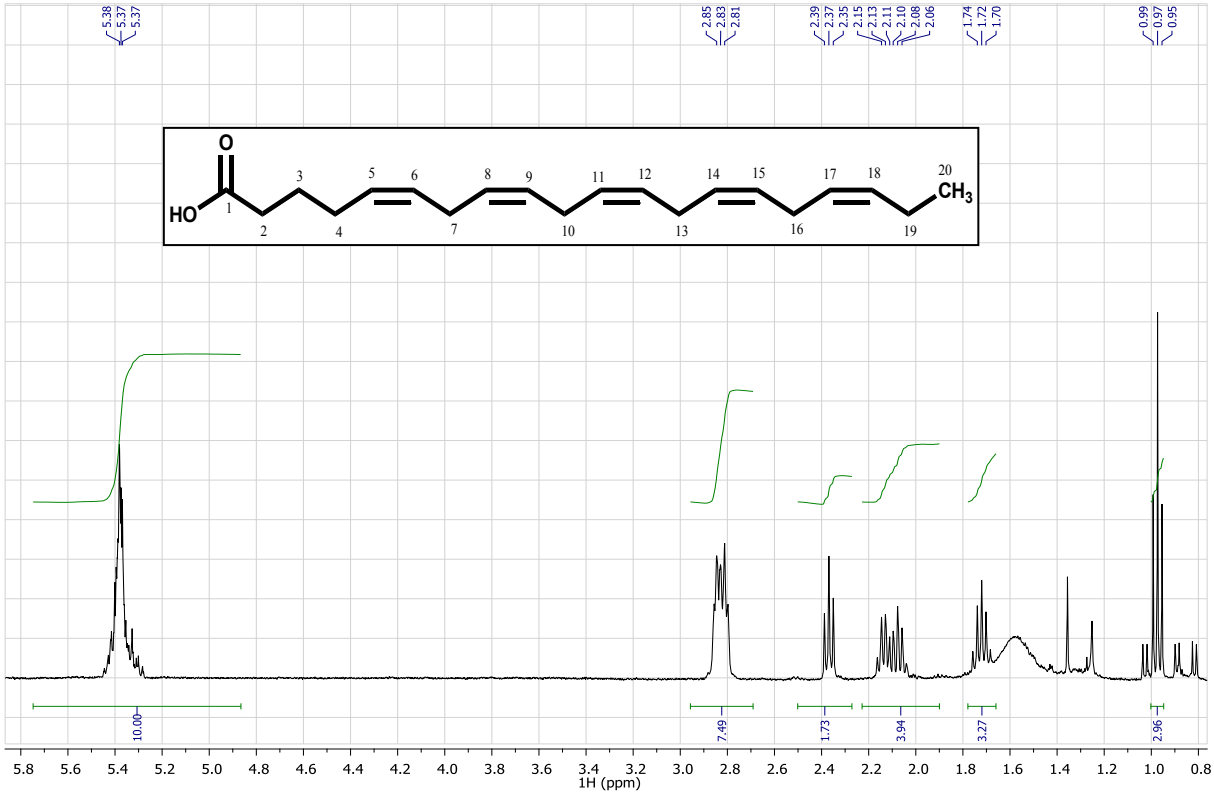


Figure 12A : Spectre RMN ^{1}H du composé **Ta7** ($CDCl_3$, 400MHz)

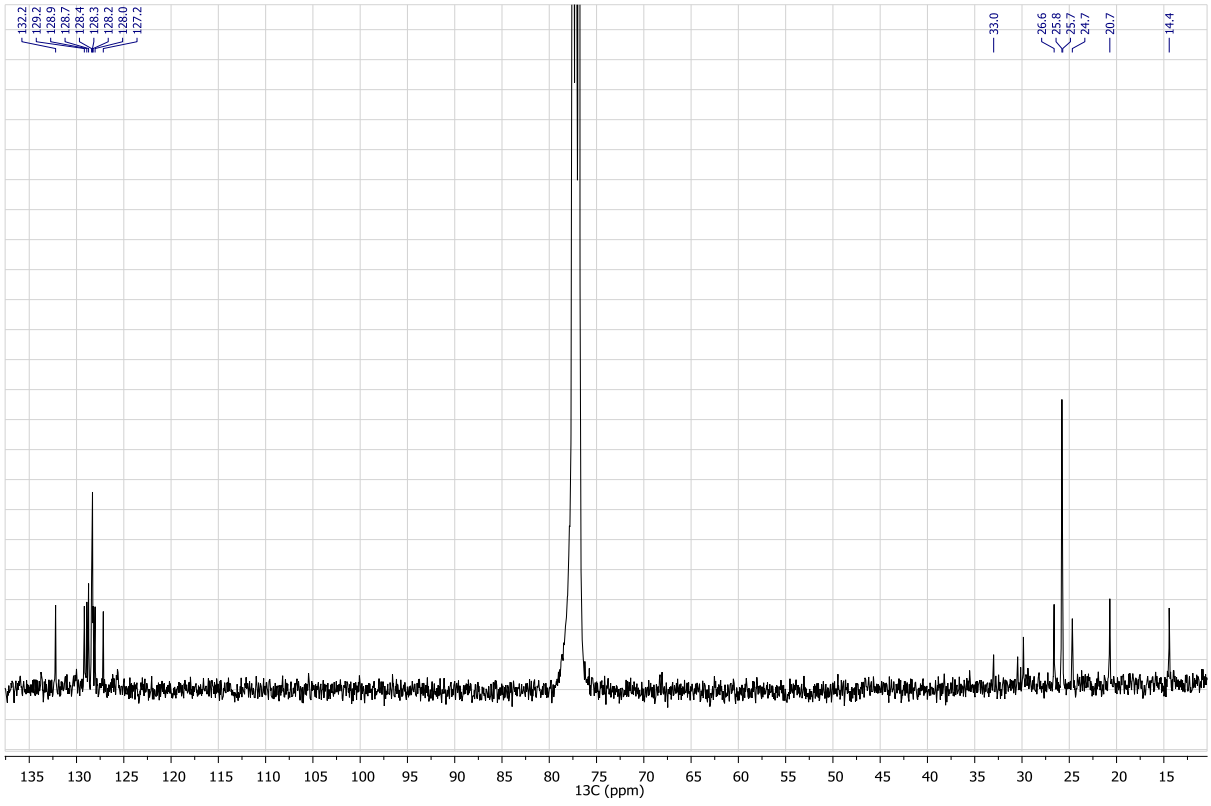


Figure 12B : Spectre RMN ^{13}C du composé **Ta7** ($CDCl_3$, 100MHz)

Tableau 12C : Données RMN 1D et 2D ($CDCl_3$, 400 MHz) du composé **Ta7**

$C_{20}H_{29}O_2$

MM = 301 g/mol

IR : 3014, 2960, 2924, 2870, 2850, 1709, 1579, 1119 cm^{-1}.

$[\alpha]_D^{25}$ = -1 (MeOH, 0.005 mg/100 ml)

N°	^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz)	DEPT	^1H ($CDCl_3$, 400 MHz)	Corrélation HMBC	COSY ^1H-^1H
1	177,5	C	-	-	-
2	33,0	CH_2	2,37 *t* (7,5 Hz)	n.o.	C-2
3	24,7	CH_2	1,71 *quint* (7,5 Hz)	n.o	C-1, C-3
4*	26,6	CH_2	2,14 *td* (7,5, 7,0 Hz)	C-4	C-2,C-4
5*	128,9	CH	5,38 *m*	C-3	C-3
6**	129,2	CH	5,38 *m*	C-6	C-3
7***	25,7-25,8[1]	CH_2	2,83 *m*	C-5, C-7	C-5, C-7
8***	128,0-128,7[2]	CH	5,38 *m*	C-6	C-6
9**	128,0-128,7[2]	CH	5,38 *m*	C-9	C-9
10***	25,7- 25,8[1]	CH_2	2,83 *m*	C-8, C-10	C-8, C-10
11***	128,0-128,7[2]	CH	5,38 *m*	C-9	C-9
12**	128,0-128,7[2]	CH	5,38 *m*	C-12	C-12
13***	25,7-25,8[1]	CH_2	2,83 *m*	C-11, C-13	C-11, C-13
14***	128,0-128,7[2]	CH	5,38 *m*	C-12	C-12
15**	128,0-128,7[2]	CH	5,38 *m*	C-15	C-15
16	25,7- 25,8[1]	CH_2	2,83 *m*	C-14, C-16	C-14, C-16
17	127,2	CH	5,38 *m*	C-18	C-16
18	132,2	CH	5,38 *m*	C-18, C-19	n.o.
19	20,7	CH_2	2,08 *qd* (7,5 ; 7,0 Hz)	C-18	C-18
20	14,5	CH_3	0,97 *t* (7,5 Hz)	C-18	C-19

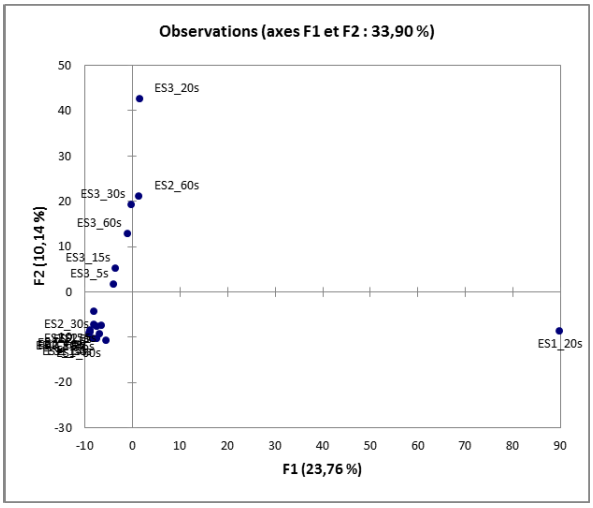
*,**,*** échangeable

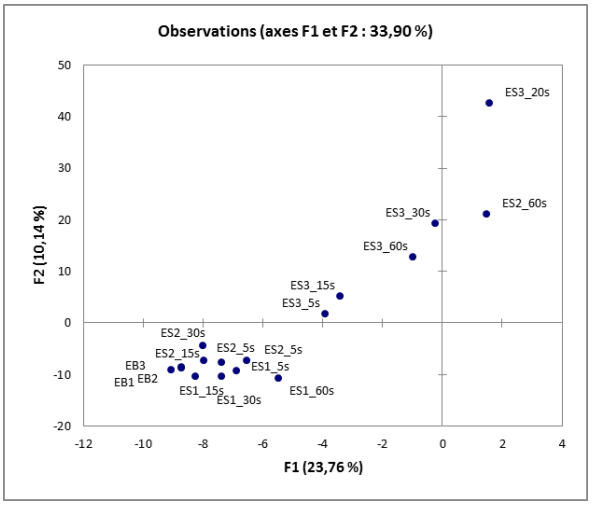
…[1] 25,7 ppm (× 1), 25,8 ppm (× 3)

[2] 128,0 ppm (× 1), 128,2 ppm (× 1), 128,3 ppm (× 2), 128,4 ppm (× 1), 128,7 ppm (× 1)

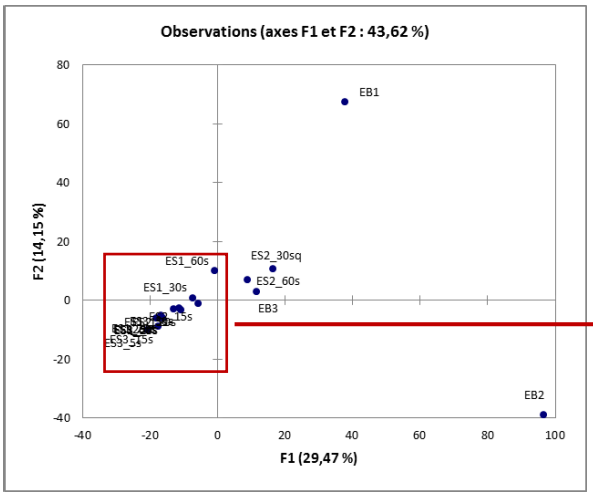
Annexe 13 : Analyse par ACP des signatures chimiques des extraits surfaciques (MeOH) de *T. atomaria* pour les mois de février à juillet.

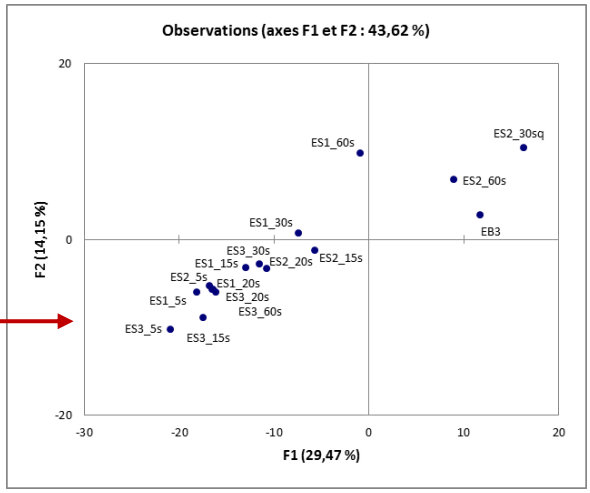
Février



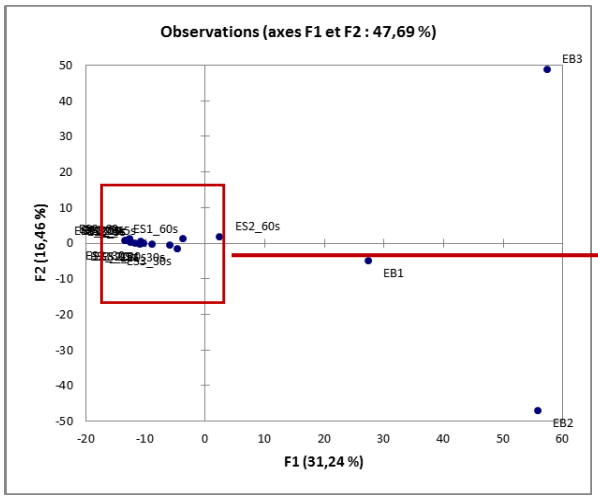


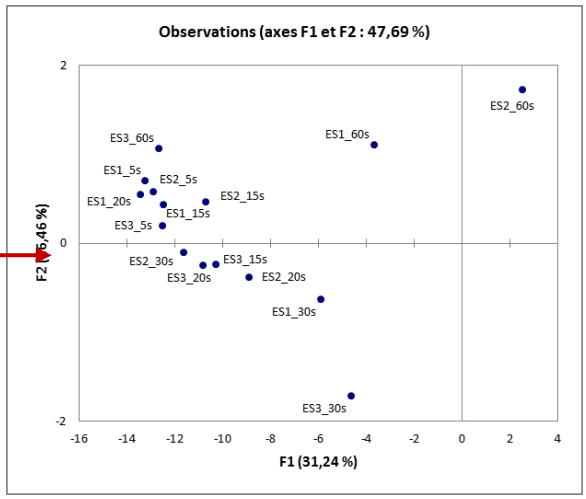
Mars



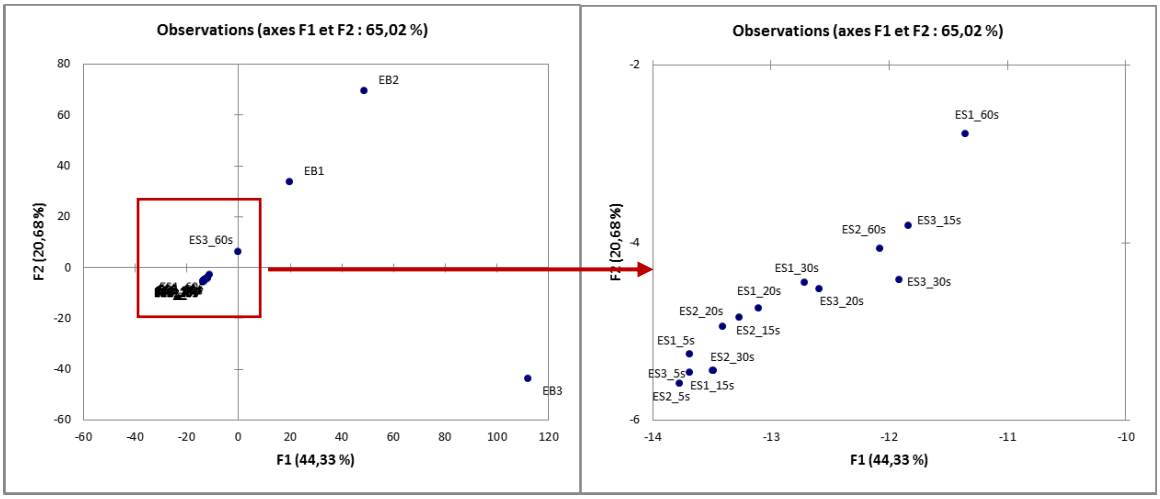


avril

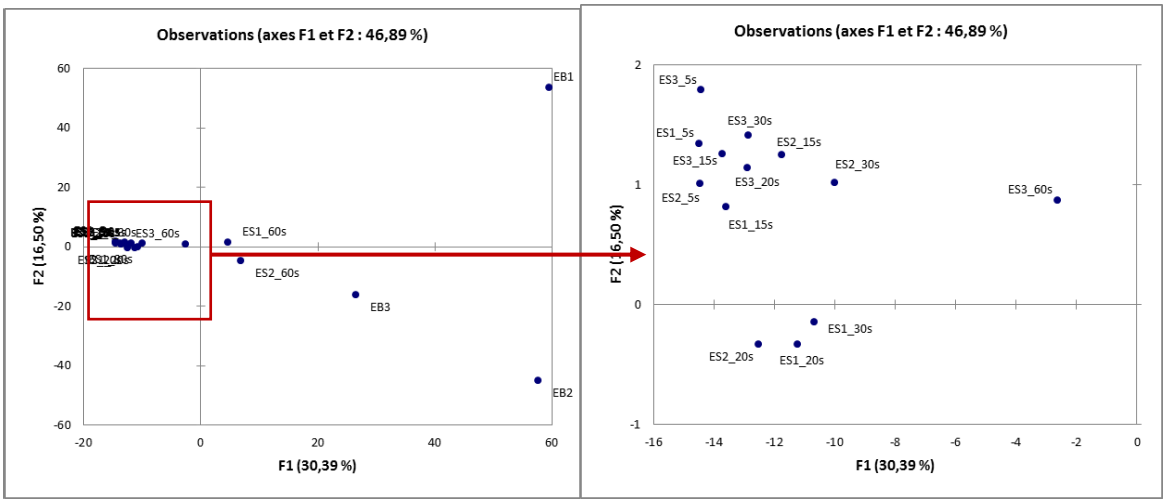




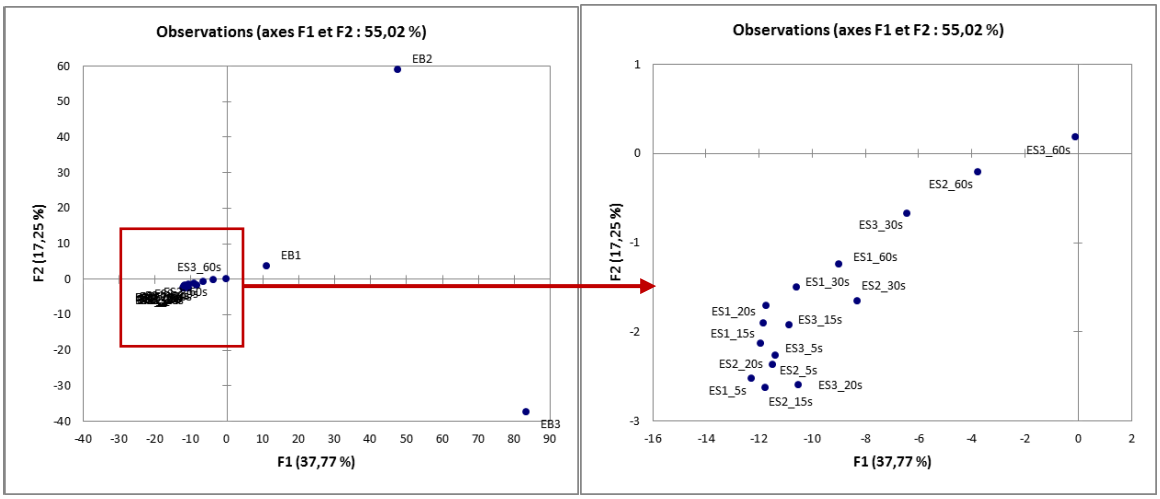
Mai



Juin

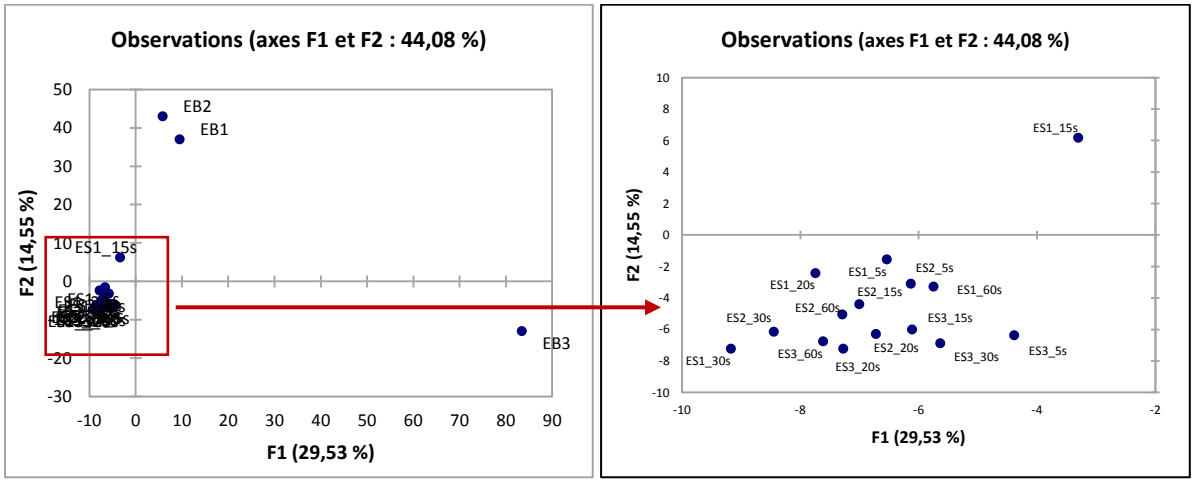
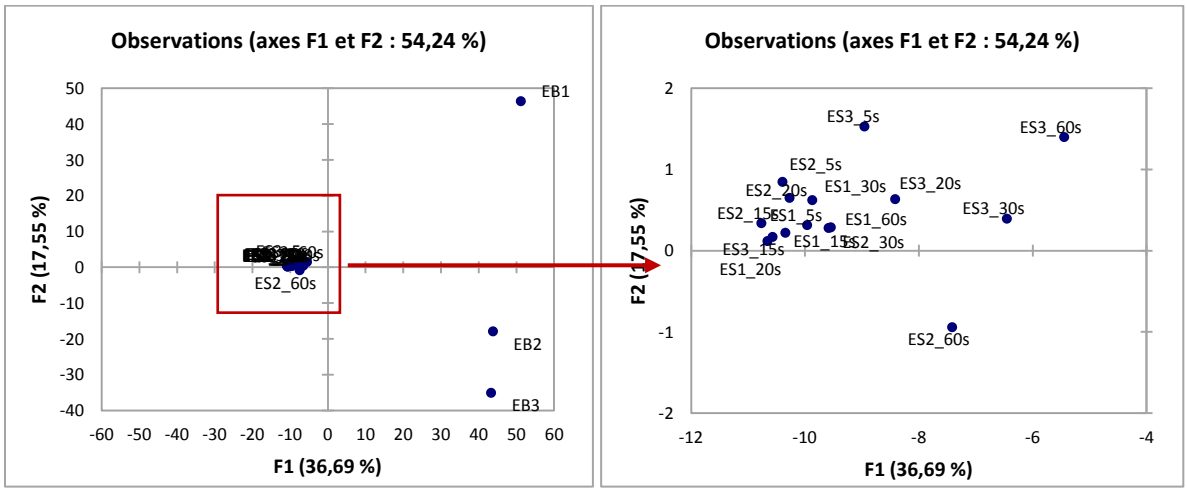


Juillet



Annexe 14 : Analyse par ACP des signatures chimiques des extraits surfaciques ($MeOH/CH_2Cl_2$) de *T. atomaria* : exemple des mois de février et mars.

Février



Mars