HAL
open science

Caractérisation chimique d'espèces du complexe Laurencia par RMN du carbone-13

Hélène Esselin

To cite this version:

Hélène Esselin. Caractérisation chimique d'espèces du complexe Laurencia par RMN du carbone-13. Chimie analytique. Université de Corse Pascal Paoli, 2018. Français. NNT : . tel-02529734

HAL Id: tel-02529734

https://hal.science/tel-02529734

Submitted on 2 Apr 2020

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.

UNIVERSITE DE CORSE - PASCAL PAOLI
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE
UMR CNRS 6134 (SPE)

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN CHIMIE
Mention : chimie théorique, physique, analytique

Soutenue publiquement par
HELENE ESSELIN
Le 20/11/2018

Caractérisation chimique d'espèces du complexe *Laurencia* par RMN du carbone-13

Directeurs :

M. Félix Tomi, Professeur, Université de Corse
M. Ange Bighelli, Professeur, Université de Corse

Rapporteurs :

M. Joël Boustié, Professeur, Université de Rennes I
M. Nicolas Baldovini, MC-HDR, Université de Nice

Jury

Mme Line Le Gall, MC-HDR, Museum National d'Histoire Naturelle
Mme Liliane Berti, Professeur, Université de Corse
M. Joël Boustié, Professeur, Université de Rennes I
M. Nicolas Baldovini, MC-HDR, Université de Nice
M. Marc Gibernau, CR-HDR, Université de Corse
M. Sylvain Sutour, Dr, Université de Neuchâtel

Membres invités :

M. Félix Tomi, Professeur, Université de Corse
M. Ange Bighelli, Professeur, Université de Corse

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse, associée au CNRS (UMR 6134 « Sciences pour l'Environnement »), sous la direction de Messieurs Félix Tomi et Ange Bighelli (Professeurs, Université de Corse). Je tiens à leur exprimer ma profonde reconnaissance. Leur disponibilité et leur expérience m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Je suis également sensible à l'honneur que me font M. Joël Boustié (Professeur, Université de Rennes) et M. Nicolas Baldovini (Maître de Conférences – HDR, Université de Nice) en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je suis très heureuse de bénéficier de leurs recommandations et je tiens à leur exprimer ma sincère reconaissance pour cette marque d'intérêt.

Que Mesdames Line Le Gall (MC – HDR, Museum National d'Histoire Naturelle) et Liliane Berti (Professeur, Université de Corse) ainsi que Messieurs Marc Gibernau (CR – HDR, Université de Corse) et Sylvain Sutour (Dr, Université de Neuchâtel), qui ont accepté de participer à cette commission d'examen, trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail.

Je remercie la Collectivité de Corse de m'avoir attribué un contrat doctoral, qui m'a permis de réaliser cette thèse.

Je tiens à remercier M. Sylvain Sutour pour avoir participé à l'élaboration de ce projet de thèse, et de l'avoir soutenu jusqu'au bout. Merci pour ton enthousiasme et ta disponibilté, même de l'autre côté de la Méditerranée. Merci également d'avoir effectué les analyses en spectrométrie de masse et de m'avoir permis de réaliser ce séjour à la plateforme analytique de Neuchâtel. Je souhaite également remercier M. Marc Gibernau pour sa sympathie et son enthousiasme ainsi que M. Pierre Tomi pour toute l'aide apportée pour les enseignements et pour la traduction du résumé en langue corse. Je remercie également l'ensemble de l'équipe « Chimie et Biomasse ».

Je remercie Mme Line Le Gall pour m'avoir initiée aux aspects phylogénétiques de ce travail et M. Marc Verlaque pour les identifications botaniques.

Je tiens également à remercier Mesdames Joana Liberal, Maria Teresa Cruz et Ligia Salgueiro (Université de Coimbra, Portugal) pour les tests biologiques effectués, ainsi que Mme Ingrid Freuze

(Université d'Angers) pour les analyses en spectrométrie de masse et M. Benjamin Siegler (Université d'Angers) pour les analyses de RMN bidimensionnelle.

Merci également à mes camarades de l'équipe « Chimie et Biomasse » : Doreen, Tao, Gaby, Sylvain, Anne-Marie, Ophélie, Albert, Blanchard et tant d'autres. Merci pour votre soutien et pour ces moments de détente.

Un merci tout particulier à *Lady* Clémentine Baccati, nommée officiellement stagiaire de l'année. Merci d'avoir mis ta vie en péril pour cette ultime récolte d'algues, merci pour tes idées toutes plus intringantes les unes que les autres, merci pour ces longues heures de nettoyage en musique et pour ton répertoire si surprenant. Merci tout simplement d'avoir rendu ces derniers mois de thèse un peu moins monotones.

Un grand merci à Mme Jennifer Galtié, pour ta gentillesse et ta grande disponibilité, au labo mais pas que. Merci pour ces moments partagés autour d'un thé ou à jardiner.

Merci également aux membres de l'équipe « Energies renouvelables » : Dalia Si Ahmed, Tina Le Mao, Manuel Espinosa, David Ouvrard, Guillaume Pigelet et Anto Faggianelli pour les (trop) nombreuses pauses café partagées.

J'en profite également pour remercier ma famille et mes amis pour leur soutien. Damien, merci pour tout ce que tu m'apportes et merci de toujours trouver les mots justes en toutes circontances.

INTRODUCTION **1**

CHAPITRE I LE COMPLEXE *LAURENCIA* **3**

I Présentation du complexe *Laurencia* 4

I.1. Position taxonomique 4

I.2. Reproduction et cycle de développement 5

I.3. Distribution géographique 6

I.4. Caractères morphologiques 6

II Etude chimique du complexe *Laurencia* 8

II.1. Sesquiterpènes 9

Chamigranes 9

Perforanes 11

Brasilanes 12

Snydéranes 13

Lauranes 13

Bisabolanes 14

Cuparanes 15

Eudesmanes 15

Autres sesquiterpènes 16

II.2. Diterpènes et triterpènes 17

II.3. C_{15} acétogénines 19

II.4. Autres métabolites secondaires 25

III Activités biologiques 26

III.1. Activité cytotoxique 26

Cytotoxicité *vs. Artemia salina* 26

Cytotoxicité *vs.* lignées cellulaires cancéreuses 26

III.2. Autres activités biologiques 29

CHAPITRE II ANALYSE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE QUATRE POPULATIONS DE *LAURENCIA OBTUSA* PAR RMN DU CARBONE 13 ..... **30**

I Présentation des populations étudiées 31

I.1. Récolte et Extraction 31

I.2. Identification et position taxonomique 32

II Méthode analytique 34

II.1. Identification par RMN ^{13}C sans séparation préalable 34

Intérêt de la RMN ^{13}C 34

Observation des signaux 34
Individualisation des signaux 35
Attribution des signaux 35
II.2. Méthode développée au laboratoire 36
II.3. Application de la méthode aux extraits d'algues 37
Paramètres d'identification 37
Schéma analytique 38
III Caractérisation chimique de l'extrait et fractions obtenus à partir de la population 1 40
III.1. Diterpènes identifiés par comparaison avec les données de la littérature 41
III.2. Elucidation structurale des diterpènes absents des banques de données 47
Composé A 47
Composé B 49
III.3. Sesquiterpènes identifiés par comparaison avec les données de la littérature 51
III.4. Elucidation structurale des sesquiterpènes absents des banques de données 54
Composé C (Laurintérol) 54
III.5. Acétogénines identifiées par comparaison avec les données de la littérature 55
III.6. Elucidation structurale des acétogénines absentes des banques de données 59
Composé D 59
Composé E 62
IV Caractérisation chimique de l'extrait et fractions obtenus à partir de la population 2 65
IV.1. Snydéranes 66
Subject and Source 68
Previous work 68
Present study 68
Chemotaxonomic significance 71
IV.2. Autres sesquiterpènes 72
IV.3. Acétogénines identifiées par comparaison avec les données de la littérature 73
IV.4. Elucidation structurale des acétogénines absentes des banques de données 77
Composé F 77
V Caractérisation chimique de l'extrait et fractions obtenus à partir de la population 3 79
Introduction 81
Results 81
Discussion 86
Material and Methods 88
VI Caractérisation chimique de l'extrait et fractions obtenus à partir de la population 4 90
Introduction 92

Results 92
Discussion 96
Material and Methods 99
VII Bilan 102
CHAPITRE III APPLICATIONS DE LA RMN EN MELANGE : APPROCHES METABOLOMIQUES 105
I Métabolomique 106
I.1. Définition 106
I.2. Démarches analytiques 106
I.3. Outils de la métabolomique 106
Outils analytiques 106
Outils statistiques 107
I.4. Métabolomique par RMN ^{1}H 107
Pré-traitement des spectres 107
Traitement des spectres 108
II Métabolomique et relations taxonomiques 110
II.1. La chimiotaxonomie, un outil de classification des végétaux 110
II.2. Etudes chimiotaxonomiques du complexe Laurencia 110
II.3. Développement d'une méthode de discrimination de deux populations 112
Introduction 114
Results and Discussion 114
Conclusions 118
Experimental Section 119
III Perspectives : discrimination d'espèces au sein du même genre 121
CONCLUSION 122
PARTIE EXPERIMENTALE 125
Matériel végétal 126
Identification 126
Extraction 126
Chromatographie sur colonne de silice 126
Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) 126
BIBLIOGRAPHIE 127
ANNEXES 139
Annexe A : Spectres de RMN 1D et 2D du composé A 140
Annexe B : Spectres de RMN 1D et 2D du composé B 144
Annexe C : Spectres de RMN 1D et 2D du composé C 148
Annexe D : Spectres de RMN 1D et 2D du composé D 152

Annexe E : Spectres de RMN 1D et 2D du composé E 156

Annexe F: Annexes de l'article 1 « Snyderol derivatives from *Laurencia obtusa* collected in Corsica » 159

Annexe G : Spectres de RMN 1D et 2D du composé F 165

Annexe H : Annexes de l'article 2 «Chemical Composition of *Laurencia obtusa* Extract and Isolation of a New C_{15}-Acetogenin» 169

Annexe I : Annexes de l'article 3 « New Metabolites Isolated from a *Laurencia obtusa* Population Collected in Corsica » 173

Annexe J : Annexes de l'article 4 « Discrimination and Characterization of Two Mediterranean Species from the *Laurencia* Complex (Rhodomelacea) Using an NMR-Based Metabolomic Approach » 190

Annexe K : Fractionnement de l'extrait issu de la population 3 203

Annexe L : Fractionnement de l'extrait issu de la population 4 204

RESUMES 205

Résumé de l'article 1 « Snyderol derivatives from *Laurencia obtusa* collected in Corsica » 206

Résumé de l'article 2 « Chemical Composition of *Laurencia obtusa* Extract and Isolation of a New C_{15}-Acetogenin » 207

Résumé de l'article 3 « New Metabolites Isolated from a *Laurencia obtusa* Population Collected in Corsica» 208

Résumé de l'article 4 « Discrimination and Characterization of Two Mediterranean Species from the *Laurencia* Complex (Rhodomelacea) Using an NMR-Based Metabolomic Approach» 209

Résumé vulgarisé 210

Riassuntu vulgarizatu 211

Abstract 212

Résumé 213

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle de vie de *Polysiphonia* 5
Figure 2 : Tétraspores observés sur une population de *Laurencia obtusa* (x 10)..... 6
Figure 3 : Trichoblastes (A) et corps en cerise (B) observés sur une population de *L. obtusa* (x10 ; x20)7
Figure 4 : Répartition des métabolites secondaires du complexe *Laurencia* d'après Harizani *et. al* [17] . 8
Figure 5 : Principaux squelettes sesquiterpéniques du complexe *Laurencia* 9
Figure 6 : Structures des chamigranes **1** à **18** 10
Figure 7 : Structures des chamigranes **19** à **25**..... 11
Figure 8 : Structures des perforanes **26** à **37** 11
Figure 9 : Structures des brasilanes **38** à **42**..... 12
Figure 10 : Structures des brasilanes **43** à **48**..... 12
Figure 11 : Structures des snydéranes **49** à **58**..... 13
Figure 12 : Structures des lauranes **59** à **67** 14
Figure 13 : Structures des bisabolanes **68** à **72**..... 15
Figure 14 : Structures des cuparanes **73** à **76** 15
Figure 15 : Structures des eudesmanes **77** à **80**..... 16
Figure 16 : Structures des sesquiterpènes **81** à **83**..... 16
Figure 17 : Structures des sesquiterpènes **84** à **87**..... 17
Figure 18 : Structures des diterpènes **88** à **90** 17
Figure 19 : Structures des diterpènes **91** à **101** 18
Figure 20 : Structure du triterpène **102** 18
Figure 21 : Structures des acétogénines **103** à **109**..... 19
Figure 22 : Structures des acétogénines **110** à **118**..... 20
Figure 23 : Structures des acétogénines **119** à **125**..... 21
Figure 24 : Structures des acétogénines **126** à **129**..... 22
Figure 25 : Structures des acétogénines **130** à 1**41**..... 23
Figure 26 : Structures des acétogénines **142** à **154**..... 24
Figure 27 : Structures des composés **152** à **155**..... 25
Figure 28 : Workflow du barcode moléculaire d'après Fajarningsih [109] 32
Figure 29 : Arbre phylogénétique (analyse de distance) représentant les relations entre membres du complexe *Laurencia*. 33
Figure 30 : Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN ^{13}C. 36
Figure 31 : Schéma analytique..... 38
Figure 32 : Fractionnement de l'extrait issu de la population 1 41
Figure 33 : Voie de biosynthèse des prévézanes et néorogiolanes d'après Iliopoulou *et al* [68]..... 42
Figure 34 : Structure proposée pour le composé A..... 48
Figure 35 : Structure proposée pour le composé B..... 51
Figure 36 : Structure du laurintérol..... 55
Figure 37: Structure linéaire du composé D..... 60
Figure 38 : Structure plane proposée pour le composé D..... 61
Figure 39 : Structure présumée du composé D..... 62
Figure 40: Structure linéaire du composé E..... 63
Figure 41 : Structure proposée pour le composé E..... 63
Figure 42 : Fractionnement de l'extrait issu de la population 2 66
Figure 43 : Fragments linéaires du composé F..... 77
Figure 44 : Structure partielle proposée pour le composé F 77

Figure 45 : Répartition des métabolites secondaires identifiés dans les 4 extraits étudiés 102
Figure 46 : **(a)** Superposition de spectres ^{1}H ; **(b)** Superposition de spectres ^{1}H après binning Source : Manuel d'utilisation du logiciel Mestrenova 108

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Nombre d'espèces du complexe *Laurencia* 4
Tableau 2 : Cellules cancéreuses utilisées pour évaluer l'activité anti cancéreuse 27
Tableau 3 : Activités cytotoxiques des composés isolés de *L. obtusa* (IC_{50} en µM) 28
Tableau 4 : Structure et déplacements chimiques du néorogioldiol 43
Tableau 5 : Structure et déplacements chimiques des prévézols C et B 44
Tableau 6 : Structure et déplacements chimiques du prévézol E 45
Tableau 7 : Structure et déplacements chimiques de l'O^{11},15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol 45
Tableau 8 : Structure et déplacements chimiques de l'obtusadiol 46
Tableau 9 : Structure et déplacements chimiques du composé de type labdane 47
Tableau 10 : Données RMN ^{1}H et ^{13}C relatives au composé A 49
Tableau 11 : Données RMN ^{1}H et ^{13}C relatives au composé B 50
Tableau 12 : Structure et déplacements chimiques de l'α- et du β-snydérol 51
Tableau 13 : Structure et déplacements chimiques de l'obtusénol 52
Tableau 14 : Structure et déplacements chimiques de l'α-bromocuparène et du laurène 52
Tableau 15 : Structure et déplacements chimiques de l'*iso*-laurénisol et du composé de type laurane . 53
Tableau 16 : Structure et déplacements chimiques du 1β-bromosélin-3,11-diène 54
Tableau 17 : Données RMN ^{1}H et ^{13}C relatives au composé C 55
Tableau 18 : Structure et déplacements chimiques du rogioloxépane A 56
Tableau 19 : Structure et déplacements chimiques de la rogiolényne D 56
Tableau 20 : Structure et déplacements chimiques de la srilankényne 57
Tableau 21 : Structure et déplacements chimiques de la *E*-dihydrorhodophytine 58
Tableau 22 : Structure et déplacements chimiques du microcladallène A 58
Tableau 23 : Structures et déplacements chimiques des laurénynes 59
Tableau 24: Données RMN ^{1}H et ^{13}C relatives au composé D 60
Tableau 25 : Comparaison des déplacements chimiques du néolaurallène, itomanallène, isolaurallène et du composé D 61
Tableau 26 : Comparaison des déplacements chimiques du Composé D et du composé de synthèse SI-A-24 62
Tableau 27 : Données RMN ^{1}H et ^{13}C relatives au composé E 64
Tableau 28 : Structure et déplacements chimique du 1-déacétoxy-8-déoxyalgoane 72
Tableau 29 : Structure et déplacements chimiques du 9,15-dibromo-1,3(15)-chamigradiène-11-ol 73
Tableau 30 : Structure et déplacements chimiques de l'obtusine 74
Tableau 31 : Structure et déplacements chimiques de l'acétogénine de type THF/THF 74
Tableau 32 : Structure et déplacements chimique de l'acétogényne de type THF 75
Tableau 33 : Structure et déplacements chimiques de l'acétogénine de type THP/THF 75
Tableau 34 : Structure et déplacements chimiques de l'acétogénine de type THF/oxocane 76
Tableau 35 : Structure et déplacements chimiques du *trans*-pinnatifidényne 76
Tableau 36 : Données RMN ^{1}H et ^{13}C relatives au composé F 78
Tableau 37 : Composés identifiés dans les 4 populations de *L. obtusa* 103

RMN : Résonance magnétique nucléaire
ACG : Acétogénine
SM : Spectrométrie de masse
THF : Tétrahydrofurane
THP : Tétrahydropyrane
LD_{50} : Dose létale médiane
mM : Milimolaire
µM : Micromolaire
CMI : Concentration minimale inhibitrice
AcOEt : Acétate d'éthyle
CO1 : Cytochrome oxydase
ppm : Partie par million
δ : Déplacement chimique
Δδ : Variation de déplacement chimique
FID : Free induction decay (décroissance de l'induction libre)
HE : Huile essentielle
$CDCl_3$: Chloroforme deutéré
CPG : Chromatographie en phase gazeuse
CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CPG(Ir) : Chromatographie en phase gazeuse – Indices de rétention
CC : Colonne de chromatograhie
SiO_2 : gel de silice
DEPT : Distortionless enhancement by polarization transfer
HSQC : Heteronuclear single quantum correlation
HMBC : Heteronuclear multiple bond correlation
COSY : Correlation spectroscopy
NOESY : Nuclear overhauser effect spectroscopy
DCM : Dichlorométhane
ACN : Acétonitrile
MeOH : Méthanol
Hex : Hexane
Pent : Pentane
$CHCl_3$: Chloroforme
ESI : Electrospray ionization
APCI : Atmospheric pression chemical ionization
QTRAP : Détecteur de type quadripôle – trappe ionique
QTOF : Détecteur de type « time of flight »
TMS : Tétraméthylsilane
HRMS : High resolution mass spectrometry
CLHP : Chromatographie liquide haute performance
PLS-DA : Analyse discriminante par régression des moindres carrées partiels
CAH : Classification ascendante hiérarchique
ACP : Analyse en composante principale
CCM : Chromatographie sur couche mince

INTRODUCTION

Ce travail de thèse, financé par la Collectivité Territoriale de Corse, a été réalisé dans le cadre des recherches auxquellles se consacre, depuis une vingtaine d'années, l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse. Il s'inscrit dans le projet « Ressources Naturelles » de l'UMR-CNRS 6134 « Sciences pour l'environnement ».

La Corse, de part son insularité et son contexte pédoclimatique particulier, connait un fort taux d'endémisme de ses espèces végétales. Le secteur des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) est un secteur en plein essor. En effet, les huiles essentielles, huiles végétales ou autres extraits obtenus à partir de plantes endémiques corses ont fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques et valorisations, en particulier dans les domaines de la parfumerie, de l'aromathérapie et des cosmétiques. En revanche, les ressources végétales d'origine marine présentes autour de l'île sont très mal connues et quasiment inexploitées. Pourtant, la mer Méditerrannée, qui représente seulement 0,8% de la surface des océans dans le monde, possède paradoxalement une très grande biodiversité (12%) marquée par un fort taux d'endémisme (27%).

L'étude des algues est beaucoup plus récente que celle des végétaux terrestres. Les algues occupent une grande partie des milieux aquatiques et possèdent des organismes très diversifiés. Cette diversité est également très marquée sur le plan de la systématique, témoignant d'une longue évolution génétique. Les algues se répartissent en plusieurs lignées évolutives totalement indépendantes les unes des autres. On distingue en effet 4 groupes : les algues bleues (cyanobactéries), les algues brunes, les algues vertes et les algues rouges.

Bien que leur exploitation à l'échelle mondiale reste bien inférieure à la production végétale terrestre (15 millions de tonnes *vs.* 4 milliards de tonnes), les algues commencent à trouver leur place tant dans la recherche que dans l'industrie. En effet, les valorisations peuvent être nombreuses dans plusieurs domaines tels que la pharmaceutique, les cosmétiques, la dépollution de l'eau ou encore comme source de bioénergie.

Parmis les algues rouges, ce sont les espèces appartenant au « complexe *Laurencia* » qui font l'objet du plus grand nombre de recherches chimiques et biochimiques. Ce complexe est aujourd'hui composé de 8 genres qui sont issus de la scission du genre *Laurencia* initialement décrit par Lamouroux en 1813. La difficulté à observer des caractères morphologiques discriminants ainsi que l'augmentation constante du nombre d'espèces ont rendu les relations phylogénétiques de ces espèces très complexes, et ce malgré de nouveaux outils d'identification moléculaire.

La diversité morphologique et génétique de ces espèces se reflète également dans leur composition chimique. En effet, les *Laurencia* sont capables de synthétiser de nombreuses familles de métabolites secondaires, notamment des sesquiterpènes, diterpènes et triterpènes ainsi que des C_{15} non terpéniques (acétogénines). Par ailleurs, les structures originales issues de ces algues possèdent la plupart du temps des activités biologiques prometteuses (antibactérienne, antifongique ou encore anticancéreuse).

Dans ce contexte, ce travail présentait comme objectif principal de contribuer à la valorisation des ressources marines en Corse à travers la caractérisation chimique d'extraits issus d'espèces du genre

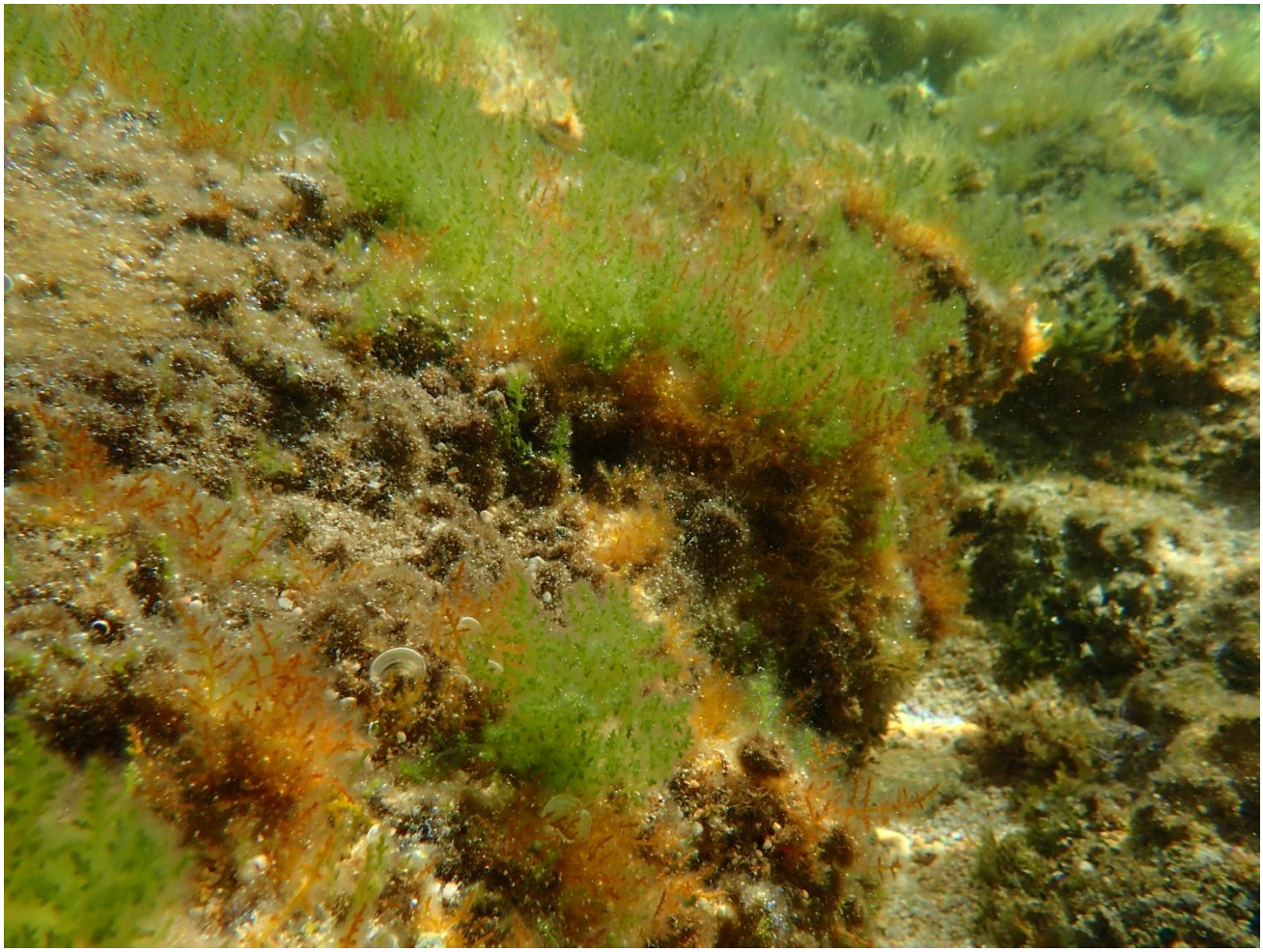
Laurencia. En raison de la complexité des mélanges étudiés, la stratégie analytique a été adaptée, afin d'identifier un maximum de constituants.

Ainsi, dans le premier chapitre, nous ferons une revue des données bibliographiques sur le complexe *Laurencia* avec un focus sur l'espèce *L. obtusa* en développant trois aspects : la taxonomie, les études chimiques et les activités biologiques.

Le second chapitre sera consacré à la caractérisation chimique d'extraits obtenus à partir de quatre populations de *L. obtusa* récoltées en Corse. Nous présenterons tout d'abord la méthode d'analyse par RMN ^{13}C développée au laboratoire, qui repose sur l'identification des composés en mélange par comparaison avec des données spectrales compilées dans des bibliothèques, ainsi que la stratégie analytique utilisée dans notre étude. Nous décrirons ensuite, pour chacune des populations, les molécules identifiées par RMN ^{13}C en mélange, puis nous présenterons l'identification de composés absents de nos bibliothèques de spectres ou non décrits dans la littérature au moyen d'analyses structurales par RMN bidimensionnelle.

Enfin, la diversité des molécules identifiées dans chacune des 4 populations nous a conduits à nous intéresser aux études chimiotaxononomiques des *Laurencia* dans le dernier chapitre. Après une description de la métabolomique, nous exposerons une méthode de discrimination de deux espèces du complexe par RMN ^{1}H.

CHAPITRE I
LE COMPLEXE *LAURENCIA*



I PRESENTATION DU COMPLEXE *LAURENCIA*

I.1. *Position taxonomique*

Le complexe *Laurencia* qualifie un groupe de taxa issu de la scission du genre *Laurencia* en de nombreux genres. Le genre *Laurencia* décrit par Lamouroux en 1813 contenait initialement 8 espèces. La diversité morphologique très importante au sein de ce complexe, mise en évidence dès sa première description, a mené à plusieurs révisions taxonomiques. De nouveaux critères de distinction morphologique ainsi que des outils d'identification moléculaire (ADN) ont permis de reclasser à plusieurs reprises les espèces du complexe *Laurencia*. Il comprend aujourd'hui 8 genres : *Chondrophycus* (Tokida & Y. Saito) Garbary & J.T. Harper [1], *Coronaphycus* Metti [2], *Laurencia* [3], *Laurenciella* V. Cassano, Gil-Rodriguez, Senties, Diaz-Larrea, M.C. Oliveira & M.T. Fujii [4], *Osmundea* Stackhouse [5], *Palisada* K .W. Nam [6], *Yuzurua* (K.W.Nam) Martin-Lescanne [7] et enfin *Ohelopapa* F. Rousseau, Martin-Lescanne, Payri & L.Le Gall [8].

Phylum Rhodophyta

Classe Florideophyceae

Ordre Ceremiales

Famille Rhodomelaceae

Malgré ces nombreux remaniements taxonomiques, la résolution des relations phylogénétiques au sein des *Laurencia* reste complexe. En effet près des ¾ des espèces décrites appartiennent au genre *Laurencia stricto sensu* (285 espèces) et parmi elles seulement 137 sont acceptées taxonomiquement [9]. Les autres sont considérées comme synonymes, c'est-à-dire que deux noms au moins ont été proposés pour une espèce identique. Dans ce cas, le code de nomenclature prévoit par « principe d'antériorité » que le premier nom proposé s'applique [10].

Tableau 1 : Nombre d'espèces du complexe *Laurencia*

Genre	Nombre d'espèces acceptées taxonomiquement / Nombre d'espèces présentes dans la base de données Algaebase [9] (consultée le 07/09/2018)
Chondrophycus	16/41
Coronaphycus	2/2
Laurencia	137/285
Laurenciella	2/2
Osmundea	24/27
Palisada	25/29
Yuzurua	2/2
Ohelopapa	1/1
Total	215/389

D'après Rousseau et al. 2017 [8] *(Màj Algae base 07/09/2018). Ne comprend pas les taxa infraspécifiques.*

Les critères d'identification de ces espèces, basés sur des caractères morpho anatomiques difficiles à observer (nombre de cellules apicales, présence de corps en cerise ...) ainsi que leur plasticité phénotypique ont rendu l'identification et la discrimination de ces espèces très difficiles. Aujourd'hui, l'utilisation de données moléculaires s'avère donc nécessaire à l'identification des espèces.

I.2. *Reproduction et cycle de développement*

Le cycle de reproduction des espèces du complexe *Laurencia* est similaire à celui du genre *Polysiphonia* qui fait partie du même ordre des Floridées, les Céramiales. Ces espèces présentent un cycle de reproduction trigénique.

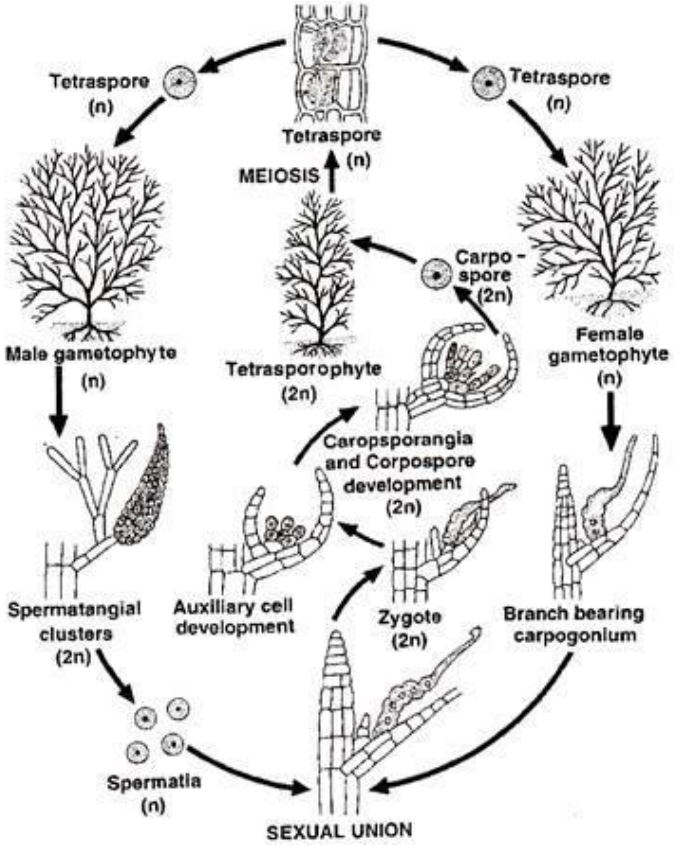


Figure 1 : Cycle de vie de *Polysiphonia*

Trois générations se succèdent : gamétophyte, carposporophyte et tétrasporophyte. Les gamétophytes mâles et femelles (1ère génération) sont haploïdes (présentent N chromosomes) et produisent des gamètes qui vont fusionner lors de la fécondation pour donner un zygote diploïde (2N chromosomes). Celui-ci va se développer directement sur le gamétophyte femelle et former une nouvelle génération appelée carposporophyte (2N chromosomes). A l'intérieur des carposporophytes matures, qui forment des excroissances, vont se produire des spores (2N chromosomes) qui vont germer en un tétrasporophyte (3ème génération). A maturité, sur le tétrasporophyte va se produire la méïose (réduction chromatique *i.e.* passage de 2N à N chromosomes) conduisant à la formation des tétraspores (N chromosomes). Les tétraspores qui germeront, engendreront des gamétophytes.

Les espèces du complexe *Laurencia* sont en général considérées comme annuelles. Des facteurs environnementaux tels que la température de l'eau ou la luminosité, ainsi que la saisonnalité peuvent influencer leur croissance et leur cycle de vie, surtout en milieu tropical [11].

Figure 2 : Tétraspores observés sur une population de *Laurencia obtusa* (x 10)

I.3. *Distribution géographique*

Les algues du complexe *Laurencia* sont communément retrouvées dans les éco systèmes marins côtiers. Elles peuvent se développer dans des habitats très divers, la plupart du temps entre 0 et 10 m de profondeur, mais elles peuvent aussi se retrouver dans des étages inférieurs (jusqu'à plus de 60 m de profondeur). Ce sont des algues ubiquitaires très largement réparties et en particulier dans les zones intertropicales.

Récemment, une étude a été menée sur la diversification spatio-temporelle du complexe *Laurencia* sur plus de 800 échantillons à partir desquels une phylogénie a été construite sur la base de données moléculaires. Ceci a permis de mettre en évidence les zones géographiques de prédominance de ces algues selon leur genre. Les espèces des genres *Laurencia*, *Palisada*, et *Chondrophycus* se sont avérées être des espèces ubiquitaires puisque très largement répandues dans les eaux des deux hémisphères. En revanche, on peut noter que le genre *Coronaphycus*, initialement décrit en Australie, a aussi été identifié en Maraconésie. *Ohelopapa* se limite au Pacifique sud, *Yuzurua* aux Antilles, *Laurenciella* aux Antilles, Maraconésie et Méditéranée et *Osmundea* à l'hémisphère nord [12].

I.4. *Caractères morphologiques*

Trois caractères remarquables ont été définis pour caractériser l'appartenance au complexe *Laurencia* (Kylin 1956) :

- une cellule apicale au creux des apex des rameaux

- un axe central visible uniquement à proximité de l'apex
- un cortex étendu

D'autres caractères sont spécifiques au complexe et peuvent permettre de différencier certains genres entre eux :

- le nombre de cellules péricentrales (2 ou 4)
- les corps en cerises (lieu de synthèse et/ou stockage des métabolites secondaires)
- les trichoblastes (moins abondants que chez les autres Rhodomelaceae)

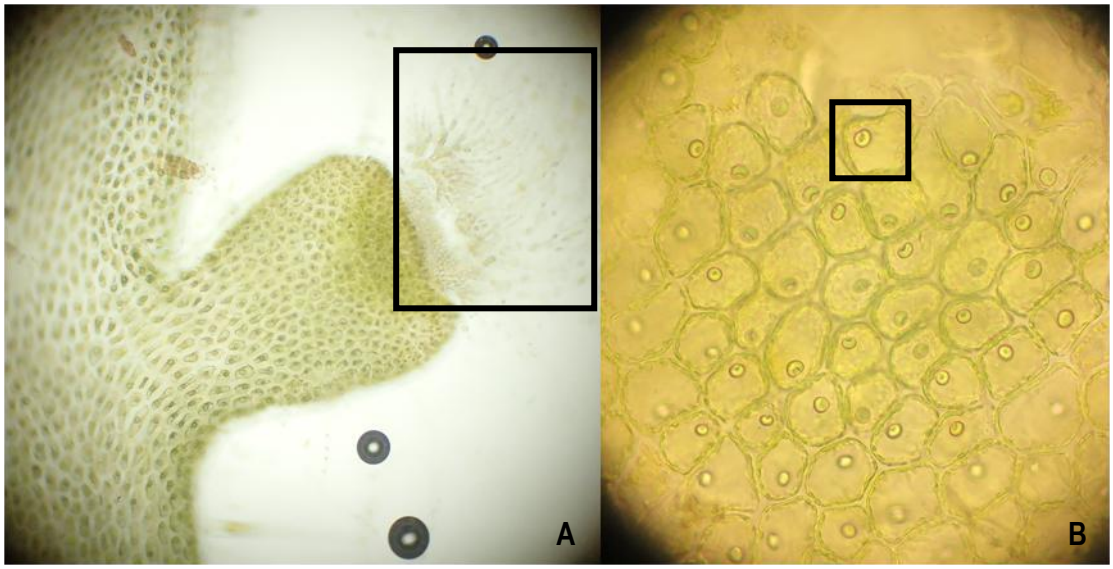


Figure 3 : Trichoblastes (A) et corps en cerise (B) observés sur une population de *L. obtusa* (x10 ; x20)

Les espèces du complexe *Laurencia* peuvent avoir des formes morphologiques très diverses et possèdent par ailleurs une forte plasticité intra spécifique. Il est alors difficile de fournir une description morphologique type, mais d'une manière générale les algues du complexe *Laurencia* ont des tailles variant de quelques millimètres à une trentaine de centimètres et ont une consistance variable. Ce sont des algues qui peuvent se fixer au substrat soit par un disque soit par des crampons. L'axe principal peut être pourvu de plusieurs niveaux de ramifications dont la disposition varie également énormément. Enfin leur couleur est également un caractère morphologique très variable puisque elle peut passer du brun, au rouge, orangé, jaunâtre voire vert [11].

D'après un article récent sur la phylogénie des *Laurencia*, le genre *Laurencia stricto sensu* est désormais restreint aux espèces présentant 4 cellules péricentrales, un développement des tétraspores à partir des cellules péricentrales, des corps en cerise dans les cellules épidermales ainsi que des « pit connections » entre ces cellules. [8]

Les substances naturelles d'origine marine sont caractérisées par la présence d'éléments chimiques et de structures rares par rapport à celles d'origine terrestre, et en particulier par la présence de nombreux éléments halogénés. Les métabolites secondaires des algues appartiennent à des familles chimiques très diverses et sont souvent issues de voies de biosynthèse inconnues en milieu terrestre [13].

L'intérêt pour les ressources marines a connu un essor considérable avec de multiples applications. On note notamment l'utilisation omniprésente d'algues dans la cuisine traditionnelle asiatique ainsi qu'une utilisation croissante dans l'agriculture, l'industrie pharmaceutique, ou encore la cosmétologie [14].

Les premières études chimiques sur le genre *Laurencia* ont débuté avec la caractérisation de l'huile essentielle de *Laurencia glandulifera* [15]. Ensuite, de nombreux travaux ont été réalisés sur des extraits de plusieurs espèces du genre *Laurencia* faisant de ce genre l'un des plus étudiés parmi les algues rouges [16].

L'étude de la composition chimique des espèces du genre *Laurencia* et de mollusques se nourrissant de ces algues a conduit à l'identification de plusieurs centaines de métabolites secondaires avec une prédominance des sesquiterpènes. D'autres familles de composés sont retrouvées : des diterpènes, des triterpènes et des acetogénines (C_{15} ACG) non terpéniques ainsi que quelques indoles, phénols, stérols, et d'autres métabolites non classés. Selon une revue parue en 2016, ces métabolites secondaires se répartissent de la manière suivante [17].

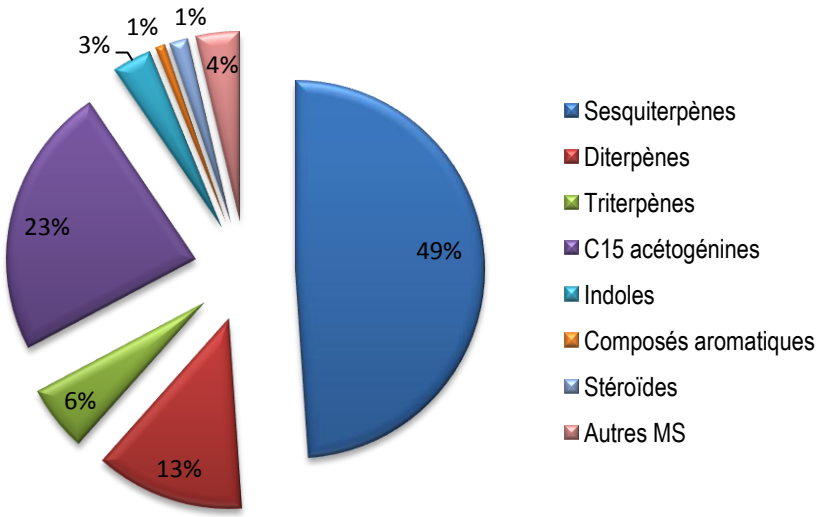


Figure 4 : Répartition des métabolites secondaires du complexe *Laurencia* d'après Harizani *et. al* [17]

De par l'intérêt constant pour les métabolites secondaires issus des espèces du genre *Laurencia*, plusieurs revues récentes ont permis de synthétiser l'ensemble des molécules isolées à partir de ces espèces. Nous exposerons ici uniquement les métabolites secondaires isolés de l'espèce *Laurencia obtusa*, dont la composition chimique fera l'objet du chapitre suivant.

II.1. *Sesquiterpènes*

Les sesquiterpènes représentent le plus grand groupe de métabolites secondaires isolés à partir du genre *Laurencia* avec un peu plus de 500 molécules identifiées dans des espèces du genre ou dans des mollusques s'en nourrissant. Ces molécules sont basées sur une cinquantaine de squelettes pouvant être acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques ou tétracycliques. Pour l'espèce *L. obtusa*, moins d'une centaine (87 exactement) de sesquiterpènes est décrite. Ils se répartissent dans toutes les classes de sesquiterpènes typiquement décrits chez les *Laurencia*, exceptée la classe des aristolanes qui ne représente qu'un petit groupe de sesquiterpènes avec 14 composés dans le complexe.

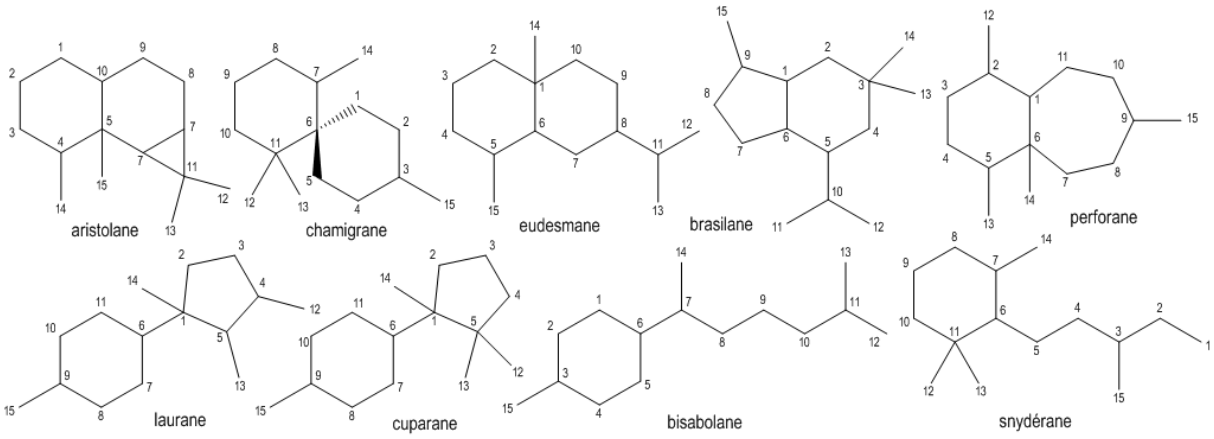


Figure 5 : Principaux squelettes sesquiterpéniques du complexe *Laurencia*

Afin d'assurer l'homogénéité de la synthèse bibliographique suivante, le nom des sesquiterpènes décrits est basé sur la numérotation ci-dessous, et peut donc être différent de celui décrit dans la référence correspondante.

Chamigranes

Les chamigranes représentent le plus grand groupe de sesquiterpènes isolés des *Laurencia* en général et c'est aussi le cas pour l'espèce *L. obtusa* avec 25 chamigranes décrits jusqu'à présent. Les chamigranes sont caractérisés par un squelette spiro[5.5]décanique et peuvent être substitués de manière variée. La quasi-totalité de ces composés comporte au moins un halogène (brome ou chlore). On note la présence des deux isomères : α-chamigrane (double liaison intracyclique méthylée en position 7) et β-chamigrane (double liaison exocyclique sur le carbone 7) ainsi que quelques époxydes.

La plupart de ces métabolites n'ont été isolés qu'à partir de populations appartenant à l'espèce *L. obtusa*. Cependant, quelques composés ont aussi été décrits dans d'autres espèces, comme par exemple le 2,10-dibromo-3-chloro-α-chamigrène (**1**), décrit à partir d'un échantillon récolté en Arabie Saoudite [18] mais initialement isolé d'une espèce de *Laurencia* non identifiée en 1975 au Mexique [19].

Les laurencénones C (**2**), B (**3**), A (**4**) et D (**5**) ont été isolées dans les eaux jamaïquaines avec le deschloroélatol (**12**) isolé naturellement pour la première fois [20]. Ce dernier avait été synthétisé précédemment par réduction de l'obtusol [21]. La 4-chloro-3-hydroxy-α-chamigrèn-9-one (**6**) ainsi que son analogue époxydé (**24**) ont également été isolés dans les eaux jamaïquaines [22] avec l'élatol (**13**) qui avait été décrit, initialement, à partir de l'espèce *L. elata* [23].

L'obtusol (**7**), l'isoobtusol (**10**), le débromoélatol (**20**) ainsi que les composés **18** et **19** ont été isolés à partir d'un extrait à l'éther éthylique d'une population de *L. obtusa* [21]. Une biogénèse de ces composés a été proposée à partir d'un ion bisabolonium.

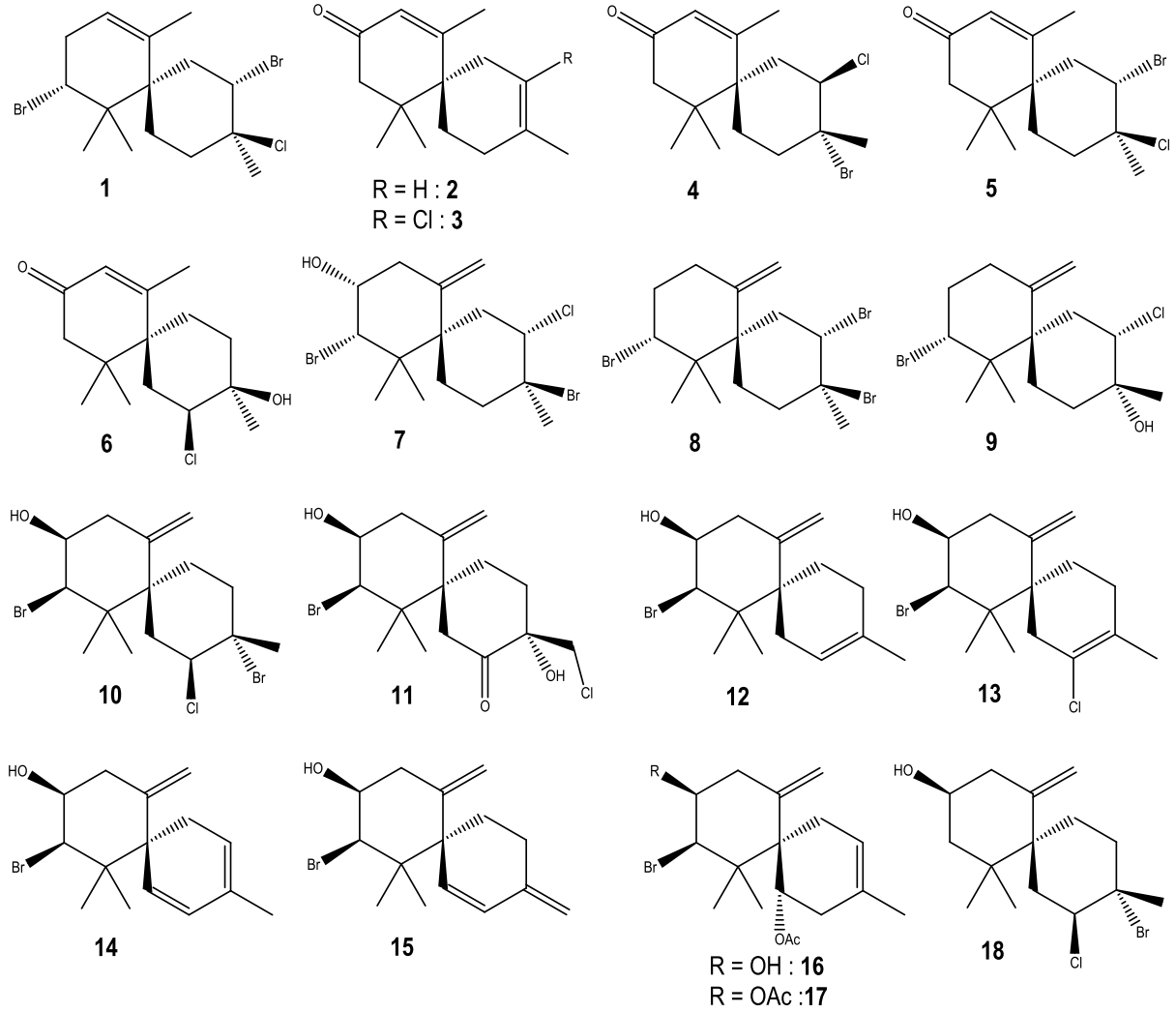


Figure 6 : Structures des chamigranes **1** à **18**

L'oxachamigrène (**22**) et le 5-acétoxy-oxachamigrène (**23**) sont les deux uniques exemples de chamigrane présentant une structure oxacylique. Ces deux composés ont été décrits dans une espèce récoltée à Cuba [24] avec le nidificène (**8**) précédemment isolé d'une population de *L. nidifica* [25]. L'hurgadol (**9**) a été isolé a partir d'une population récoltée dans le golfe de Suez [26]. Le composé **11** est l'unique exemple d'un chamigrane caractérisé par une cétone en position 4 isolé à partir d'une population de *L. obtusa* [27]. L'obtusadiène (**14**) et l'isoobtusadiène (**15**) ont été isolés à partir d'une population récoltée aux Caraïbes [28]. Ce sont les deux seuls chamigranes présentant deux insaturations au sein du cycle B. Trois composés possédant des structures originales ont été identifiés dans un échantillon récolté dans les îles Canaries [29]. Les composés **16** (5-acétoxy-10-bromo-9-hydroxy-β-chamigrène) et **17** (10-bromo-5,9-diacétoxy-β-chamigrène) sont caractérisés par la présence d'un acétate en position 5, alors que le composé **21** (7,14-époxy-obtusol) est l'unique chamigrane époxydé entre les carbones 7 et 14. Enfin, le composé **25** (chamigrènelactone), isolé dans les Caraïbes est l'unique exemple d'un chamigrane possédant une fonction lactone [30].

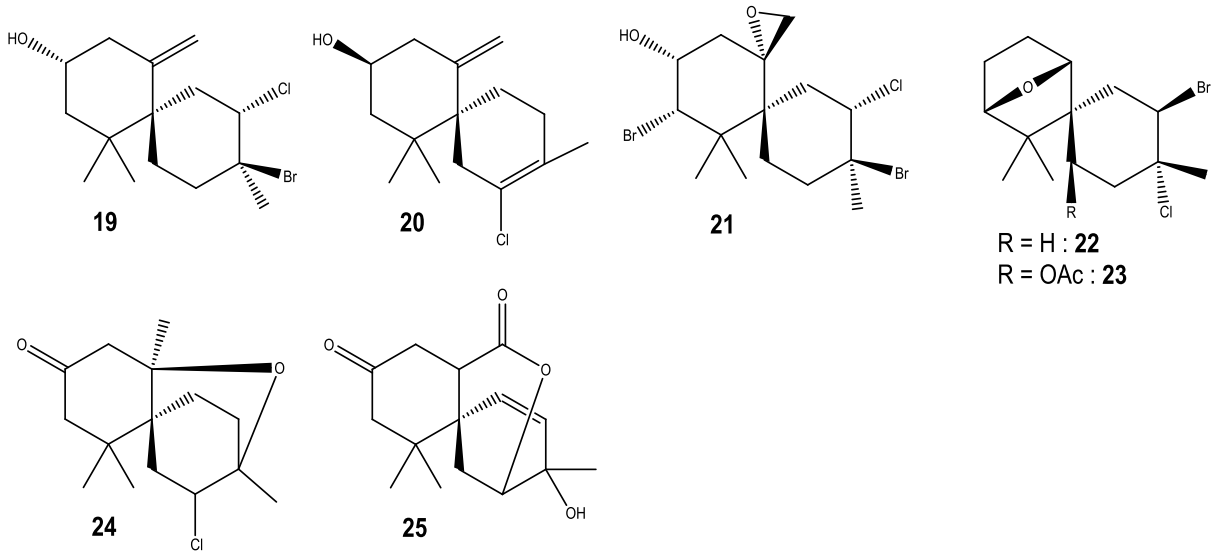


Figure 7 : Structures des chamigranes **19** à **25**

Perforanes

Le groupe des perforanes et de leurs dérivés est le second groupe le plus représenté dans l'espèce *L. obtusa* avec 12 molécules. Paradoxalement c'est l'un des groupes les moins représentés au sein du complexe *Laurencia* avec seulement 22 composés reportés.

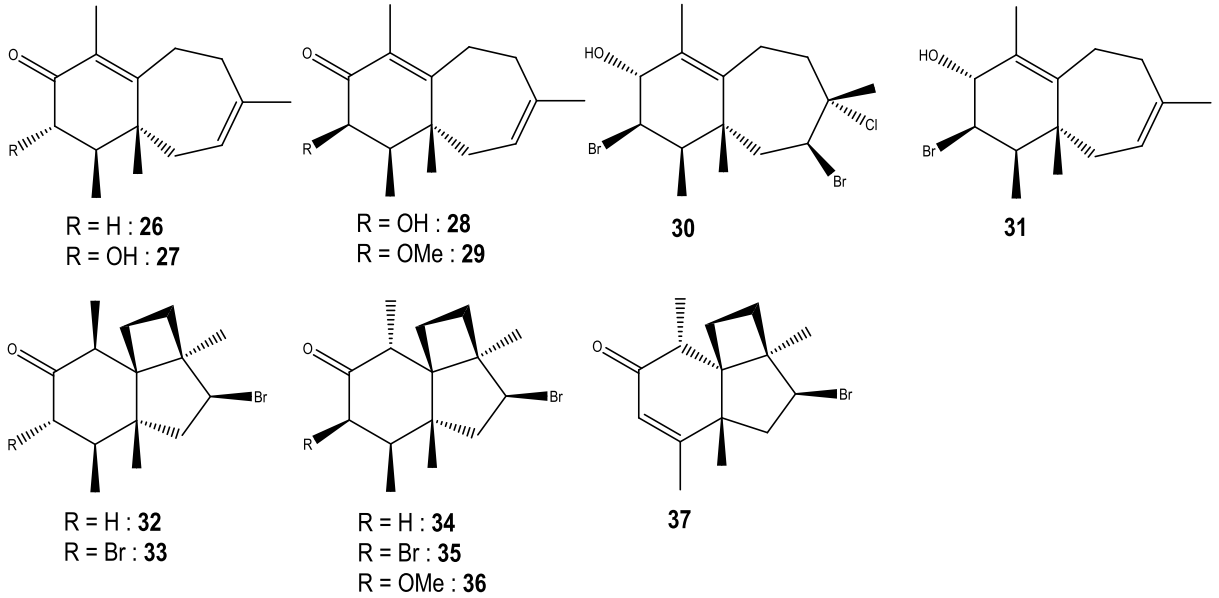


Figure 8 : Structures des perforanes **26** à **37**

La structure de quatre nouveaux perforanes a été élucidée à partir d'un extrait de *L. obtusa* récoltée en Grèce : la perforénone D (**29**) et les composés **34**, **35** et **36** [31]. Lors de la même étude, la stéréochimie de la perforatone (**33**), précédemment extraite de *L. perforata* [32], ainsi que la structure de la débromoperforatone (**32**), précédemment synthétisée à partir de la perforatone [33], ont été révisées. La perforénone (**26**) et le perforénol (**30**) ont également été identifiés dans cet extrait mais avaient déjà été précédemment décrits [25],[26].

Le perforénol B (**31**) et le composé **37** ont été identifiés dans une population de *L. obtusa* récoltée en Grèce [35] avec la perforénone A (**27**) et la 4-*épi*-perforénone A (**28**) qui avaient été précédemment isolées à partir de *L. perforata* [21],[25].

Brasilanes

Sur les 17 brasilanes décrits jusqu'à présent dans le complexe *Laurencia*, 11 ont été identifiés dans des populations de *L. obtusa*. Le brasilénol (**38**) et son épimère (**39**) ont été isolés pour la première fois à partir du mollusque *Aplysia brasiliana* [37] et décrits plusieurs fois dans des populations de *L. obtusa* [38],[39].

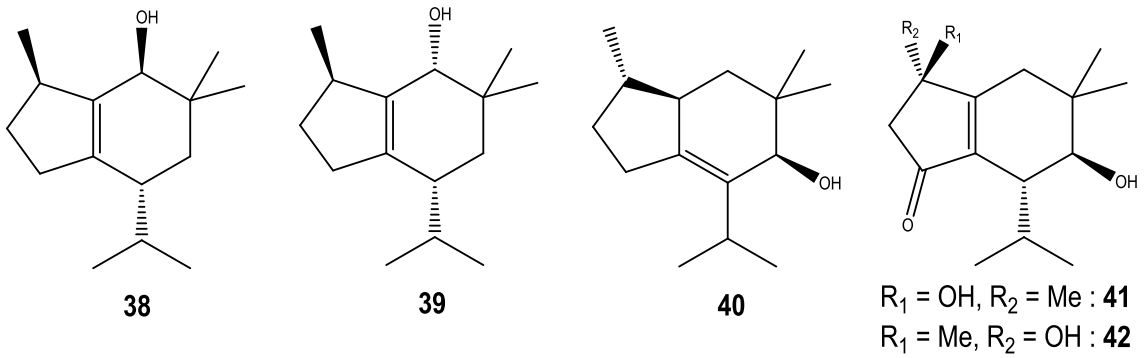


Figure 9 : Structures des brasilanes **38** à **42**

Une équipe explorant la composition chimique de populations récoltées en Sicile a mis en évidence la présence de plusieurs brasilanes (composés **40**-**43**, **48**) [32],[33] dont certains possèdent des structures originales. Le composé **40** a la particularité d'avoir une double liaison C5-C6 à la place de la double liaison C1-C6 habituelle, tandis que le composé **48** se distingue par un époxyde entre les carbones C2 et C5. Le composé **44**, identifié dans une population récoltée en Turquie [42], est le seul brasilane possédant deux hydroxyles sur les carbones C1 et C6 à la place de la double liaison habituelle entre ces deux positions. Enfin, les composés **45**, **46** et **47**, isolés dans la même population récoltée en Grèce, ont la particularité de contenir un époxyde intégrant ces mêmes carbones C1 et C6 [38].

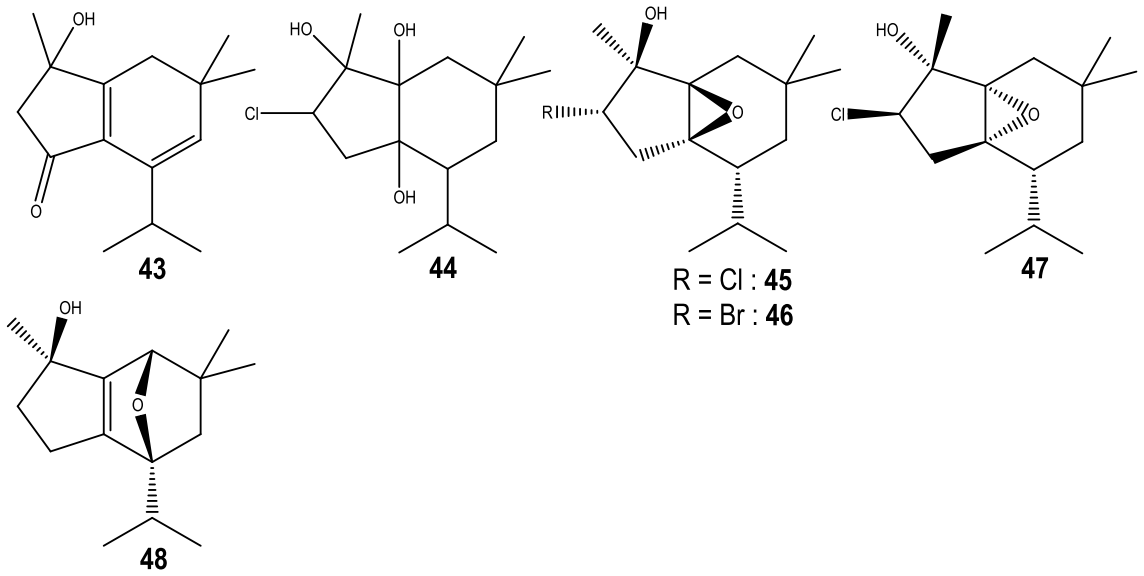


Figure 10 : Structures des brasilanes **43** à **48**

Snydéranes

Les snydéranes représentent le 3ème plus important groupe de sesquiterpènes au sein du complexe *Laurencia* avec 57 composés décrits jusqu'à présent. On en dénombre 10 identifiés dans des populations de *L. obtusa*. La majorité des snydéranes est caractérisée par un cyclohexane, la plupart du temps insaturé, avec une chaîne latérale sur le carbone C6.

L'α-snydérol (**49**) a été décrit initialement dans une population récoltée en Espagne [43] et son acétate (**50**) en Grèce [39]. Ces deux composés ont été identifiés par la suite dans une population récoltée en Turquie [44] avec 4 autres composés : deux dérivés du β-snydérol, le (8S*)-8-bromo-β-snydérol (**53**) et le (8R*)-8-bromo-10-*épi*-β-snydérol (**54**), ainsi que la 5-bromo-3-(3'-hydroxy-3'-methylpent-1'4'-diényle)-2,4,4-trimethylcyclohexanone (**55**) et le composé **56** qui présente la particularité d'être époxydé entre les carbones C6 et C7.

Le β-snydérol (**51**), initialement isolé à partir d'une population de *L. snyderae* [43], a été décrit dans une population récoltée dans le golfe du Suez [26] avec son acétate (**52**). Enfin, deux composés bicycliques, le 3β-bromo-8-épicaparrapi oxide (**57**) et le dactyloxène D (**58**) ont également été décrits dans des populations de *L. obtusa* [45],[46].

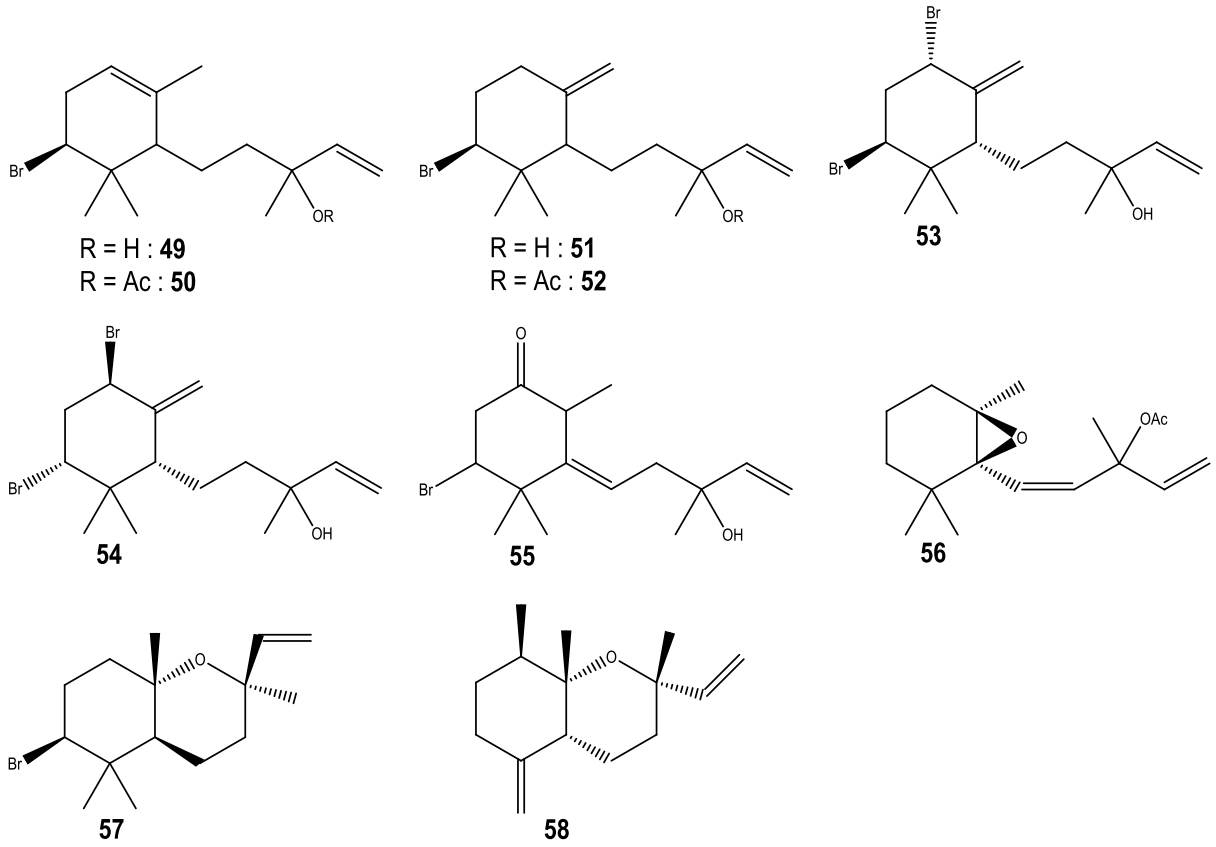


Figure 11 : Structures des snydéranes **49** à **58**

Lauranes

Le groupe des lauranes est le deuxième plus important au sein du complexe *Laurencia* avec une centaine de molécules décrites jusqu'à présent. Dans l'espèce *L. obtusa* seuls 9 composés sont décrits et aucun ne possède la structure d'un cyclolaurane.

Les composés **63** (15-hydroxy isolaurène), **64** (isolauraldéhyde) et **66** (8,11-dihydro-15-hydroxy isolaurène) ont été isolés à partir d'une même population de *L. obtusa* récoltée en Arabie Saoudite [18]. Les composés **61** (laur-5-ène-4,15-diol) et **67** (8,11-dihydro-1-méthoxy-laurokamurèn-15-ol) ont également été décrits à partir d'une espèce provenant d'Arabie Saoudite [47] et présentent des structures similaires à celles des composés décrits dans l'étude précédente. Les composés **63** et **64** partagent la même structure et diffèrent uniquement par la fonction intégrant le carbone C9 (alcool ou aldhéhyde).

L'étude de la composition chimique d'une population récoltée en Grèce [35] a permis de mettre en évidence la présence dans *L. obtusa* du composé **59** (7-hydroxylaurène), initialement décrit dans un extrait de *L. subopposita* [48], du composé **62** (isolaurénisol), précédemment isolé de *Laurencia* sp. cf. *gracilis* en Nouvelle Zélande [49], ainsi que d'un nouveau composé, le 4,7-dihydroxy-dihydrolaurène (**65**).

L'étude d'un extrait au dichlorométhane d'une population récoltée aux Caraïbes a montré que sa composition est très largement dominée par l'allolaurintérol (**60**) qui représente un peu plus de 30% de l'extrait [50].

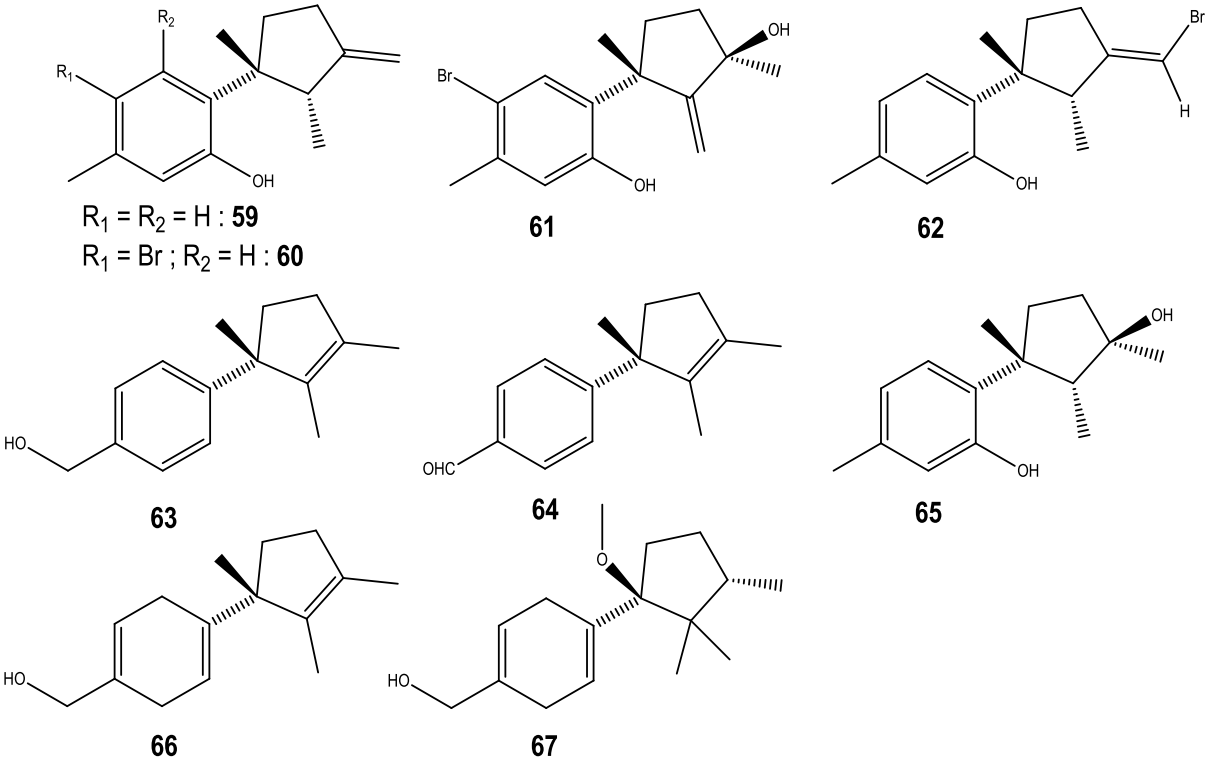


Figure 12 : Structures des lauranes **59** à **67**

Bisabolanes

La famille des bisabolanes est couramment décrite dans les végétaux terrestres et se retrouve également dans le complexe des *Laurencia*, avec 72 composés décrits jusqu'à présent. Ces composés peuvent être monocycliques ou peuvent également contenir des époxydes (caespitanes). Seulement cinq de ces sesquiterpènes ont été reportés dans des populations de *L. obtusa*.

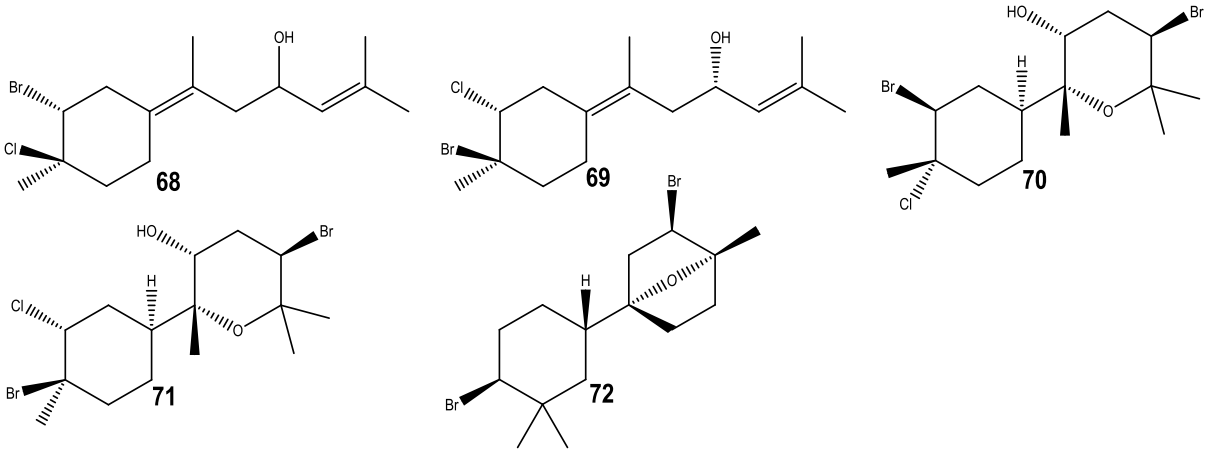


Figure 13 : Structures des bisabolanes **68** à **72**

Deux bisabolanes monocycliques ont été reportés dans une population récoltée aux Canaries [51], les puertitol A (**68**) et B (**69**). Deux caespitanes (7,11-époxydes), le caespitol (**70**) et l'isocaespitol (**71**) ont été identifiés dans la même région [52]. Ces deux composés avaient précédemment été décrits dans des populations de *L. caespitosa* [45],[46] et la structure du caespitol, initialement assignée à celle d'un chamigrane, a été révisée par la suite [55]. Le composé **72**, isolé par la même équipe [56], est l'un des rares bisabolanes bicycliques.

Cuparanes

Les cuparanes ne constituent qu'un petit groupe de métabolites au sein du complexe *Laurencia*. Deux cuparanes, les composés **73** (cuparène-4,15-diol), et **74** (4-hydroxy-cuparèn-15-al) ont été identifiés dans des populations de *L. obtusa* récoltées en Arabie Saoudite [47],[57]. Une de ces populations contenait également deux *nor*-cuparanes : les composés **75** (15-nor-cuparène-4,9-diol) et **76** (8-bromo-15-nor-cuparène-4,9-diol).

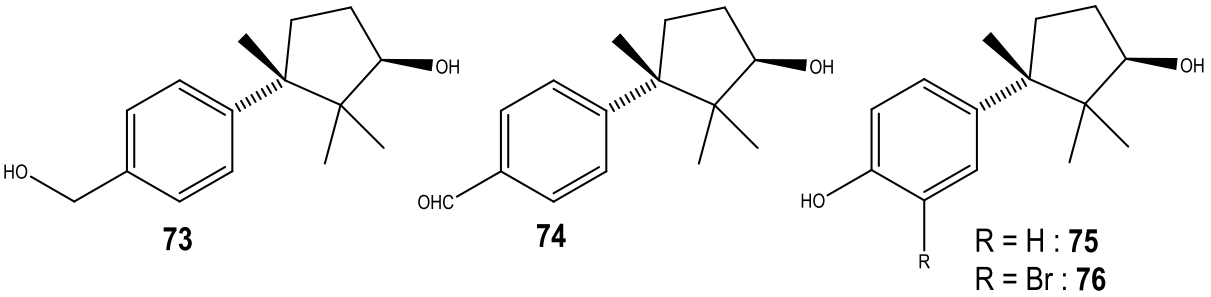


Figure 14 : Structures des cuparanes **73** à **76**

Eudesmanes

Comme pour les cuparanes, on ne dénombre qu'un petit nombre d'eudesmanes dans le complexe *Laurencia*. Deux eudesmanes, les composés **77** (eudesma-5(15),8-diène-6,11-diol) et **80** (eudesma-5(15),11-diène-6,8-diol) ont été identifiés dans des populations de *L. obtusa* récoltées en Arabie Saoudite [57], [58]. L'extrait contenant le composé **80** comportait aussi la teuhétenone (**79**), un tri *nor*-sesquiterpène précédemment isolé à partir de *Teucrium heterophyllum* (Lamiacées, Germandrées) et la chabrolidione B (**78**) décrite initialement dans le corail *Nephthea chabrolii*.

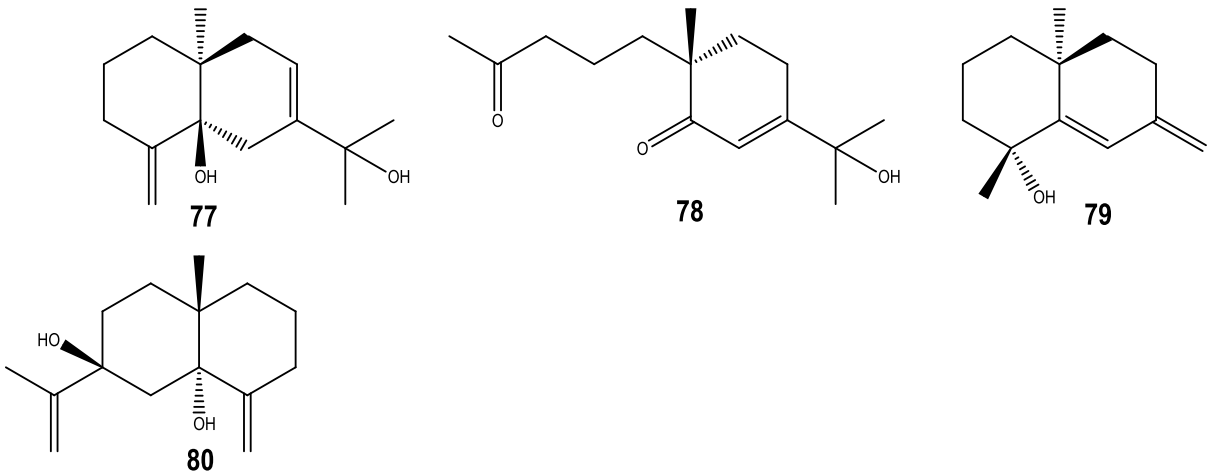


Figure 15 : Structures des eudesmanes **77** à **80**

Autres sesquiterpènes

En plus des métabolites précédemment cités, les espèces du complexe *Laurencia* peuvent contenir des sesquiterpènes présentant des squelettes rares. On dénombre une cinquantaine de divers sesquiterpènes dans le complexe, et 7 identifiés dans des populations de *L. obtusa*. L'obtusénol (**81**), qui contient un cycle tétrahydropyranique, a été extrait d'une population récoltée en Turquie [59]. Le guaiazulène (**82**), qui est l'unique sesquiterpène présentant un squelette guaiane dans le complexe *Laurencia,* a été identifié dans une population de Grèce avec l'α-snydérol acétate, le brasilénol, l'épibrasilénol et l'obtusadiol [39]. C'est un sesquiterpène fréquemment identifié dans des huiles essentielles notamment celles du guaiac et de la camomille. Le bromocyclocanol (**83**), isolé à partir de *L. obtusa* récoltée à Cuba [60], est le premier sesquiterpène présentant le nouveau squelette tricyclique nommé cyclocane.

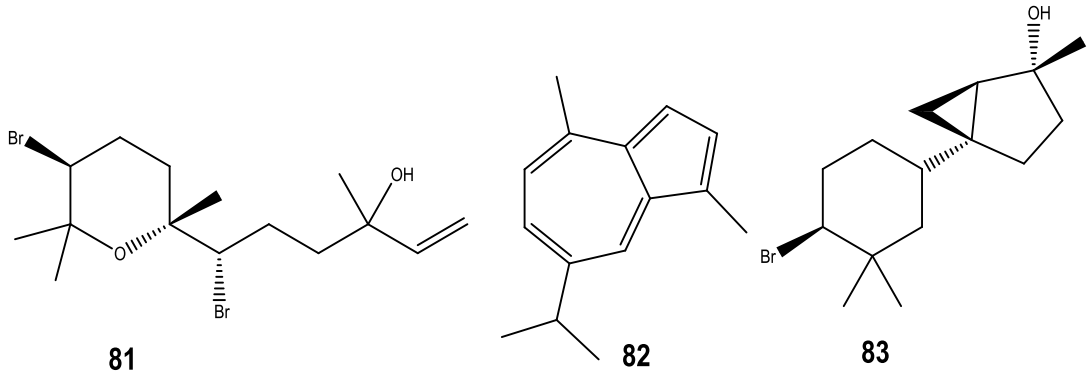


Figure 16 : Structures des sesquiterpènes **81** à **83**

Le laurobtusol (**84**) a été isolé et caractérisé à partir d'un extrait de *L. obtusa* et des hypothèses biosynthétiques suggèrent que c'est un dérivé de l'humulène [61]. Cependant, des études ultérieures de synthèse de stéréoisomères du laurobtusol ont montré que la structure a été mal construite, mais n'ont toutefois pas proposé une nouvelle structure [62]. Enfin les composés **85** (guimarédiol), **86** (rhodolauradiol) et **87** (rhodolauréol) ont été identifiés comme composés minoritaires d'un échantillon de *L. obtusa* à Lanzarote (Canaries) [29]. Ces trois composés avaient été précédemment identifiés dans la même population de *Laurencia* sp. [63]. Le guimarédiol (**85**) est l'un des premiers sesquiterpènes présentant un squelette omphalane isolé à partir de ressources naturelles marines. Les composés **86** et **87** possèdent le squelette rhodolaurane, identifié dans plusieurs espèces de *Laurencia*.

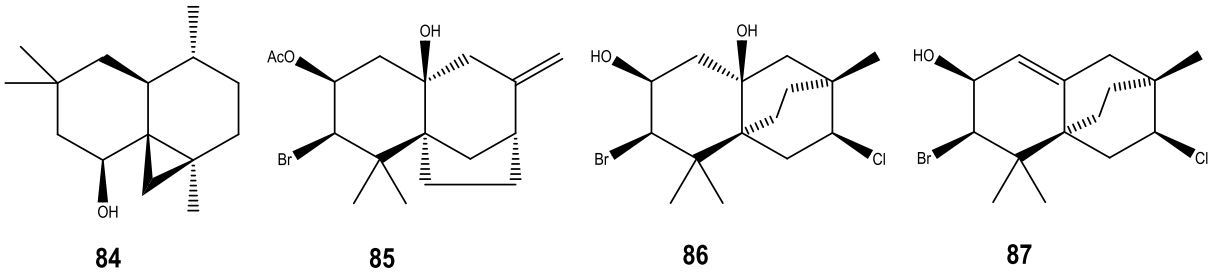


Figure 17 : Structures des sesquiterpènes **84** à **87**

II.2. *Diterpènes et triterpènes*

Malgré un nombre important de squelettes différents décrits, le groupe des diterpènes n'est que peu représenté dans le complexe *Laurencia*, avec environ 130 métabolites reportés. Ils se divisent en 6 principaux squelettes : parguérane, labdane, iriéane, dactylomélane, obtusane, prévézane et néorogiolane. On trouve également une vingtaine de diterpènes dont les squelettes sont rares ou non classés. En ce qui concerne l'espèce *L. obtusa*, on ne dénombre que 14 diterpènes jusqu'à présent. Parmi eux, un seul parguérane a été identifié dans une population de *L. obtusa* récoltée en Angleterre, le 15-bromo-2,16-diacétoxy-7-hydroxy-9(11)-parguérane (**88**) [64]. Le même squelette avait été auparavant décrit dans un extrait d'*Aplysia dactylomela* [65], un mollusque connu pour se nourrir d'algues rouges et notamment de *Laurencia*. Higgs *et al.* suggérèrent alors que les parguérols identifiés dans ces mollusques proviendraient d'algues du genre *Laurencia* qu'ils auraient consommées. Les diterpènes **89** et **90** sont les deux seuls représentant de la famille des labdanes identifiés dans une population de *L. obtusa* [66]. Ils possèdent la particularité de contenir des cycles éther à 7 et 8 membres respectivement.

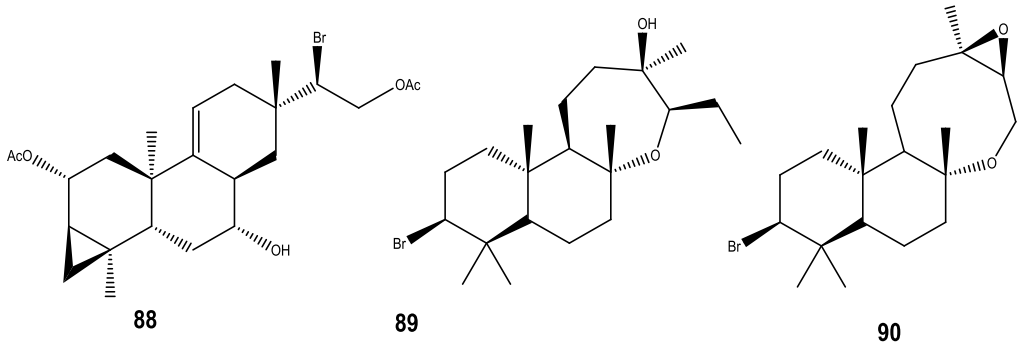
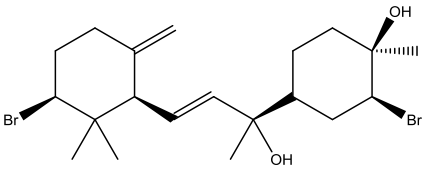


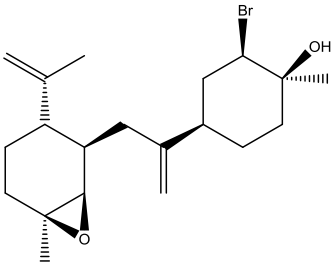
Figure 18 : Structures des diterpènes **88** à **90**

L'obtusadiol, identifié dans un extrait provenant de Grèce avec plusieurs autres métabolites [39], est le premier obtusane décrit dans une population de *Laurencia*. L'étude des métabolites secondaires de populations de *L.obtusa* récoltées en Grèce a permis d'identifier les prévézols A (**92**), B (**93**), C (**94**), D (**95**) et E (**96**) [67], [68]. Cette espèce est jusqu'à présent la seule à contenir des diterpènes possédant le squelette prévézane. Le néorogioldiol B (**98**) ainsi que son épimère le néorogioldiol (**97**) et l'O^{11},15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol (**101**) ont également été identifiés dans la même population. Ces deux derniers diterpènes avaient aussi été identifiés dans *L. microcladia* [69].

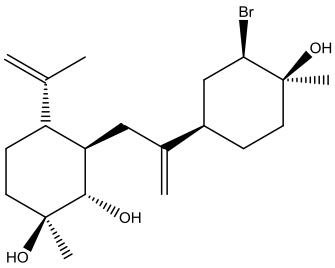
Enfin deux autres diterpènes possédant des squelettes atypiques ont été décrits chez *L. obtusa* : le laurencianol (**99**) [70] et le 10-hydroxy-kakuhuène (**100**) [47] qui est l'un des rares diterpènes tricycliques identifiés dans le complexe *Laurenci*a.



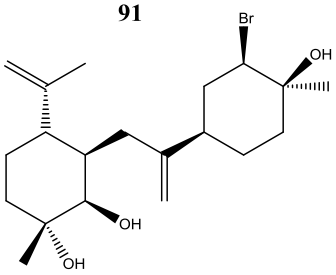
91



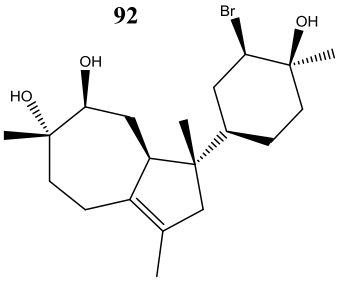
92



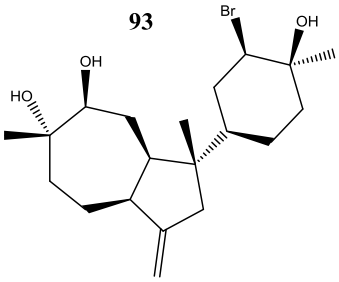
93



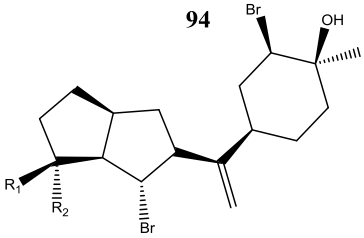
94



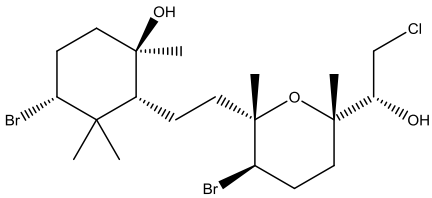
95



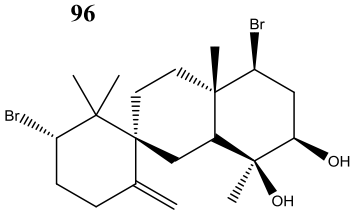
96



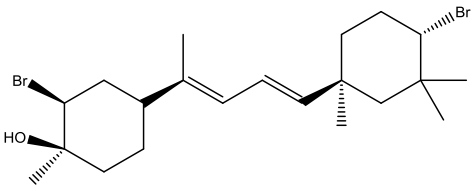
R_1 = Me, R_2 = OH : **97**
R_1 = OH, R_2 = Me : **98**



99



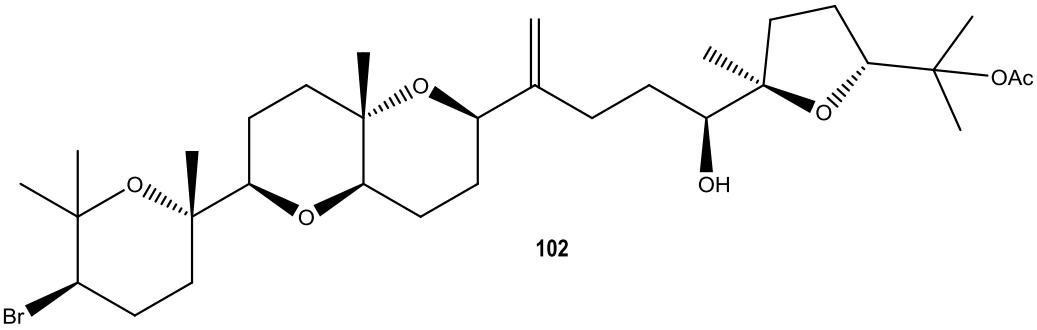
100



101

Figure 19 : Structures des diterpènes **91** à **101**

On dénombre jusqu'à présent 59 triterpènes isolés à partir de populations du complexe *Laurencia*. Ils sont divisés en 3 groupes majoritaires : les métabolites présentant un système cyclique 2,7-dioxabicyclo[4.4.0]décanique, ceux ayant un système cyclique 2,8-dioxabicyclo[5.4.0]décanique, et ceux présentant un élément de symétrie. Un seul triterpène a été décrit dans une population de *L. obtusa*, il s'agit du déhydrothyrsiferyl 23-acétate (**102**) [71]**.**



102

Figure 20 : Structure du triterpène **102**

II.3. *C_{15} acétogénines*

Les acétogénines représentent un grand groupe de métabolites secondaires dans le complexe *Laurencia*. Ce sont des molécules non terpéniques, constituées de 15 carbones, dont le précurseur est probablement un acide gras constitué de 16 carbones. Quelques acétogénines sont linéaires mais la plupart contiennent des cycles éthers de taille différente (de 5 à 12 membres). Ces molécules sont pour la majeur partie halogénées et se distinguent par 3 unités terminales majeures : bromoallène « Br-ène », bromopropargylique « Br-yne », ou un alcyne conjugué « én-yne ».

Un extrait de *L. obtusa* récolté aux Canaries [72] constitue un bel exemple de la diversité des acétogénines présentes dans ces espèces. En effet, l'étude menée sur cet extrait a permis de décrire trois nouveaux composés : un tétrahydrofurane (**106**), un tétrahydropyrane (**120**) ainsi qu'un oxocane (**137**). L'isolation de ce dernier, après une réaction d'acétylation a permis de réviser la structure du composé **138** précédemment isolé d'une autre population de *L. obtusa* [52]. Six autres métabolites, contenant une terminaison « Br-ène », « én-yne » ou « Br-yne » ont également été identifiés dans cet extrait dont trois tétrahydrofuranes, le graciosallène (**103**), la graciosine (**104**), et l'obtusine (**108**) précédemment décrits dans *L. obtusa* [73],[74], le 3-*E*-pinnatifidényne (**128**) décrit dans *L. pinnatifida* [75] ainsi que deux composés linéaires les 3-*E*-laurédiol (**153**) et 3-*Z*-laurédiol (**154**) isolés précédemment d'une population de *L. nipponica* [76]. Les acétogénines contenant un cycle tétrahydrofuranique peuvent être monocycliques, comme l'hurgadényne (**105**) [26], bicycliques avec par exemple le composé **107** [77] ou encore tricycliques comme la néoobtusine (**109**) [78].

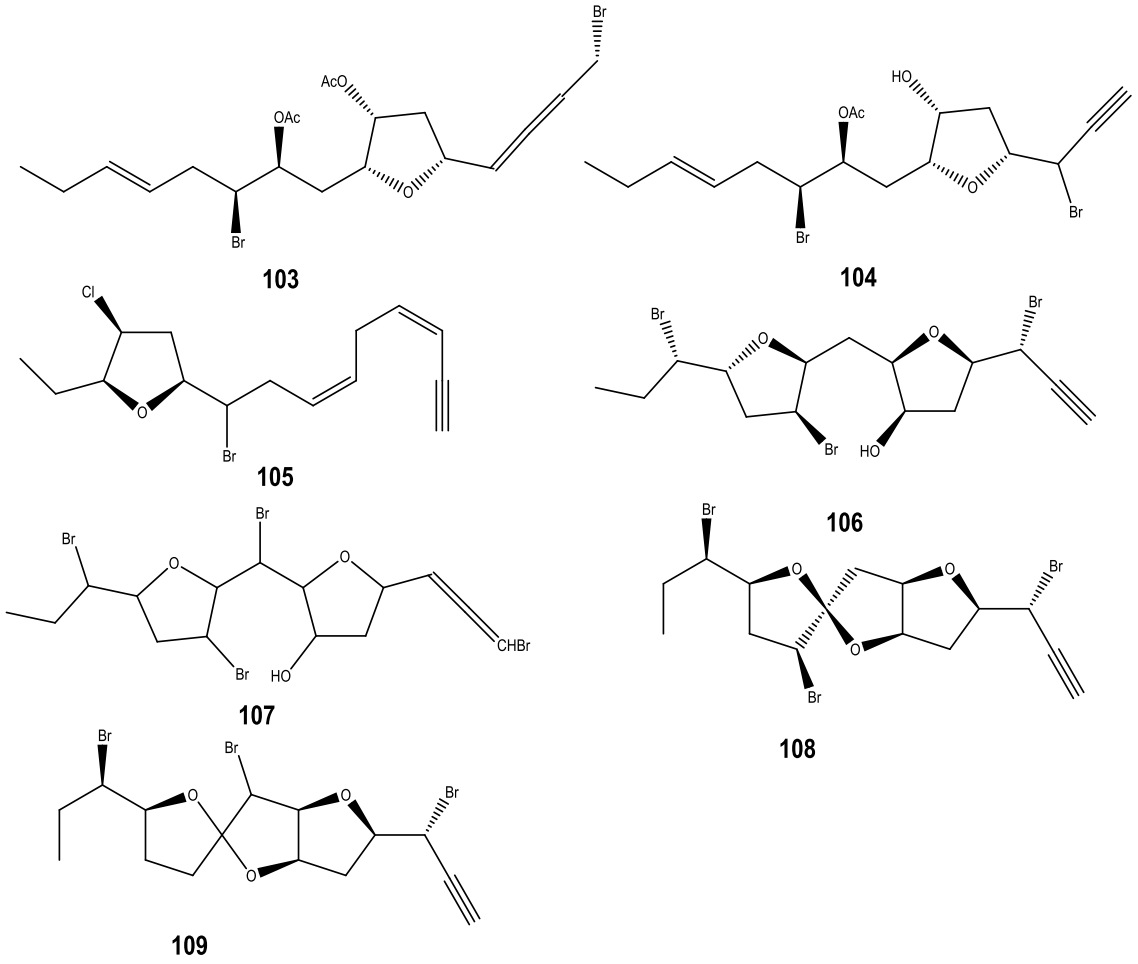


Figure 21 : Structures des acétogénines **103** à **109**

Les manéones, initialement décrites dans des populations de *L. nidifica* [71],[72], présentent une structure unique parmi tous les acétogénines décrites dans le complexe *Laurencia*. Quatre d'entre elles ont été reportées dans un extrait de *L. obtusa* en 2011 [81] : la *cis*-manéone E (**111**), la *cis*-manéone D (**112**), la *trans*-manéone C (**113**) ainsi que la *cis*-manéone A (**110**). Cependant, leurs structures, et particulièrement la stéréochimie du carbone 5 ont été remises en questions [82]. Plus récemment, trois dérivés de manéone ou d'isomanéone, les jeddahénynes A (**114**) et B (**115**) ainsi que la 12-débromo-12-méthoxy isomanéone A (**116**) ont été identifiées dans une population de *L. obtusa* récoltée en Arabie Saoudite [83]. Le même groupe a également décrit deux acétogénines contenant deux cycles tétrahydrofuraniques joints : l'iso- (**117**) et la bromo-(**118**) laurénidificine [84].

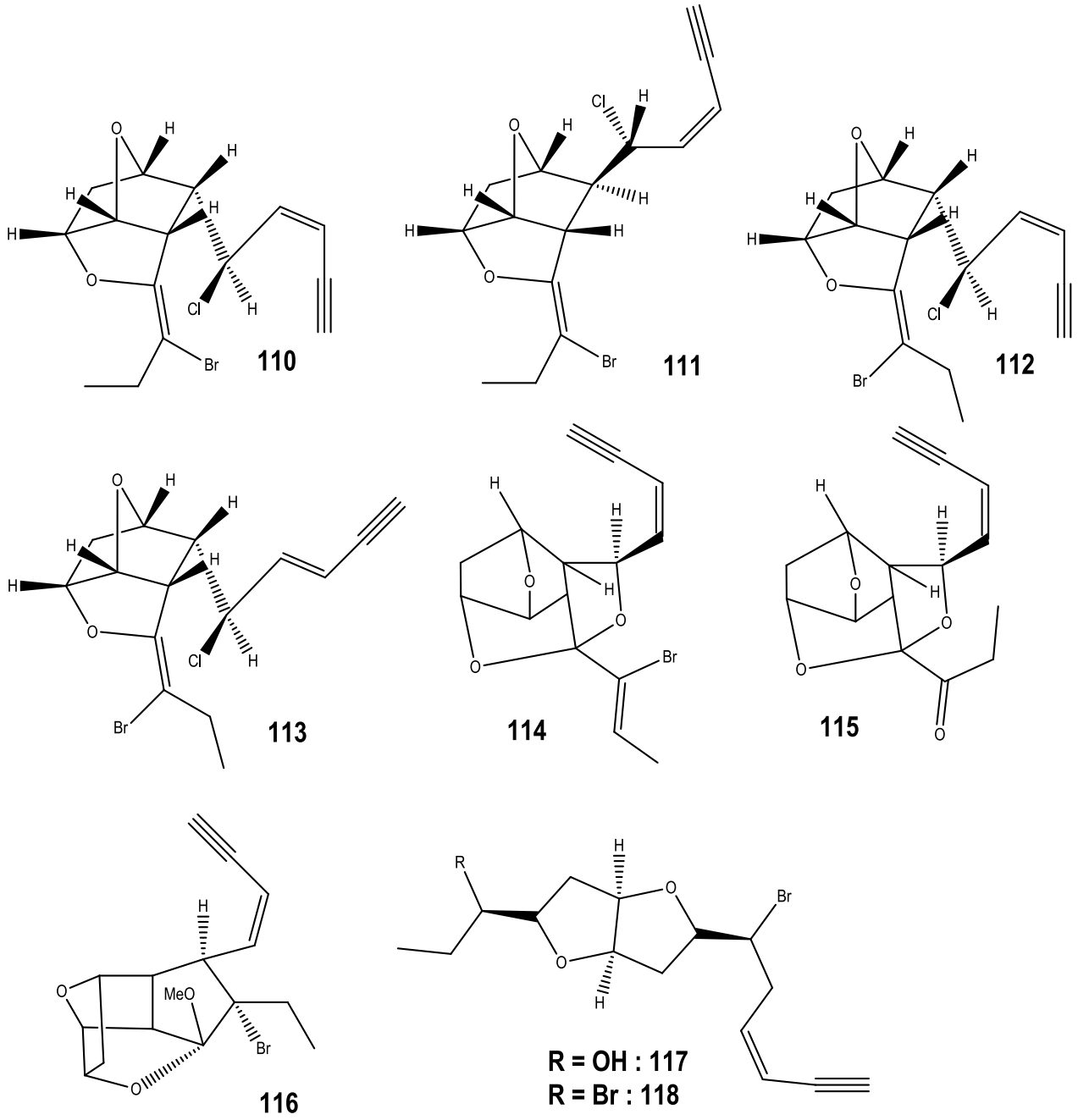


Figure 22 : Structures des acétogénines **110** à **118**

Quelques acétogénines contenant des cycles tétrahydropyraniques ont également été décrites dans l'espèce *L. obtusa*. Ces métabolites peuvent être monocycliques comme la scanlonényne (**119**) isolée dans les eaux irlandaises [85] ou bicycliques avec un second cycle tétrahydrofuranique joint au premier tel que la laurobtusine (**122**) [86] ou séparés du premier par un méthylène comme le composé **121** [87], précédemment isolé de l'éponge *Mycale rotalis* [88]. Aydogmus *et al.* [42] ont également identifié de nombreuses acétogénines dans un extrait de *L. obtusa* récoltée en Turquie. Elles contiennent toutes la terminaison « én-yne » : un tétrahydropyrane, la 3-*E*-dactylomélyne (**123**), précédemment isolée de *Aplysia dactylomela* [89], un oxacane, la laurenciényne (**130**) décrite auparavant dans *L. obtusa* [90] ainsi que deux oxépanes, la rogiolényne B (**124**) et la 3-*E*-néoisoprélauréfucine (**125**). La première avait déjà été isolée dans un extrait de *L. microcladia* [91] alors que la seconde avait été reportée dans cet article pour la première fois. On peut noter que le nombre d'acétogénines à 6 membres décrites dans l'espèce *L. obtusa* (5) est relativement élevé par rapport au nombre total de ces composés décrits dans le complexe (14).

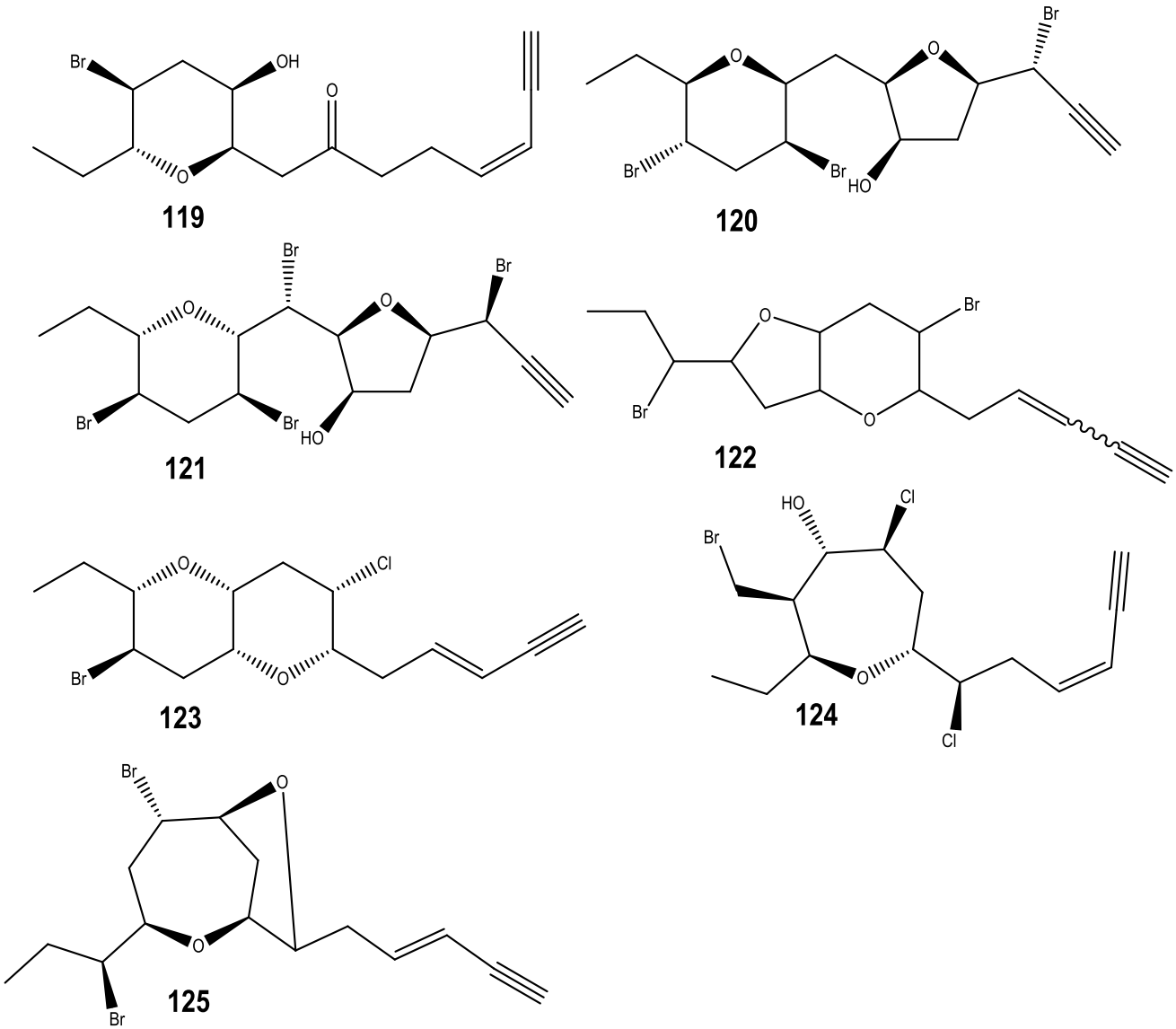


Figure 23 : Structures des acétogénines **119** à **125**

Les acétogénines contenant un cycle éther à 8 membres représentent le plus grand groupe d'acétogénines dans le complexe *Laurencia* et c'est aussi le cas pour l'espèce *L. obtusa* avec 15 composés décrits jusqu'à présent. Dans cette espèce, tous les représentants possèdent une terminaison « én-yne », *E* ou *Z*, hormis les composés **137** et **138** qui possèdent une terminaison « Br-yne » et possèdent également la particularité de posséder un second cycle éther à 5 membres. La plupart de ces composés sont caractérisés par la même chaine latérale bromée sur le carbone C12, mise à part la 3-*E*-laurényne (**126**), isolée à partir d'une population collectée en Turquie, qui possède à la place de l'halogène une double liaison [92].

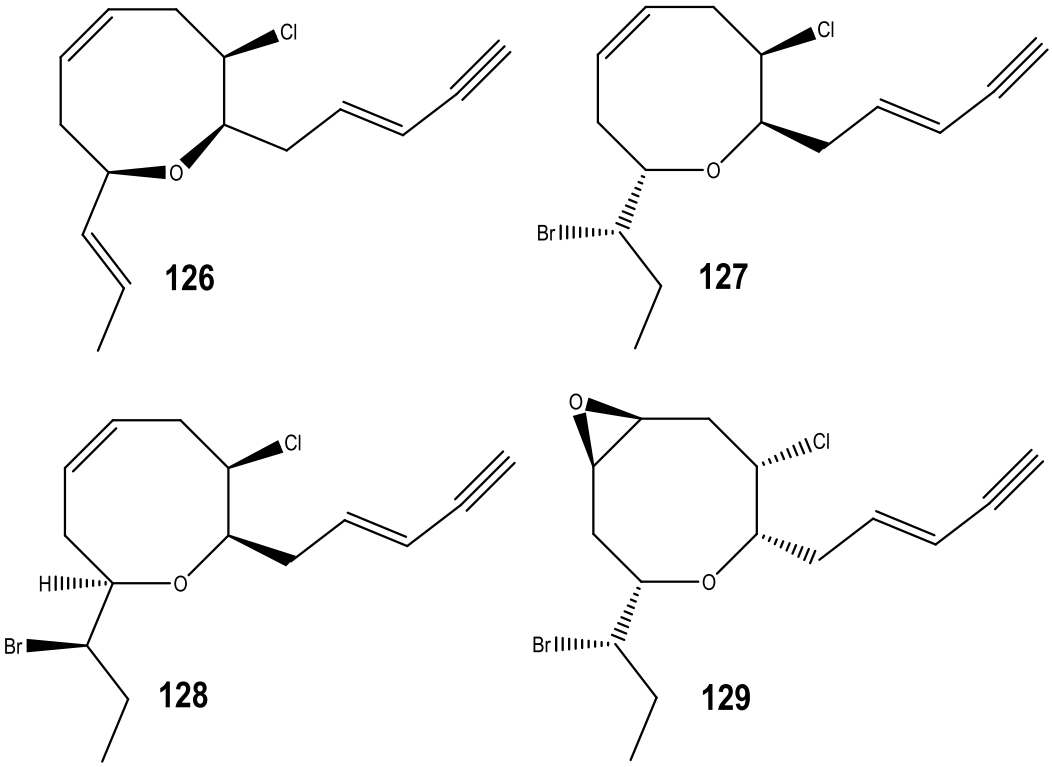
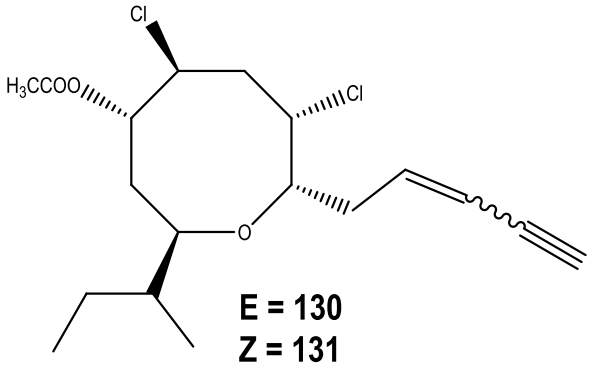
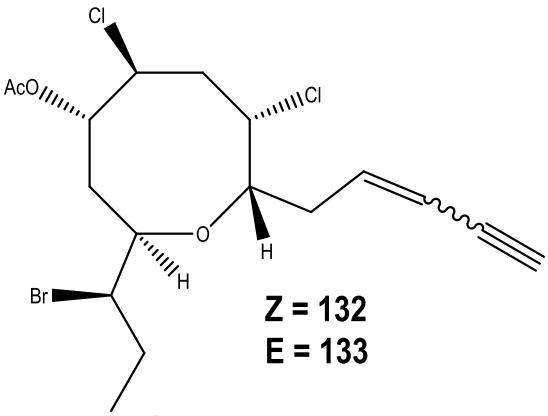


Figure 24 : Structures des acétogénines **126** à **129**

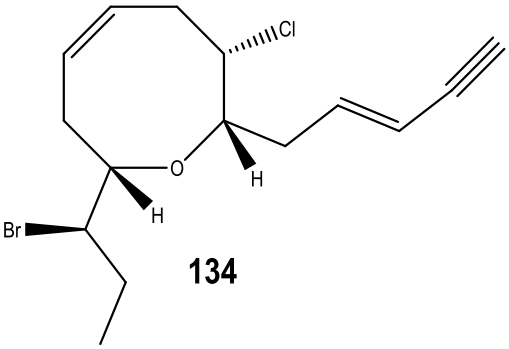
Le composé **127** a été isolé à partir du mollusque *Aplysia dactylomela* [93]. Ses déplacements chimiques étaient identiques à ceux de la 3-*E*-13-épipinnatifidényne (**134**) [94] mais les deux composés possèdent un pouvoir rotatoire opposé. La configuration absolue des centres asymétriques du composé **127** a été établie par diffraction des rayons X. Les auteurs suggèrent donc que le composé **134** est un énantiomère du composé **127** et que la configuration du carbone C12 doit alors être *R* et non pas *S* comme décrite précedemment. A partir de cette même population de *L. obtusa*, 4 autres acétogénines ont été isolées : le composé **132** ((3Z)-13-épilaurenciényne) et son isomère **133** ((3E)-13-épilaurenciényne) ainsi que deux isomères doublement acétylés, les composés **135** ((3E,6S*,7R*,9S*,10S*,12R*)-9-chloro-13-bromo-6:12-époxy-7,10-diacéoxypentadéc-3-én-1-yne) et **136** **(**(3Z, 6S*, 7R*, 9S*, 10S*, 12R*)-9-chloro-13-bromo-6:12-époxy-7,10-diacétoxypentadéc-3-én-1-yne). Le composé **129** (époxy-*trans*-isodihydrorhodophytine), qui possède la particularité d'être époxydé entre les carbones C9 et C10, le composé **131**, un isomère de la laurenciényne, le composé **140**, ainsi que le composé **139** (*Z* isodihydrorhodophytine) ont également été isolés de populations de *L. obtusa* [95],[87],[96],[59]. Enfin, le composé **141** (obtusényne), est le seul représentant des acétogénines contenant un cycle éther à 9 membres dans l'espèce *L. obtusa* [97].



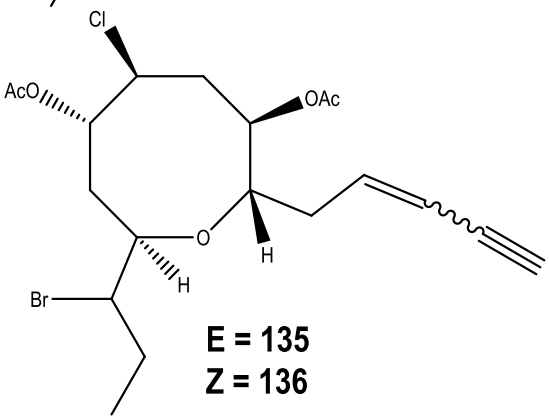
E = 130
Z = 131



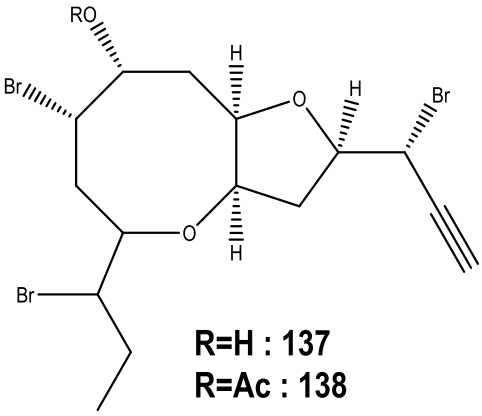
Z = 132
E = 133



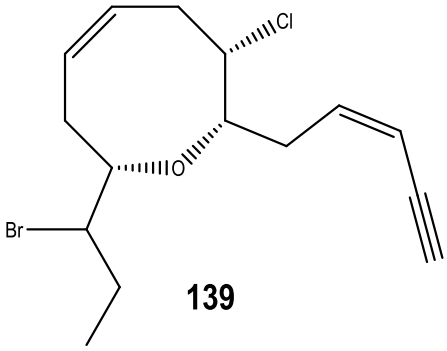
134



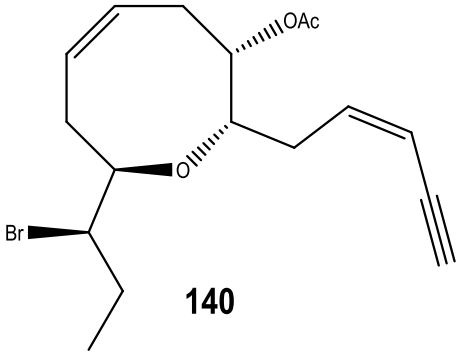
E = 135
Z = 136



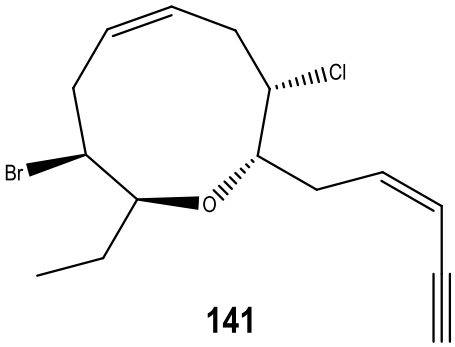
R=H : 137
R=Ac : 138



139



140



141

Figure 25 : Structures des acétogénines **130** à **141**

Les acétogénines présentant des cycles à 12 membres sont réparties dans 3 espèces du complexe : *Laurenciella marilzae*, *Laurencia chondriodes* et *Laurencia obtusa*. La plupart de ces métabolites sont connus sous le nom d'obtusallène et sont caractérisés par *i)* un époxyde entre les carbones C4 et C14, *ii)* une terminaison bromoallène, ainsi *iii)* qu'un ou plusieurs cycles éther. Le premier exemple (obtusallène I, composé **144**) de ces molécules a été décrit en 1982 [98] puis cité à nouveau en 1991 [99] avec deux autres membres, les obtusallènes II (**142**) et III (**143**). Guella *et al*., en identifiant un nouveau membre, l'obtusallène IV (**145**) ainsi que le 10-bromoobtusallène I (**146**) [100] précédemment décrit, ont mis en évidence l'existence de conformères autour de la double liaison oléfinique. En effet, les obtusallènes existent en fait sous la forme de conformères majoritaire/minoritaire créant des signaux larges en RMN du proton lorsque le spectre est enregistré à température ambiante. En abaissant la température en dessous de la coalescence, seuls les signaux du conformère majoritaire sont alors visibles [101]. Cinq autres obtusallènes ont été par la suite identifiés et possèdent les mêmes caractéristiques conformationnelles : les composés **147** (V), **148** (VI), **149** (VII), **150** (VIII), et **151** (IX) [102]. Enfin le kassallène (152) constitue l'unique exemple d'obtusallène comprenant un motif dioxane [103].

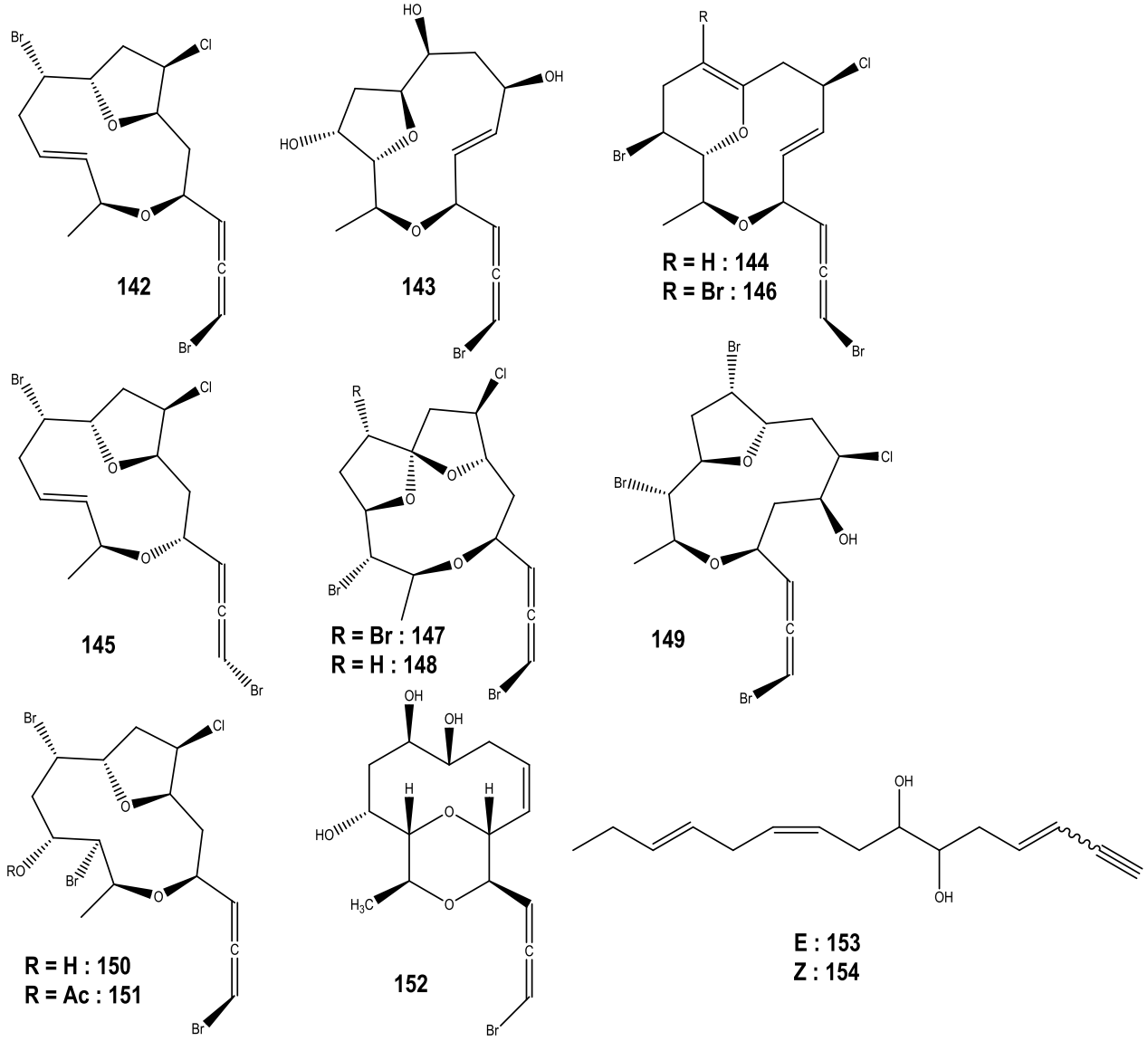


Figure 26 : Structures des acétogénines **142** à **154**

II.4. *Autres métabolites secondaires*

D'autres métabolites secondaires ont été mis en évidence au sein du complexe *Laurencia* : des indoles, des composés aromatiques, des stéroïdes, ainsi que quelques métabolites non classés. Aucun indole ou composé aromatique n'a été identifié dans l'espèce *L. obtusa*. Sur les 17 stéroïdes identifiés dans le complexe, 3 ont été reportés dans des populations de *L. obtusa* : le cholestérol (**152)** [26], la cholest-4-èn-one (**153**) et le [18] 2a-oxa-2-oxo-5α-hydroxy-3,4-dinorcholéstane (**154**) [104]. Enfin, parmi les 38 métabolites non classés identifiés dans le complexe, seul un aldéhyde α,β-insaturé a été identifié dans l'espèce *L. obtusa*, il s'agit du 2-*E*-tridécyl-2-heptadécanal (**155**) [26].

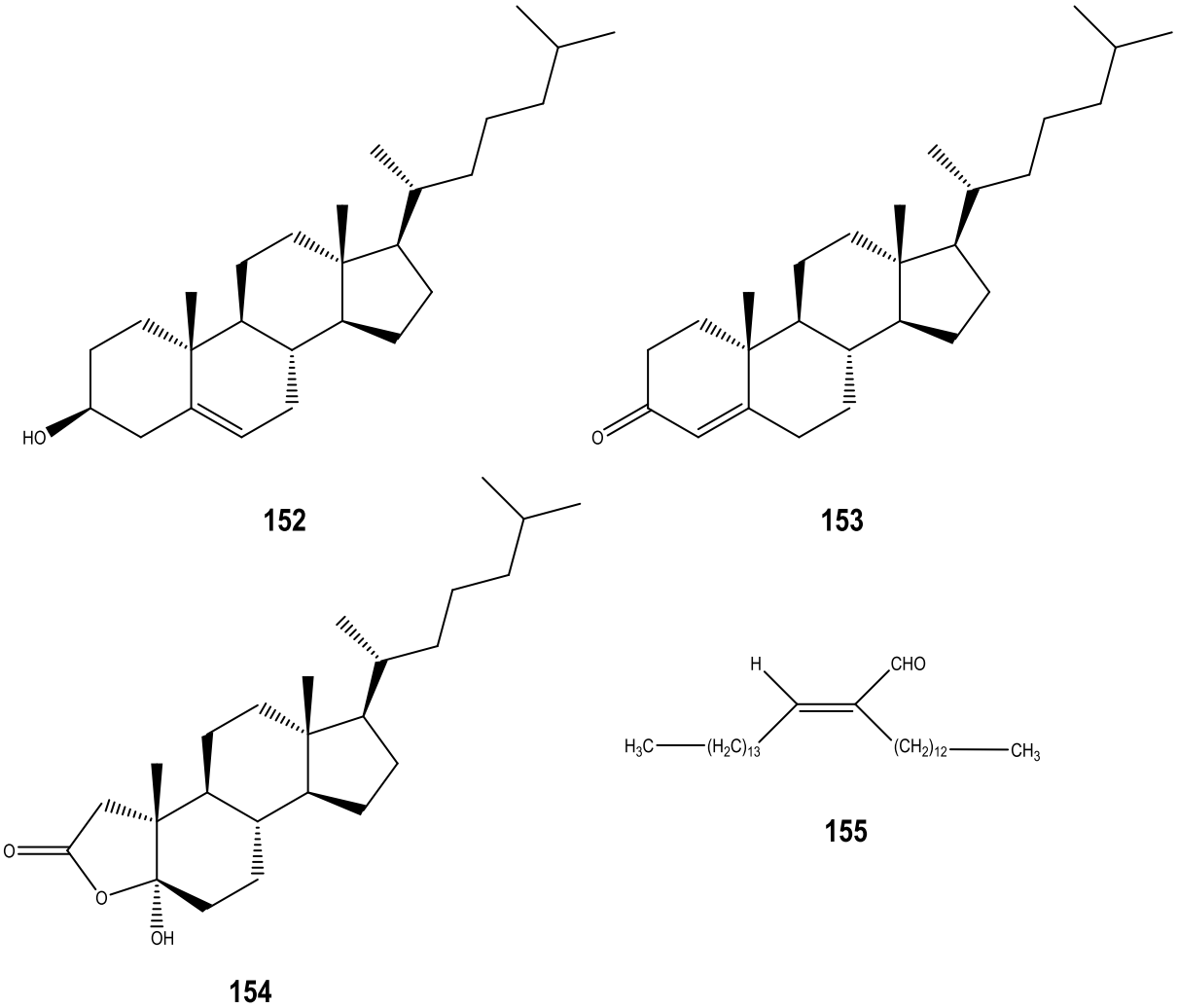


Figure 27 : Structures des composés **152** à **155**

III.1. *Activité cytotoxique*

Cytotoxicité *vs. Artemia salina*

Evaluer la toxicité d'un composé vis-à-vis des larves d'*Artemia salina* constitue une manière simple et rapide qui permet d'estimer la potentielle toxicité d'un produit naturel. Les larves sont mises en contact avec le produit testé à différente concentration. On mesure ensuite la dose létale médiane (LD_{50}) c'est-à-dire la concentration nécessaire pour tuer 50% des individus.

Les sesquiterpènes **74**, **75**, **76** et **80** ont été testés mais n'ont pas démontré d'activité cytotoxique (LD_{50} > 0,5 mM) [57] de même que les composés **117** et **118** (LD_{50} > 12 mM) [84]. En revanche l'élatol (**13**) possède une bonne activité vis-à-vis d'*Artemia salina* avec 100% d'inhibition des larves après 24h d'incubation pour une concentration de 0,5 mg/mL [105].

Cytotoxicité *vs.* lignées cellulaires cancéreuses

L'activité antitumorale des composés **64** et **66** a été évaluée sur une tumeur commune, « Ehrlich Ascites Carcinoma » (EAC). La viabilité de ces cellules en contact avec les produits à différentes concentrations est mesurée. Les deux lauranes testés ont démontré une bonne activité avec 83,1% de cytotoxicité pour le composé **64** et 79,9% pour le composé **66** [18].

La cytotoxicité des produits suivants a été testée vis-à-vis de cellules cancéreuses humaines de différentes origines. Dans ce cas, on mesure la capacité antiproliférative des molécules testées par l'IC_{50} qui représente la concentration requise pour inhiber 50% des cellules. Certains de ces tests ont démontré des activités très intéressantes vis-à-vis de certaines lignées de cellules cancéreuses. D'autres, comme par exemple les composés **49**, **50** et **53** à **56** n'ont pas d'activité cytotoxique sur les cellules testées [44].

Deux cuparanes, les composés **61** et **67**, un laurane, le composé **73**, et un diterpène, le 10-hydroxy-kakuhuène (**100**) ont été testés sur 3 lignées de cellules cancéreuses. Le composé **66** s'est avéré inactif, les composés **61** et **73** ont démontré une activité modérée vis-à-vis des cellules KB (nasopharynx) tandis que le composé **100** possède un effet comparable à celui du contrôle positif (5-fluorouracil) contre les 3 lignées cellulaires [47].

Les composés **77**, **78**, **79**, dérivés d'eudesmane, ont tous une activité cytotoxique comparable à celle d'un contrôle positif (Cisplatine) contre la lignée cellulaire MCF-7 [58]. Les composés **27**, **28**, **31**, **37**, **59**, **62, 65** et **155**, isolés d'une même population de *L. obtusa*, ont également fait l'objet d'étude de l'activité cytotoxique vis-à-vis des cellules MCF-7 ainsi que 4 autres lignées cellulaires cancéreuses [35]. Les composés **31**, **59** et **155** ont démontré une cytotoxicité importante contre toutes les cellules testées. Les auteurs suggèrent que la présence d'un atome de brome dans le composé **31** améliore son activité, par comparaison avec les composés **27** et **28** dont la structure est proche. De la même manière, en comparant les activités respectives des composés **65**, **59** et **62**, la double liaison exocyclique du composé **59** semble être responsable de son fort potentiel cytotoxique.

Des hypothèses similaires de relation structure-activité ont été émises après l'étude de la cytotoxicité des prévézols B, C, D, E (**93**, **94**, **95**, **96**) ainsi que du néorogioldiol (**98**) [68]. Les composés **93** et **98** se sont avérés les plus actifs vis-à-vis des 5 lignées cellulaires testées. Les auteurs suggèrent que les lignées PC-3 et K562 sont sensibles à la stéréochimie relative des deux hydroxyles en position C13 et C14 puisque l'IC_{50} du composé **93** est deux fois moins élevée que celle du composé **94**. La cytotoxicté vis-à-vis des cellules HeLa, A431 et K562 serait quant à elle dépendante de la présence de la double liaison exocyclique du composé **96**, inactif contre ces cellules alors que son épimère possède une activité modérée.

L'activité cytotoxique de l'obtusadiène (**14**) et l'isoobtusadiène (**15**) a été évaluée vis-à-vis des cellules KB mais les deux composés se sont avérés inactifs. En revanche, l'isoobtusadiène, ainsi que l'élatol (**13**) ont démontré une très forte activité (inférieure ou égale à 1 µM) contre les cellules A549, P388, HT-29 et MEL-28 [20],[97],[98]. Les composés **117** et **118** ont démontré une activité cytotoxique faible contre les cellules A549, HepG2, MCF-7, HCT116 et PC-3 avec des IC_{50} supérieures à 15 mM [84].

Tableau 2 : Cellules cancéreuses utilisées pour évaluer l'activité anti cancéreuse

A549	Cellules de cancer du poumon
HepG2	Cellules de cancer du foie
HCT116	Cellules de cancer colorectal
MCF-7	Cellules de cancer du sein
PC-3	Cellules de cancer de la prostate
KB	Cellules de cancer du nasopharynx
LU1	Cellules de cancer du poumon
Col2	Cellules de cancer du colon
LNCaP	Cellules de cancer de la prostate
HeLa	Cellules de cancer du cerveau
A431	Cellules de cancer de l'épiderme
K562	Cellules de leucémie myéloïde chronique
HM02	Cellules de cancer gastrique
P388	Cellules de cancer de la prostate
HT-29	Cellules de cancer du colon
MEL-28	Mélanome
Hep-2	Cellules de cancer du larynx
Vero	Cellule de rein de singe (non tumoral)
CHO	Biopsie ovaire hamster chinois

Tableau 3 : Activités cytotoxiques des composés isolés de *L. obtusa* (IC_{50} en µM)

Composés [référence]	A 549	HepG2	HCT 116	MCF-7	PC-3	KB	LU1	Col2	LNCaP	HeLa	A431	K562	CHO	P388	HT-29	MEL-28	HM02
13 [106],[105]	0,1	< 1,0		< 1,0										1,0	0,1	0,1	< 1,0
14 [28]						inactif											
15 [28],[106]	1,0					inactif								1,0	0,25	1,0	
27 [35]				> 300	138,3					117,7	105,1	> 300	> 300				
28 [35]				> 300	144,4					154,2	151,9	> 300	> 300				
31 [35]				28,2	54,8					50,9	73,2	67,4	80,2				
37 [35]				> 300	126,2					111,3	137,1	> 300	> 300				
49 [44]						inactif	inactif	inactif	inactif								
50 [44]						inactif	inactif	inactif	inactif								
53 [44]						inactif	inactif	inactif	inactif								
54 [44]						inactif	inactif	inactif	inactif								
55 [44]						inactif	inactif	inactif	inactif								
56 [44]						inactif	inactif	inactif	inactif								
59 [35]				15,8	18,1					40,5	23,9	64,2	78,2				
60 [107]														23,4			
61 [47]		> 0,500		0,184		0,171											
62 [35]				95,5	103,2					88,6	122,0	127,4	165,5				
65 [35]				201,7	182,3					121,3	176,4	> 300	234,7				
67 [47]		> 0,500		> 0,500		> 0,500											
73 [47]		> 0,500		> 0,500		0,213											
77 [58]				39,5													
78 [58]				63,6													
79 [58]				22,8													
93 [68]				135,6	80,4					78,0	65,2	76,4					
94 [68]				140,5	158,8					80,5	78,4	123,5					
95 [68]				> 200	> 200					120,6	135,5	156,9					
96 [68]				> 200	> 200					> 200	> 200	> 200					
98 [68]				172,3	50,8					34,4	65,8	76,4					
100 [47]		0,057		0,054		0,100											
117 [84][1]	15,6	15,1	> 20	15,5	17,9												
118 [84][1]	15,9	15,3	17,9	17,9	> 20												
155 [35]				51,4	71,6					51,8	45,8	82,7	107,6				

[1] IC_{50} en mM

III.2. *Autres activités biologiques*

Certains composés isolés de population de *L. obtusa* ont également fait l'objet de tests d'activité antifongique et/ou antibactérienne. Le composé **80** a, par exemple, démontré une forte activité antifongique contre les souches *C. albicans* et *C. tropicalis* (Concentration Minimale Inhibitrice, CMI = 8,27 et 10,13 µM) alors que le composé **74** s'est avéré particulièrement actif vis-à-vis des souches bactériennes *E. faecalis* et *S. aureus* (CMI = 0,08 et 0,09 mM) [57]. Les composés **77** et **78** ont démontré une forte activité antifongique contre les 4 souches testées (*C. albicans, C. tropicalis, A. flavus* et *A. niger*) avec des CMI inférieures à 7 µM [58].

Trois dérivés du laurane, les composés **63**, **64** et **65** ont été testés pour leur potentielle activité antibactérienne et antifongique [18]. Le composé **63** n'a démontré aucune activité vis-à-vis des 3 champignons testés (*Candida albicans, Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus*) avec des CMI supérieures ou égales à 2000 µg/mL. Le composé **65** possède une activité modérée pour ces 3 champignons mais c'est le composé **64** qui a démontré le plus fort potentiel antifongique, surtout contre *C. albicans* avec une CMI égale à 70 µg/mL, comparable à celle du contrôle positif le kétoconazol (CMI = 40 µg/mL). Aucune hypothèse concernant la relation structure-activité de ces molécules n'a été émise, mais on peut comparer les CMI des composés **63** et **64** qui ne diffèrent que par leur fonction en position 9 (CH_2OH *vs.* CHO). Pour *C. albicans*, la CMI de l'aldéhyde est quasiment 30 fois inférieure à celle de l'alcool, on peut alors supposer que la fonction est responsable de l'activité du composé **64**. Concernant l'activité antibactérienne, les 3 composés ont démontré un bon potentiel vis-à-vis des deux bactéries à gram positifs testées (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) mais sont inactifs contre la bactérie a gram négatif *Pseudomonas aeruginosa*.

Les acétogénines **111** et **112** ainsi que **114** à **118**, isolées de populations de *L. obtusa* récoltées en Arabie Saoudite possèdent toutes une structure tétrahydrofuranique ainsi qu'une terminaison « én-yne ». Elles ont toutes été évaluées pour leur potentiel anti-infammatoire en mesurant leur effet inducteur ou inhibiteur de l'apoptose (mort cellulaire) des granulocytes neutrophiles. Ces cellules, qui sont phagocytes, interviennent dans les réactions de défense de l'organisme en éliminant les éléments pathogènes. Les résultats ont montré que ces molécules semblent être impliquées dans la régulation de la mort cellulaire programmée pendant les phases d'initiation et de programmation des réponses anti inflammatoires [83],[84],[81].

Composés	**111**	**112**	**114**	**115**	**116**	**117**	**118**	Dexaméthasone[2]
IC_{50} (µM)	15	23	15,9	12,4	35,0	14	11	0,9

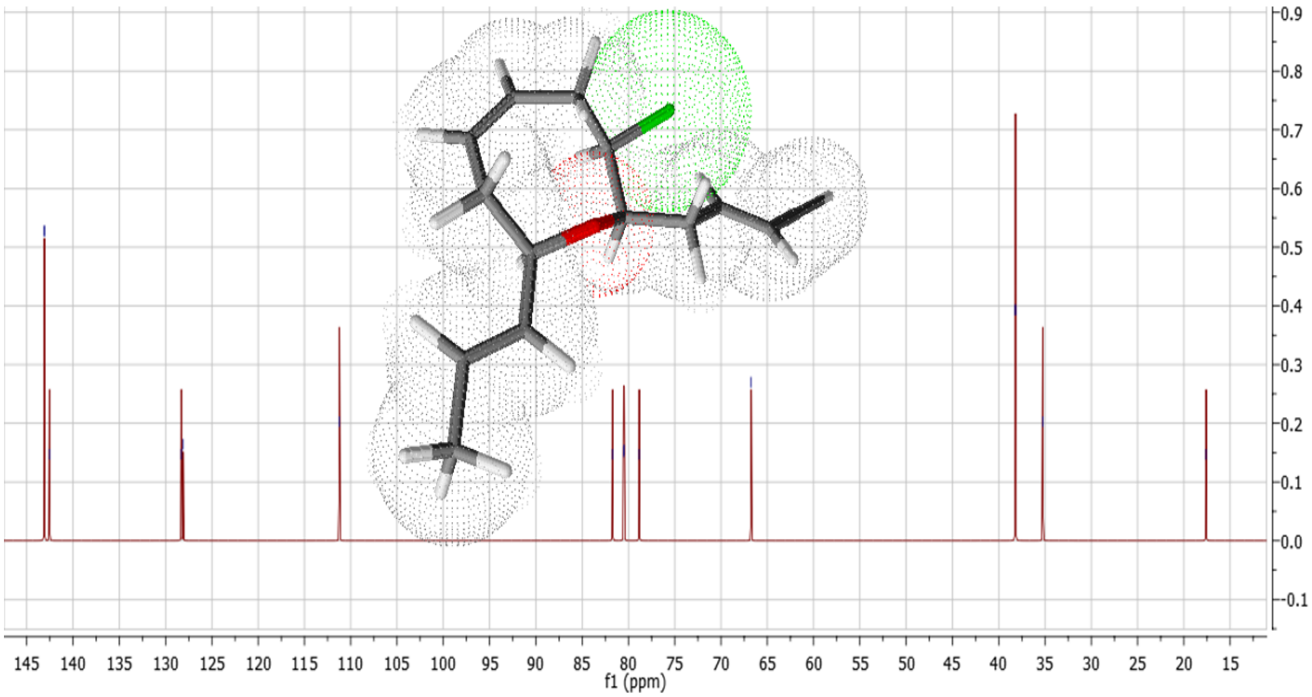
Les composés **26**, **29**, **30** et **32** à **36** ont quand à eux été testés contre plusieurs virus dont le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) mais aucun d'entre eux n'a démontré d'activité antivirale [31].

L'activité insecticide des acétogénines **132** à **136** a été évaluée contre les fourmis *Pheidole pllidula*. Les résultats ont montré que les composés dont la stéréochimie est *Z* possèdent une forte activité dès leur application alors que ceux possédant une stéréochimie *E* ont une activité modérée qui s'est intensifiée au cours du test (mortalité > 70% au 4ème jour d'application) [94].

Enfin, l'allolaurintérol (**60**) et l'élatol (**13**) ont été testés pour leur activité anti algue. L'allolaurintérol a démontré une bonne inhibition de l'algue *Chlorella fuscea* avec un diamètre d'inhibition de 1 cm pour 50 µg de composé alors que l'élatol n'est pourvu d'aucune activité vis-à-vis de la même algue [50][105].

[2] Contrôle positif

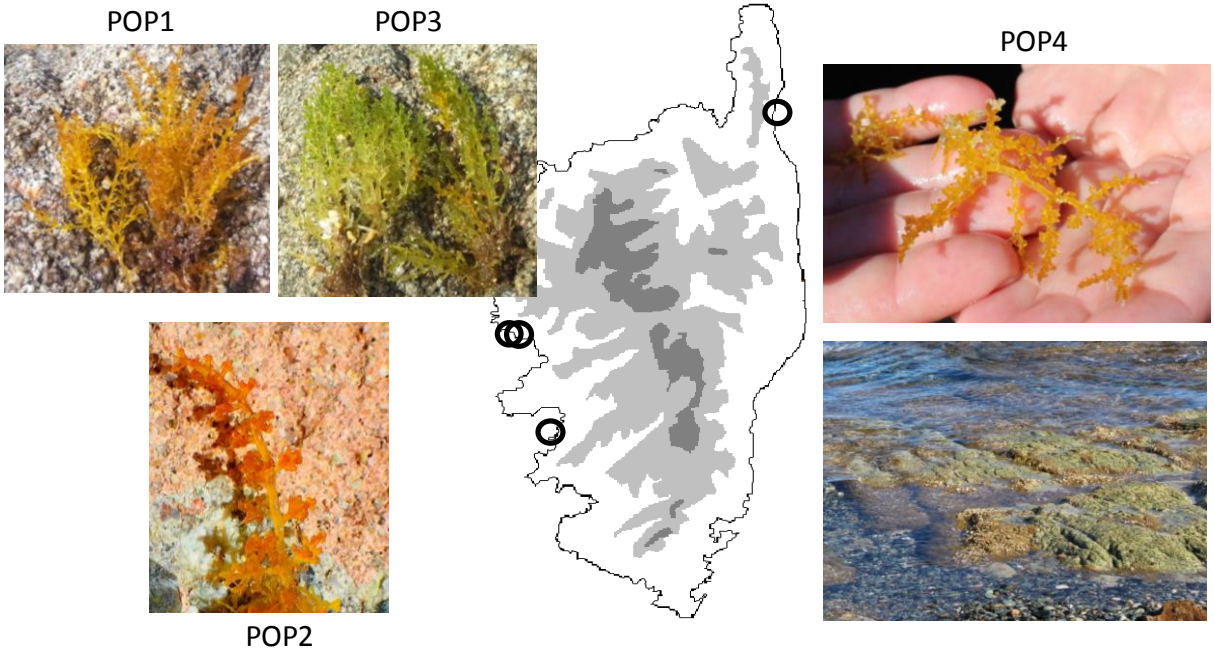
CHAPITRE II
ANALYSE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE QUATRE POPULATIONS DE *LAURENCIA OBTUSA* PAR RMN DU CARBONE 13



I PRESENTATION DES POPULATIONS ETUDIEES

I.1. *Récolte et Extraction*

Quatre populations (POP1 à POP4) d'algues appartenant au genre *Laurencia* ont été collectées dans 3 localités. Chaque population a suivi le même traitement après récolte. Les algues ont été dans un premier temps triées et séparées des épiphytes, puis lavées à l'eau claire. Elles ont ensuite été congelées afin de procéder à leur lyophilisation dans le but de retirer toutes les traces d'eau présentes. Les algues sèches ont été broyées à l'aide d'azote liquide. La poudre d'algue obtenue a ensuite été extraite 3 fois avec de l'acétate d'éthyle (AcOEt), qui a ensuite été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif.



	Lieu de récolte	Date de récolte	Couleur	Masse séchée broyée (g)	Masse extraite (g)	Rdt
Population 1	Tiuccia	06/2016	Orange	368,0	2,1205	0,57%
Population 2	Ajaccio	06/2016	Orange	291,1	2,7682	0,95%
Population 3	Tiuccia	07/2015	Vert	531,8	4,8963	0,92%
Population 4	Erbalunga	06/2016	Orange	152,2	1,1305	0,74%

Un échantillon de chacune des populations a été placé dans un Herbarium (HCOM, Centre d'Océanologie de Marseille – Université d'Aix-Marseille II) sous les références suivantes : H8315 (POP1), H8317 (POP2), H8314 (POP3) et H8318 (POP4).

I.2. *Identification et position taxonomique*

Comme évoqué précédemment, l'identification des espèces du complexe *Laurencia* nécessite l'utilisation de données moléculaires (ADN). La technique couramment utilisée est celle du barcode moléculaire (DNA barcoding). Cette approche génomique, proposée par Hebert en 2003, permet d'obtenir des données génétiques standardisées et référencées qui constituent un système global d'identification des espèces [108].

Le barcode moléculaire, ou code-barre ADN, est un fragment d'ADN dont la séquence est caractéristique de l'espèce. Ainsi, le séquençage de ce fragment, quasiment identique chez les individus d'une même espèce, permet de déterminer à quelle espèce appartient un individu.

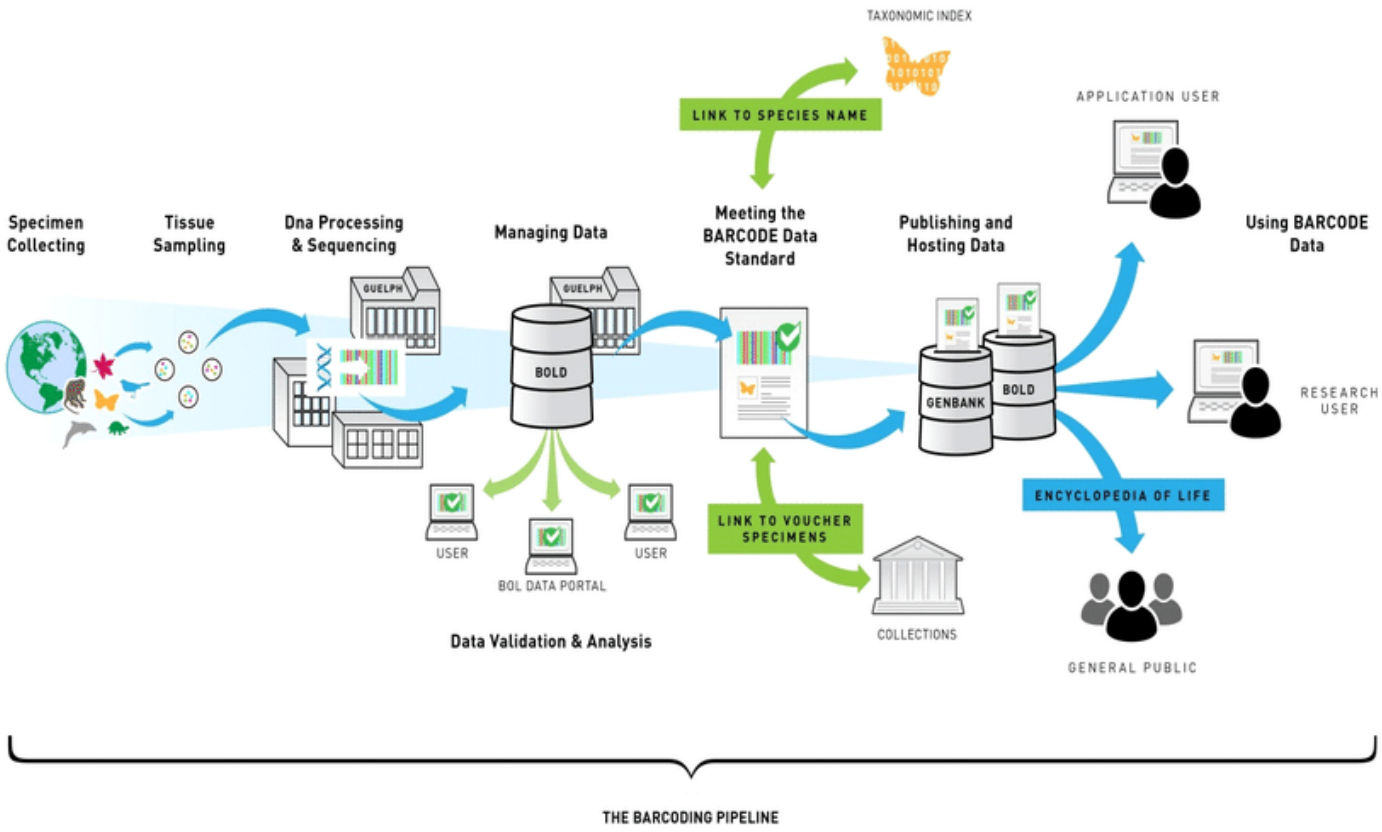


Figure 28 : Workflow du barcode moléculaire d'après Fajarningsih [109]

La plupart du temps, le fragment ADN de référence est le gène mitochondrial codant pour la première sous-unité de la cytochrome oxydase (CO1), une protéine intervenant dans la chaine respiratoire de la mitochondrie [110], [111].

Un spécimen de chacune des populations étudiées a été identifié par cette technique au Museum d'Histoire Naturelle, qui dispose d'une large banque de références pour le complexe *Laurencia*. La phylogénie obtenue (*cf.* Figure 29) permet de les regrouper sous la même espèce, à savoir *L. obtu*sa.

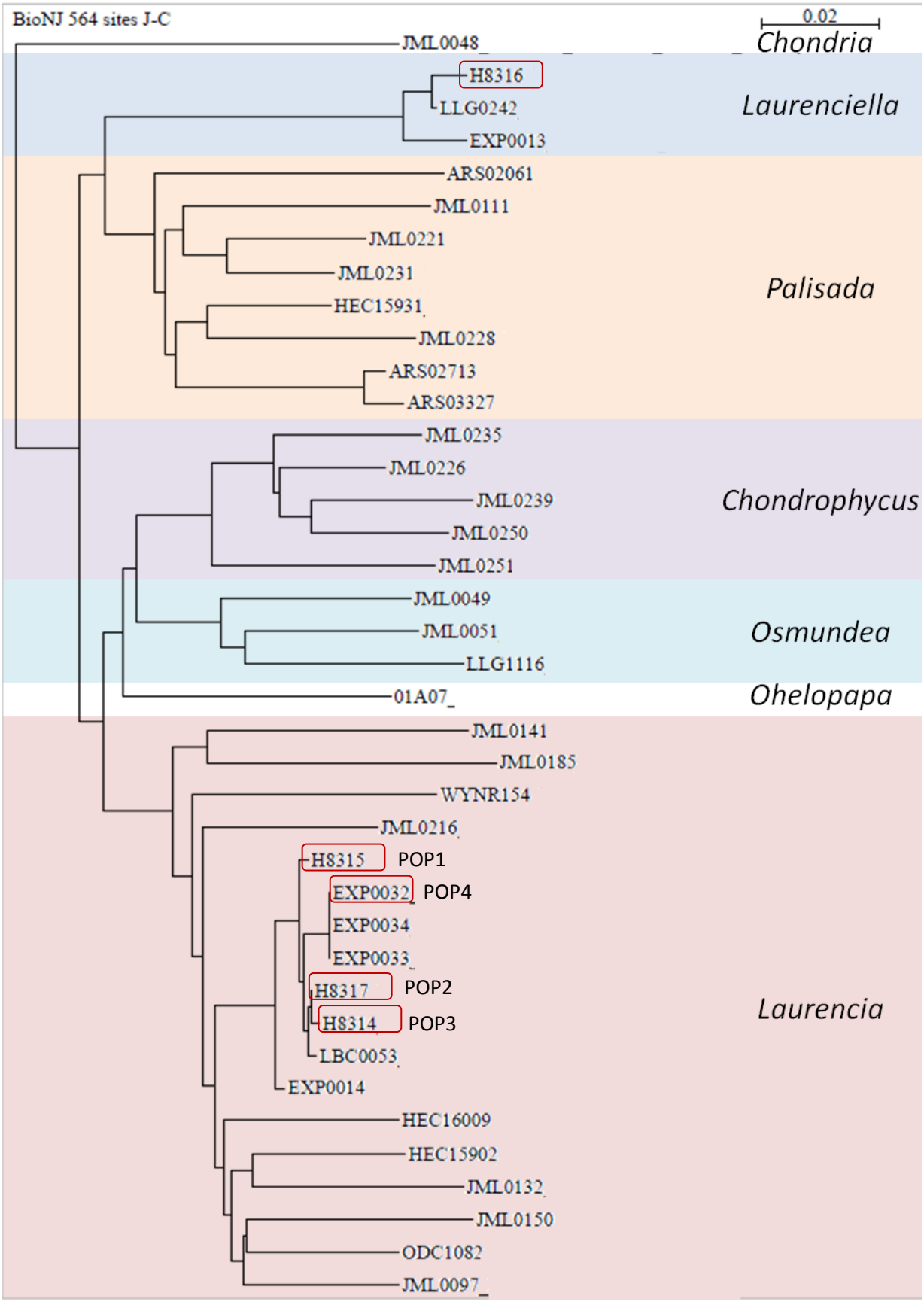


Figure 29 : Arbre phylogénétique (analyse de distance) représentant les relations entre membres du complexe *Laurencia*.

II.1. *Identification par RMN ^{13}C sans séparation préalable*

Intérêt de la RMN ^{13}C

Dans le domaine des analyses de mélanges complexes, c'est le noyau du carbone-13 qui est privilégié malgré sa faible abondance isotopique (1%) et son rapport gyromagnétique environ 5700 fois moins sensible que celui du proton [112]. Ce choix est basé sur plusieurs raisons :

- le carbone-13 est l'élément constitutif de toutes les molécules organiques ;
- la plupart du temps, le spectre ^{13}C présente autant de raies de résonance que de carbones dans la molécule (superposition possible) permettant d'identifier sans ambiguïté des molécules dont la structure est proche ;
- l'irradiation des noyaux de proton permet de simplifier les spectres ^{13}C en supprimant les couplages $^{1}J_{C\text{-}H}$ (une seule raie de résonance par carbone) ;
- la finesse et la résolution des pics est meilleure que dans le cas du proton car le temps de relaxation transversale T_2, inversement proportionnel à la largeur des pics, est plus élevé pour le carbone que celui du proton ;
- la gamme de résonance du carbone est plus large que celle du proton (240 ppm *vs.* 12 ppm) permettant une meilleure dispersion et évitant la superposition des signaux ;
- la RMN est une technique non destructive et les spectres sont enregistrés à température ambiante évitant les possibles dégradations ou transformations des molécules thermosensibles.

L'identification des constituants d'un mélange par RMN ^{13}C s'effectue par comparaison des déplacements chimiques (δ) dans le spectre du mélange avec ceux de composés de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. L'identification d'une molécule repose sur 3 paramètres : l'observation des signaux, leur individualisation et enfin leur attribution. La reproductivité des résultats nécessite des conditions expérimentales optimisées et standardisées.

Observation des signaux

L'observation des raies de résonance des carbones d'une molécule dépend de sa concentration dans l'échantillon, sa viscosité, sa solubilité dans le solvant choisi, ainsi que de la sensibilité de l'appareil qui est caractérisée par le rapport signal sur bruit (S/B). L'observation des signaux peut être améliorée par plusieurs procédés :

- l'augmentation du nombre d'acquisitions puisque le rapport (S/B) croit comme la racine carrée du nombre d'acquisitions ;
- l'utilisation d'une cryosonde qui peut augmenter la sensibilité d'un facteur 4 ;
- l'augmentation de la concentration du produit en utilisant des tubes à paroi épaisse ou à restriction ;
- l'utilisation d'aimants supraconducteurs à très hauts champs (jusqu'à 23,5 Tesla) ;
- l'irradiation des protons qui peut multiplier le rapport S/B jusquà 3 grâce à l'effet nucléaire Overhauser (NOE) [112].

Individualisation des signaux

L'individualisation des signaux est une étape primordiale pour identifier les constituants d'un mélange par RMN ^{13}C. Elle est rarement problématique dans le cas d'un composé pur puisque la superposition des signaux de deux carbones est rare. En revanche, cette étape peut se compliquer lorsque le nombre de constituants est important, augmentant ainsi la probabilité de superposition des raies de résonance.

Cette étape dépend de la résolution de l'appareil et donc de la puissance de l'aimant et des caractéristiques du système informatique qui permet l'acquisition du signal. Certains facteurs peuvent influencer la résolution comme le nombre de points de digitalisation sur le signal FID, l'application d'une fonction exponentielle de Lorentz Gauss sur le signal préalablement à la transformée de Fourrier ou encore la largeur de la fenêtre spectrale.

Attribution des signaux

Chaque molécule est définie par une série de déplacements chimiques qui lui est propre et qui constitue son spectre. Ainsi, contrairement à la majorité des autres techniques spectroscopiques, il est peu probable de ne pas pouvoir distinguer deux molécules même si leur structure est très proche.

Il est primordial, pour assurer la bonne identification d'une molécule, que les paramètres d'enregistrement du spectre se rapprochent au maximum des conditions d'enregistrement des produits de référence. De ce fait, plusieurs paramètres pouvant influencer les déplacements chimiques sont à prendre en compte : la puissance du champ magnétique B_0, les séquences impulsionnelles, ainsi que les paramètres d'acquisition et de traitement du signal.

De plus, les déplacements chimiques d'un composé peuvent également être affectés par son environnement, c'est-à-dire la nature du solvant, sa concentration dans le mélange ainsi que la présence d'autres molécules causant possiblement la formation de liaisons hydrogène. L'utilisation de spectromètres plus puissants permet de pallier ce problème puisque les expériences nécessitent alors une concentration moins importante.

II.2. *Méthode développée au laboratoire*

L'équipe « Chimie et Biomasse » a mis au point et développé depuis une vingtaine d'années une méthode analytique mettant en œuvre la RMN du carbone-13 pour l'identification des constituants des mélanges complexes sans séparation préalable, ou du moins en limitant les procédés de séparation. Cette méthode se base sur l'informatisation de la recherche puisque c'est un logiciel développé au laboratoire qui compare les déplacements chimiques de chacun des carbones du mélange avec ceux des composés présents dans les bibliothèques de spectres.

Trois paramètres doivent être pris en compte pour assurer l'identification d'un composé :

- le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque molécule ;
- le nombre de superpositions des signaux qui peuvent se produire quand différents effets stériques et électroniques font que deux carbones appartenant à deux molécules différentes ont fortuitement le même déplacement chimique ;
- les variations de déplacement chimique (Δδ) des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de produits de référence compilés dans différentes bibliothèques de spectres.

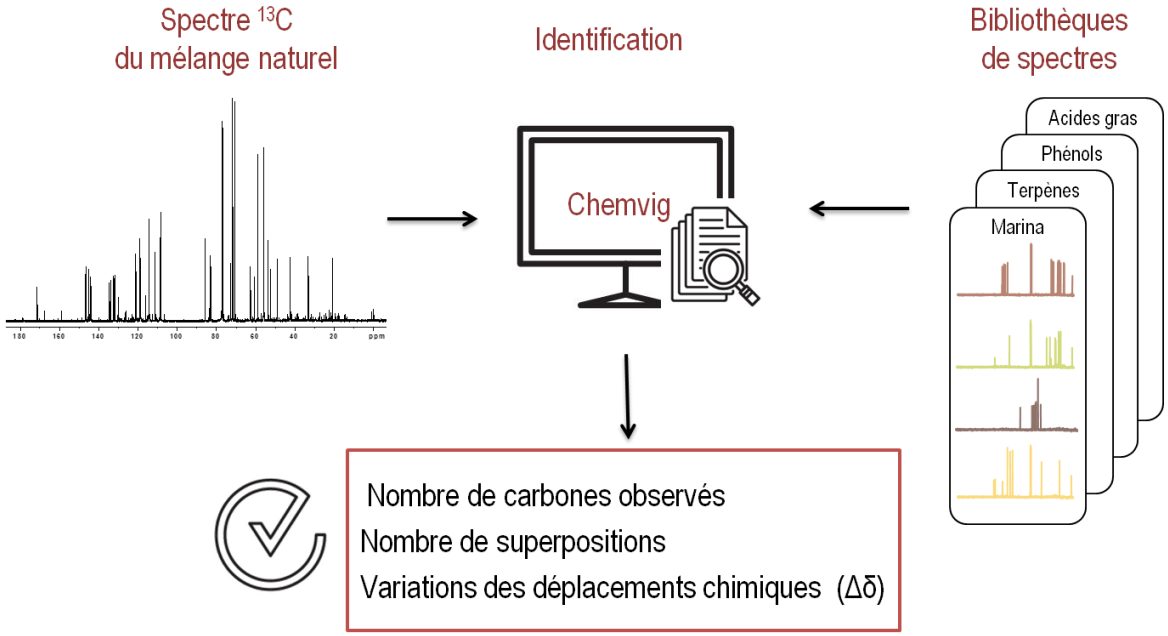


Figure 30 : Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN ^{13}C.

Cette méthode analytique, jusqu'à présent appliquée principalement à l'analyse d'huiles essentielles (HEs) et d'huiles végétales, a permis d'identifier plusieurs familles de molécules (terpènes, flavonoïdes, coumarines, acides gras, sucres, phénols, etc.). Pour se faire, plusieurs bibliothèques de spectres ont été construites à partir de produits commerciaux puis enrichies avec les données spectrales des composés isolés au laboratoire.

De plus, des bibliothèques contenant des données spectrales issues de la littérature ont été ajoutées afin de disposer d'un plus large panel de références. Dans le domaine des huiles essentielles, la grande majorité des spectres de RMN est aujourd'hui enregistrée dans le chloroforme deutéré ($CDCl_3$) assurant ainsi une assez bonne reproductibilité des déplacements chimiques.

Au laboratoire, cette méthode, appliquée aux mélanges de composés volatils, est associée au couplage CPG/SM qui fournit un autre mode d'identification ainsi qu'à la CPG(Ir) pour disposer de données quantitatives. Ceci permet une identification complète de chacun des constituants avec d'une part la série de déplacements chimiques, les fragments de masse, le couple d'indices de rétention sur colonne polaire et apolaire et d'autre part le pourcentage relatif de chacun des contituants du mélange.

En ce qui concerne les mélanges analysés jusqu'à présent au laboratoire (HEs, extraits végétaux, huiles végétales ou résines), on peut dresser le bilan suivant :

- en général les signaux de tous les carbones de la molécule sont observés mis à part quelques carbones quaternaires de composés minoritaires ;
- le nombre de superpositions reste limité et n'empêche pas l'identification des constituants ;
- les variations de déplacements chimiques (Δδ) sont en général inférieures à 0,05 ppm.

Cette méthode permet, par ailleurs, l'identification de molécules:

- qui co-éluent en CPG ;
- de type stéréoisomères dont les spectres de masse sont quasi superposables ;
- thermosensibles (source de faux positifs et d'erreur quantitatives en CPG) ;
- peu ou pas volatiles lors de l'étude d'extraits ou d'huiles végétales.

Elle permet par ailleurs de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique par traitement statistique des compositions chimiques obtenues.

II.3. *Application de la méthode aux extraits d'algues*

Paramètres d'identification

Après une étude bibliographique de la composition chimique des espèces du complexe *Laurencia*, il a fallu adapter les paramètres d'identification des constituants aux extraits d'algues.

Les molécules décrites dans la littérature sont spécifiques aux espèces du complexe *Laurencia*. Il a donc été nécessaire de créer une bibliothèque de spectres adaptée, c'est-à-dire contenant des composés identifiés dans des algues du complexe mais également issues de mollusques pouvant se nourrir de ces algues. Ce travail, initié lors du projet « Marina cosmétique » de l'Université de Corse, a permis de créer une bibliothèque de données spectrales issues de la littérature. Cette bibliothèque contient aujourd'hui plus de 2000 composés de familles variées : terpènes, acétogénines, stérols, composés phénoliques, acides gras, etc. et est constamment enrichie grâce à une veille bibliographique des genres étudiés.

Le fait que notre bibliothèque de spectres comporte uniquement des données issues de la littérature n'assure pas une reproductivité idéale des déplacements chimiques (différence de solvant, de concentration ou encore effet de matrice) et peut entrainer des variations de déplacements chimiques (Δδ) plus importantes que celles observées au laboratoire pour les études sur les HEs.

Par ailleurs, la présence d'halogènes, qui augmente considérablement la masse moléculaire de ces molécules, empêche l'utilisation parallèle de la CPG. L'identification des constituants de nos extraits repose uniquement sur l'analyse du spectre de RMN du carbone 13 du mélange, à partir de séries de déplacements chimiques. La prise en compte de l'intensité des signaux permet aussi de fournir des indications quantitatives succinctes mais suffisantes pour repérer les composés majoritaires.

Ainsi, nous avons établi les paramètres suivants lors de l'utilisation du logiciel d'aide à l'identification :

- une $\Delta\delta < 0{,}20$ ppm : suffisamment élevée pour prendre en compte la variabilité possible due à l'environnement chimique ou aux variations de concentration ou d'appareil utilisé ;
- un minimum de 70% des carbones doivent être observés : ceci permet d'identifier également les molécules minoritaires dont les carbones quaternaires ne seraient pas observés sur le spectre.

Le nombre de superposition n'a, quant à lui, pas de valeur limite compte tenu de la complexité des extraits et fractions étudiés. L'identification de chaque molécule, suggérée par le logiciel, est manuellement confirmée car un nombre de superpositions trop elevé empêche de valider le choix initialement proposé. De plus, il est alors possible de s'assurer de l'homogénéité de la série de déplacements chimiques repérée en tenant compte de l'intensité des signaux liée à la nature de chaque carbone (C, CH, CH_2 ou CH_3).

Schéma analytique

Les quatre extraits de *Laurencia* obtenus ont fait l'objet de la même méthode d'analyse résumée sur le schéma ci-dessous. L'extrait brut a été analysé par RMN ^{13}C à l'aide de la méthode développée au laboratoire. Le logiciel Chemvig a ainsi permis, pour chaque extrait, d'identifier directement plusieurs molécules. Compte tenu de la complexité de ces extraits, seules les séries de déplacements chimiques présentant des intensités relativement élevées et distinguables des autres séries de raies peuvent être attribuées à des molécules. Afin d'étudier plus précisément la composition chimique de ces extraits, ceux-ci ont été soumis à des fractionnements sur colonne de silice avec des gradients de polarité croissante. Ainsi, chaque fraction obtenue a été analysée par RMN ^{13}C dans les mêmes conditions que l'extrait brut, aboutissant à l'identification de molécules connues supplémentaires.

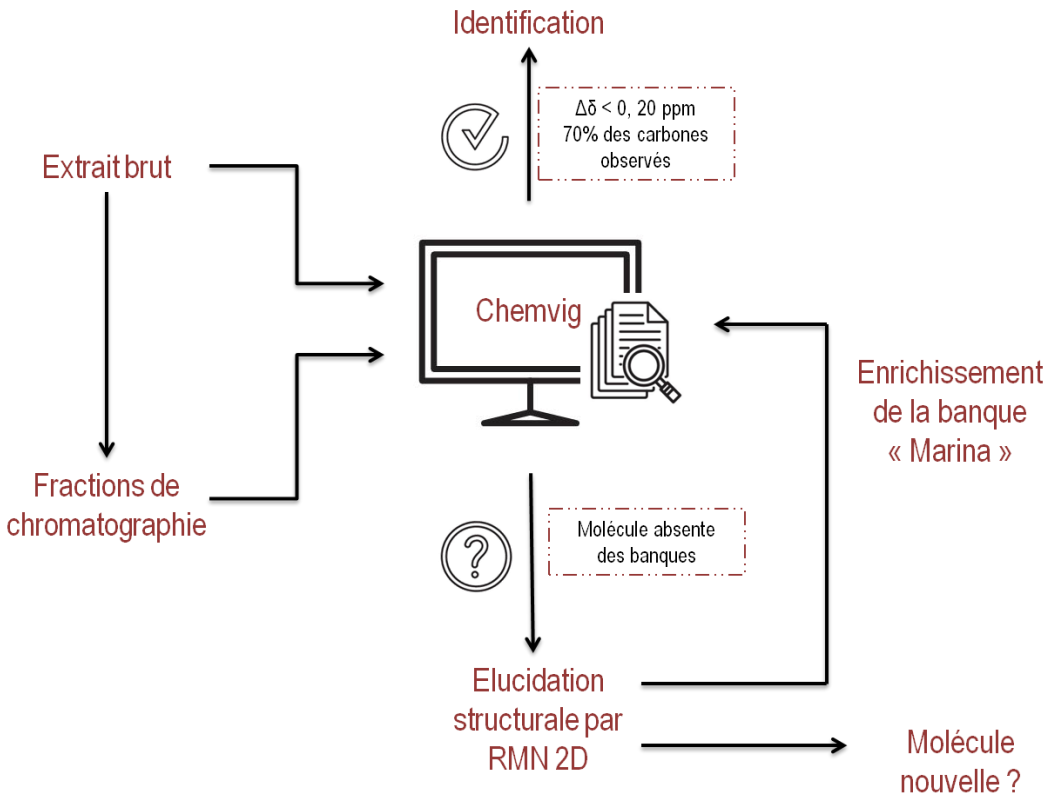


Figure 31 : Schéma analytique

Des séries de déplacements chimiques avec des intensités relativement élevées ne fournissant aucune correspondance avec les données spectrales de la littérature ont également été mise en évidence. Dans ce cas, la fraction enrichie en ce composé non identifié est analysée par RMN bidimensionnelle afin d'établir la structure de la molécule. Après une recherche par comparaison de structure avec les données de la littérature, deux cas sont envisageables :

- La molécule est connue mais s'avère absente de notre bibliothèque de spectres. Dans ce cas, les données de déplacements chimiques de RMN ^{13}C sont introduites, après contrôle, dans notre bibliothèque de spectres contribuant ainsi à son enrichissement ;
- La molécule n'a jamais été décrite et pourrait être nouvelle. Dans ce cas, le fractionnemment est poursuivi afin d'isoler la molécule potentiellement nouvelle. Une caractérisation complète de celle-ci par RMN 1D et 2D, ainsi que par spectrométrie de masse permet d'établir sa structure.

Les expériences de spectrométrie de masse mises en œuvre lors de l'analyse structurale des molécules nouvelles ont été menées en collaboration avec la Plateforme d'Ingénierie et d'Analyses Moléculaires de l'Université d'Angers pour la population 3, et avec la Plateforme de Chimie Analytique de Neuchâtel pour les populations 2 et 4.

III CARACTERISATION CHIMIQUE DE L'EXTRAIT ET FRACTIONS OBTENUS A PARTIR DE LA POPULATION 1

Le spectre de RMN ^{13}C de l'extrait brut obtenu à partir de la population de *L. obtusa* récoltée à Tiuccia à été soumis au logiciel Chemvig. L'interrogation de notre banque « Marina » a permis d'identifier 5 molécules connues à savoir 3 diterpènes : le néorogioldiol, l'obtusadiol et l'O^{11},15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol, et 2 sesquiterpènes : l'obtusénol et le β-snydérol. Cet extrait ne présente pas de molécule ultra majoritaire puisque les déplacements chimiques des 5 molécules identifiées présentent des intensités à peu près équivalentes.

Nous repérons également une série de déplacements chimiques présentant des intensités semblables à celles des composés identifiés mais dont l'interrogation de la banque de données ne donne aucun résultat. Ce métabolite présente des déplacements chimiques caractéristiques d'un bromoallène (73,9 / 201,6 / 102,0 ppm). Ce composé étant majoritaire dans un autre extrait (POP4), nous détaillerons son analyse structurale ultérieurement.

Afin de confirmer la présence de plusieurs composés minoritaires, suggérée par le logiciel d'aide à l'identification, mais avec des notes de concordance non satisfaisantes, nous avons réalisé un fractionnement de cet extrait et soumis les nouvelles fractions à une analyse par RMN ^{13}C.

Les composés proposés ne répondant pas aux critères d'identification précédemment établis ($\Delta\delta < 0,20$ ppm ; 70% des carbones identifiés), ont été enrichis après fractionnements successifs et soumis à des analyses de RMN bidimensionnelle, afin de confirmer ou non leur structure, ou encore d'établir une nouvelle structure.

L'extrait a subi le schéma de fractionnement ci-dessous. Les fractions F1 à F6 ont été chromatographiées à l'aide d'une silice plus fine que lors de la première étape (35-70 µm) en utilisant un gradient de polarité croissante Hexane/AcOEt ou Pentane/AcOEt. L'analyse des sous-fractions F4 et F6 n'a pas permis d'identifier de molécule supplémentaire.

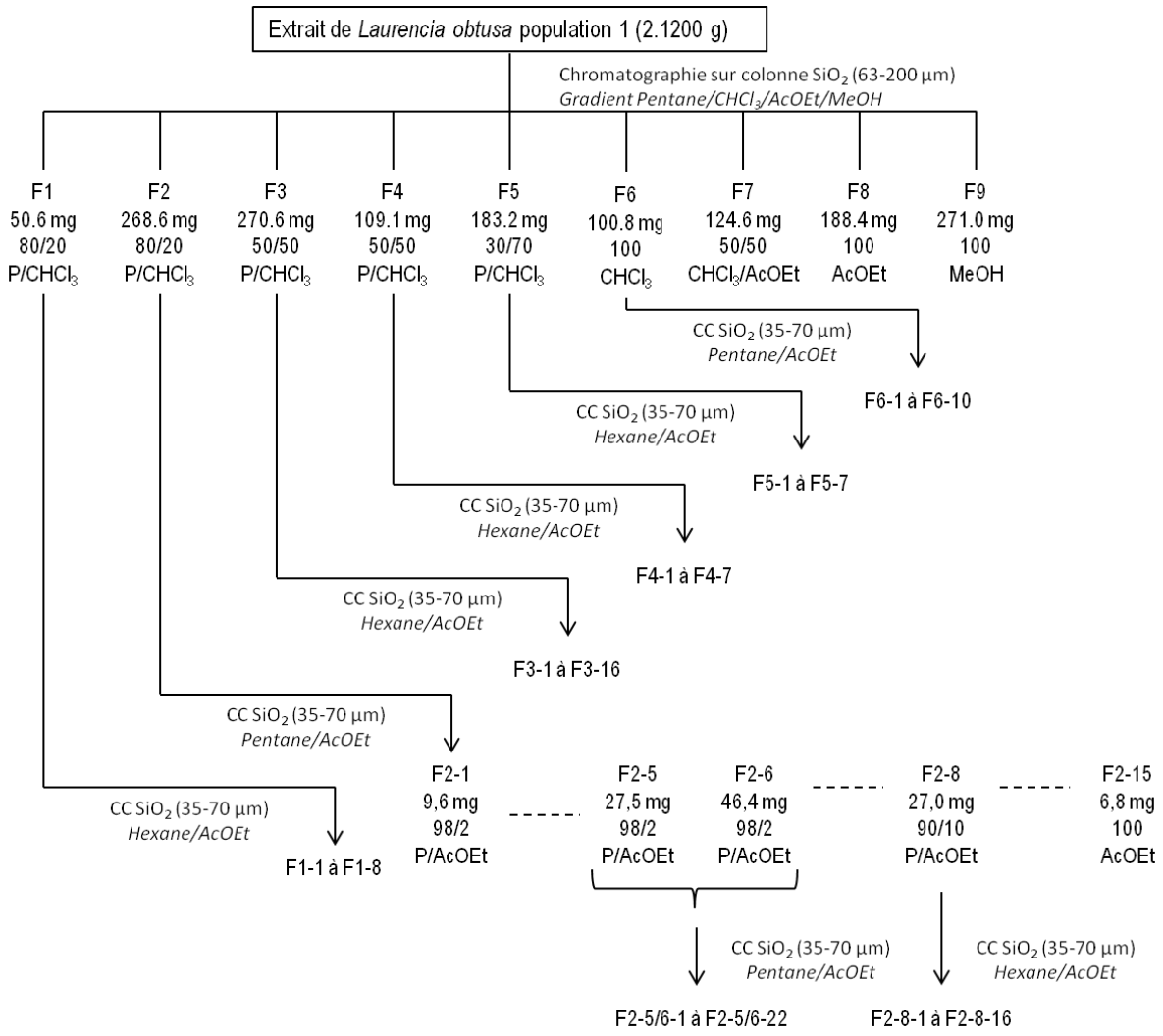


Figure 32 : Fractionnement de l'extrait issu de la population 1

III.1. *Diterpènes identifiés par comparaison avec les données de la littérature*

Au total, 9 diterpènes ont pu être identifiés dans les fractions ou l'extrait de cette population dont 3 directement dans l'extrait total : il s'agit du *O*[11],15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol, du néorogioldiol et de l'obtusadiol.

Six des diterpènes identifiés appartiennent au groupe des prévézanes et néorogiolanes. Ce groupe est composé au total de 8 molécules qui se divisent en 3 structures carbonées. Ces squelettes ont été jusqu'à présent uniquement identifés dans des espèces du complexe *Laurencia*. Ils possèdent tous en commun un cycle hexanique bromé en position 2 et doublement substitué en position 3 par un méthyle et un groupement hydroxyle. La stéréochime de ce cycle est inchangée pour tous les métabolites de ce groupe (les groupements Br et OH présentent une stéréochimie *cis*).

On distingue ensuite 3 systèmes : 1,2-dicyclohexylethane (prévézols A, B et C), 1-cyclohexyldécahydroazulène (prévézols D et E) ou 2-(cyclohexylméthyl)octahydropentalène (néorogioldiol, néorogioldiol B et néorogioltriol).

Le premier métabolite de ce groupe à avoir été identifié, le néorogioldiol, a été isolé à partir d'une population de *L. microcladia* collectée dans la région du Rogiolo en Toscane [69]. Les structures des prévézol A et B ont ensuite été établies à partir d'un extrait de *L. obtusa* de Grèce [67], ainsi que celles des prévézols C, D, E et d'un isomère du néorogioldiol, le néorogioldiol B [68]. Lors de cette dernière étude, la structure du prévézol B a été révisée, et deux autres composés identifiés : le néorogioldiol et l'O^{11},15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol. Enfin, le néorogioltriol a été isolé à partir de *L. glandulifera*, toujours collectée en Grèce [113].

Tous les métabolites de ce groupe semblent provenir d'une voie de biosynthèse commune. En effet, Iliopoulou *et al*. ont proposé une séquence biosynthétique qui permet de former les prévézols A à E, les 2 isomères du néorogioldiol ainsi que l' O^{11},15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol à partir d'un précurseur commun. Cette séquence fait intervenir des réactions de bromination allylique, d'époxidation, d'attaque nucléophile ou encore de cyclisation intramoléculaire [68].

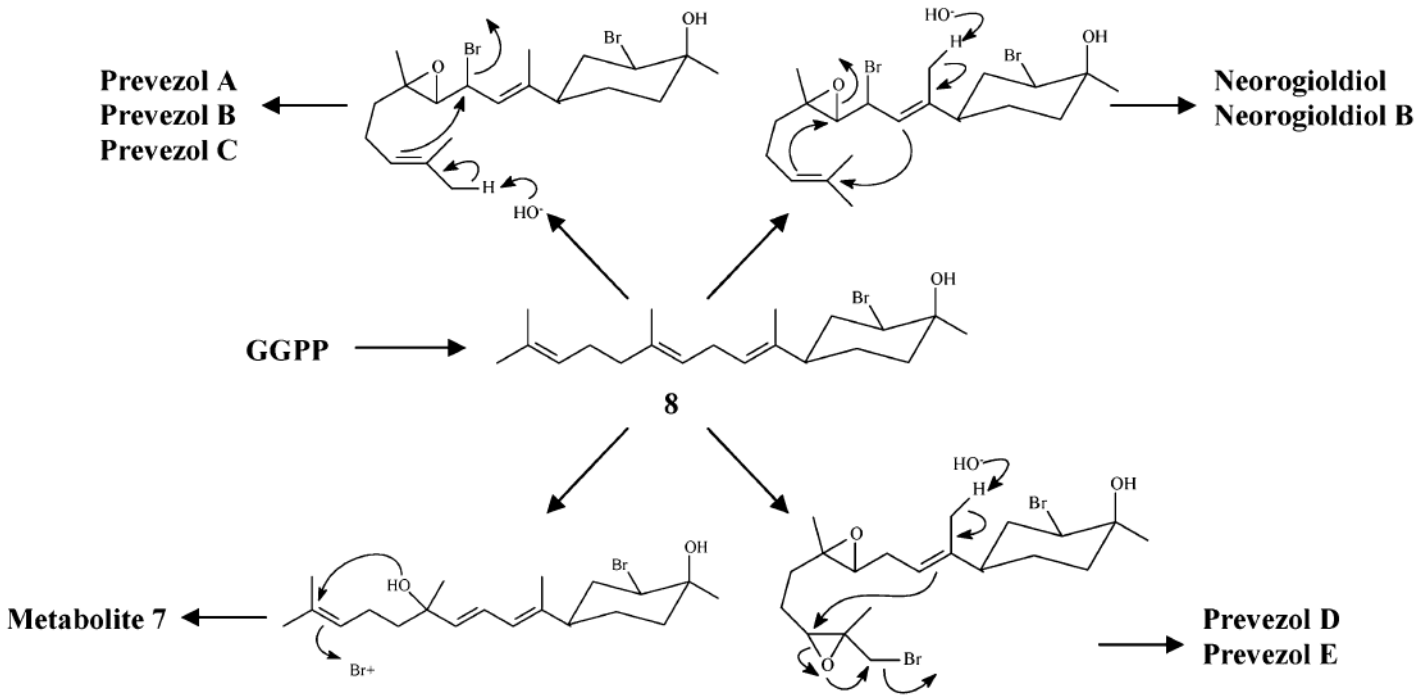
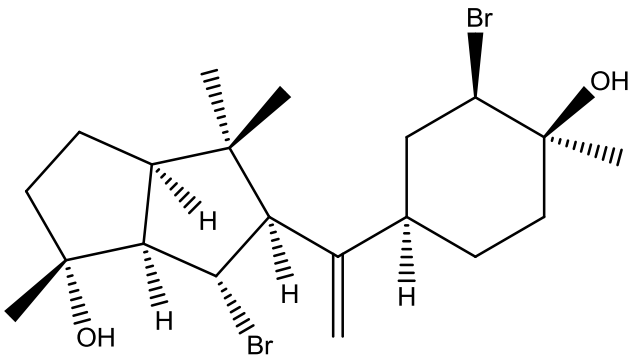


Figure 33 : Voie de biosynthèse des prévézanes et néorogiolanes d'après Iliopoulou *et al* [68].

Dans notre extrait nous avons pu identifier, par comparaison avec les données de la littérature [69], un néorogiolane : le néorogioldiol. Celui-ci a ensuite été fortement concentré dans la sous-fraction F2-11. Tous les carbones, y compris les quaternaires, ont donc tous été repérés. Les variations de déplacements chimiques par rapport aux données de la littérature sont très faibles (la plupart en dessous de 0,05 ppm) hormis pour le méthyle C20 ($\Delta\delta$ = 0,47 ppm). Aucune autre variation notable ne permet cependant pas d'émettre l'hypothèse de la présence d'un isomère et cet écart relève alors probablement d'une erreur typographique dans la description antérieure de ce composé.

Tableau 4 : Structure et déplacements chimiques du néorogioldiol

néorogioldiol		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[3]	Δδ
147,58	147,59	0,01
111,81	111,83	0,02
80,55	80,65	0,10
70,31	70,37	0,06
65,80	65,80	0,00
65,70	65,67	0,03
63,37	63,34	0,03
54,32	54,36	0,04
53,63	53,63	0,00
46,53	46,53	0,00
41,71	41,73	0,02
41,71	41,72	0,01
40,44	40,45	0,01
37,56	37,57	0,01
31,27	31,27	0,00
30,51	30,51	0,00
26,08	26,08	0,00
24,33	24,30	0,03
23,68	23,68	0,00
19,87	19,40	0,47



Néorogioldiol

Les prévézols B et C ont été identifés dans les sous-fractions F2-11 et F3-6 respectivement. Il s'agit de deux isomères qui ne diffèrent que par leur stéréochimie au niveau des carbones C13 et C14. Nous identifions sans difficulté ces deux composés avec des Δδ relativement faibles. Il est intéressant de noter, que malgré leur proximité structurale, chacun possède une série de déplacements chimiques qui lui est propre et suffisamment différente entre les deux isomères pour pouvoir aisément les distinguer.

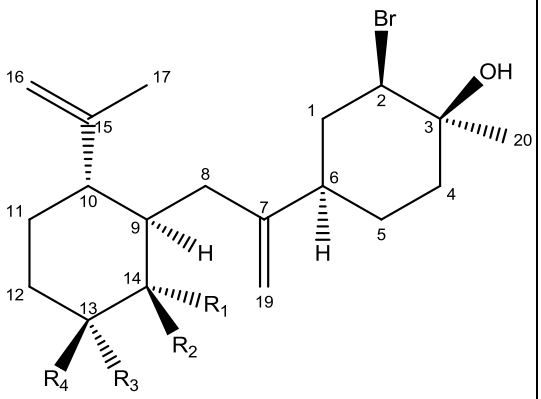
Comme évoqué précédemment, la structure initialement proposée du prévézol B a été révisée deux années plus tard [68]. A la place d'un époxyde situé entre les carbones C12 et C14, les auteurs proposent la présence de deux groupements hydroxyle positionnés sur les carbones C13 et C14.

Cependant, la structure des prévézols B et C a été récemment remise en question. En effet, les données RMN des prévézols B et C obtenus après synthèse énantiosélective [106],[107], présentent des divergences avec les données spectroscopiques des produits isolés à partir des populations de *Laurencia*. Pour autant, aucune autre structure des prévézols B et C n'a été proposée lors de cette étude.

[3] Sous-fraction F2-11

Tableau 5 : Structure et déplacements chimiques des prévézols C et B

prévézol C			prévézol B		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm) [4]	Δδ*	δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[3]	Δδ*
150,2	150,21	0,01	149,6	149,70	0,10
147,3	147,34	0,04	146,7	146,77	0,07
112,1	112,18	0,08	113,1	113,18	0,08
110,2	110,25	0,05	110,2	110,21	0,01
73,8	73,82	0,02	75,9	75,88	0,02
72,3	72,43	0,13	72,9	73,04	0,14
70,3	70,41	0,11	70,4	70,46	0,06
65,7	65,73	0,03	66,0	65,96	0,04
44,2	44,36	0,16	52,6	52,62	0,02
43,7	43,76	0,06	45,8	45,83	0,03
39,9	39,94	0,04	43,1	43,14	0,04
37,4	37,44	0,04	39,4	39,41	0,01
35,6	35,61	0,01	38,3	38,39	0,09
35,2	35,30	0,10	37,6	37,63	0,03
34,6	34,69	0,09	37,6	37,63	0,03
30,5	30,49	0,01	30,5	30,51	0,01
30,1	30,21	0,11	28,6	28,67	0,07
27,6	27,71	0,11	26,8	26,84	0,04
26,1	26,24	0,14	23,5	23,50	0,00
18,6	18,38	0,22	19,1	19.12	0,02



$R_1 = R_4 = OH$, $R_2 = H$, $R_3 = CH_3$: Prévézol B
$R_1 = H$, $R_2 = R_3 = OH$, $R_4 = CH_3$: Prévézol C

**Nous avons comparé les chiffres au dixième de ppm près et au centième de ppm bien que ce ne soit pas mathématiquement correct pour donner un ordre de grandeur. Ceci est valable également pour les tableaux suivants.*

Ces deux composés ne sont pas majoritaires des fractions dans lesquelles ils ont été identifiés. Il n'a donc pas été envisageable de les isoler ou de les caractériser par RMN 2D en mélange afin de confirmer leurs structures.

Un troisième prévézane, le prévézol E, a été identifié après le fractionnement de F3. Celui possède une structure tricylique et contrairement aux composés précédents, la double liaison est exocyclique.

Le dernier diterpène partageant le même cycle hexanique bromé (cycle A), l'*O*[11],15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol, a été identifié directement dans l'extrait brut puis enrichi dans la sous-fraction F2-7.

[4] Sous-Fraction F3-6

Tableau 6 : Structure et déplacements chimiques du prévézol E

prevezol E		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[5]	Δδ
147,7	147,80	0,10
108,0	108,05	0,05
75,9	75,86	0,04
72,8	72,91	0,11
70,4	70,49	0,09
67,2	67,17	0,03
51,0	51,08	0,08
48,1	48,16	0,06
45,6	45,69	0,09
43,7	43,83	0,13
43,0	43,00	0,00
37,7	37,88	0,18
37,6	37,74	0,14
37,3	37,36	0,06
34,7	34,76	0,06
30,5	30,63	0,13
24,8	24,83	0,03
23,4	23,39	0,01
21,0	21,06	0,06
19,3	19,43	0,13

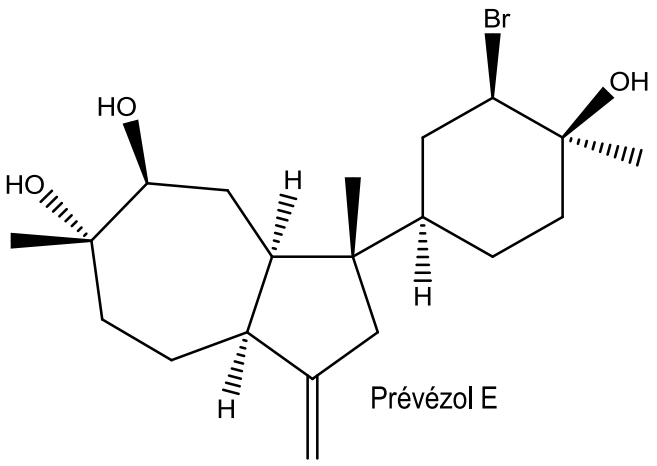
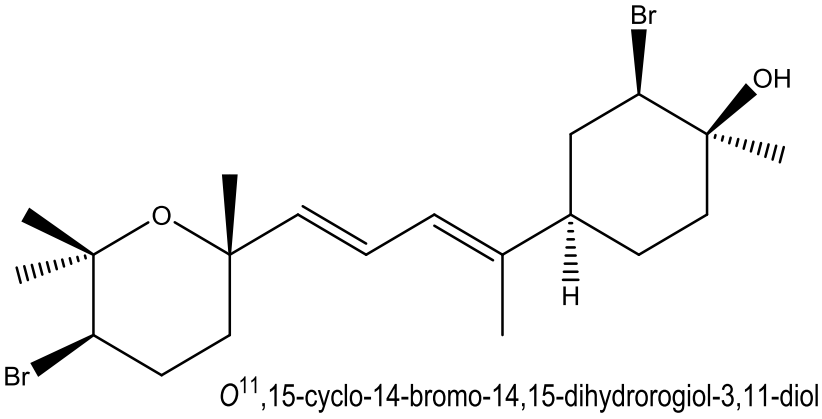


Tableau 7 : Structure et déplacements chimiques de l'*O*[11],15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol

O[11],15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[6]	Δδ
140,60	140,59	0,01
140,31	140,31	0,00
123,77	123,77	0,00
122,43	122,44	0,01
74,74	7474	0,00
73,66	73,67	0,01
70,24	70,27	0,03
65,76	65,74	0,02
59,45	59,47	0,02
48,54	48,53	0,01
38,77	38,75	0,02
37,43	37,43	0,00
32,50	32,41	0,09
30,58	30,58	0,00
29,36	29,36	0,00
28,83	28,86	0,03
28,79	28,79	0,00
27,67	27,65	0,02
25,82	25,80	0,02
14,93	14,93	0,00

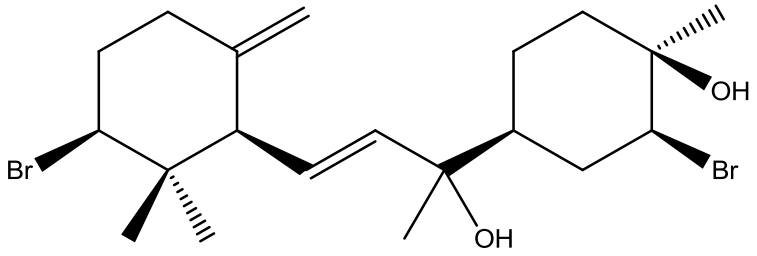


[5] Sous-fraction F3-8
[6] Fraction F2-7

Nous identifions également dans l'extrait brut, puis comme composé majoritaire de la sous-fraction F2-11, l'obtusadiol. Ce composé est le premier diterpène présentant le squelette obtusane. Celui-ci a initialement été décrit à partir d'une population de *L. obtus*a récoltée en Grèce [39], puis dans *L. microcladia* dans la région du Rogiolo [116]. Le groupe des obtusanes ne contient que 8 diterpènes identifés dans le complexe *Laurencia*. La plupart des diterpènes de ce groupe partagent la même fonction *cis*-1,2-bromohydrine.

Tableau 8 : Structure et déplacements chimiques de l'obtusadiol

obtusadiol		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[7]	$\Delta\delta$
147,2	147,16	0,04
139,1	138,92	0,18
126,8	126,90	0,10
110,3	110,27	0,03
74,3	74,38	0,08
70,3	70,30	0,00
66,4	66,48	0,08
66,2	66,12	0,08
56,5	56,41	0,09
49,7	57,56	0,14
41,1	41,08	0,02
37,5	37,53	0,03
36,6	36,53	0,07
34,9	34,91	0,01
34,8	34,83	0,03
30,4	30,44	0,04
29,5	29,44	0,06
26,1	26,19	0,09
22,0	21,93	0,07
16,1	16,10	0,00



Obtusadiol

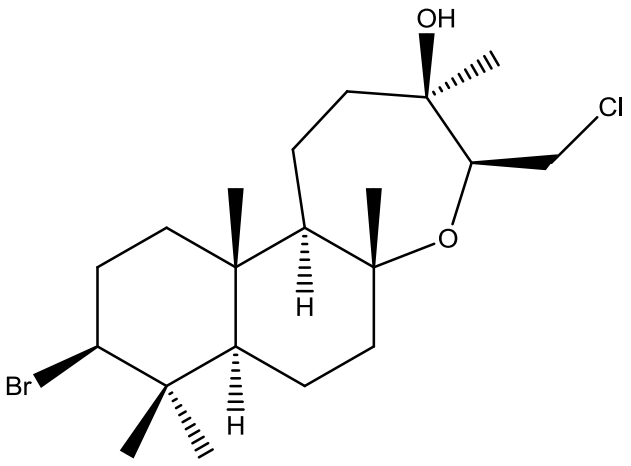
Malgré leur large abondance dans le complexe *Laurencia*, les labdanes ne sont représentés dans notre échantillon que par un seul représentant. La plupart des labdanes décrits dans le complexe sont bicycliques voire tricycliques et contiennent un squelette bicyclo[4.4.0]décanique. Le composé identifié ici est le seul contenant une partie oxépane. Celui-ci a été précédemment isolé de *L. obtusa* en Grèce [66].

Il a été identifié comme composé minoritaire de la sous-fraction F2-8-10. Par conséquent, sa faible concentration dans celle-ci a rendu impossible l'observation de ses carbones quaternaires sur le spectre ^{13}C.

[7] Fraction F2-11

Tableau 9 : Structure et déplacements chimiques du composé de type labdane

composé de type labdane		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[8]	Δδ
78,7	78,80	0,10
74,5	74,58	0,08
72,5	nd*	
69,0	69,00	0,00
57,9	57,97	0,07
56,3	56,41	0,11
45,4	45,42	0,02
44,7	44,75	0,05
40,9	41,02	0,12
39,7	nd	
38,9	39,00	0,10
37,3	nd	
30,7	30,79	0,09
30,4	30,51	0,11
24,9	24,94	0,04
24,0	24,05	0,05
22,3	22,40	0,10
18,1	18,13	0,03
17,7	17,78	0,08
16,2	16,22	0,02



** nd = non détecté*

III.2. *Elucidation structurale des diterpènes absents des banques de données*

Composé A

Le composé majoritaire de la fraction F5-4, noté A, est absent de notre bibliothèque de spectre « Marina ». Sur le spectre RMN ^{13}C de cette fraction, nous identifions 20 raies de résonance appartenant à la molécule recherchée. La séquence DEPT nous a permis de distinguer :

- 4 atomes de carbone quaternaires dont 1 sp^2 (150,13 ppm) et 3 sp^3 (36,70 ; 70,50 et 73,06 ppm) ;
- 4 méthines aliphatiques (67,23 ; 51,04 ; 45,31 et 71,97 ppm) ;
- 7 méthylènes aliphatiques (34,74 ; 37,70 ; 21,04 ; 37,27 ; 33,72 ; 32,09 et 41,22 ppm) et 1 méthylène éthylénique (110,05 ppm) ;
- 3 méthyles (22,89 ; 18,81 et 30,56 ppm).

Deux des carbones quaternaires et l'un des méthines possèdent des déplacements chimiques typiques d'atomes de carbone liés à une fonction hydroxyle (71,97 ; 70,50 et 73,06 ppm). La valeur de 67,23 ppm de l'un des méthines suggère la présence d'un atome de brome lié à celui-ci. Ces informations permettent de proposer la formule brute $C_{20}H_{33}O_4Br$ indiquant 4 centres d'insaturation, parmi lesquels une double liaison exocyclique (150,13 et 110,05 ppm). Les trois autres centres d'insaturation correspondent donc à 3 cycles. L'interrogation de la bibliothèque de spectres « Marina » nous oriente vers une molécule à squelette prévézane.

[8] Sous Fraction F2-8-10

La complexité du spectre ^{1}H ainsi que la présence dans la fraction d'une molécule comportant des déplacements chimiques proches de ceux de la molécule que nous recherchons, rendent difficile l'observation des corrélations ^{1}H-^{13}C sur le spectre HSQC.

Nous pouvons cependant, à l'aide des spectres COSY, HSQC et HMBC (Annexe A) constituer un premier cycle (cycle A). Celui-ci partage les même subsitutants que les prévézols décrits précédemment.

L'ensemble des données RMN 1D et 2D permet de suggérer ensuite la présence d'une structure bicyclo[4.4.0]décanique. La double liaison exocyclique a été positionnée en position 15 grâce aux corrélations HMBC observés entres les protons H18 et les carbones C14 et C16.

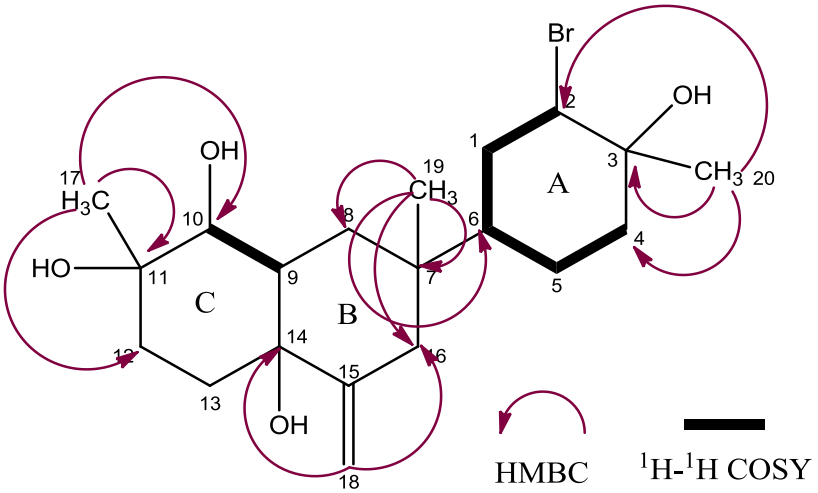


Figure 34 : Structure proposée pour le composé A

La correlation HMBC entre les protons du méthyle C19 et le carbone C6 permet de relier la structure bicyclique au cycle A. La structure proposée semble cohérente vis-à-vis des déplacements chimiques et de la multiplicité des carbones observés. Cependant, la difficulté à observer les corrélations COSY entre les protons H9 et H8 ainsi qu'entre H12 et H13, en raison de la complexité du spectre ^{1}H, ne permet pas de valider de manière certaine la structure de la molécule.

Par ailleurs, l'enregistrement de spectres ^{1}H dans des solvants deutérés tels que la pyridine ou l'acétone n'a pas permis d'oberver les signaux des protons des hydroxyles, ce qui aurait pu nous fournir des informations quant à la configuration relative de la molécule par l'observation de correlations NOESY.

Le composé A présente beaucoup de similitudes avec le prévézol E puisqu'il possède notamment les mêmes substitutions sur les carbones C2, C3, C7, C10, C11 et C15. La principale différence entre ces deux composés concerne l'ajout d'une fonction hydroxyle sur le carbone C14 ainsi que la structure bicyclique. En effet, le prévézol E comporte une structure bicyclo[4.4.0]décanique tandis que les données de RMN bidimensionnelles obtenues pour la molécule A nous orientent plutôt vers une structure bicyclo[5.3.0]décanique. La faible quantité de ce produit et sa dégradation assez rapide ne nous ont pas permis d'aller plus avant dans son élucidation structurale

Tableau 10 : Données RMN ^{1}H et ^{13}C relatives au composé A

C	DEPT	δ ^{13}C (ppm)	δ ^{1}H (ppm)	multiplicité (J (Hz))	COSY ^{1}H – ^{1}H	HMBC H → C
1	CH_2	34,74	a 2,22	m	H1b ; H2 ; H6	
			b 2,03	m	H1a ; H2 ; H6	C2 ; C6
2	CH	67,23	4,16	m	H1a ; H1b	C1
3	C	70,50				
4	CH_2	37,70	2,10	m	H5	
5	CH_2	21,04	1,57	m	H4 ; H6	
6	CH	51,04	1,23	m	H1a ; H1b	
7	C	36,70				
8	CH_2	37,27	a 1,82	m		C7 ; C19
			b 1,47	m		C19
9	CH	45,31	1,66	m		
10	CH	71,97	4,40	d (11,6)	H9	C9 ; C11 ; C17
11	C	73,06				
12	CH_2	33,72	a 2,09	m	H12b	C11
			b 1,91	m	H12a	C11
13	CH_2	32,09	1,78	m	H12a ; H12b	
14	C	72,77				
15	C	150,13				
16	CH_2	41,22	a 2,40	m	H16b ; H18a ; H18b	C7 ; C15 ; C18 ; C19
			b 1,81	m	H16a	C14 ; C15 ; C18
17	CH_3	22,89	1,36	s		C10 ; C11 ; C12
18	CH_2	110,05	a 4,93	s	H16a	C14 ; C16
			b 4,80	s	H16a	C14 ; C16
19	CH_3	18,81	0,78	s		C6 ; C7 ; C8 ; C16
20	CH_3	30,56	1,32	s		C2 ; C3 ; C4

Composé B

Le spectre de la fraction F7 était largement dominé par une série de 20 carbones. Le logiciel Chemvig suggère la présence du néorogioltriol mais plusieurs Δδ sont supérieurs à 0.20 ppm. Une étude par RMN bidimensionnelle (Annexe B) a donc été menée sur cette fraction afin de confirmer, ou non, la présence du néorogioltriol.

Le spectre ^{13}C ainsi que la séquence DEPT a permis de mettre en évidence 4 carbones quaternaires, 6 méthines, 6 méthylènes et 4 méthyles. Parmis ces 20 signaux, on note notamment la présence d'une double liaison (150,2 / 110,9 ppm) ainsi que 3 déplacements chimiques caractéristiques de carbones liés à une fonction hydroxyle (70,3 / 76,3 / 80,7 ppm). Les séquences HSQC et COSY ont permis d'établir la structure linéaire de la molécule. Le spectre HMBC a quant à lui permis de mettre en évidence sa structure tricyclique et de positionner les 4 méthyles (Figure 32).

La structure plane de notre composé correspond donc à celle du néorogioltriol. Les différences de déplacements chimiques pourraient alors s'expliquer par une éventuelle différence de stéréochimie [113]. Une séquence NOESY a donc été enregistrée à partir de la fraction F7. Les corrélations observées entre le proton H2 et ceux du méthyle C16 ainsi que H6 permettent de positionner le brome et la fonction hydroxyle de manière cis. De la même façon, les corrélations entre H14 / H19 / H6 permettent de placer ces protons de l'autre côté de la molécule. Enfin, on peut également grâce au spectre NOESY positionner les protons des méthyles C18 et C20 ainsi que H9 à l'avant du composé. La configuration relative des carbones C2, C3, C9 et C11 correspond donc à celle indiquée dans la littérature pour le néorogioltriol. Cependant, la superposition des signaux des protons H10 et H8 ne nous permet pas de conclure sur la stéréochimie des carbones C8 et C10. La faible quantité de ce produit et sa dégradation assez rapide ne nous ont pas permis d'aller plus avant dans son élucidation structurale.

Tableau 11 : Données RMN ^{1}H et ^{13}C relatives au composé B

C	DEPT	δ ^{13}C litt (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	Δδ	δ ^{1}H (ppm)	multiplicité (J (Hz))	COSY ^{1}H – ^{1}H	HMBC H → C	NOESY ^{1}H – ^{1}H
1	CH_2	40,7	40,68	0,02	a 2,30	m	H1b ; H2 ; H6	C3	H2
					b 1,90	m	H1a ; H2 ; H6	C6	
2	CH	65,5	65,36	0,14	4,12	dd (14,3 ; 7,2)	H1a ; H1b	C1 ; C3	H1a ; H5a ; H16
3	C	70,3	70,49	0,19	-				
4	CH_2	37,6	37,60	0,00	a 2,08	m	H4b ; H5a ; H5b		
					b 1,48	m	H4a ; H5a ; H5b	C5	
5	CH_2	26,1	25,97	0,13	a 1,84	m	H5b ; H4a ; H4b		
					b 1,56	m	H5a ; H4a ; H4b ; H6		
6	CH	46,5	46,47	0,03	1,83	m	H5b		H16
7	C	150,2	149,85	0,35	-				
8	CH	64,0	63,64	0,36	2,19	m	H9	C15 ; C19 ; C20	
9	CH	76,3	76,39	0,09	3,76	dd (10,4 ; 8,8)	H8 ; H10	C11	H17a ; H17b ; H18 ; H20
10	CH	61,1	60,67	0,43	2,19	m	H8 ; H14		
11	C	80,7	80,91	0,21	-				
12	CH_2	41,3	41,35	0,05	a 1,65	m	H12b ; H13a ; H13b	C11	
					b 1,51	m	H12a ; H13a		
13	CH_2	23,9	23,86	0,04	a 1,80	m	H10 ; H12a ; H12b		H14
					b 1,56	m	H10 ; H12b		H14
14	CH	51,8	51,88	0,08	2,57	br t (9,7)	H10 ; H13a ; H13b		H13a ; H13b ; H19
15	C	40,8	40,69	0,11	-				
16	CH_3	30,5	30,40	0,10	1,33	s		C2 ; C3 ; C4	H2
17	CH_2	110,9	111,00	0,10	a 5,19	s	H17b	C6 ; C7 ; C8	H9
					b 4,84	s	H17a	C6 ; C7 ; C8	H9
18	CH_3	24,1	23,95	0,15	1,43	s		C10 ; C11 ; C12	H9
19	CH_3	31,8	31,61	0,19	1,00	s		C8 ; C14 ; C15 ; C20	H14
20	CH_3	20,2	20,16	0,04	0,65	s		C8 ; C14 ; C15 ; C19	H9

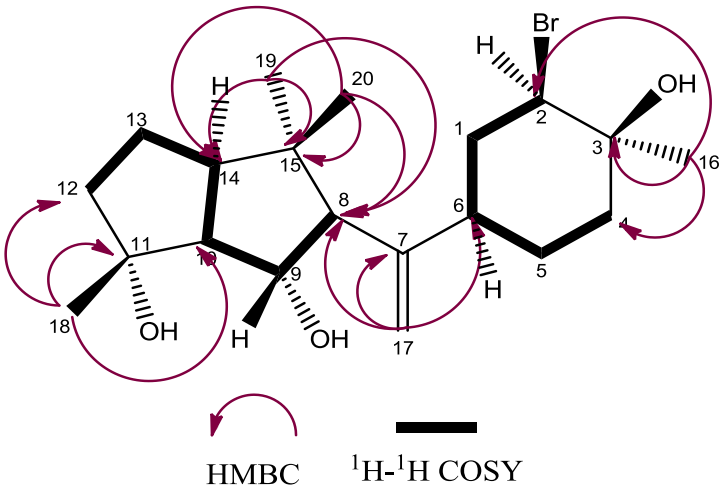


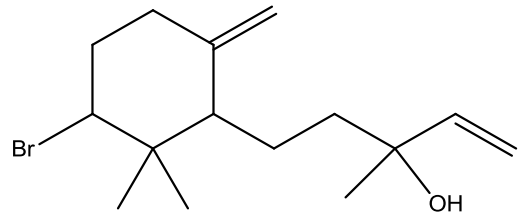
Figure 35 : Structure proposée pour le composé B

III.3. *Sesquiterpènes identifiés par comparaison avec les données de la littérature*

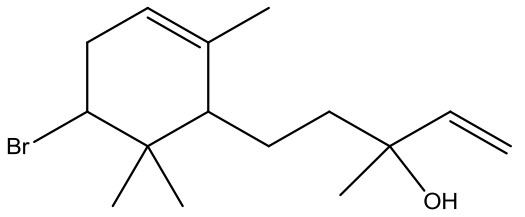
Les deux isomères du snydérol, l'α- et le β- snydérol ont été identifiés dans la sous-fraction F2-8. Ces deux sesquiterpènes avaient déjà été décrits dans des populations de *L. obtusa* [26], [43].

Tableau 12 : Structure et déplacements chimiques de l'α- et du β-snydérol

α-snydérol			β-snydérol		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[9]	Δδ	δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[9]	Δδ
145,1	144,66	0,44	145,60	145,55	0,05
137,0	136,74	0,26	144,90	145,01	0,11
120,7	120,68	0,02	111,80	111,81	0,01
112,0	112,10	0,10	109,00	109,16	0,16
73,4	73,38	0,02	73,30	73,29	0,01
65,0	65,25	0,25	67,10	67,37	0,17
50,5	50,27	0,23	53,10	53,14	0,04
44,4	44,23	0,17	41,90	41,68	0,22
39,2	39,35	0,15	41,30	41,24	0,06
35,4	35,30	0,10	37,40	37,41	0,01
28,5	28,42	0,08	35,90	35,92	0,02
27,7	27,76	0,06	28,40	28,41	0,01
23,5	23,40	0,10	28,10	27,74	0,36
22,2	22,12	0,08	20,60	20,58	0,02
15,7	15,59	0,11	16,40	16,36	0,04



β-snydérol



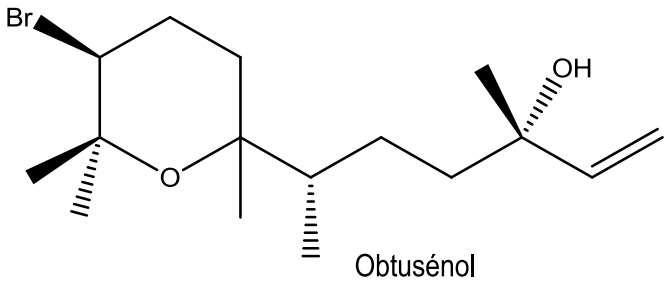
α-snydérol

L'obtusénol, précédemment décrit dans une population de *L. obtusa* de la mer Egée [59], a été identifié directement dans l'extrait brut. Ce sesquiterpène possède un squelette assez original puisqu'il possède un cycle tétrahydropyranique. Il possède également la même terminaison que les isomères du snydérol.

[9] Sous-fraction F2-8

Tableau 13 : Structure et déplacements chimiques de l'obtusénol

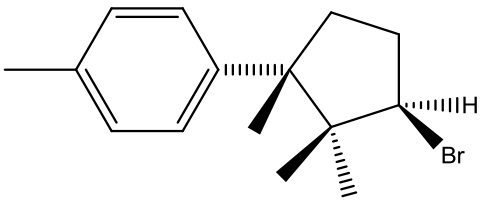
obtusénol		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[10]	Δδ
144,8	144,73	0,07
112,1	112,06	0,04
76,2	76,15	0,05
75,7	75,62	0,08
73,4	73,38	0,02
68,5	68,42	0,08
57,6	57,82	0,08
40,6	40,45	0,15
38,3	38,18	0,12
30,9	30,87	0,03
28,6	28,53	0,07
28,4	25,37	0,03
27,5	27,36	0,14
23,6	23,48	0,12
19,8	19,73	0,07



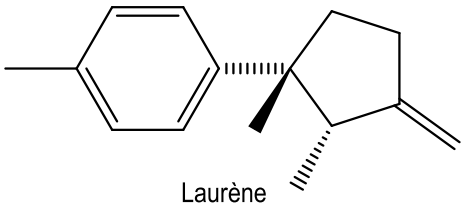
L'α-bromocuparène a été initialement décrit à partir de l'huile essentielle de *L. glandulifera*, et son isomère, l'α-isobromocuparène dans l'huile essentielle de *L. okamurai* [117]. Ce sont les deux premiers cuparanes décrits comme produits naturels issus de macroalgue. L'α-bromocuparène a été identifié dans la fraction F1 et ses déplacements chimiques ont été comparés à ceux du composé identifié dans *L. microcladia* [118]. Ce composé a été décrit dans plusieurs espèces du complexe, mais c'est la première fois qu'il a été identifié dans une population de *L. obtusa*.

Tableau 14 : Structure et déplacements chimiques de l'α-bromocuparène et du laurène

α-bromocuparène			laurène		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[11]	Δδ	δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[11]	Δδ
143,9	144,00	0,10	157,4	157,49	0,09
135,5	135,48	0,02	144,4	144,46	0,06
128,2	128,21	0,01	134,8	134,78	0,02
128,2	128,21	0,01	128,6	128,62	0,02
127,4	127,38	0,02	128,6	128,62	0,02
127,4	127,38	0,02	126,9	126,88	0,02
62,1	62,01	0,09	126,9	126,88	0,02
48,4	48,48	0,08	105,6	150,59	0,01
47,4	47,46	0,06	50,5	50,48	0,02
36,5	36,55	0,05	49,0	48,96	0,04
33,1	33,14	0,04	34,7	34,75	0,05
25,1	25,09	0,01	29,7	29,60	0,10
22,4	22,50	0,10	29,2	29,18	0,02
20,9	20,91	0,01	20,9	20,95	0,05
20,8	20,86	0,06	17,3	17,25	0,05



α-bromocuparène



Laurène

[10] Extrait brut
[11] Fraction F1

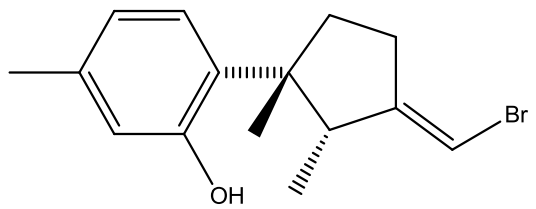
Le laurène, identifié dans la même fraction, a également été décrit à partir d'une population de *L. glandulifera* en 1965 [119] et sa stéréochimie a été établie deux années plus tard [120]. Comme la molécule précédente, le laurène a été décrit dans de nombreuses espèces du genre *Laurencia* mais jamais dans *L. obtusa*. Ses données RMN ont été obtenues à partir d'un extrait de *L. filiformis* [121], dans lequel d'autres dérivés du laurane ont également été isolés.

Deux autres lauranes ont été identifiés après chromatographie de la fraction F2. L'*iso*-laurénisol, a été initialement isolé d'une population de *Laurencia* sp. cf. *gracilis* [49] puis retrouvé dans *L. obtusa*.

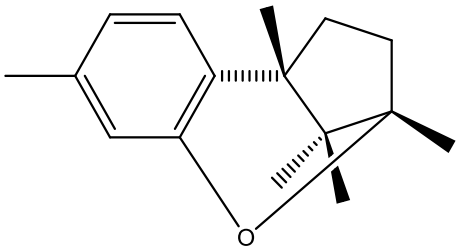
Le composé suivant n'a été décrit qu'à partir de l'espèce *L. okamurai* avec une dizaine d'autres sesquiterpènes du même type. Ce composé à la particularité de présenter un époxyde entre les carbones C3 et C7 [122].

Tableau 15 : Structure et déplacements chimiques de l'*iso*-laurénisol et du composé de type laurane

iso-laurénisol			composé de type laurane		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[12]	Δδ	δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[13]	Δδ
155,0	155,08	0,08	152,4	152,40	0,00
152,9	152,92	0,02	137,0	137,00	0,00
137,2	137,21	0,01	130,5	130,49	0,01
130,6	130,61	0,01	124,0	124,04	0,04
128,2	128,22	0,02	120,6	120,69	0,09
121,6	121,50	0,10	115,8	115,90	0,10
116,5	116,51	0,01	86,2	86,19	0,01
98,3	98,28	0,02	45,7	45,72	0,02
49,6	49,56	0,04	41,4	41,37	0,03
48,9	48,81	0,09	41,0	41,06	0,06
33,6	33,57	0,03	30,1	30,08	0,02
28,7	28,74	0,04	21,0	21,02	0,02
25,7	25,64	0,06	20,5	20,55	0,05
20,7	20,72	0,02	18,2	18,21	0,01
19,0	19,10	0,10	15,0	14,96	0,04



Iso-laurénisol

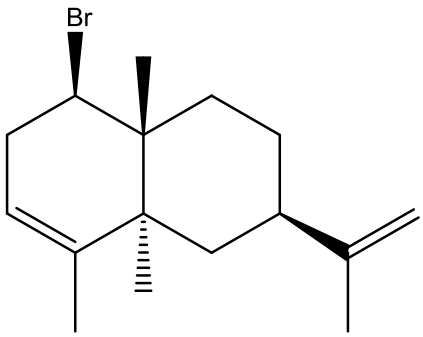


Enfin, le dernier sesquiterpène identifié dans cet extrait est un sélinane (eudesmane). Il a été récemment isolé à partir d'une population de *L. pinnata* [123]. Cet extrait est riche en eudesmanes, et au vu de leur faible abondance dans le complexe, les auteurs suggèrent que leur présence dans cette population peut être perçue comme un marqueur chimiotaxonomique.

[12] Sous-fraction F2-5
[13] Sous-fraction F2-2

Tableau 16 : Structure et déplacements chimiques du 1β-bromosélin-3,11-diène

1β-bromosélin-3,11-diène		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[14]	Δδ
150,1	150,09	0,01
135,5	135,50	0,00
120,5	120,47	0,03
108,7	108,73	0,03
65,7	65,67	0,03
48,1	48,01	0,09
46,0	46,00	0,00
38,6	38,55	0,05
38,1	38,11	0,01
36,0	35,98	0,02
29,5	29,55	0,05
26,8	26,78	0,02
20,9	20,90	0,00
20,7	20,77	0,07
10,9	10,87	0,03



1β-bromosélin-3,11-diène

III.4. *Elucidation structurale des sesquiterpènes absents des banques de données*

Composé C (Laurintérol)

Nous avons pu identifier de nombreux composés dans la fraction F2, dont des sesquiterpènes, des acétogénines « én-yne » ou encore des bromoallènes. Cette fraction reste néanmoins assez complexe à analyser au vue du nombre de composés qu'elle contient. Nous avons donc entrepris un fractionnement de celle-ci. Sur les spectres des sous-fractions F2-5 et F2-6, une série de 15 déplacements chimiques d'intensité importante est aisément repérée mais ne corrèle pas avec des données issues de notre bibliothèque. Nous avons tenté d'isoler la molécule inconnue après une autre étape de fractionnement. Le composé C est donc très largement majoritaire de la sous-fraction F2-5/6-8 (Annexe C).

Les séquences DEPT 135 et 90 ont permis de mettre en évidence :

- 4 carbones quaternaires sp^2 (153,27 ; 135,97 ; 134,01 et 114,92 ppm) et 2 sp^3 (48,01 et 29,60 ppm).
- 2 méthines sp^2 (132,34 et 118,83 ppm) et 1 aliphatique (24,38 ppm)
- 3 méthylènes (35,92 ; 25,28 et 16,19 ppm)
- 3 méthyles (23,51 ; 22,22 et 18,62 ppm)

Le spectre ^{1}H permet quant à lui de mettre en évidence la présence de deux protons aromatiques (7,60 s et 6,61 s) confirmant la présence d'un benzène tétrasubstitué. Nous notons également la présence d'un singulet élargi à 5,17 ppm qui ne corrèle avec aucun des carbones de la molécule sur le spectre HSQC. Il pourrait donc s'agir du proton d'un groupement hydroxyle. Le méthylène qui résonne à 16,19 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec un groupement de deux protons à 0,54 ppm. Cette valeur

[14] Sous-fraction F1-2

blindée est caractéristique de la présence d'un cyclopropane. Ces informations orientent notre recherche vers une structure de cycle cyclolaurane qui comporte un groupement hydroxyle.

Tableau 17 : Données RMN ^{1}H et ^{13}C relatives au composé C

Carbone	Multiplicité	Laurintérol		Composé C		Δδ
		δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	
1	C	153,44	-	153,27	-	0,17
2	CH	118,98	6,61	118,83	6,61	0,15
3	C	136,11	-	135,97	-	0,14
4	C	115,05	-	114,92	-	0,13
5	CH	132,48	7,61	132,34	7,60	0,14
6	C	134,20	-	134,01	-	0,19
7	C	48,16	-	48,01	-	0,15
8	CH_2	36,08	1,31	35,92	1,28	0,16
			2,09		2,05	
9	CH_2	25,43	1,66	25,28	1,63	0,15
			1,95		1,92	
10	CH	24,54	1,15	24,38	1,13	0,16
11	C	29,74	-	29,60	-	0,14
12	CH_3	18,75	1,32	18,62	1,31	0,13
13	CH_3	23,63	2,30	23,51	1,40	0,12
14	CH_3	22,34	1,41	22,22	2,29	0,12
15	CH_2	16,35	0,58	16,19	0,54	0,16
			0,55			

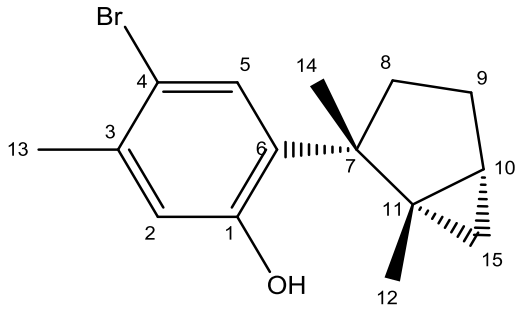


Figure 36 : Structure du laurintérol

La recherche d'une telle structure nous mène vers le laurintérol. La comparaison des données RMN du laurintérol avec le composé C nous permet d'identifier cette molécule avec des Δδ relativement faibles [124]. Nous notons uniquement une inversion d'attribution des protons H13 et H14 par rapport aux données de la littérature.

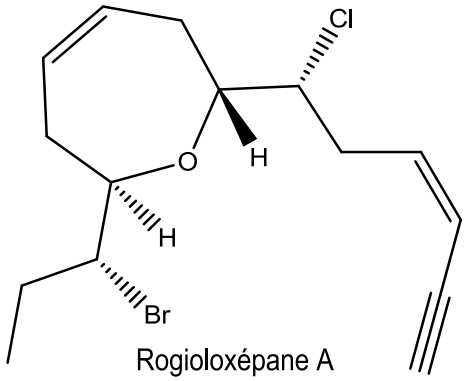
III.5. *Acétogénines identifiées par comparaison avec les données de la littérature*

Nous avons identifié dans la sous-fraction F2-3 deux acétogénines contenant des cycles éther à 7 membres. Les oxépanes sont assez rares dans le complexe *Laurencia* avec 13 composés décrits jusqu'à présent, et la plupart ont été identifiés dans *L. microcladia*. Ils sont tous formés par étherification entre les carbones C7 et C12.

Le rogioloxépane A et la rogiolényne D ont été décrits dans des populations de *L. microcladia* dans la région du Rogiolo (Toscane) [117],[118]. Ces deux composés ont en commun la même terminaison « én-yne » avec une stéréochimie *Z* et portent un atome de chlore sur le carbone C6. Ils diffèrent par leur chaine latérale : le rogioloxépane A est substitué par une chaine 1-bromopropargyle sur le carbone C12 tandis que la rogiolényne D est doublement substituée avec un groupement éthyle sur le carbone C11 et un bromoéthyle sur le carbone C12.

Tableau 18 : Structure et déplacements chimiques du rogioloxépane A

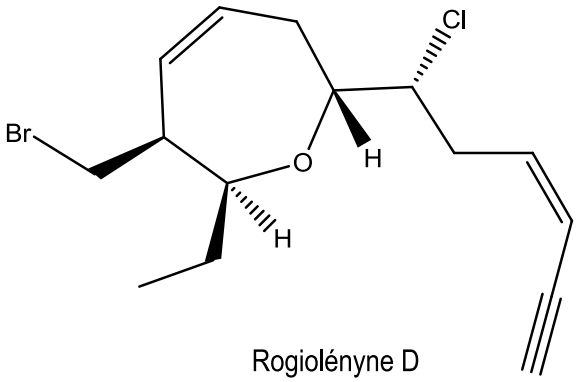
rogioloxépane A		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[15]	Δδ
141,42	141,43	0,01
128,17	128,16	0,01
127,85	127,84	0,01
110,66	110,65	0,01
82,38	82,39	0,01
79,96	79,89	0,07
77,06	77,06	0,00
77,03	77,03	0,00
64,41	64,41	0,00
62,78	62,81	0,03
34,92	34,86	0,06
32,63	32,66	0,03
31,08	30,10	0,02
28,43	28,43	0,00
12,78	12,79	0,01



Rogioloxépane A

Tableau 19 : Structure et déplacements chimiques de la rogiolényne D

rogiolényne D		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[15]	Δδ
141,23	141,24	0,01
132,78	132,76	0,02
128,29	128,30	0,01
110,68	110,68	0,00
82,41	82,43	0,02
79,99	79,89	0,10
77,40	77,35	0,05
76,79	76,79	0,00
64,52	64,51	0,01
47,58	47,54	0,04
34,81	34,81	0,00
33,65	33,71	0,06
29,62	29,57	0,05
25,19	25,32	0,13
11,14	11,12	0,01



Rogiolényne D

[15] Fraction F2-3

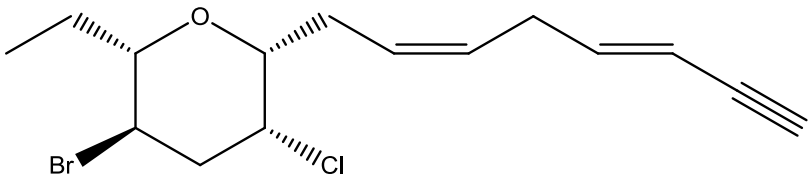
L'extrait ayant permis d'identifier le rogioloxépane A comportait également un C_{15} acyclique : le prérogioloxépane. Les auteurs suggèrent que ce composé pourrait être biosynthétisé à partir de la laurencényne après époxydation entre les carbones C6 et C7 et attaque d'un ion chlorure. Ce composé peut ensuite générer le rogioloxépane par cyclisation intramoléculaire.

Nous identifions également dans la même sous fraction une acétogénine à 6 membres. Les acétogénines contenant un tétrahydropyrane (THP) sont également rares dans le complexe avec 14 composés décrits jusqu'à présent. Plusieurs systèmes de cyclisation sont possibles : *i)* un unique THP, *ii)* un THP lié à à un THF par un méthylène ou un méthine bromé, *iii)* un THF et un THP joints, ou *iv)* deux THP.

La srilankényne, initialement isolé du mollusque *Aplysia oculifera* possède un seul cycle tétrahydropyranique [127]. On ne dénombre que 5 ACG contenant un unique THP, et ceux-ci ont été décrits à partir de mollusques du genre *Aplysia*, de *L. obtusa* ou encore d'une espèce de *Laurencia* non identifiée. La singularité de ce type d'actéogénine pourrait constituer un marqueur chimiotaxonomique.

Tableau 20 : Structure et déplacements chimiques de la srilankényne

srilankényne		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[15]	Δδ
143,96	143,99	0,03
128,48	128,51	0,03
126,04	125,97	0,07
109,17	109,09	0,08
83,83	83,79	0,04
82,80	82,81	0,01
78,73	78,66	0,07
76,32	76,29	0,03
60,47	60,44	0,03
46,54	46,54	0,00
43,85	43,91	0,06
31,08	30,02	0,06
30,87	30,86	0,01
26,19	26,16	0,03
9,28	9,34	0,06



Srilankényne

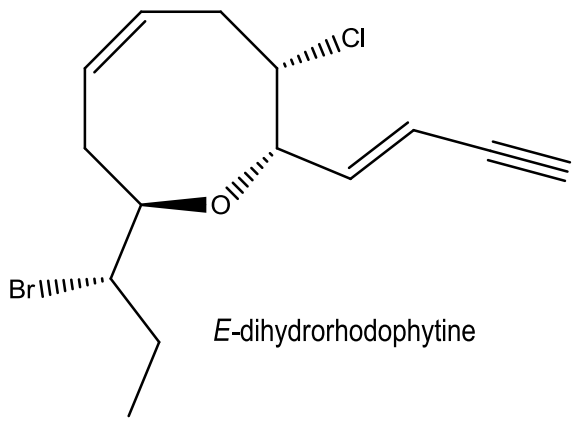
Deux autres acétogénines ont été identifiées dans la sous-fraction F2-4. Il s'agit de deux oxocanes, la *E*-dihydrorhodophytine et le microcladallène A. Le groupe des oxocanes est le groupe d'acétogénines le plus important au sein du complexe *Laurencia*.

La *E*-dihydrorhodophytine a été précédemment décrite à partir d'une population de *L. pinnatifida* (synonyme *d'Osmundea pinnatifida*) avec son isomère *Z* [128].

Le microcladallène A possède un second cycle ether (THP). Il a été initialement isolé de *L. microcladia* [129]. Ses données spectroscopiques ont été décrites par la suite à partir d'un extrait de *Laurencia* sp. récoltée dans les eaux Japonaises (Okinawa) [130]. Il a été identifié dans la sous-fraction F2-4 avec des Δδ faibles (la plupart inférieurs à 0,05 ppm). Seule la valeur du carbone C15 diffère avec les données de la littérature, mais aucune autre variation notable de permet de suggérer la présence d'un isomère.

Tableau 21 : Structure et déplacements chimiques de la *E*-dihydrorhodophytine

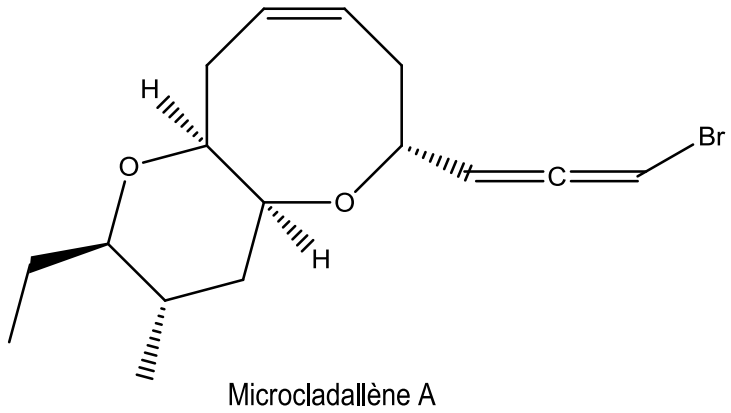
E-dihydrorhodophytine		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[16]	Δδ
141,24	141,02	0,22
130,32	130,25	0,07
127,65	127,58	0,07
112,65	112,37	0,28
82,50	82,40	0,10
79,33	79,16	0,17
77,13	77,01	0,12
73,49	73,28	0,21
64,24	64,25	0,01
61,69	61,48	0,21
38,60	38,43	0,17
33,72	33,56	0,16
30,28	30,17	0,11
29,78	29,67	0,11
12,45	12,30	0,15



E-dihydrorhodophytine

Tableau 22 : Structure et déplacements chimiques du microcladallène A

microcladallène A		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[16]	Δδ
203,1	203,07	0,03
129,1	129,09	0,01
129,0	129,02	0,02
99,9	99,88	0,02
83,4	83,42	0,02
80,6	80,85	0,25
74,6	74,60	0,00
74,5	74,55	0,05
70,2	70,15	0,05
49,3	49,33	0,03
43,7	43,63	0,07
31,4	31,29	0,11
31,1	31,09	0,01
26,4	26,35	0,05
11,0	9,76	1,24



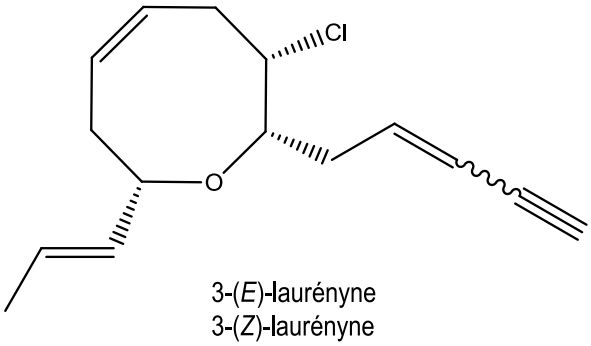
Microcladallène A

Deux oxocanes supplémentaires ont été identifiés dans la sous-fraction F2-3, il s'agit des isomères *E* et *Z* de la laurényne. La 3-*Z*-laurényne a été initialement décrite à partir d'une population de *L. yonaguniensis* au Japon [131], puis identifiée dans *L. nangii* [132] et le mollusque *Aplysia dactylomela* [93]. C'est donc la première fois que ce composé est décrit dans une population de *L. obtusa*, contrairement à la 3-*E*-laurenyne dont la description initiale a été effectuée à partir d'un extrait de *L. obtusa* provenant de Turquie [92]. Ses données RMN ont été comparées aux données spectrales du produit issu d'une synthèse [133].

[16] Sous-fraction F2-4

Tableau 23 : Structures et déplacements chimiques des laurénynes

3-(*E*)-laurényne			3-(*Z*)-laurényne		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[17]	Δδ	δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[17]	Δδ
142,1	142,06	0,04	141,8	141,74	0,06
131,8	131,82	0,02	132,1	132,09	0,01
131,2	131,19	0,01	131,1	131,08	0,02
128,5	128,48	0,02	128,6	128,53	0,07
126,8	126,73	0,07	126,2	126,22	0,02
111,6	111,64	0,04	110,2	110,21	0,01
82,2	82,18	0,02	82,1	82,13	0,03
81,7	81,70	0,00	81,7	81,70	0,00
79,0	79,06	0,06	80,2	82,13	0,03
76,3	76,26	0,04	79,1	79,06	0,04
65,0	64,98	0,02	65,3	65,29	0,01
38,1	38,11	0,01	35,3	35,33	0,03
34,8	34,80	0,00	34,9	35,04	0,14
34,4	34,45	0,05	34,5	34,53	0,03
17,8	17,77	0,03	17,8	17,77	0,03



3-(*E*)-laurényne
3-(*Z*)-laurényne

III.6. *Elucidation structurale des acétogénines absentes des banques de données*

Composé D

Le fractionnement des sous-fraction F2-5 et F2-6, mis en oeuvre pour identifier le laurintérol, a permis de mettre en evidence un autre composé absent de nos bibliothèques de spectres. En effet, les spectres ^{13}C des sous-fractions F2-5/6-13 à F2-5/6-16 sont dominés par une série de 15 raies de résonance. Ces sous-fractions ont été réunies et l'échantillon obtenu a été soumis à une étude de RMN bidimensionnelle. La séquence DEPT nous a permi de distinguer :

- 6 méthines aliphatiques (38,95 ; 80,38 ; 82,40 ; 82,64 ; 51,98 et 84,86 ppm) et 2 éthyléniques (128,53 et 126,85 ppm) ;
- 4 méthylènes (38,19 ; 29,81 ; 32,19 et 23,57 ppm) ;
- 1 méthyle (7,32 ppm).

Sur le spectre ^{13}C, on observe également un signal à 76,18 ppm, dont l'intensité relative est similaire aux méthines du composé D, ainsi qu'un signal à 79,86 ppm, dont l'intensité, 3 fois inférieure à celle des autres carbones de la molécule, pourrait correspondre à un carbone quaternaire. Aucun de ces 2 carbones n'apparait cependant sur le DEPT.

Cette observation nous oriente vers un alcyne puisque la constante de couplage ^{13}C-^{1}H très inhabituellement élevée de ce type de composé peut générer des signaux innatendus sur les spectres HSQC et HMBC, ainsi que des signaux de signe opposé à celui attendu sur la séquence DEPT[134]. Ceci est confirmé par la présence sur le spectre ^{1}H des 2 signaux caractéristiques de la terminaison « Br-yne » des acétogénines (2,67 d et 4,57 dd). On n'observe aucune corrélation HSQC entre le proton à 2,68 et l'un ou l'autre carbone à 76,18 et 79,86 ppm (Annexe D).

[17] Sous-fraction F2-3

L'un des méthines restants possède un déplacement chimique caractéristique d'un carbone lié à un halogène (51,98 ppm) et les autres à des carbones liés à des atomes d'oxygène. Les séquences HSQC et COSY permettent d'établir la structure linéaire du composé D.

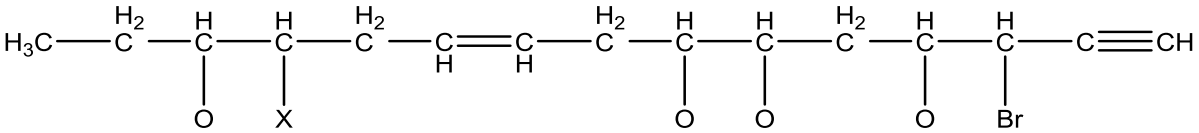


Figure 37: Structure linéaire du composé D

Le composé D a été purifié sur HPLC mais nous n'avons pas pu obtenir sa masse exacte malgré les différentes techniques mises en œuvre[18]. Nous ne pouvons donc ni établir la formule brute de la molécule, ni la nature des groupements oxygénés avec certitude. Cependant les valeurs des carbones portant les oxygènes semblent plutôt correspondre à des éthers qu'à des groupements hydroxyles. Nous nous orientons alors vers une structure bicyclique. La séquence HMBC a permis de confirmer la présence d'un premier cycle éther à 9 membres puisque le proton H13 corrèle avec le carbone C7. Seuls 12 acétogénines à 9 membres ont été décrits dans le complexe *Laurencia*, dont un dans l'espèce *L. obtusa* (obtusényne).

Malheureusement, nous n'observons pas sur notre spectre HMBC de corrélation liant les positions 7 et 4 et permettant de confirmer la présence d'un second cycle éther à 5 membres.

Tableau 24: Données RMN ^{1}H et ^{13}C relatives au composé D

C	δ ^{13}C (ppm)	DEPT	δ ^{1}H (ppm)	multiplicity (J (Hz))	COSY ^{1}H – ^{1}H	HMBC H → C	NOESY ^{1}H – ^{1}H
1	79,86*	CH	2,67	d (2,4)	H3	C3	
2	76,18*	C					
3	38,95	CH	4,57	dd (8,1 ; 2,4)	H1 ; H4	C1 ; C2 ; C4	H4
4	80,38	CH	4,11	m	H3 ; H5a ; H5b		H6
5	38,19	CH_2	2,41	m	H4 ; H6	C3	H4 ; H6
			2,13	m	H4 ; H6	C3	
6	82,40	CH	3,96	ddd (9,3 ; 5,4 ; 3,9)	H5a ; H5b ; H7	C13	H5a ; H13 ; H14
7	82,64	CH	4,09	m	H6 ; H8a ; H8b		H8b
8	29,81	CH_2	2,76	q (11,4)	H7 ; H9	C9 ; C10 ; C7	H11a
			2,31	m	H7 ; H9	C9 ; C10	
9	128,53	CH	5,68	dt (10,7 ; 5,4)	H8a ; H8b ; H10	C11	H8b
10	126,85	CH	5,78	dt (10,7 ; 5,1)	H9 ; H11a ; H11b	C8	H11b
11	32,19	CH_2	3,40	m	H10 ; H12	C9 ; C10	H8a
			2,39	m	H10 ; H12		
12	51,98	CH	4,16	m	H11a ; H11b		H13 ; H15
13	84,86	CH	3,36	m	H12 ; H14	C15 ; C12 ; C6	H12 ; H14 ; H6
14	23,57	CH_2	1,83	m	H13 ; H15	C13 ; C12 ; C15	H13
15	7,32	CH_3	0,93	t (7,4)	H14	C13 ; C14	H12 ; H14

[18] Des solvants et combinaisons de solvants, qui possèdent des pouvoirs de protonation différents, ont été testés : DCM, AcOEt, ACN, MeOH, MeOH/H_2O ; ainsi que plusieurs mode d'ionisation : ESI (ElectronSpray Inonization) et APCI (Atmospheric Pression Chemical Ionization) ; et différents détecteurs : QTRAP (quadripôle) et QTOF (Time Of Flight).

Nous nous orientons tout de même vers la recherche d'un composé bicyclique qui devrait correspondre à la structure plane suivante.

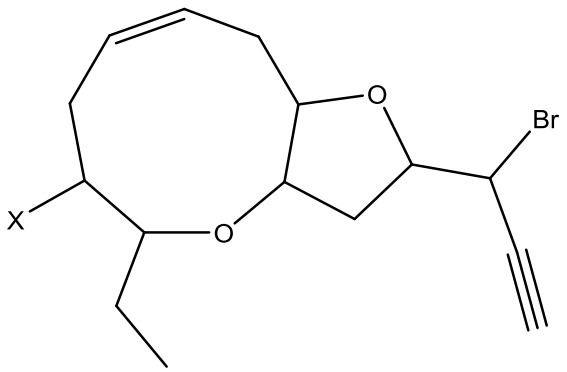


Figure 38 : Structure plane proposée pour le composé D

Trois composés, qui diffèrent du composé D par leur terminaison, possèdent la même structure bicyclique : l'isolaurallène, le néolaurallène et l'itomanallène. Ces trois composés ont la même composition moléculaire et diffèrent uniquement par la stéréochimie des méthines oxygénés. Nous pouvons donc considérer, étant donné la faible variation entre le carbone C12 des 3 molécules et le carbone C12 du composé D, que celui-ci est également substitué par un brome.

Les attributions des déplacements ^{13}C n'ayant pas été établies pour chacune des molécules, il nous est difficile d'établir précisément d'où provient la différence entre le composé D et les trois molécules connues. On peut cependant noter que la valeur du méthyle C15 diffère selon la stéréochimie du cycle à 9 membres. En effet, dans le cas du néolaurallène et de l'itomanallene A (stéréochimie *trans*) le carbone C15 résonne autour de 11 ppm, tandis que sa valeur est de 7,7 ppm lorsque le cycle à une configuration *cis*. De plus, deux des valeurs de méthines fournies dans la littérature pour l'isolaurallène semblent correspondre aux valeurs des méthines C6 et C13 de notre composé. Enfin, la stéréochimie *cis* de ce premier cycle éther est confirmée par la corrélation NOESY observée entre les protons H-6 et H-13.

Tableau 25 : Comparaison des déplacements chimiques du néolaurallène, itomanallène, isolaurallène et du composé D

	Neolaurallène [132]	Itomanallène A [135]	Isolaurallène** [136]	Composé D
C6	73,7	72,7	82,9	82,40
C13	84,5	84,4	85,0	84,86
C15	11,9	11,4	7,7	7,32
C12	53,7	52,8	52,3	51,98

*** Les carbones ne sont pas attribués dans les données issues de la littérature. Ils ont donc été attribués par comparaison avec les autres composés.*

Le même raisonnement n'a pas pu être appliqué pour déterminer la stéréochimie relative du tétrahydrofurane puisque la proximité de la fonction terminale induit forcément une variation de déplacements chimiques lorsqu'on passe du bromoallène à la terminaison bromopropargylique. De plus, les valeurs des protons H4 et H7 étant très proches, et par conséquent leur signaux superposés, il nous est difficile d'établir ou non la présence d'une corrélation sur le spectre NOESY.

Nous avons donc comparé les déplacements chimiques du composé D avec ceux d'un composé issu de la synthèse de l'isolaurallène, dont la structure plane correspond à celle du composé D [136].

Tableau 26 : Comparaison des déplacements chimiques du Composé D et du composé de synthèse SI-A-24

Carbone	SI-A-24*	Composé D	Δδ
	δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)	
1	79,8	79,86**	0,06
2	76,3	76,18**	0,12
3	37,9	38,95	1,05
4	80,0	80,38	0,38
5	37,6	38,19	0,59
6	83,3	82,40	1,20
7	83,8	82,64	1,16
8	29,4	29,81	0,41
9	128,3	128,53	0,23
10	127,0	126,85	0,15
11	32,3	32,19	0,11
12	52,5	51,98	0,52
13	85,7	84,86	0,84
14	23,9	23,57	0,33
15	7,7	7,32	0,38

** Les carbones ne sont pas attribués dans les données issues de la littérature. Ils ont donc été attribués par comparaison avec les autres composés.*
*** Les carbones C1 et C2 peuvent être inversés.*

Les variations de déplacements chimiques sont relativement importantes pour certains carbones. Nous pensons donc que notre composé ne correspond pas à celui décrit lors de cette synthèse. Aucune expérience permettant de déterminer la stéréochimie des méthines restants n'a pu être réalisée à cause du manque de quantité du composé D.

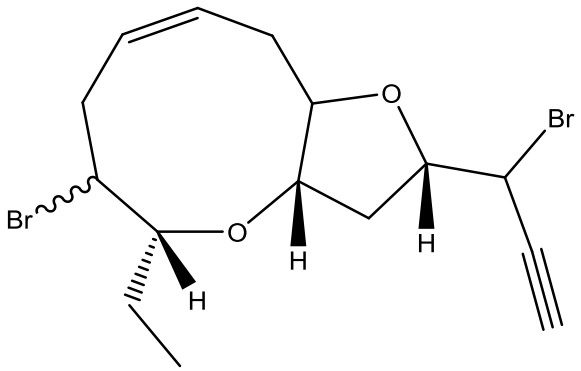


Figure 39 : Structure présumée du composé D

Composé E

Le spectre ^{13}C de la sous-fraction F2-8, largement dominé par la présence du β-snydérol, contenait également entre autre une série de 17 déplacements chimiques non identifiée après interrogation de la bibliothèque de spectres « Marina ». Après une seconde étape de fractionnement, le composé recherché (composé E) a été enrichi dans la sous-fraction F2-8-10.

Les déplacements chimiques de ce composé présentent de grandes similitudes avec le composé 1 isolé de la population 4, avec des Δδ inférieures à 0,20 ppm pour 8 des carbones de la molécule (Annexe E).

Les séquences RMN ^{13}C et DEPT 135 ont permis de mettre en évidence :

- 2 carbones quaternaires : 201,63[19] et 170,38 ppm ;
- 9 méthines : 73,85 ; 102,00 ; 74,74 ; 52,86 ; 78,67 ; 75,39 ; 71,68 ; 47,66 et 83,62 ;
- 4 méthylènes : 43,09 ; 36,08 ; 40,37 et 26,38 ;
- 2 méthyles : 9,68 et 21,09.

On note donc la présence d'une terminaison bromoallène [δ_H 6,11 (1H, dd, *J* = 5,6 ; 1,3 Hz, H1) et 5,66 (1H, dd, *J* = 7,3 ; 5,6 Hz, H3); δ_C 73,85 (C1),102.00 (C3) et 201,63 (C2)] ainsi que d'un groupement acétate [δ_H 2,13 (1H, s) ; δ_C 170,38 et 21,09]. Nous nous orientons donc vers un analogue acétylé du composé 1 de la population 4.

L'enregistrement des spectres HSQC et COSY de la sous-fraction a permis de confirmer la structure linéaire suivante.

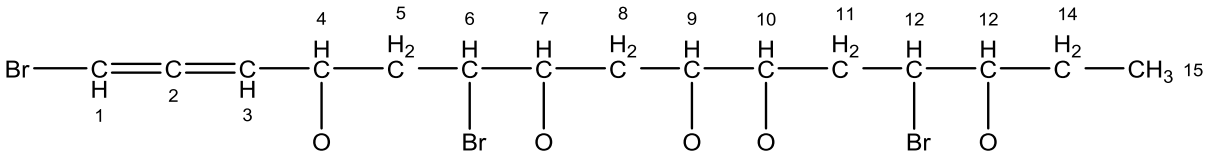
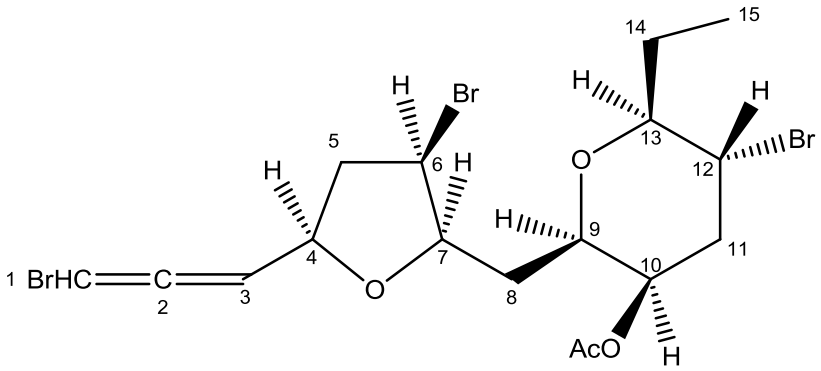


Figure 40: Structure linéaire du composé E

Les Δδ les plus importantes concernent les carbones C9 à C11. Nous suggérons donc que le composé E est substitué par un acétate sur le carbone C10, à la place d'un hydroxyle pour le composé 1 de la population 4. On observe en effet un déblindage de ces trois carbones ainsi que du proton H10 (+ 1,12 ppm).



Composé E

Figure 41 : Structure proposée pour le composé E

La faible quantité de cette sous-fraction ne nous a pas permis d'isoler ce composé et donc d'enregistrer un spectre HMBC ainsi qu'un spectre de masse, nécessaires pour confirmer cette structure.

[19] Ce carbone n'est plus observé sur le spectre de la molécule enrichie puisque sa quantité est insuffisante.

Tableau 27 : Données RMN ^{1}H et ^{13}C relatives au composé E

Carbones	Multiplicité	Composé 1 POP4		Composé E		Δδ
		δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	
1	CH	73,94	6,11	73,85	6,11	0,09
2	C	201,63	-	nd	-	-
3	CH	102,01	5,66	102,00	5,65	0,01
4	CH	74,83	4,64	74,74	4,63	0,09
5	CH_2	43,01	2,97	43,09	2,96	0,08
			2,46		2,44	
6	CH	53,08	4,46	52,86	4,44	0,22
7	CH	79,09	3,89	78,67	3,93	0,42
8	CH_2	36,20	2,01	36,08	1,87	0,12
			1,85		1,75	
9	CH	77,16	3,71	75,39	3,82	1,77
10	CH	69,75	3,75	71,68	4,87	1,96
11	CH_2	43,17	2,60	40,37	2,61	2,80
			2,13		2,18	
12	CH	47,95	4,03	47,66	3,90	0,29
13	CH	83,53	3,38	83,62	3,39	0,09
14	CH_2	26,36	2,06	26,38	2,10	0,02
			1,51		1,51	
15	CH_3	9,57	0,97	9,68	0,98	0,11
OAc	C			170,38	-	
	CH_3			21,09	2,13	

IV CARACTERISATION CHIMIQUE DE L'EXTRAIT ET FRACTIONS OBTENUS A PARTIR DE LA POPULATION 2

La seconde population étudiée dans ce chapitre a été récoltée à Ajaccio. L'extrait obtenu par macération dans de l'acétate d'éthyle a été analysé par RMN et soumis au logiciel Chemvig afin d'identifier les molécules majoritaires. Cette analyse a permis de mettre en évidence que l'α-snydérol constitue le composé majoritaire de cet extrait. Deux acétogénines présentant une terminaison « bromopargylique » ont également été identifiées.

Afin d'apporter plus de précision à cette étude, l'extrait a été soumis à un fractionnement sur gel de silice, avec un gradient de solvant allant d'une faible polarité (hexane) à une polarité plus importante (acétate d'éthyle puis méthanol). Nous avons alors obtenu 9 fractions (F1 à F9) qui ont été analysées de la même manière que l'extrait brut pour identifier leurs composants. Les fractions présentant une complexité encore trop importante ou pour lesquelles le composé majoritaire n'a pas pu être identifié (F1, F2, F4, F5, F6) ont à nouveau été fractionnées sur gel de silice utilisant le même gradient de solvant mais avec une silice plus fine. L'analyse des sous-fractions de F2, F5 et F6 n'a pas permis d'identifier de molécule supplémentaire.

L'analyse des sous-fractions de F4 a permis de mettre en évidence une série de raies de résonances non identifiée par rapport aux données de la littérature. Ce composé a été purifié après plusieurs étapes de fractionnement (CC et Sephadex) et sa structure a été déterminée par RMN bidimensionnelle. Il s'agit d'un sesquiterpène présentant le squelette du γ-snydérol. Sa présence dans cet extrait avec d'autres snydérols (α et β) est discutée dans un article soumis dans le journal BSE.

Au total, 17 composés connus ont pu être identifiés : 9 sesquiterpènes, 5 acétogénines « Br-yne » et 3 acétogénines « én-yne ».

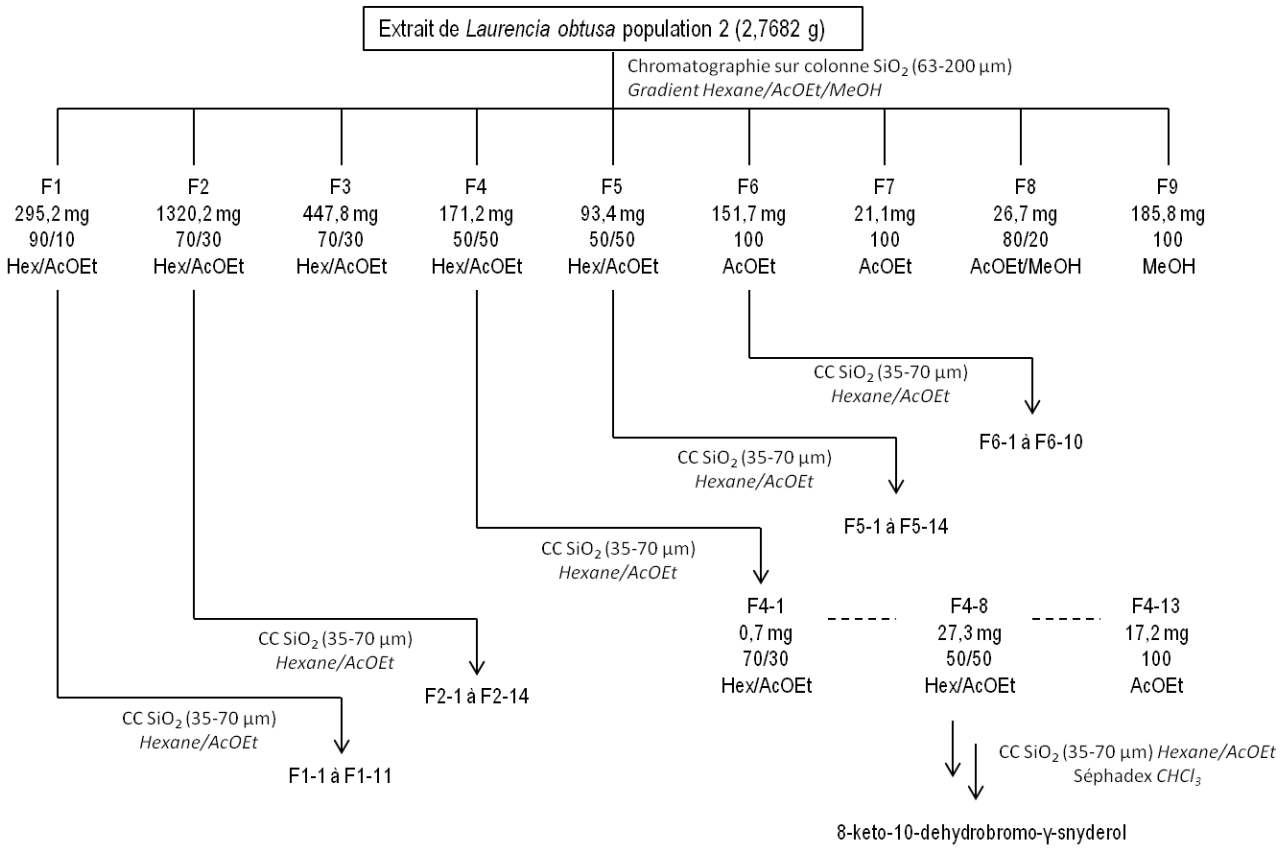


Figure 42 : Fractionnement de l'extrait issu de la population 2

IV.1. *Snydéranes*

Le spectre ^{13}C de l'extrait obtenu est largement dominé par une série de 15 raies de résonance avec des intensités importantes. La séquence DEPT permet notamment de noter la présence de deux méthines à 144,85 et 120,65 ppm ainsi qu'un carbone quaternaire à 136,76 ppm et un méthylène à 112,05 ppm suggérant la présence d'une double liaison terminale et d'une double liaison fonctionnalisée, ainsi que la présence d'une fonction alcool avec un carbone quaternaire à 73,52 ppm.

Après analyse par le logiciel Chemvig, cette molécule a été identifiée comme étant l'α-snydérol. Tous les carbones sont observés mais certains Δδ sont supérieures à 0,20 ppm [43]. Le spectre ^{1}H de l'extrait, dominée également par une série de multiplets, a permis de confirmer la présence de l'α-snydérol. En effet on observe les protons de la double liaison terminale [δ_H 5,92 (1H, dd, *J* = 17,3 ; 10,7Hz, H-2) ; 5,22 (1H, d, J = 17,3 Hz, H1a) ; 5.09 (1H, d, J = 10,7, H1b)] ainsi que le proton H-10 du carbone halogéné [δ_H 4,17 (1H, dd, *J* = 9,8 ; 6,7Hz, H-10)].

Son isomère, le β-snydérol, a été quant à lui identifié après la première étape de fractionnement dans la fraction F2. Même si cette molécule n'est pas majoritaire de la fraction, tous les carbones ont pu être observés y compris les quaternaires. Excepté un carbone, les Δδ sont ici toutes inférieures à 0.20 ppm.

Deux isomères du β-snydérol ainsi que deux isomères de l'α-snydérol ont également été identifés après fractionnement de l'extrait. Un nouveau composé dérivé du γ-snydérol a également été identifié et caractérisé par RMN 1D, 2D et spectrométrie de masse. Ces résultats ont fait l'objet d'une soumission d'article dans le journal Biochemical Systematics and Ecology.

Snyderol derivatives from *Laurencia obtusa* collected in Corsica

Hélène Esselin[1], Sylvain Sutour[2], Ange Bighelli[1] and Félix Tomi[1]*

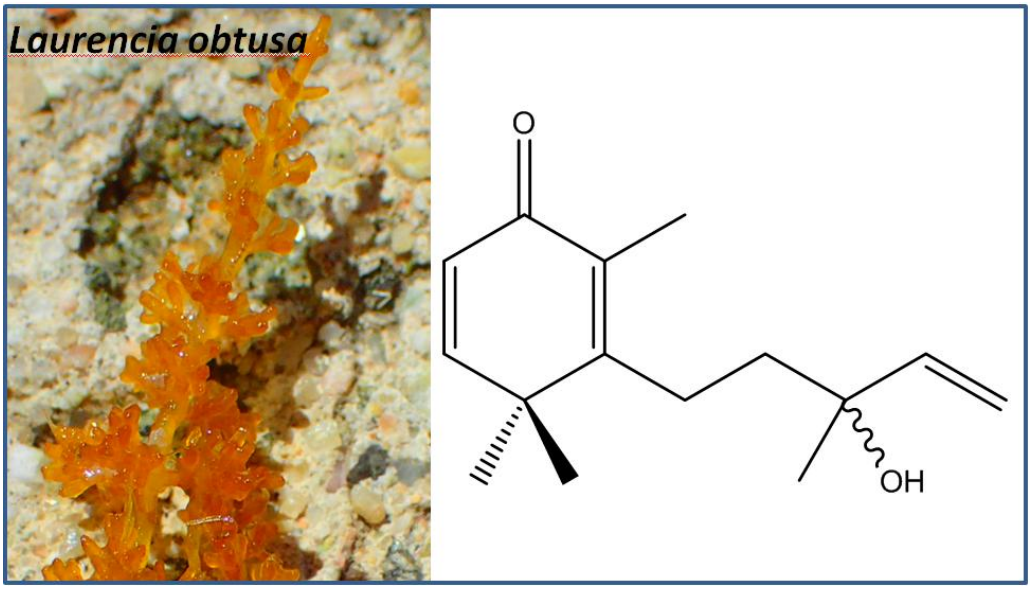
[1] Université de Corse - CNRS, UMR 6134 SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France

[2] Neuchâtel Platform of Analytical Chemistry, University of Neuchâtel, Avenue de Bellevaux 51, 2000 Neuchâtel, Switzerland

* Corresponding author. Email: tomi_f@univ-corse.fr

Abstract: 8-keto-10-dehydrobromo-γ-snyderol (**1**), a new sesquiterpene exhibiting the unusual γ-snyderane skeleton, was isolated from the ethyl acetate extract of *Laurencia obtusa* collected in Ajaccio (Corsica, France). (**1**) was isolated and fully characterized by detailed spectroscopic analysis. Six known compounds were identified after column chromatography steps using a ^{13}C NMR based computerized method developed in our laboratory: α-snyderol (**2**), two rearranged derivatives of α-snyderol (**3**,**4**), 8-keto-10-dehydrobromo-β-snyderol (**5**), β-snyderol (**6**) and 8-hydroxy-β-snyderol (**7**).

Keywords: *Laurencia obtusa* ; NMR ; sesquiterpene ; γ-snyderol



Subject and Source

Species belonging to the *Laurencia* complex are the most investigated alga among Rhodophyta for their rich chemistry [13]. These species are well-known to produce a large variety of halogenated secondary metabolites belonging to several classes including sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes and C_{15} acetogenins [17], [137]–[139].

The population of *Laurencia obtusa* was collected in Ajaccio (Corsica, France) and a specimen was identified by Dr. Line Le Gall (Museum d'Histoire Naturelle, Paris, France). A voucher specimen (H8317) was deposited at the Verlaque Herbarium (Institut Méditerranéen d'Océanologie, Université d'Aix Marseille).

Previous work

Sesquiterpenes constitute the largest group of natural products produced among the *Laurencia* complex. The unusual structural diversity of these compounds is due to a large number of skeletons such as cuparane, laurane, brasilane or snyderane. Snyderane is the third most important skeleton of sesquiterpenes found in *Laurencia* species with 57 members reported up to date [17]. Ten compounds exhibiting a snyderane skeleton were previously isolated from a *L. obtusa* population: α and β snyderols derivatives, an epoxy and a bicyclic snyderane.

As part of our ongoing work on the chemical diversity of secondary metabolites of *L. obtusa* populations collected around Corsica [140]–[142], we investigated the chemical composition of the ethyl acetate extract from a population collected from Ajaccio coast. This led us to the identification of 6 known snyderanes (α and β isomers) and one new γ-snyderol derivative. For the best of our knowledge, it is the first γ-snyderane obtained from *Laurencia obtusa*.

Present study

Extraction and isolation

Fresh algae were washed with tap water and dried with a lyophilizer. The air-dried sample of *Laurencia obtusa* (291.1 g) was grounded with liquid N_2 in a mortar and extracted 3 times (3x 900 mL) with ethyl acetate (EtOAc) at room temperature. The solvent were removed under reduced pressure to afford a dark green extract (2.7682g). The extract together with all fractions of chromatography were analyzed using a computerized method that was developed in our laboratory based on ^{13}C NMR which led to the identification of α-snyderol (**2**) as the major component. The extract was subjected to silica gel column chromatography (Sigma, St. Louis, MO, USA, SiO_2, 63–200 µm, 70 g) and eluted with increasing amount of EtOAc in hexane to afford nine fractions (F1-F9). β-snyderol (**6**) was identified in fraction F2 (1.3202 g, EtOAc/Hexane, 30:70).

F4 (171.2 mg, EtOAc/Hexane, 50:50) was then submitted to another step of fractionation using the same gradient but a smaller granulometry (Sigma, St. Louis, MO, USA, SiO_2, 35–70 µm, 20 g) Compounds **3** and **4** were identified by analysis of F4-8 (27.3 mg, 50:50), **5** of F4-6 (16.9 mg, 30:70) and **7** of F4-11 (17.6 mg, 50:50).

Subfraction F4-8 (27.3 mg, 50:50) containing 8-keto-10-dehydrobromo-γ-snyderol (**1**) was further purified on sephadex LH-20 with $CHCl_3$ as eluent to yield 3.9 mg of pure compound. The chemical structure of compound (**1**) was unambiguously elucidated by detailed spectroscopic analysis.

*Structure elucidation of 8-keto-10-dehydrobromo-γ-snyderol (**1**)*

The molecular formula of compound (**1**) was determined as $C_{15}H_{22}O_2$ by HRESIMS and NMR data, indicating 5 degrees of unsaturation. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra displayed resonance signals of two ethylenic protons [δ_H 6.18 (1H, d, *J*=9.8, H-9) and 6.72 (1H, d, *J*=9.8, H-10)], four sp^2 carbons [δ_C 161.36 (C-6), 131.85 (C-7), 125.86 (C-9) and 156.93 (C-10)], one α,β-unsaturated carbonyl group [δ_C 186.39 (C-8)] as well as a vinyl moiety connected to an alcohol function in α-position characteristic to snyderanes [δ_H 5.29 (1H, d, *J*=17.3, H1a), 5.16 (1H, d, *J*=10.8, H1b) and 5.96 (1H, dd, *J*=17.3, 10.8, H2); δ_C 112.60 (C-1), 144.24 (C-2) and 73.24 (C-3)]. Detailed interpretation of HSQC, COSY and HMBC spectra demonstrated the occurrence of a 1,4-cyclohexadiene, substituted by a methyl on C-7 and a ketone function on C-8. The HMBC crosspeak observed between C-6 and H-5 allowed to connect the lateral chain to the cyclohexane moiety, leading to the γ-snyderane skeleton.

Resonances for four methyls were also observed on 1D NMR spectra [δ_H 1.22 (3H, s, H-12*), 1.23 (3H, s, H-13*), 1.89 (3H, s, H-14) and 1.36 (3H, s, H-15); δ_C 25.87 (C-12*), 25.94 (C-13*), 11.35 (C-14) and 28.14 (C-15)]. HMBC correlations allowed connecting methyls C-12 and C-13 to the quaternary carbon C-11 while methyl C-14 is positioned on C-7 and methyl C-15 on C-3 as shown on the figure below.

Table 1: NMR Spectroscopic data (400 MHz, $CDCl_3$) of compound 1.

Position	δ_H (*J* in Hz)	δ_C
1a	5.29 (d 17.3)	112.60
1b	5.16 (d 10.8)	
2	5.96 (dd 17.3, 10.8)	144.24
3	-	73.24
4	1.68 (m)	40.06
5	2.39 (m)	24.89
6	-	161.36
7	-	131.85
8	-	186.39
9	6.18 (d 9.8)	125.86
10	6.72 (d 9.8)	156.93
11	-	40.74
12	1.22* (s)	25.87*
13	1.23* (s)	25.94*
14	1.89 (s)	11.35
15	1.36 (s)	28.14

** Attribution may be reversed*

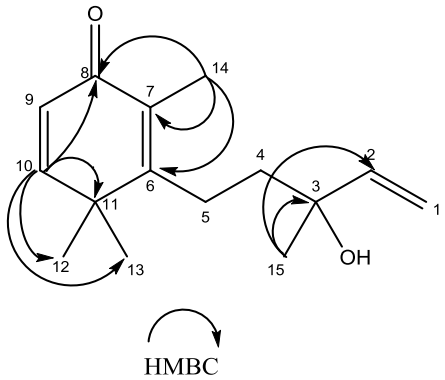


Figure 1: Key HMBC correlations of compound 1.

*Identification of compounds **2-7***

The extract and fractions were submitted to the ^{13}C NMR based computerized method developed in our laboratory. This method allowed the identification of individual components with limited step of fractionations by comparison of the chemical shifts value from the mixture with those of reference compounds present in an in-house library. Each compound is identified by taking into account three parameters directly available from the software: the number of carbon observed compared to what is expected, the difference between the chemical shift of each signal in the mixture and those from reference spectral data (Δδ), and the number of overlapped signals of carbons belonging to two components that fortuitously possess the same chemical shift [142]. Six known components were identified by comparison with literature data: α-snyderol (**2**), β-snyderol (**6**) [43], compounds **3** and **4** [143], 8-keto-10-dehydrobromo-β-snyderol (**5**) and 8-hydroxy-β-snyderol (**7**) [144]. α and β snyderols were previously identified in *L. obtusa* species [26], [43] collected in Spain and in the gulf of Suez respectively whereas β-snyderol derivatives **5** and **7** were isolated from *L. caespitosa* in the Canary Islands. Compounds **3** and **4** were initially isolated from the mollusk *Aplysia punctata* collected in Sardinia (Mediterranean Sea) and then from *L. nangii* in Borneo Island (Asia) [132]. *Laurencia* is a food source of sea hare. Thus, same metabolites are co-occurring in both *Laurencia* and sea hare [145].

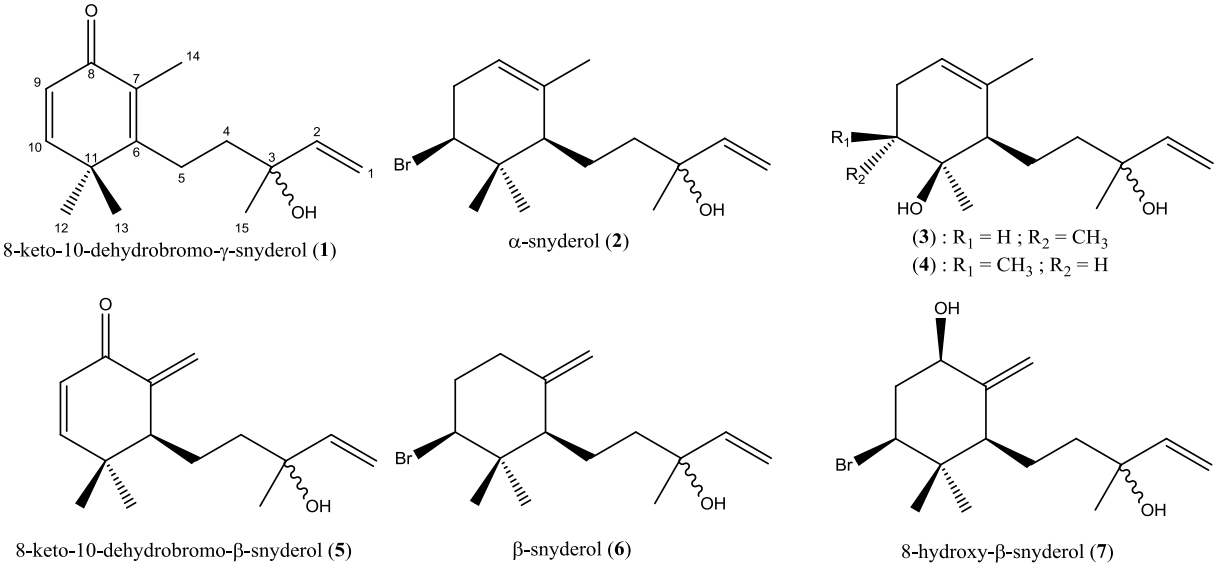


Figure 2: Chemical structures of compounds **1-7**

Chemotaxonomic significance

We report here the structure of one new γ-snyderane (**1**) as well as 6 known α- and β- snyderol derivatives (**2**-**7**). α- and β-snyderanes are common compounds in the *Laurencia* complex [17] whereas the γ-isomer appears to be rarer. Indeed, only one has been described up to date: 8-hydroxy-γ-snyderol. This metabolite was isolated from *L. caespitosa* [144] together with 8-hydroxy-β-snyderol (**7**) and 8-keto-10-dehydrobromo-β-snyderol (**5**).

Recently, Cartin-Franklin and Butler showed that the three isomers of snyderol (α, β and γ) could arise from the same precursor [146]. Indeed, the enzyme V-BrPO (vanadium bromoperoxidase) isolated from marine red algae including *Laurencia* species, is able to catalyze the bromination and cyclization of (*E*)-(+)-nerolidol, leading to α-, β-, and γ-snyderols as well as the bicyclic 3β-bromo-8-epicaparrapi oxide. The relative proportion of the 3 isomers was not reported. These metabolites were only produced in trace without the enzyme instead of 10% (total of α, β, γ, and 3β-bromo-8-epicarrapi oxide) with V-BrPO. Furthermore, single stereoisomers were formed with the enzyme. Derivatives of the three isomers were identified in our extract, however, (*E*)-nerolidol was not detected. Surprisingly, γ-snyderol was the only isomer never reported in *L. obtusa* populations [43], [45].

Several hypotheses can be made concerning the unusual presence of γ-snyderol derivative (**1**). The formation of this isomer from the carbocation suggested by Cartin-Franklin and Butler may be disadvantaged by the steric environment of H-6. Otherwise, γ-snyderol derivative may rather be considered as biosynthesic intermediates of bicyclic compounds as previously suggested by Wolinsky and Faulkner [147]. Environmental factors (temperature, photoperiod, aeration, pH) do not influence the chemical composition of secondary metabolites of *Laurencia* species [130], [148], [149]. Thus, occurrence of compound (**1**) in this population of *L. obtusa* can be considered as a chemotaxonomic marker. However, a systematic study of several others *L. obtusa* populations would of valuable interest to investigate the chemotaxonomic significance of γ-snyderol and γ-snyderol derivatives and may highlight chemical types inside *L. obtusa* species.

Acknowledgments: The authors thank Line Le Gall (Institut de Systématique, Evolution et Biodiversité, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris) for identification of the specimen. The authors are grateful to the Collectivité de Corse (HE research grant) and to the FEDER project 2014-2020, AGRIEX No. CO 0009204 for partial financial support.

Supplementary material: Voir Annexe F

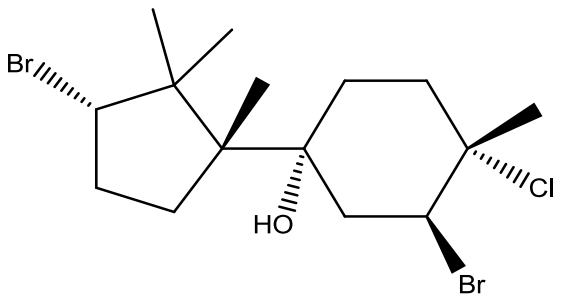
IV.2. *Autres sesquiterpènes*

Deux autres sesquiterpènes ont été identifiés après le fractionnement de F1. Il s'agit d'un cuparane, le 1-déacétoxy-8-déoxyalgoane et d'un chamigrane, le 9,15-dibromo-,13(15)-chamigradiène-11-ol.

Le premier, identifié dans la fraction F1-6 a été décrit précédemment dans un extrait de glande digestive du mollusque *Aplysia dactylomela* [150]. On peut remarquer que parmi tous les cuparanes décrits dans le complexe *Laurencia,* seuls 4 présentent un cycle hexanique sans insaturation et ceux-ci ont tous été isolés à partir du même genre de mollusques (*Aplysia*).

Tableau 28 : Structure et déplacements chimique du 1-déacétoxy-8-déoxyalgoane

1-déacétoxy-8-déoxyalgoane		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[20]	$\Delta\delta$
78,9	78,96	0,06
70,8	70,84	0,04
63,8	63,83	0,03
60,6	60,62	0,02
50,2	50,18	0,02
47,6	47,68	0,08
43,2	43,18	0,02
38,2	38,25	0,05
30,8	30,85	0,05
30,7	30,68	0,02
29,5	29,55	0,05
23,3	23,37	0,07
23,2	23,25	0,05
22,6	22,56	0,04
22,2	22,17	0,03



1-déacétoxy-8-déoxyalgoane

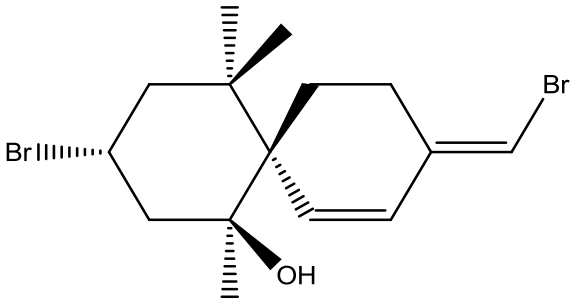
Le 9,15-dibromo-,13(15)-chamigradiène-11-ol a également été isolé dans des extraits d'*Aplysia dactylomela* [105]. Il a été décrit à la fois dans une population de *L. microcladia* et dans l'éponge *Spongia zimocca* dans la baie du Rogiolo [151]. Les auteurs ont, lors de cette étude, cherché à déterminer la relation entre les métabolites secondaires isolés des populations d'algues rouges (*Laurencia microcladia* ou *Sphaerococcus coronopifolius*) et ceux identifiés dans l'éponge *Spongia zimocca*. Ils ont observé que 3 composés identifiés dans l'éponge (1 sesquiterpène, 1 acétogénine et 1 diterpène) étaient les analogues acétylés des alcools correspondant à ceux identifiés dans *Laurencia*.

Les auteurs suggérèrent alors que l'organisme de l'éponge, après absorption de ces produits, serait capable de les acétyler probablement dans un but d'adaptation. Ce phénomène ne concernerait cependant que les alcools primaires, puisque le 9,15-dibromo-,13(15)-chamigradièn-11-ol et son isomère *Z* ainsi que deux diterpènes, qui contiennent des alcools tertiaires, sont observés indifféremment dans les algues et dans l'éponge, puisque la fonction alcool est, dans ce cas, protégée stériquement de l'acétylation.

[20] Fraction F1-6

Tableau 29 : Structure et déplacements chimiques du 9,15-dibromo-1,3(15)-chamigradiène-11-ol

9,15-dibromo-1,3(15)-chamigradiène-11-ol		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[21]	Δδ
138,7	138,68	0,02
132,6	132,58	0,02
128,3	128,23	0,07
106,1	106,04	0,06
78,3	78,28	0,02
49,3	49,28	0,02
49,2	49,15	0,05
46,8	46,79	0,01
46,2	46,13	0,07
41,2	41,17	0,03
30,2	30,12	0,08
29,4	29,38	0,02
26,5	26,47	0,03
25,0	24,98	0,02
21,9	21,86	0,03



9,15-dibromo-1,3(15)-chamigradiène-11-ol

IV.3. *Acétogénines identifiées par comparaison avec les données de la littérature*

Au total 5 acétogénines possédant une terminaison “Br-yne” ont été identifiées et celles-ci contiennent toutes au moins un tétrahydrofurane (THF). Il n’y a pas de valeurs RMN ^{13}C remarquables pour caractériser cette terminaison mais on peut cependant observer sur le spectre ^{1}H deux signaux particuliers si la molécule est suffisamment concentrée dans l’échantillon. On retrouve notamment un doublet autour de 2,50 ppm qui correspond au proton H1 ainsi qu’un doublet dédoublé autour de 4,50 ppm correspondant au proton H-3.

D’après une revue récente [17], les acétogénines comportant cette terminaison sont assez rares comparés aux bromoallènes ou aux acétogénines contenant la terminaison « én-yne ». En effet, la revue n’en dénombre que 8 sur 244 acétogénines, et celles-ci n’ont été décrites qu’à partir de populations appartenant à l’espèce *L. obtusa*.

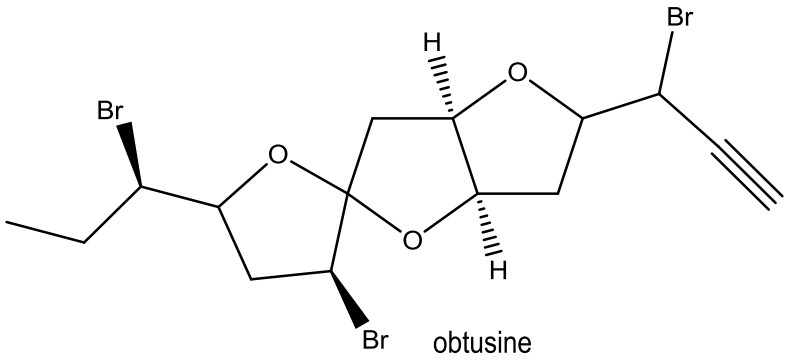
Toutes les acétogénines « Br-yne » décrites jusqu’à présent comportent toutes au moins un cycle tetrahydrofuranique (THF). Elles peuvent être mono, bi, ou tricycliques et le THF peut être associé à un tétrahydropyrane (THP) ou à un oxocane.

Les deux acétogénines suivantes ont été directement identifiées dans l’extrait total dans des proportions à peu près équivalentes. Tous les carbones de l’obtusine, y compris les quaternaires, sont observés et les Δδ sont pour la plupart des carbones inférieures à 0,10 ppm.

[21] Fraction F1-7

Tableau 30 : Structure et déplacements chimiques de l'obtusine

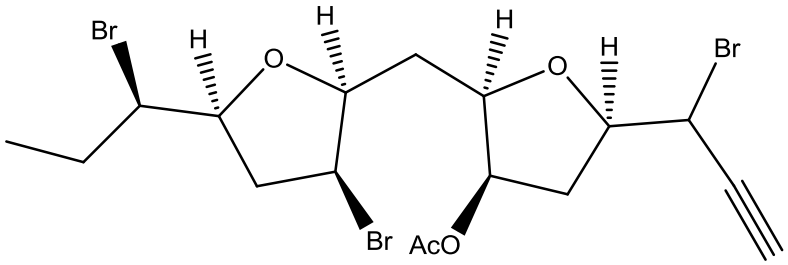
obtusine		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[22]	Δδ
115,5	115,45	0,05
86,7	86,74	0,04
84,6	84,65	0,05
83,9	83,86	0,04
80,8	80,82	0,02
80,2	80,23	0,03
76,0	76,06	0,06
61,5	61,50	0,00
50,5	50,55	0,05
40,4	40,44	0,04
40,0	40,12	0,12
39,2	39,24	0,04
37,5	37,48	0,02
29,1	29,08	0,02
11,7	11,78	0,08



Pour l'acétogénine suivante, les données de la littérature ne décrivent que 16 signaux de RMN ^{13}C sur les 17 attendus. Il manque en effet la valeur d'un des méthines, que nous avons pu repérer dans la sous fraction F4-4 dans laquelle ce composé est majoritaire.

Tableau 31 : Structure et déplacements chimiques de l'acétogénine de type THF/THF

acétogénine de type THF/THF		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[23]	Δδ
170,03	170,09	0,06
82,05	82,01	0,04
80,96	80,95	0,01
80,09	80,00	0,09
***	76,53	***
76,14	76,16	0,02
73,11	73,02	0,09
71,78	71,66	0,12
61,33	61,35	0,02
55,24	55,27	0,03
39,07	39,19	0,12
38,21	38,21	0,00
32,89	32,71	0,18
32,41	32,34	0,07
29,35	29,31	0,04
21,08	21,13	0,05
11,93	11,95	0,02

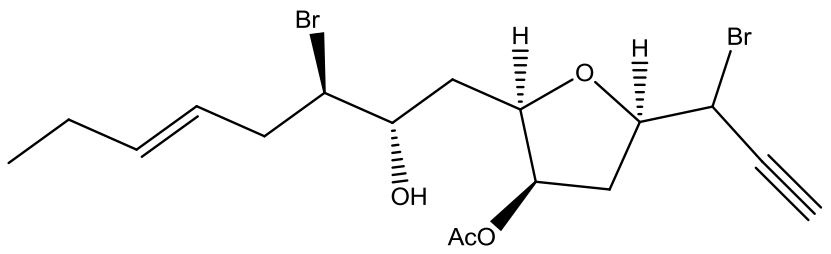


[22] Fraction F2-6
[23] Fraction F4-4

Ces deux composés ont été identifiés dans un même extrait de *L. obtusa*, récoltée sur l'île de la Graciosa (Iles Canaries) avec également l'acétogénine suivante qui présente un seul cycle tétrahydrofuranique [52].

Tableau 32 : Structure et déplacements chimique de l'acétogényne de type THF

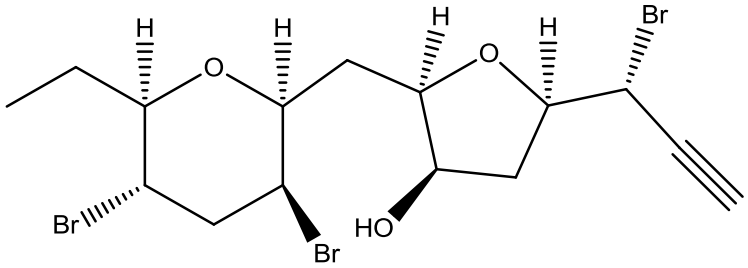
acétogénine de type THF		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[24]	Δδ
170,73	170,63	0,10
136,33	136,27	0,06
124,49	124,40	0,09
81,29	81,27	0,02
80,61	80,53	0,08
80,14	80,00	0,14
76,61	76,49	0,12
72,44	72,31	0,13
72,05	71,99	0,06
57,23	57,13	0,10
38,48	38,36	0,12
38,04	37,78	0,26
32,41	32,34	0,07
32,22	32,11	0,11
25,66	25,58	0,08
21,19	21,07	0,12
13,71	13,61	0,10



Les deux acétogénines suivantes, identifiées dans la fraction F3 et la sous-fraction F5-10, ont été précédemment isolées à partir d'une population de *L. obtusa* récoltée dans les îles Canaries [72]. La première contient un tétrahydropyrane et la seconde est composée d'une unité oxocane.

Tableau 33 : Structure et déplacements chimiques de l'acétogénine de type THP/THF

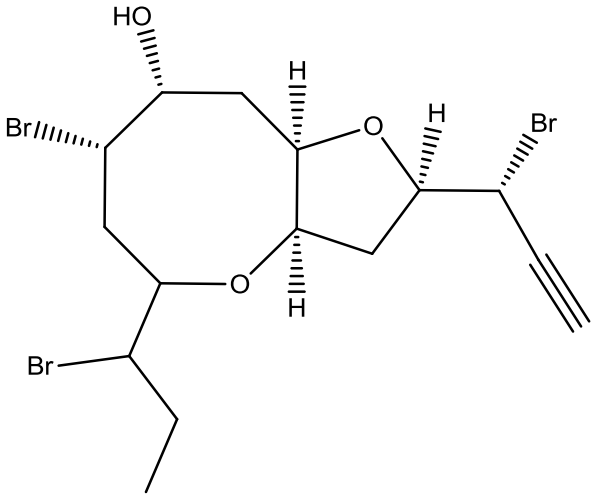
acétogénine de type THP/THF		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[25]	Δδ
83,88	83,88	0,00
80,79	80,83	0,04
80,72	80,60	0,12
79,79	79,65	0,14
76,66	76,53	0,13
75,58	75,43	0,15
72,01	71,96	0,05
55,53	55,51	0,02
46,75	46,63	0,12
44,41	44,44	0,03
38,63	38,56	0,07
37,78	37,85	0,07
34,29	34,10	0,19
26,19	26,02	0,17
9,30	9,16	0,14



[24] Fraction F4-6
[25] Fraction F3

Tableau 34 : Structure et déplacements chimiques de l'acétogénine de type THF/oxocane

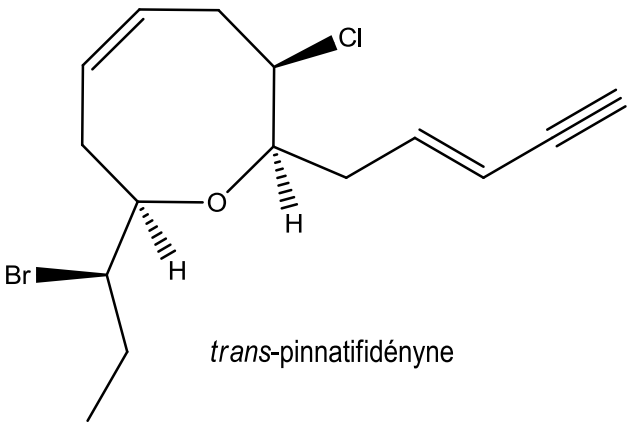
acétogénine de type THF/oxocane		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[26]	Δδ
82,01	82,06	0,05
80,41	80,47	0,06
79,82	79,89	0,07
76,43	76,23	0,20
76,42	76,23	0,19
71,44	71,63	0,19
71,44	71,63	0,19
61,93	62,14	0,21
61,10	61,16	0,06
39,31	38,96	0,35
38,05	38,08	0,03
34,87	35,13	0,26
32,25	32,37	0,12
29,02	29,17	0,15
11,84	11,89	0,05



Trois acétogénines présentant une terminaison "én-yne" ont été identifiées dans cette population, il s'agit de 3 oxocanes, le *trans*-pinnatifidényne (F1-3) et les deux isomères de la laurényne (*E* et *Z*, F1-2). Le *trans*-pinnatifidényne a été précédemment décrit à partir d'une population de *L. pinnatifida* [75], en compagnie de l'isomère *cis*.

Tableau 35 : Structure et déplacements chimiques du *trans*-pinnatifidényne

trans-pinnatifidényne		
δ_C litt(ppm)	δ_C (ppm)[27]	Δδ
141,3	141,34	0,04
130,9	130,91	0,01
128,8	128,82	0,02
112,1	112,10	0,00
83,3	83,30	0,00
nd	nd	
79,5	76,51	0,01
76,8	76,70	0,10
64,5	64,48	0,02
61,0	61,07	0,07
37,7	37,73	0,03
34,3	34,34	0,04
30,5	30,45	0,05
27,4	27,35	0,05
12,8	12,79	0,01



[26] Fraction F5-10
[27] Fraction F1-3

IV.4. *Elucidation structurale des acétogénines absentes des banques de données*

Composé F

L'analyse de la sous-fraction F1-7 par RMN ^{13}C révèle que celle-ci est largement dominée par la présence d'une molécule (composé F) non identifiée par le logiciel Chemvig. Le spectre de RMN ^{13}C de cette fraction laisse en effet apparaître 15 raies de résonance de forte intensité appartenant au composé recherché. La séquence DEPT a permis de distinguer :

- 2 carbones quaternaires (79,49 et 116,17 ppm) ;
- 8 méthines (76,58 ; 37,88 ; 82,23 ; 80,66 ; 91,63 ; 54,85 ; 84,05 et 61,28 ppm) ;
- 4 méthylènes (35,26 ; 33,00 ; 29,62 et 28,75 ppm) ;
- 1 méthyle (11,75 ppm).

Nous notons sur le spectre ^{1}H deux signaux caractéristiques d'une terminaison « Br-yne » : un doublet à 2,68 ppm ainsi qu'un doublet dédoublé à 4,54 ppm. L'enchaînement C1-C2-C3 contenant l'alcyne bromé a été confirmé par les spectres COSY, HSQC et HMBC (Annexe G).

Parmi les 6 méthines restant, 4 semblent correspondre à des déplacements chimiques de carbones liés à un atome d'oxygène et les deux autres plutôt à des carbones liés à un halogène. Les séquences HSQC et COSY ont permis de construire les 2 fragments de molécule suivant.

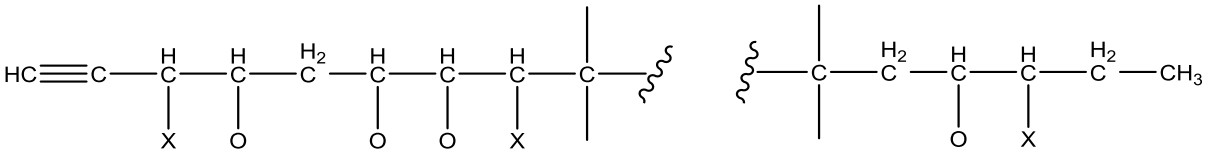


Figure 43 : Fragments linéaires du composé F

La molécule n'ayant pas pu être purifiée, il nous a été impossible d'obtenir la masse exacte du produit. Ceci nous empêche donc de définir le nombre d'atomes d'oxygène présents et par conséquent de déterminer leur nature (hydroxyle ou éther).

Cependant, les corrélations HMBC observées entre le proton H-4 et le carbone C-7, ainsi qu'entre le carbone C-9 et les protons H-6 et H-12, permettent de suggérer la présence d'une molécule composée de 3 cycle THF. Ces informations nous permettent alors de proposer la structure plane ci-dessous.

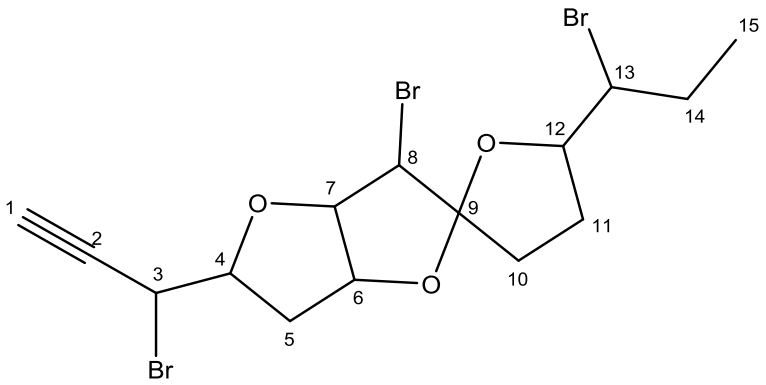


Figure 44 : Structure partielle proposée pour le composé F

La recherche bibliographique de cette structure nous a mené à comparer le composé F à la néobtusine [78]. L'attribution des déplacements chimiques ^{13}C n'ayant pas été réalisée par les auteurs, nous n'avons pas pu déterminer les Δδ pour chacun des carbones. Cependant, si l'on compare 2 à 2 les valeurs les plus proches, la plupart des Δδ sont inférieures à 1,8 ppm. Les différences les plus notables concernent les carbones C-1 et C-2. Dans le cas de la molécule F, il a été difficile d'attribuer ces deux carbones. En effet, sur le spectre HSQC le proton H-1 corréle avec les deux carbones. Ceci peut s'expliquer par la constante de couplage ^{13}C-^{1}H des alcynes qui peut créer des signaux innattendus sur les spectres HSQC et HMBC, ainsi que des signaux de signe opposé à celui attendu sur la séquence DEPT [134]. Cependant, les intensités relatives des signaux des deux carbones observés dans la molécule F, ainsi que la corrélation HMBC entre le proton H-4 et le signal à 79,49 ppm, nous suggèrent que c'est ce dernier qui est quaternaire.

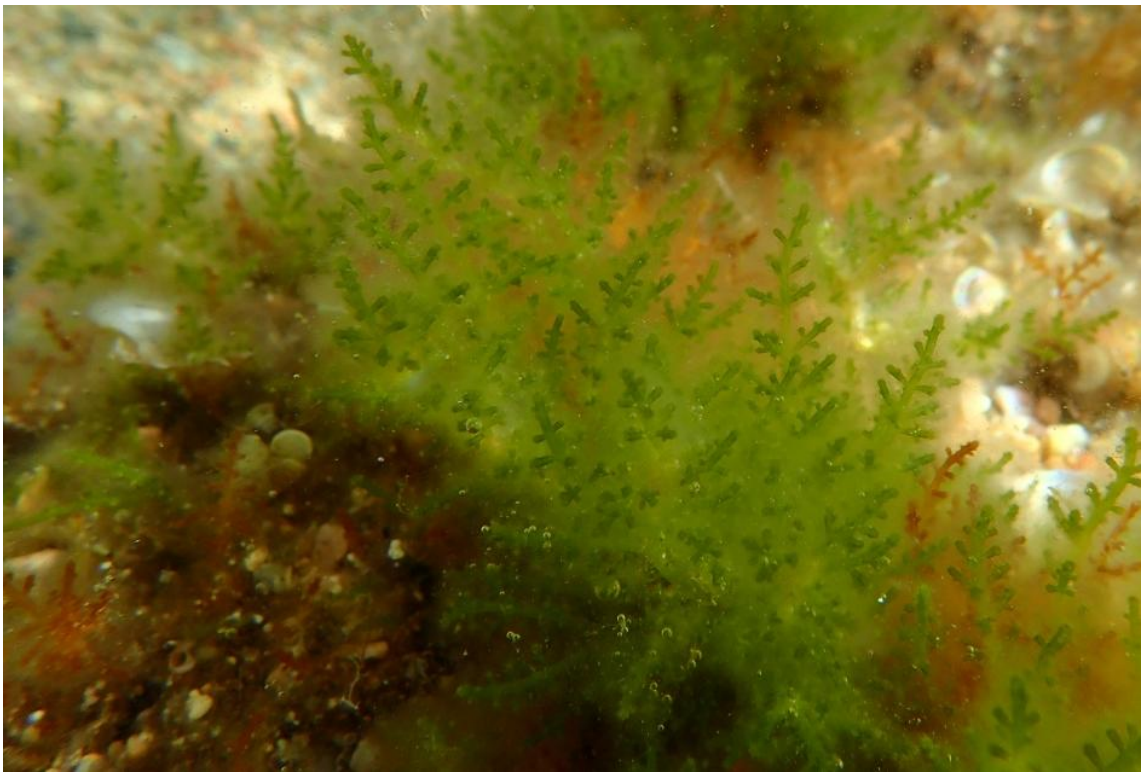
Si l'on considère la bonne attribution des déplacements chimiques de la néobtusine, les Δδ des carbones C-8 et C-13 paraissent trop peu élevées pour envisager la présence d'un autre halogène à la place du brome. Par ailleurs, quelques différences notables dans les multiplicités et constantes de couplage des protons de la néobtusine avec ceux du composé F tendent plutôt à suggérer des différences de stéroéchimie entre les deux composés.

Cependant, les informations obtenues à l'aide du spectre NOESY ne nous ont pas permis de conclure sur la configuration relative des carbones de la molécule F.

Tableau 36 : Données RMN ^{1}H et ^{13}C relatives au composé F

C	δ ^{13}C (ppm)	DEPT	δ ^{1}H (ppm)	multiplicity (J (Hz))	COSY ^{1}H – ^{1}H	HMBC H → C	NOESY ^{1}H – ^{1}H
1	76,58	CH	2,68	d (2.4)	H3	C3	
2	79,49	C					
3	37,88	CH	4,54	dd (7.5 ; 2.4)	H1 ; H4	C1 ; C2 ; C4 ; C5	H4 ; H5b ; H8
4	84,23	CH	4,38	td (7.5 ; 5.7)	H3 ; H5a ; H5b	C1 ; C3 ; C6 ; C7	H3 ; H5a ; H5b
5	35,26	CH_2	2,41	m	H4 ; H5b ; H6	C3 ; C6 ; C7	H4 ; H6
			2,28	m	H4 ; H5a ; H6	C3 ; C6 ; C7	H3 ; H4 ; H6
6	80,66	CH	4,83	ddd (6.7 ; 5.7 ; 2.8)	H5a ; H5b ; H7	C7	H5a ; H5b
7	91,63	CH	4,87	dd (5.7 ; 4.0)	H6 ; H8	C4 ; C6 ; C8	H4 ; H8
8	54,85	CH	4,09	d (4.0)	H7		H3 ; H7 ; H10
9	116,17	C					
10	33,00	CH_2	2,14	m	H11a ; H11b	C9 ; C11 ; C12	H8 ; H12
11	29,62	CH_2	2,26	m	H10 ; H12	C10 ; C13	H12
			2,03	m	H10 ; H12	C10 ; C13	
12	84,05	CH	4,25	td (8.4 ; 6.0)	H11a ; H11b ; H13	C9	H10 ; H11a ; H13 ; H15
13	61,28	CH	3,92	td (8.8 ; 3.1)	H12 ; H14a ; H14b	C11 ; C12 ; C14 ; C15	H12 ; H14a ; H15
14	28,75	CH_2	2,10	m	H13 ; H15	C15	H13 ; H15
			1,80	m	H13 ; H15	C15	H15
15	11,75	CH_3	1,10	t (7.2)	H14a ; H14b	C13 ; C14	H12 ; H13 ; H14a ; H14b

V CARACTERISATION CHIMIQUE DE L'EXTRAIT ET FRACTIONS OBTENUS A PARTIR DE LA POPULATION 3



La troisième population de *L. obtusa*, récoltée à Tiuccia en 2015, a été traitée selon le même schéma analytique que les deux populations précédentes. L'analyse par RMN de l'extrait obtenu par macération dans l'acétate d'éthyle a permis l'identification en mélange de 5 sesquiterpènes présentant des squelettes snydérane ou brasilane.

L'analyse de fractions obtenues après chromatographie sur gel de silice de l'extrait brut a permis d'identifier 18 molécules connues supplémentaires. Nous notons la présence de sesquiterpènes présentant des squelettes cuparane ou laurane, des acétogénines linéaires ou cycliques, deux diterpènes et deux stérols. Enfin, le fractionnement de cet extrait (*cf.* Annexe K) a permis d'isoler une molécule nouvelle à savoir une acétogénine comportant un tétrahydropyrane et une terminaison « én-yne ». L'élucidation structurale de cette molécule a été effectuée par RMN 1D et 2D et par spectrométrie de masse. Les expériences de spectrométrie de masse mises en œuvre lors de l'analyse structurale de cette molécule ont été menées en collaboration avec la Plateforme d'Ingénierie et d'Analyses Moléculaires de l'Université d'Angers.

Enfin, l'extrait brut a été soumis à des tests d'activités biologiques afin de déterminer sa cytotoxicité sur plusieurs cellules cancéreuses. L'extrait s'est montré particulièrement actif sur la lignée cellulaire THP-1. Ces expériences ont été menées en collaboration avec l'équipe du professeur Ligia Salguiero de l'Université de Coimbra au Portugal.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal « Molecules ».

Chemical Composition of *Laurencia obtusa* Extract and Isolation of a New C_{15}-Acetogenin

Hélène Esselin[1], Sylvain Sutour[1], Joana Liberal[2,3], Maria Teresa Cruz[2], Ligia Salgueiro[2], Benjamin Siegler[4], Ingrid Freuze[4], Vincent Castola[1], Mathieu Paoli[1], Ange Bighelli[1] and Félix Tomi[1,*]

[1] Université de Corse-CNRS, UMR 6134 SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France

[2] CNC.IBILI/Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Health Sciences Campus, Azinhaga de S. Comba, 3000-548

[3] Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Campus da Talagueira, 6000-767 Castelo Branco, Portugal

[4] Plateforme d'Ingénierie et d'Analyses Moléculaires, Université d'Angers, UFR Sciences, 49000 Angers, France;

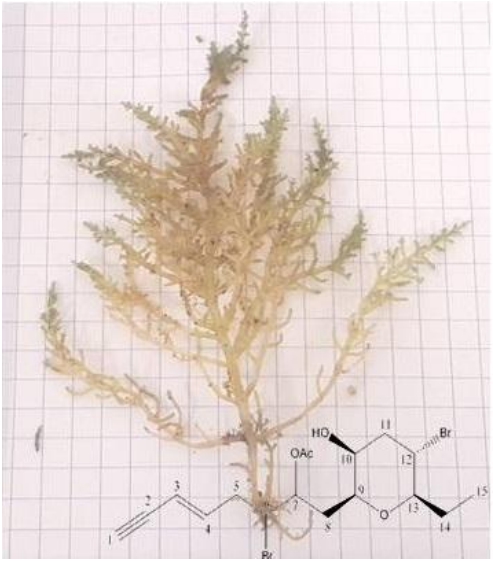
* Correspondence: felix.tomi@univ-corse.fr; Tel.: +33-495-52-4122

Academic Editor: Derek J. McPhee

Received: 11 April 2017; Accepted: 6 May 2017; Published: 11 May 2017

Abstract: A new C_{15}-acetogenin, sagonenyne (**20**), exhibiting an unusual single tetrahydropyran ring was isolated from an ethyl acetate extract of *Laurencia obtusa* collected on the Corsican coastline. Its structure was established by detailed NMR spectroscopic analysis, mass spectrometry, and comparison with literature data. Twenty-three known compounds were identified in the same extract by means of column chromatography steps, using a ^{13}C-NMR computer aided method developed in our laboratory. In addition to sesquiterpenes, which represent the main chemical class of this extract, diterpenes, sterols, and C_{15}-acetogenins were identified. The crude extract was submitted to a cytotoxicity assay and was particularly active against THP-1 cells, a human leukemia monocytic cell line.

Keywords: *Laurencia obtusa*; ^{13}C-NMR; Corsica; cytotoxic activity; sagonenyne



Introduction

Marine organisms are shown to be a large source of natural products with unusual structures and exhibiting a wide range of bioactivities. The genus *Laurencia* (Ceramiales, Rhodomelaceae) is one of the most studied among red algae. Species of this genus are mainly characterized by the presence of sesquiterpenes, di- and triterpenes, sterols, alkaloids and C_{15}-acetogenins [138]. These secondary metabolites are usually distinguished by the presence of at least one halogen atom [17]. *Laurencia obtusa* (Hudson) J. V. Lamouroux is the type species of this genus.

A large number of metabolites isolated from *Laurencia* species have been evaluated for their in vitro cytotoxic activity against several human tumor cells [25],[103],[104]. For now, the cytotoxic activity cannot be corroborated with the presence or absence of a functional group in the molecules.

In the course of our study on the constituents of Mediterranean seaweeds [105],[106] we investigated the chemical composition of a *Laurencia* species growing wild in Corsica. We describe in this context the secondary metabolites present in *Laurencia obtusa* ethyl acetate extract and its cytotoxic activity, as well as the structure elucidation of a new C_{15}-acetogenin derivative.

Results

All samples (crude extract and chromatography fractions) were submitted to the ^{13}C-NMR computer aided method developed in our laboratory [156].This method allows identification of individual components with limited fractionations, by comparison of the signals of the mixture spectrum with those of reference spectra present in a laboratory-built library. A library dedicated to marine components has been created, using spectral data associated with usual marine organisms' components from the literature. This library contains more than 2000 entries belonging to numerous families — mono-, sesqui-, and diterpenes; sterols; C_{15}-acetogenins; and fatty acids — which exhibited a wide range of skeletons.

Each compound is identified by taking into account three parameters directly available from the software: the number of carbon observed compared to what is expected, the difference between the chemical shift of each signal in the mixture and those from reference spectral data ($\Delta\delta$), and the number of overlapped signals of carbons belonging to two components that fortuitously possess the same chemical shift.

This method, applied to essential oils [157] and to various plant extract analysis [158] has demonstrated reliable results, using both libraries constructed with spectra recorded in our laboratory under the same experimental conditions (solvent, concentration, data treatment), and libraries built with literature data [110],[111]. The analysis of *Laurencia obtusa* extract was realized by a combination of chromatographic (CC SiO_2, Sephadex® LH-20) and spectroscopic (^{13}C-NMR) techniques.

Chemical Composition of Laurencia obtusa Extract

Validation of ^{13}C-NMR Method on Crude Extract

The direct analysis of Laurencia obtusa crude extract allowed the identification of 5 sesquiterpenes: β- (**1**) and α-snyderol (**2**) (Table1), epibrasilenol (**3**), brasilenol (**4**), and 4-hydroxy-5-brasilene (**5**) (Table2; Figure S3). α-Snyderol and 4-hydroxy-5-brasilene have firstly been isolated from *L. obtusa* [41], [43] and β-snyderol from *L. snyderae* [43]. Brasilenol and epibrasilenol were identified in *Aplysia brasiliana* [37], a marine mollusk which feeds on various algae including *Laurencia* species.

The ^{13}C-NMR spectrum exhibited a series of 15 chemical shifts with high intensities corresponding to those of β-snyderol which is obviously the main component of this extract. Table1 shows comparison between β-snyderol ^{13}C-NMR data obtained from our extract and those from literature. For this compound, the $\Delta\delta$ ranged from 0.00 to 0.34 ppm, most of them are however inferior to 0.15 ppm. The number of overlapped signals for this molecule (4) is due to the presence of an isomer (α-snyderol) which differs only by the position of a double bond and exhibits close chemical shifts to those of β-snyderol. However, it does not avoid a proper identification since each component possesses characteristic chemical shifts which differ from one isomer to another.

Table 1. Chemical shifts of β-snyderol in $CDCl_3$.

C	δ Extract (ppm)	δ Litt [13] (ppm)
1	111.80	111.8
2	145.07	144.9
3	73.40	73.3
4	41.27	41.3
5	20.61	20.6
6	53.15	53.1
7	145.57	145.6
8	37.47	37.4
9	35.94	35.9
10	67.44	67.1
11	42.10	41.9
12	28.44	28.4
13	16.37	16.4
14	109.16	109.0
15	27.78	28.1

Concerning these five molecules (**1** to **5**), the number of overlapped signals (up to four), the chemical shift disparities between our extract and the literature (mostly inferior to 0.15 ppm) and the number of observed signals (only quaternary carbons were not observed for some components) fulfill the conditions for a proper identification (Table 2).

Application of ^{13}C-NMR Method to Chromatography Fractions

In order to get a better overview of the *L. obtusa* chemical composition, the crude extract was submitted to column chromatography (CC) and 17 fractions were obtained and analyzed by ^{13}C-NMR. This fractionation allows the identification of 18 supplementary components (compounds **6** to **19** and **21** to **24**) including seven laurane derivatives (**6**, **9**–**14**), two cuparane derivatives (**7** and **8**), two linear C_{15}-acetogenins (**16** and **17**), three cyclic C_{15}-acetogenins (**15**, **18**, **19**), two diterpenes (**21** and **22**), and two sterols (**23** and **24**) (Table 2). They all possess skeleton commonly found in *Laurencia* species.

All these molecules (**6**–**24**) were identified by comparison of their chemical shifts in the fractions with literature data. Each carbon was observed except the quaternary one of 3-(*E*)-laurenyne. Most of $\Delta\delta$ values were inferior to 0.15 ppm. For most components, the number of overlapped signals was low (0 to 5) but the sterols (**23** and **24**) exhibited up to 12 overlapped signals over 27 and 29. Indeed, only the side chain differed from one derivative to another, leading to some overlapped signals. However, each molecule possessed enough characteristic signals to be clearly distinguished from one to another. Moreover, relative resonance intensities help the attribution of the series of chemical shifts.

Table 2. Compounds identified in *Laurencia obtusa* extract.

N°	Components	NMR[3]	Overlap[4]	References
	Sesquiterpenes			
1	β-snyderol[1]	15/15	4	[13]
2	α-snyderol[1]	12/15	3	[13]
3	Epibrasilenol[1]	15/15	1	[15]
4	Brasilenol[1]	13/15	1	[15]
5	4-hydroxy-5-brasilene[1]	15/15	1	[14]
6	laurene	15/15	0	[16]
7	α-bromocuparene	15/15	1	[17]
8	α-isobromocuparene	15/15	3	[17]
9	laurinterol	15/15	3	[18]
10	iso-laurenisol	15/15	0	[19]
11	3,7-dihydroxydihydrolaurene	15/15	1	[4]
12	laurane derivative	15/15	0	(compound **1** in [3])
13	laurane derivative	15/15	0	(compound **10** in [20])
14	11-iodolaurinterol	15/15	0	[21]
	C_{15}-acetogenins			
15	3-(*E*)-laurenyne	14/15	0	[22]
16	(*Z*) linear acetogenin	15/15	2	(compound **3** in [23])
17	(*E*) linear acetogenin	15/15	1	(compound **4** in [23])
18	13-(*E*)-epipinnatifidenyne	15/15	4	[24]
19	(*E*)-dihydrorhodophytin	15/15	5	[25]
20	Sagonenyne[2]	15/15	0	-
	Diterpenes			
21	neorogioldiol	20/20	3	[26]
22	obtusadiol	20/20	2	[27]
	Sterols			
23	fucosterol	29/29	12	[28]
24	cholesterol	27/27	12	[29]

[1] : Compounds identified directly from *L. obtusa* crude extract; [2] : New compound isolated from chromatography fractions; [3] : Number of observed signals compared to number of expected signals; measured in NMR spectra of the crude extract (**1**–**5**) or fractions (**6**–**24**); [4] : Number of overlapped signals; measured in NMR spectra of the crude extract (**1**–**5**) or fractions (**6**–**24**).

*Structure Elucidation of Compound **20***

After identification of the known compounds with the library generated in our laboratory, the same set of 15 chemical shifts remained unassigned in the ^{13}C-NMR spectrum of fractions F6 to F9. Combined repetitive chromatographies (CC on silica gel using a gradient of solvents and size-exclusion on sephadex LH-20) were implemented in order to isolate this compound (**20**).

Combination of information provided by DEPT spectrum (3 C, 9 CH, 4 CH_2 and 2 CH_3) and by ^{1}H and ^{13}C chemical shift values suggested the presence of a 2-penten-4-ynyl moiety: [δ_H 2.85 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 5.55 (1H, dd, *J* = 15.9 and 2.0 Hz), and 6.22 (1H, dt, *J* = 15.9 and 7.1 Hz); δC 81.55, 77.21,112.13

and 141.29]. Moreover, the *J*-value (15.9 Hz) measured between H-3 and H-4 ensured the *E* stereochemistry of the double bond. 1D NMR spectra also revealed the presence of an acetoxyl group [δ_H 2.13 (3H, s), δ_C 170.19 and 20.87].

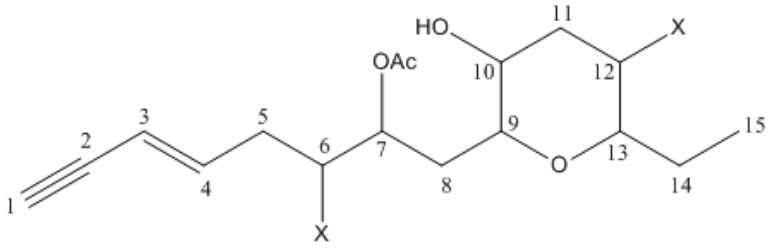


Figure 1. Planar structure for sagonenyne (**20**); X = halogen atom.

Based on the ^{13}C-NMR spectra (Table3), substituent at C-7, C-9, C-10, and C-13 are oxygen atoms (δ_C 71.38, 76.25, 69.95 and 83.98 respectively) whereas those at C-6 and C-12 are halogen atoms (55.52 and 47.50). Chemical shift value at H-7 (δ_H 5.23) revealed that the acetoxyl group is linked to this carbon.

Most of the time, algal C_{15}-acetogenins are cyclic ether metabolites with different ring sizes. Consequently, HMBC experiment will be needed to observe a connectivity between oxygenated methines, and to determine the size of the ether cycle. HMBC allowed the writing of the planar formula represented on Figure1. Indeed, a long-range correlation between H-9 and C-13 has been observed. The presence of a connection between C9 and C13, through an oxygen atom, confirmed a tetrahydropyran ring system (Figure H1).

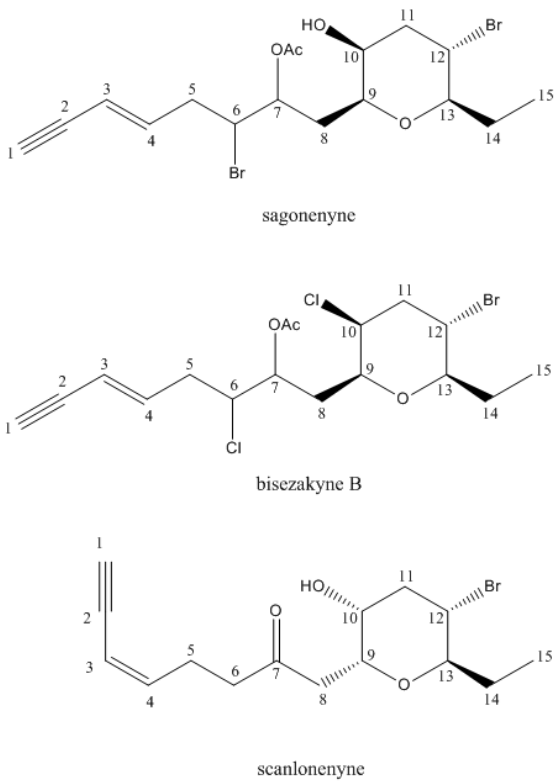


Figure 2. Structures of sagonenyne, bisezakyne-B, and scanlonenyne.

The group of acetogenins containing a six-membered cyclic ether ring includes only 14 compounds isolated from *Laurencia* species or mollusks grazing on these algae. Among them, four components exhibited one single tetrahydropyran ring, and only two were isolated directly from a *Laurencia* species: bisezakyne-B and scanlonenyne [17]. Bisezakyne-B has been isolated from a Japanese *Laurencia* species [161] whereas scanlonenyne has been detected in a *L. obtusa* specimen from Irish waters [85]. Bisezakyne-B and compound (**20**) exhibit similar structures since their carbon C-7 carry an acetoxyl group, instead of a carbonyl group for scanlonenyne (Figure 2). Even though ^{13}C-NMR data of bisezakyne-B were obtained in benzene-d_6, two chemical shifts, C-6 and C-10 differed substantially and indicated that substituent were different. For bisezakyne-B, C-6, and C-10 both carry a chlorine atom with chemical shifts at 62.7 and 61.2 ppm respectively. For compound **20**, and according to chemical shift values, there might be a hydroxyl group at C-10 (69.95 ppm) and a bromine at C-6 (55.52 ppm). Then, compound **20** was submitted to ESI-Ion trap mass spectrometry which confirmed the presence of one hydroxyl and one acetoxyl group. The ESI-IT mass spectra revealed an adduct $[M + Na]^+$ at m/z 475 in positive mode and an adduct $[M + Cl]^-$ at m/z 487 in negative mode, indicating a molecular weight of 452 g/mol. Both signals showed an isotopic pattern with a 1:2:1 ratio, characteristic of the presence of two bromine atoms in the molecule. These data allowed the establishment of the formula $C_{17}H_{24}Br_2O_4$ for compound **20** (Figure H2). We suggest the name sagonenyne for this new compound which is the third C_{15}-acetogenin containing a single tetrahydropyran ring isolated from a *Laurencia* species.

The relative stereochemistry of substituent on the tetrahydropyran ring has been established according to *J* values in ^{1}H-NMR. Protons H-9 to H-13 exhibited identical coupling constant values to those from bisezakyne-B, ensuring the relative cis stereochemistry of C-13-ethyl and the carbon chain borne by C-9 in the tetrahydropyran ring (Figure 2). However, configuration of H-6 and H-7 remained unsure.

Table 3. NMR spectroscopic data (400 MHz, $CDCl_3$) of sagonenyne (**20**)

C	δ ^{13}C (ppm)	DEPT	δ ^{1}H (ppm)	multiplicity (J (Hz))	COSY ^{1}H – ^{1}H	HMBC H → C
1	81.55	CH	2.85	d (2.0)		C3 ; C4
2	77.21	C	-	-		
3	112.13	CH	5.55	dd (15.9, 2.0)	H4 ; H1	C2 ; C4 ; C5
4	141.29	CH	6.22	dt (15.9, 7.1)	H4 ; H5a ; H5b	C1 ; C3 ; C5 ; C6
5	38.77	CH_2	a 2.55	m	H6	C3 ; C4 ; C6 ; C7
			b 2.70	m	H6	C2 ; C4 ; C6 ; C7
6	55.52	CH	4.04	ddd (9.0, 4.9, 2.7)	H5a ; H5b ; H7	C4 ; C5
7	71.38	CH	5.23	dt (9.0, 2.7)	H8a ; H8b ; H6	C5 ; C8 ; C9
8	35.35	CH_2	a 1.78	ddd (14.8, 9.0, 2.3)	H7	C6
			b 2.04	m	H9	C9
9	76.25	CH	3.43	ddd (10.7, 2.5, 1.0)	H8a ; H8b ; H10	C8 ; C10 ; C13
10	69.95	CH	3.64	br t	H11a ; H11b	C12
11	43.42	CH_2	a 2.12	m	H10 ; H12	C12 ; C13
			b 2.58	m	H10 ; H12	C9 ; C12 ; C13
12	47.50	CH	3.97	ddd (12.3, 10.2, 4.8)	H11a ; H11b ; H13	C11 ; C12 ; C14
13	83.98	CH	3.29	ddd (10.4, 9.0, 2.5)	H14a ; H14b ; H12	C9 ; C11 ; C12 ; C14 ; C15
14	26.35	CH_2	a 1.48	m	H13	C12 ; C13 ; C15
			b 2.06	m	H15	C12 ; C13 ; C15
15	9.63	CH_3	0.99	t (7.4)	H14a ; H14b	C13 ; C14
Ac	20.87	CH_3	2.13	s		
	170.19	C	-	-		

Cytotoxic Activity

The potential cytotoxic effect of the extract against a panel of different cancer cell lines, was evaluated using the resazurin assay. In order to increase the scope of this work, we selected three human tumor-derived cell lines from different origins: a leukemia monocytic cell line (THP-1), a sarcoma cell line from an osteosarcoma (MNNG-HOS), and also an epithelial cell line from a lung adenocarcinoma (A549). Data have revealed that the extract reduced cell viability in a dose dependent way (Figure 3). The effect of extract on cell viability was also cell type dependent. Overall, THP-1 cells (IC_{50} = 153.2 µg/mL), followed by MNNG-HOS cells (IC_{50} = 191.3 µg/mL), exhibited a high sensivity to the extract, whereas the A549 cell line was less sensitive, presenting the highest IC_{50} value (446 µg/mL) (Table 4).

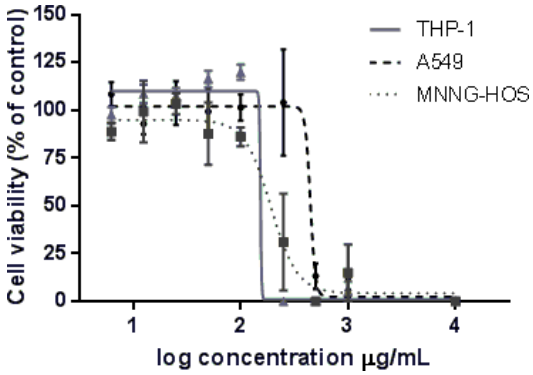


Figure 3. Dose-response effect of *Laurencia obtusa* crude extract on cell viability in different cancer cell lines. Cells were treated with different concentrations of crude extract for 24 h. Data-points correspond to the mean ± SEM of at least three independent assays. Dose-response curves were fitted to a sigmoidal function to calculate the IC_{50} values.

Table 4. IC_{50} values (µg/mL) of *Laurencia obtusa* crude extract in different cancer cell lines.

Cell Lines	*Laurencia obtusa*
MNNG-HOS	191.3
THP-1	153.2
A549	446.0

Discussion

Analysis of *L. obtusa* extract by ^{13}C-NMR allowed the identification of 24 components including sesquiterpenes, C_{15}-acetogenins, diterpenes, and sterols. The extract is rich in sesquiterpenes and its composition is dominated by β-snyderol. The sesquiterpenes identified in this extract have several skeletons — cyclofarnesane, brasilane, laurane, or cuparane — which are usually found in terrestrial plants essential oils or extracts [162]. They are also commonly identified in marine organisms, and in particular in *Laurencia* species, but these molecules usually carry one or several halogen atom.

Acetogenins are relatively common in some plant families and especially Annonaceae. These molecules possess in general 35 or 37 carbons and an ether group, but no halogen. They are also well known for their bioactivities. Algal acetogenins are smaller molecules (C_{15}) and most of them are halogenated. Investigations on acetogenins isolated from *Laurencia* species suggest that they might be chemotaxonomic markers for the genus. In particular, the determination of the type of the structure

(linear, monocyclic, or polycyclic) and the size of the ether ring could be useful in chemotaxonomical approaches [139].

Diterpenes are commonly found in marine organisms and have original skeletons compared to those of terrestrial origin [13]. As for sesquiterpenes, diterpenes are mostly mono- or polyhalogenated. In this extract, few diterpenes were identified, including two molecules previously identified in a *Laurencia* species.

We describe here a large panel of secondary metabolites identified from a *Laurencia obtusa* extract. It is well known that the metabolome and biosynthetic pathways are most of the time characteristic of one species[163], [164]. However the diversity of the *Laurencia* complex, which has previously led to wrong identification of the species [17], and the constant discovery of new components isolated from these species, avoid to establish a relation between a type of molecule and a species. Furthermore, it is noticeable that the group of acetogenins containing eight-membered cyclic ethers is the largest group among C_{15}-acetogenins isolated from *Laurencia* species or mollusks feeding on them. In contrast, only five acetogenins exhibiting one single tetrahydropyran ring have been identified: two from *Aplysia* species, one from a *Laurencia* sp. (bisezakyne-B), and two from a *L. obtusa*: scanlonenyne and sagonenyne, a new compound. This observation could constitute a marker for this species.

Besides, the ^{13}C-NMR method appeared to be a convenient method to describe the metabolite content of a species since it permits simultaneous identification of many compounds that possess a wide range of skeletons. Among them, several epimers and isomers — which might exhibit the same mass spectra — are easily identified using ^{13}C-NMR chemical shifts.

In order to explore the cytotoxicity of the extract from *Laurencia obtusa*, we have chosen three human cancer lines in order to evaluate whether this cytotoxic effect was cell type dependent. Interestingly, the human leukemia monocytic cell line (THP-1) and the osteosarcoma cell lines (MNNG-HOS) showed higher sensitivity to the extract, while the epithelial cell line from lung adenomarcinoma was the less sensitive to the extract. From our knowledge, this is the first study addressing the antiproliferative effect of *L. obtusa* extract in THP-1 and MNNG-HOS cells. Regarding A549 cells, Dellai et al. 2013 [165] evaluated the antiproliferative activity of a methanolic extract of *L. obtusa*. However, we cannot directly compare the results obtained in both studies since the extraction method was different and consequently, the chemical composition is quite dissimilar from our extract. Indeed, Dellai et al. extracted mainly phenolic compounds.

Some of the secondary metabolites of *L. obtusa* extract were previously reported as cytotoxic compounds. For instance, sesquiterpenes found in our extract — laurinterol and *iso*-laurenisol — exhibited cytotoxic activity in several human cell lines, such as MCF7, PC3, HeLa, and A431 cells [35]. Furthermore, related compounds — namely laurane and cuparane skeleton sesquiterpenes — isolated from *Laurencia* species also have cytotoxic activities in human tumor cells [47], [153]. Conversely, to the best of our knowledge, the cytotoxic activity and anticancer potential of the main compound of our extract — β-snyderol — was never addressed. Therefore, future studies are needed to explore the anticancer potential of β-snyderol and other major compounds of the extract, and also to evaluate if the cytotoxic effect described in this study is due to a single molecule or to synergistic effects achieved by two or more compounds.

Material and Methods

Plant Material

Laurencia obtusa (Hudson) J. V. Lamouroux has been collected in Sagone bay (Corsica, France, GPS point: 42°06.432'N, 8°40.278'E) during July 2015. A voucher specimen (H8314) was deposited at the Verlaque Herbarium (Institut Méditerranéen d'Océanologie, Université d'Aix Marseille). Identification of the specimen was performed by Dr. Line Le Gall (Institut de Systématique, Evolution Biodiversité—Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France) based on molecular phylogenies.

Extraction and Separation

Algae were washed with tap water and dried with a lyophilizer. The algae powder of *Laurencia obtusa* (531.8 g) were extracted with ethyl acetate at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure to yield a crude extract (4.9 g). This extract has directly been subjected to ^{13}C-NMR analysis affording the identification of compounds **1** to **5**.

Three grams of *L. obtusa* extract were fractioned on flash chromatography (SiO_2 60 A, 63–200 µm) with a gradient of mixtures of pentane–chloroform–ethyl acetate–methanol to yield 17 fractions and submitted to ^{13}C-NMR analysis affording the identification of compounds **6** to **19** and **21** to **24**. Fractions F6 to F9 were combined and submitted to repeated chromatography on silica gel using a gradient of solvents and size-exclusion on Sephadex LH-20 to yield the new compound sagonenyne (compound **20**; 1.2 mg).

NMR Analysis

All ^{13}C-NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer operating at 100.13 MHz, equipped with a 5 mm probe, in deuterated chloroform ($CDCl_3$), with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). Spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW), 4 µs (flip angle 45°); acquisition time, 2.7 s for 128 K data table with a spectral width (SW) of 24,000 Hz (240 ppm); CPD mode decoupling, digital resolution 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3000 for both samples (50 mg in 0.5 mL of $CDCl_3$).

2D NMR data for compound **20** were recorded on a Bruker AVANCE DRX500 spectrometer operating at 125.56 MHz for ^{13}C and 499.35 MHz for ^{1}H-NMR, equipped with a 1.7 mm TXI probe, in deuterated chloroform ($CDCl_3$). COSY spectrum was recorded using 1024 data points in F2 dimension and 256 in F1 dimension, a spectral width (SW) of 8 ppm in both dimensions, and an accumulation of 32 scans. HMQC and HMBC spectra were recorded using 1024 data points in F2 and 256 in F1 dimension, spectral widths (SW) of 8 ppm in F2 dimension (^{1}H-NMR) and of 250 ppm in F1 dimension (^{13}C), and accumulation of 64 scans for HMQC and 256 for HMBC.

Mass Spectrometry

Mass analyses were performed in both positive and negative modes, on an Esquire 3000 PLUS ESI ion trap mass spectrometer equipped with an electrospray source (Bruker, Wissembourg, France). The conditions were as follows: spray voltage of 4.5 kV, nebulizer and drying gas, N_2, 4 L/min; pressure of nebulizer gas, 10 psi; dry temperature, 250°C.

Identification of the Components

Identification of components was based on ^{13}C-NMR spectroscopy, following a computerized method developed in our laboratory using homemade software; by comparison of the chemical shift values of the signals in the spectra with those of reference compounds compiled in a literature library build in our laboratory. This library contains different kinds of molecules from marine organisms (about 2000): mono-, sesqui-, and diterpenes with various skeletons; sterols; C_{15}-acetogenins; fatty acids; etc.

Cell Culture

THP-1 (human leukemia monocytic cell line; ATCC® TIB-202™) and MNNG-HOS (human osteosarcoma cell line; ATCC® CRL-1547™) cells were cultured in RPMI-1640 medium with L-Glutamine, and A549 cells (human lung adenocarcinoma epithelial cells; ATCC® CCL-185™) in DMEM with 5 g/L of glucose. All mediums contained 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Cells were maintained at 37 °C and 5% CO_2 in a humidifier incubator.

Assessment of Cell Viability

Cell viability was evaluated by the resazurin assay [166] in which metabolic active cells reduce resazurin (blue) into resorufin (pink). Therefore, the magnitude of dye reduction is correlated with the number of viable cells. THP-1 (18×10^4), MNNG-HOS (6×10^4) and A549 (6×10^4) cells were plated in 48-well plates and allowed to stabilize for 12 h. The crude extract of *L. obtusa* was diluted firstly in DMSO and, subsequently, in culture medium. Then, cells were incubated with sequential concentrations of crude extract (from 0.781 to 1000 µg/mL) and controls cells were treated with the same concentrations of DMSO (the highest concentration used was 0.4% of DMSO) for 24 h.

Concerning A549 and MNNG-HOS cells, resazurin (50 µM) was added to the cells 1h before fluorescence recording, while for THP-1 the incubation with resazurin was performed for 3h. Absorbance was read using a standard spectrophotometer (Vienna, Austria) at 570 nm, with a reference wavelength of 620 nm. Treated cells were compared to the respective controls and the IC_{50} value, representing the concentration required to inhibit 50% of cell viability, was calculated via nonlinear regression.

Supplementary Materials: The following are available online. Figure H1: 2D NMR spectra of sagonenyne (**20**), Figure H2: ESI Mass spectrum of sagonenyne (**20**), Figure H3: Structures of compounds identified in the crude extract. (Annexe H)

VI CARACTERISATION CHIMIQUE DE L'EXTRAIT ET FRACTIONS OBTENUS A PARTIR DE LA POPULATION 4

Une première étude de l'extrait brut de la quatrième population par RMN ^{13}C a permis de mettre en évidence la présence d'une molécule majoritaire mais inconnue de nos banques. Le β-snydérol et le cholestérol ont également été identifiés suite à cette analyse. Des fractionnements successifs (*cf.* Annexe L) ont permis de mettre en évidence de nombreuses séries de déplacements chimiques ne correspondant à aucune des molécules connues présentes dans notre banque de données RMN.

Ainsi, pour cet extrait, nous nous sommes focalisés sur l'isolation et l'élucidation structurale des molécules inconnues. Nous avons ainsi pu identifier par association de la RMN 1D, 2D et de la spectrométrie de masse, 3 nouvelles molécules, dont deux acétogénines comportant un même motif à savoir un cycle tétrahydrofuranique lié à un cycle tétrahydropyranique par un méthylène. Ces deux molécules se distinguent par leur partie terminale : un bromoallène (molécule majoritaire de l'extrait) ou un aldéhyde α-bromo-α-β insaturé. Nous avons également identifié un diterpène présentant un squelette 19(4→3)*abeo*-labdane qui n'avait auparavant jamais été décrit dans le complexe *Laurencia*. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article dans « Molecules ». Une partie des travaux a été réalisée lors d'un stage d'un mois à la plateforme de chimie analytique de Neuchâtel en Suisse.

La structure des deux nouvelles acétogénines identifiées s'avère très proche de celle de la sagonényne décrite dans la population 3 et également retrouvée dans cet extrait. Nous proposons une voie de biosynthèse commune à ces trois métabolites. Celle-ci permettrait d'envisager que cette structure assez rare dans le complexe *Laurencia* puisse constituer un marqueur chimique des *L. obtusa* récoltées autour de la Corse.

New Metabolites Isolated from a *Laurencia obtusa* Population Collected in Corsica

Hélène Esselin[1], Félix Tomi[1], Ange Bighelli[1] and Sylvain Sutour[1,2,*]

[1]Université de Corse — CNRS, UMR 6134 SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France; helene.esselin@gmail.com (H.E.); felix.tomi@univ-corse.fr (F.T.); bighelli@univ-corse.fr (A.B.)

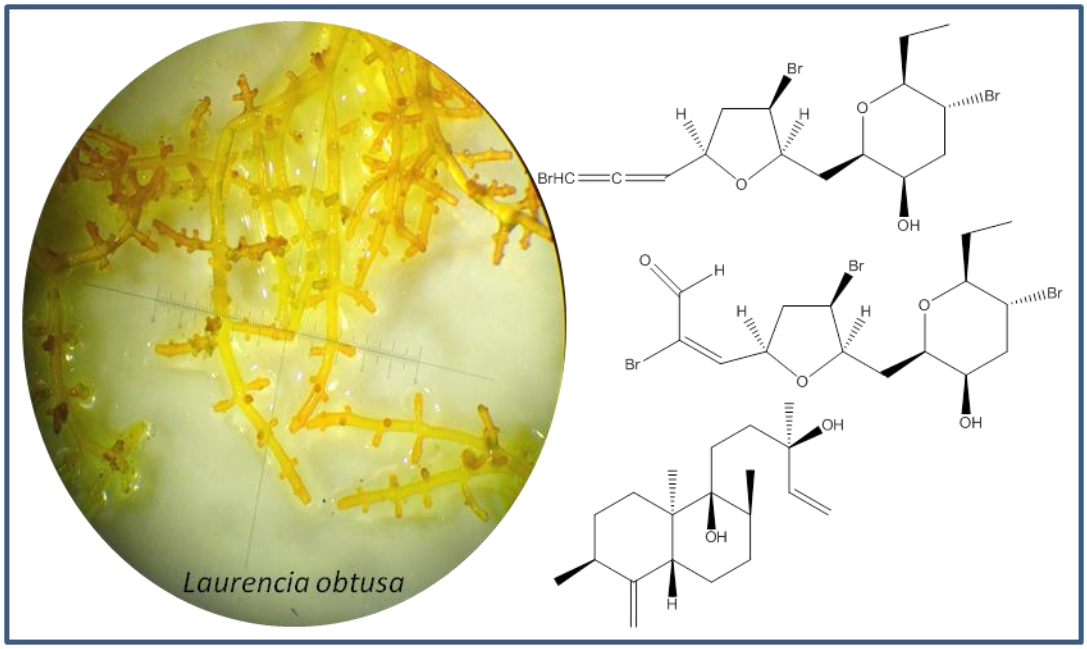
[2]Neuchâtel Platform of Analytical Chemistry, University of Neuchâtel, Avenue de Bellevaux 51, 2000 Neuchâtel, Switzerland

*Correspondence: sylvain.sutour@unine.ch; Tel.: +41-32-718-24-35

Received: 19 February 2018; Accepted: 16 March 2018; Published: 21 March 2018

Abstract: The chemical investigation of an ethyl acetate extract (EtOAc) obtained from *Laurencia obtusa*, collected in Corsica, allowed for the identification of three new compounds (**1**, **2**, and **4**) and six known compounds. Compounds **1** to **4** were isolated and fully characterized by a detailed spectroscopic analysis. Compounds **1** and **2** are two C_{15}-acetogenins sharing the same ring system: a tetrahydropyran linked by a methylene to a tetrahydrofuran ring. Compound **1** exhibits a bromoallene unit whereas compound **2** possesses an uncommon α-bromo-α,β-unsaturated aldehyde terminal unit. Compound **4** is the first diterpene exhibiting a 19(4→3)*abeo*-labdane skeleton isolated from a *Laurencia* species. Isolation of concinndiol (compound **3**) together with compound **4** suggests a common biosynthetic origin. Additionally, five known compounds, namely sagonenyne, laurene, α-bromocuparene, microcladallene A, and β-snyderol were identified in chromatographic fractions by NMR analysis using a computerized method that was developed in our laboratory.

Keywords: *Laurencia obtusa*; NMR; non terpenic; C_{15}-acetogenin; *abeo*-labdane



Introduction

Due to its wide chemodiversity, the genus *Laurenci*a has been one of the most studied genera among marine organisms. Indeed, the chemistry of *Laurencia* populations has been the subject of a number of investigations because of the large amounts of various halogenated metabolites that are produced by these populations. Besides sesquiterpenes [137] or diterpenes [167], the *Laurencia* species are known to produce C_{15} non-terpenic metabolites known as acetogenins. Most of these molecules are halogenated *O*-bridged cyclic ethers, exhibiting conjugated enyne, bromoallene, or bromopropargylic terminus [138]. They are biosynthesized from C_{16} fatty acid derivatives and may be regarded as chemotaxonomical markers of the *Laurencia* complex [138], [139], [168]. Diterpenes isolated from the *Laurencia* species or mollusks feeding on them (especially from the genus *Aplysia*) are divided into approximately twenty skeletons and one hundred compounds. Labdane-related compounds isolated from the *Laurencia* species are mostly brominated and represent more than half of the diterpenes [13].

Laurencia obtusa, the type species of the genus *Laurencia*, originates from southern England but is now widespread all over the world in warm and temperate waters, such as the Mediterranean Sea [9]. As part of our ongoing work on secondary metabolites of the *Laurencia* species, an ethyl acetate extract (EtOAc) of a *Laurencia obtusa* (Hudson) J.V. Lamouroux population, collected in Erbalunga (Corsica, France), was subjected to chromatographic fractionation in order to afford two new C_{15}-acetogenins (compounds **1** and **2**) and one new rearranged labdane derivative (compound **4**). Their structures were elucidated based on a detailed interpretation of 1D and 2D NMR, and mass spectrometry. A biogenetic pathway leading to the new acetogenins **1**-**2** and diterpene **4** is also proposed.

Results

The population of *Laurencia obtusa*, collected in Erbalunga (Corsica, France), was air-dried, frozen with liquid nitrogen, reduced to powder, and then extracted at room temperature with EtOAc. The extract was analyzed using a computerized method that was developed in our laboratory based on ^{13}C NMR [140]. This method allowed for the identification of individual components with limited fractionations, by comparison of the signals of the mixture spectrum with those of reference spectra present in a laboratory-built library. This revealed that the extract was dominated by a non-identified compound (**1**). Therefore, the extract was subjected to chromatographic fractionation, which led to the isolation of compounds **1** to **4** and to the identification of five known compounds: sagonenyne, laurene, α-bromocuparene, microcladallene A, and β-snyderol (Figure I29).

*Structure Elucidation of Compounds **1**–**4***

The molecular formula of compound **1**, $C_{15}H_{21}Br_3O_3$, was determined by HRESIMS and from NMR data (Table1, Figures I1–I7). Interrogation of our ^{13}C NMR database suggested that there were similarities to the previously described sagonenyne (compound **5**) [142]. Interpretation of 1D and 2D NMR spectra confirmed that compound **1** shared the same 10-hydroxy-12-bromo-13-ethyltetrahydropyran ring as sagonenyne. However, the differences between the chemical shifts of both of the molecules (Δδ) were larger than 0.50 ppm for seven out of 15 carbons, indicating that half of the molecules exhibited different structural features. Furthermore, compound **1** lacked the acetoxyl group and exhibited a bromoallene unit [δ_H 6.11 (1H, dd, *J* = 5.7, 1.4 Hz, H-1) and 5.66 (1H, dd, *J* = 7.2, 5.7 Hz, H-3); δ_C 73.94 (C-1), 201.63 (C-2) and 102.01 (C-3)] instead of an en-yne unit. Besides the tetrahydropyran (THP) ring, the ^{1}H and ^{13}C NMR spectra of compound **1** showed resonances for three methines, one of which was linked to a bromine atom [δ_H 4.46 (1H, ddd, *J* = 6.2, 3.5, 1.8 Hz, H-6); δ_C 53.08 (C-6)], while the other

two were linked to oxygen atoms [δ_H (4.64, 1H, dddd, *J* = 9.0, 7.2, 4.4, 1.4 Hz, H-4) and 3.89 (1H, ddd, *J* = 9.5, 3.5, 2.3 Hz, H-7); δ_C 74.83 (C-4) and 79.09 (C-7)].

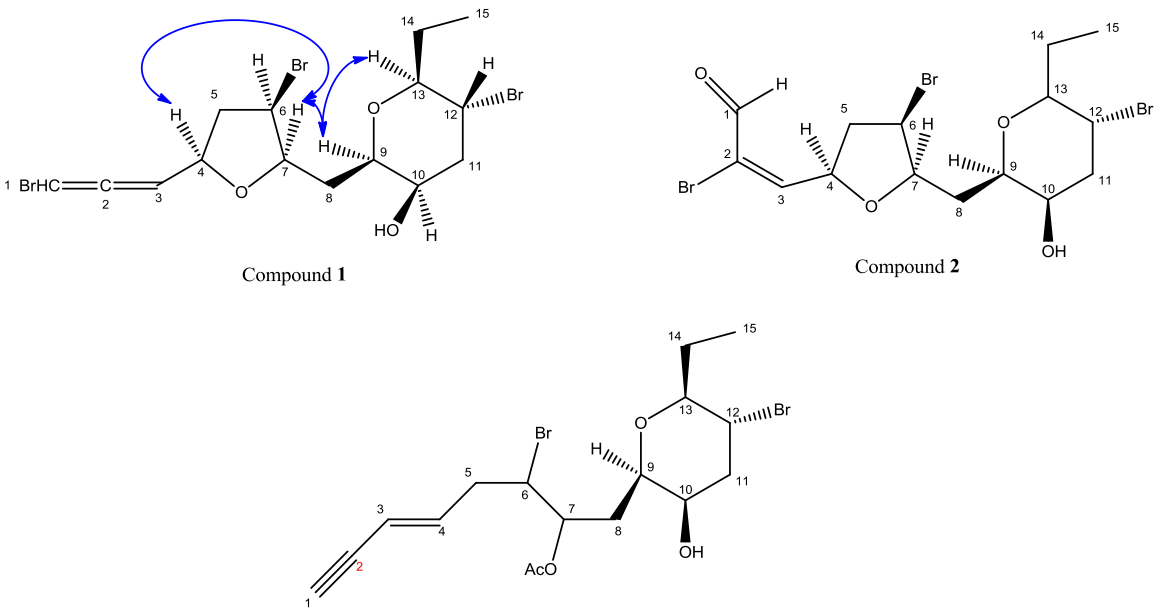


Figure 1. Structures of compounds **1**, **2,** and sagonenyne (**5**). Key NOESY correlations of compound **1,2,** and sagonenyne (**5**). Key NOESY correlations of compound **1** are represented by blue arrows.

The presence of three bromine atoms was confirmed by the typical isotopic pattern which was obtained by HRESIMS. The molecular formula of compound **1** indicated four degrees of unsaturation, revealing that compound **1** possessed a second cycle. Indeed, multiplicity and ^{13}C NMR chemical shifts of C-4 and C-7 were characteristic of a tetrahydrofuran (THF) ring linked between those carbons [72]. Finally, compound **1** was identified as a C_{15}-acetogenin exhibiting a bromoallene unit and a THF ring linked by a methylene to a THP ring.

Table 1. NMR spectroscopic data (400 MHz, $CDCl_3$) of compounds **1** and **2**.

	1		**2**	
	δ_H (*J* in Hz)	**δ_C**	**δ_H (*J* in Hz)**	**δ_C**
1	6.11 (dd 5.7, 1.4)	73.94	9.22 (s)	185.19
2	-	201.63	-	126.11
3	5.66 (dd 7.2, 5.7)	102.01	7.54 (d 6.3)	156.11
4	4.64 (dddd 9.0, 7.2, 4.4, 1.4)	74.83	5.09 (ddd 10.1, 6.3, 3.8)	76.56
5a	2.97 (ddd 15.0, 9.0, 6.2)	43.01	3.24 (ddd 15.0, 10.1, 5.6)	44.12
5b	2.46 (ddd 15.0, 4.4, 1.8)		2.47 (ddd 15.0, 3.8, 1.1)	
6	4.46 (ddd 6.2, 3.5, 1.8)	53.08	4.54 (ddd 5.6, 3.0, 1.1)	53.68
7	3.89 (ddd 9.5, 3.5, 2.3)	79.09	3.97 (ddd 9.2, 3.0, 2.8)	79.93
8	2.01 (m)	36.20	2.05 (m)	36.24
8b	1.85 (ddd 14.5, 9.5, 4.1)		1.89 (ddd 14.7, 9.2, 3.7)	
9	3.71 (ddd 9.6, 4.1, 1.1)	77.16	3.71 (ddd 10.0, 3.7, 1.1)	77.22
10	3.75 (ddd 3.2, 2.8, 1.1)	69.75	3.75 (ddd 3.2, 3.0, 1.1)	69.82
11a	2.60 (ddd 13.6, 4.6, 3.2)	43.17	2.61 (ddd 13.8, 4.6, 3.2)	43.23
11b	2.13 (ddd 13.6, 12.3, 2.8)		2.14 (m)	
12	4.03 (ddd 12.3, 10.2, 4.6)	47.95	4.03 (ddd 12.4, 10.1, 4.6)	47.58
13	3.38 (ddd 10.2, 8.8, 2.3)	83.53	3.39 (ddd 10.1, 8.7, 2.4)	83.63
14a	2.06 (m)	26.36	2.07 (m)	26.32
14b	1.51 (m)		1.52 (m)	
15	0.97 (t 7.4)	9.57	0.99 (t 7.4)	9.58

The determination of the relative configuration of stereogenic centers of compound **1** was based on coupling constant analysis and NOESY spectra. Protons H-9, H-10, H-12, and H-13 exhibited similar coupling constant values to the previously described sagonenyne. Furthermore, the presence of a NOESY correlation between H-13 and H-9 confirmed a *syn* orientation of the THP ring linkage. Coupling constants of H-10 ($^3J_{H10\text{-}H9}$ = 1.1 Hz; $^3J_{H10\text{-}H11a}$ = 3.2 Hz) were consistent with a *syn* orientation of the hydroxyl. Conversely, the large coupling constants between H-12 and H-13 (10.2 Hz) and between H-12 and H-11b (12.3 Hz) indicated that the bromine was *anti*-oriented compared with all other substituents of the THF ring. Moreover, a NOESY cross-peak observed between H-7 and H-4 indicated a *syn* orientation of the THF ring linkage. The small coupling constant between H-6 and H-7 (3.5 Hz) showed that the bromine also had a *syn* orientation, indicating an R relative configuration of C-6. In addition, a NOESY cross-peak observed between H-7 and H-9 allowed for linking the relative configuration of both THF and THP rings, as shown on Figure 1. Finally, the relative configuration of the molecule was established as 4R*,6R*,7R*,9R*,10R*,12R*,13S* (Figure1).

The elemental composition of compound **2** was deduced as $C_{15}H_{21}Br_3O_4$ based on the HRESIMS and NMR data (Figures I8–I13). ^{1}H and ^{13}C NMR data (Table 1) of compound **2** were highly similar to those of compound **1**. 1D and 2D NMR spectra confirmed the presence of both THP and THF rings exhibiting the same substitution pattern (two bromines and one hydroxyl) as compound **1**. The most significant differences were observed for the chemical shifts of C-1 to C-3, indicating a different terminal unit for compound **2**. ^{1}H, ^{13}C, and HSQC NMR spectra of compound **2** revealed the presence of an α,β-unsaturated aldehyde functionalized in α position [δ_H 9.22 (1H, s, H-1) and 7.54 (1H, d, *J* = 6.3 Hz, H-3); δ_C 185.19 (C-1), 126.11 (C-2) and 156.11 (C-3)]. According to ^{13}C NMR chemical shifts, multiplicity, the molecular formula, and the HRMS isotopic pattern, C-2 was bonded to a bromine.

The relative configuration of the stereogenic centers was determined based on H,H-coupling constant analysis and NOESY data. Coupling constant values of H-4, H-7, H-9, and H-13 were identical to those observed for compound **1**, indicating that both THF and THP ring linkages had a *syn* orientation. Moreover, the large coupling constant between H-12 and H-13 (10.1 Hz), as well as the small coupling constants between H-9 and H-10 (1.1 Hz), and between H-6 and H-7 (3.0 Hz), led to the same conclusions as for compound **1**: except the C-12 substitution orientation, all other substituents exhibited a *syn* relative orientation. Therefore, compound **2** exhibited the same relative configuration as **1**, namely 4R*,6R*,7R*,9R*,10R*,12R*,13S* (Figure 1).

The molecular formula of compound **3**, $C_{20}H_{35}BrO_2$, was established by HRESIMS (Figure I20). An interrogation of our ^{13}C NMR database provided no suitable candidate for this compound. However, the ^{13}C chemical shifts of compound **3** recorded in acetone-d_6 matched perfectly with those of concinndiol [169], [170]. Since NMR data of concinndiol has remained incomplete up to this point, we report here its complete and assigned list of ^{1}H and ^{13}C NMR data (Table 2, Figures I14–I19) for the first time. The assignment of OH signals was based on the HMBC spectrum. Long-range correlation cross-peaks were observed between the OH resonance at 3.04 ppm and carbons C-8, C-9, C-10, and C-11, as well as between the signal at 3.71 ppm, and carbons C-12 and C-14.

The molecular formula of compound **4** was established by HRESIMS (Figures I27–I28) to be $C_{20}H_{34}O_2$, indicating four degrees of unsaturation. An interpretation of 1D and 2D NMR data (Table 2, Figures I21–I26, acetone-d_6) showed that compound **4** exhibited one exocyclic double bond [δ_H (4.77, 1H, t, *J* = 2.1 Hz, H-18a) and 4.41 (1H, t, *J* = 2.1 Hz, H-18b); δ_C 157.43 (C-4) and 106.62 (C-18)] and a terminal double bound in α-position of an alcohol function [δ_H (5.92, 1H, dd, *J* = 17.3, 10.7 Hz, H-14), 5.21 (1H, dd, *J* = 17.3, 1.9 Hz, H-15a) and 4.97 (1H, dd, *J* = 10.7, 1.9 Hz, H-15b); δ_C 73.32 (C-13), 147.15 (C-14) and 111.34 (C-15)]. Additionally, compound **4** showed resonances of four methyls, six methylenes,

three methines, and two quaternary carbons, one of which was oxygenated [δ_C 76.51 (C-9)]. All of these data matched with a labdane structure similar to the one of compound **3**. The largest chemical shift differences ($\Delta\delta$ >2.00 ppm) between compounds **4** and **3** were observed on C-1 to C-5, indicating that the modification between both compounds occurred on cycle A. Indeed, 2D NMR data showed that the bromine atom bore by C-3 in compound **3** was substituted by a methyl. This observation is consistent with the molecular formula deduced from HRMS and the shielded chemical shift of C-3 compared with compound **3** (39.53 *vs*. 71.35). Moreover, HMBC spectra allowed for locating the exocyclic double bond on C-4, adding a second modification on cycle A. Finally, the structure of compound **4** was deduced to be a 19(4 → 3)*abeo*-labdane. This kind of skeleton had been previously isolated from the Mediterranean sponge *Mycale rotalis* [171]. Indeed, rotalin A is the (9-13)-epoxy analogue of compound **4**. ^{13}C chemical shifts of both molecules were compared and no significant difference was observed ($\Delta\delta$ < 1.35 ppm).

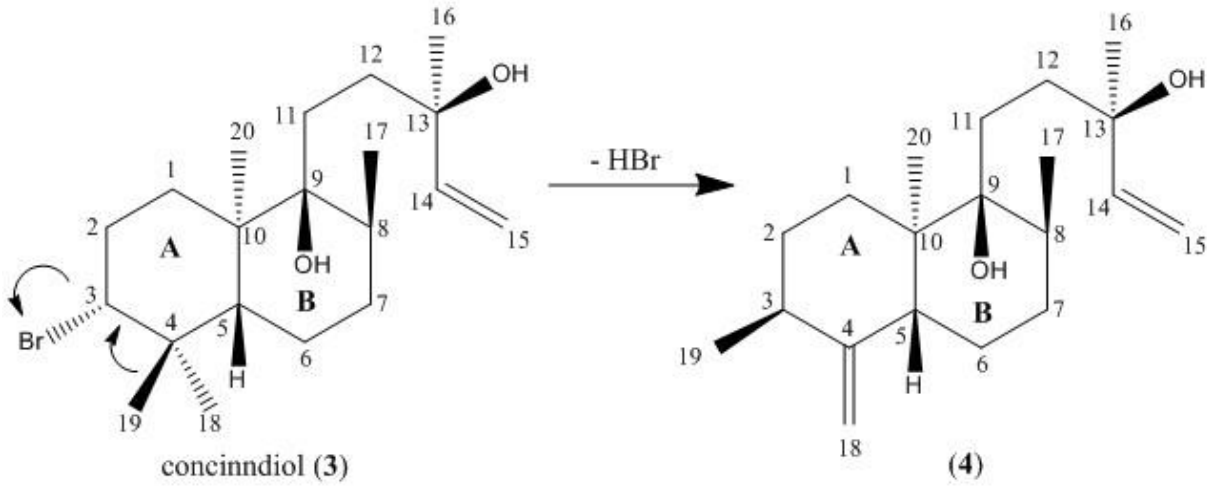


Figure 2. Biosynthetic pathway from concinndiol (compound **3**) to compound **4**.

The relative configuration of C-3, C-5, C-8, and C-10 was determined based on NOESY data. NOESY cross-peaks observed from H-19 to H-1a, H-2b, and H-5, along with correlations from H-5 to H-1a and H-7a, as well as from H-17 to H-7a, indicated that H-5 and methyls C-17 and C-19 had a *syn* orientation. NOESY cross-peaks observed from H-20 to H-1b and H-8 showed that methyl C-20 was positioned on the other side of the molecule. Concerning C-9 and C-13, the relative configuration was established by a comparison of chemical shifts with the data contained in the literatures. Both carbons exhibited a $\Delta\delta$ <0.40 ppm with concinndiol or rotalin A, indicating the same relative configuration. Therefore, compounds **3** and **4** share the same relative configuration, except for carbon C-3. This observation is consistent with the hypothetic pathway from concinndiol to compound **4** inspired by the biosynthetic formation of pannosanol [13] (Figure 2).

Table 2. NMR spectroscopic data (400 MHz, acetone-d_6) of compounds **3** and **4**.

	3		**4**	
	δ_H (*J* in Hz)	**δ_C**	**δ_H (*J* in Hz)**	**δ_C**
1a	1.88 (m)	34.55	2.14 (m)	27.21
1b	1.47 (m)		1.30 (m)	
2	2.18 (m)	32.00	1.75 (m)	29.65
2b	2.05 (m)		1.43 (m)	
3	4.07 (dd 12.7, 4.2)	71.35	2.47 (m)	39.53
4	-	40.27	-	157.43
5	1.85 (m)	47.54	2.69 (m)	39.32
6a	1.59 (m)	24.08	1.37 (m)	25.30
6b	1.44 (m)			
7a	1.42 m)	32.18	1.52 (m)	31.09
7b			1.40 (m)	
8	1.72 (m)	37.12	1.83 (m)	36.00
9	-	76.87	-	76.51
10	-	44.33	-	45.97
11a	1.67 (m)	29.20	1.66 (m)	29.85
11b	1.58 (m)			
12	1.62 (m)	38.47	1.64 (m)	38.47
13	-	73.36	-	73.32
14	5.91 (dd 17.3, 10.7)	147.17	5.92 (dd 17.3, 10.7)	147.15
15a	5.20 (dd 17.3, 1.9)	111.35	5.21 (dd 17.3, 1.9)	111.34
15b	4.96 (dd 10.7, 1.9)		4.97 (dd 10.7, 1.9)	
16	1.22 (s)	28.31	1.23 (s)	28.35
17	0.86 (d 6.6)	16.81	0.90 (d 6.6)	16.83
18a	0.96 (s)	18.74	4.77 (t 2.1)	106.62
18b			4.41 (t 2.1)	
19	1.05 (s)	31.29	1.08 (d 7.2)	20.08
20	0.99 (s)	16.65	0.78 (s)	15.49
OH (C-9)	3.04 (br s)	-	3.00 (br s)	-
OH (C-13)	3.71 (br s)	-	3.64 (br s)	-

Discussion

The group of acetogenins containing six-membered cyclic ethers is one of the smallest groups among *Laurencia* acetogenins. It includes 14 compounds which can be divided into four subgroups: those containing only one tetrahydropyran ring, those containing both tetrahydropyran and tetrahydrofuran rings (fused or not), and those containing two fused tetrahydropyran rings [17]. To the best of our knowledge, only two natural C_{15}-acetogenins containing separated tetrahydropyran and tetrahydrofuran rings were previously described [168]. One had been isolated from a *Laurencia obtusa* specimen from the Canary Islands [72] and another from the sponge *Mycale Rotalis* [88], and later from a *Laurencia paniculata* specimen from Turkey [77] and from a *Laurencia obtusa* population that was collected in Greece [87]. They both bear different substitution patterns from compounds **1** and **2** and are characterized by a bromopropargylic terminal unit. Furthermore, only one C_{15}-acetogenin containing a halogenated aldehyde terminus has been described [16]. This linear metabolite was isolated from *L. nidifica* [172] and is supposed to be synthesized from its corresponding enyne hydrocarbon.

Compounds **1**, **2**, and sagonenyne (**5**) are the only examples of acetogenins containing the same (9R*,10R*,12R*,13S*)-10-hydroxy-12-bromo-13-ethyltetrahydropyran ring (Scanlonyne exhibiting a

9,13-*trans* THP ring [85]). Consequently, we suggest a common biogenesis (Figure 3) of those compounds starting from *trans*-laurencenyne, a C_{15} acetylenic polyene isolated from a *L. okamurai* population [173]. Indeed, a first (9,10)-epoxydation followed by a (9,13)-cyclization through the oxygen atom allows the formation of a common precursor for compounds **1**, **2**, and sagonenyne (**5**). Additionally, microcladallene A (compound **8**), sharing the same relative configuration of the THP ring, could also be obtained from this compound. A second (6,7)-epoxydation, followed by a C-6 bromination may lead to sagonenyne (compound **5**) after acetylation or to compound **1** after (4,7)-THF ring closure. As shown in Figure 3, a series of hypothetic rearrangements and oxidation from the (6,7)-epoxy derivative may generate compound **2**. The fact that these compounds likely all share a common origin suggests that they may constitute interesting taxonomical markers of the *Laurencia obtusa* species from Corsica.

Compared to C_{15}-acetogenins or sesquiterpenes, diterpenes represent a small group among *Laurencia* secondary metabolites. Labdanes and related metabolites are the largest group of diterpenes isolated from the *Laurencia* species or mollusks grazing on them, and account for about 50% of the *Laurencia* diterpenes [167]. Among them, only two labdane derivatives bear a hydroxyl on C-9 (concinndiol and neoconncindiol hydroperoxyde) and all of them exhibit a bromine substitution on C-3, except laukarlaol and neoconcinndiol hydroperoxyde [17]. Altogether, the 19(4→3)*abeo*-labdane skeleton isolated in this study has never been reported in *Laurencia*, and thus represents a highly original structure to be added to the already extensive chemical diversity of this genus.

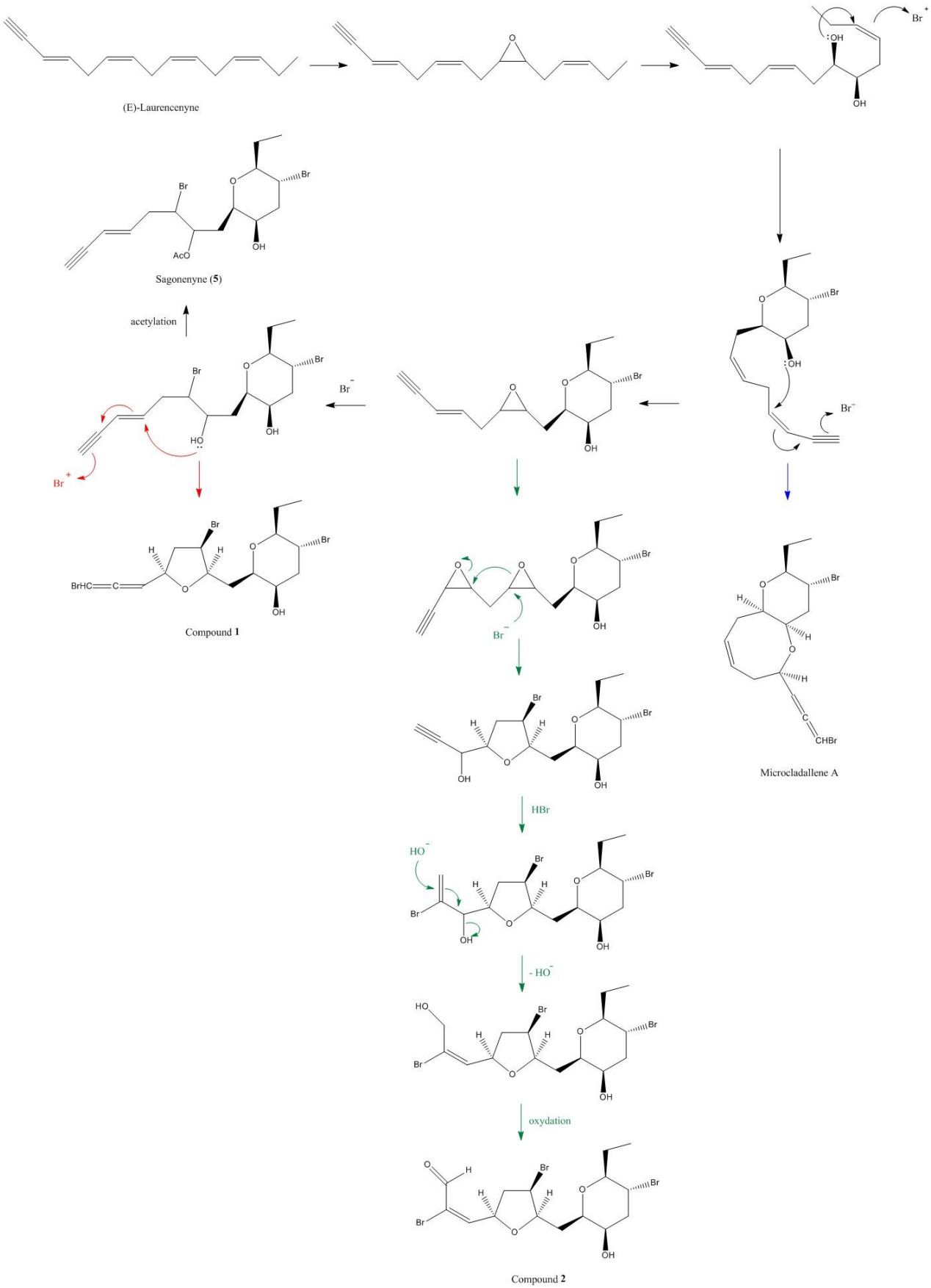


Figure 3. Hypothetic biogenesis of compounds **1**, **2**, and microcladallene A.

Material and Methods

General Experimental Procedures

The NMR Spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) operating at 400.13 MHz for ^{1}H and at 100.13 MHz for ^{13}C, using $CDCl_3$ or acetone-d_6 with TMS (Tetramethylsilane) as the internal standard. COSY spectra were recorded using 512 data points in F2 dimension and 256 data points in F1 dimension, a spectral width (SW) of 12 ppm in both dimensions, and an accumulation of 32 scans. HSQC and HMBC spectra were recorded using 512 data points in F2 and 256 data points in F1 dimension, SW of 12 ppm in F2 dimension (^{1}H) and of 220 ppm in F1 dimension (^{13}C), and an accumulation of 64 scans. NOESY spectra were recorded using the Bruker microprogram (PULPROG noesyph, Bruker, Wissembourg, France), a mixing time of 300 ms, 1024 data points in F2 dimension and 256 data points in F1 dimension, a SW of 12 ppm in both dimensions, and an accumulation of 64 scans.

High resolution mass spectra were obtained by injecting samples dissolved in MeOH on a Synapt G2 QTOF mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) in both electrospray positive and negative modes. The following conditions were employed: capillary voltage, 2.8 kV (positive mode) and −2.0 kV (negative mode); source block temperature, 120°C; desolvation gas (nitrogen) flow and temperature 400°C and 800 L/h; cone voltage +25 V (positive mode) and −25 V (negative mode). The mass range was 85–1200 Da, MS scan time was set to 0.4 s, and a resolution of 20,000 (FWHM at m/z 500) was selected. Sub-2 ppm mass accuracy was obtained by infusing a 0.5 mM solution of sodium formate, as an external calibrant prior to measurements, and a 500 ng/mL solution of leucine-enkephalin, as an internal calibrant (LocksprayTM) during measurements. Data acquisition and processing were performed in Masslynx 4.1 (Waters, Milford, MA, USA).

A semi-preparative reversed phase HPLC was used to purify components (XTerra® Prep MS C18 OBD™, Waters, Milford, MA, USA 5 µm, 19 × 150 mm) and column chromatography was performed with silica gel.

Plant Material

Specimens of Laurencia obtusa were collected at a depth of 10–20 cm in June 2016, in Erbalunga (41°44'28.4" N, 9°27'41.9" E). The voucher specimen (H8318) was deposited at the Verlaque Herbarium, HCOM (Herbarium of Centre d'Océanologie de Marseille), Aix-Marseille Université, Institut Méditerranéen d'Océanologie, France. Identification based on molecular phylogenies was then performed by Line Le Gall (Institut de Systématique, Evolution et Biodiversité, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris).

Extraction and Isolation

Algae were washed with tap water and dried with a lyophilizer. After removing the solvent under reduced pressure, the air-dried sample of *Laurencia obtusa* (152.2 g) was extracted with EtOAc at room temperature to afford a dark green crude extract (1.1305 g). This extract was subjected to silica gel column chromatography (Sigma, St. Louis, MO, USA, SiO_2, 63–200 µm, 75 g) and eluted with a gradient of pentane/$CHCl_3$/EtOAc/MeOH to afford seven fractions (F1–F7). F2, F3, and F4 (602.0 mg, 50%Pentane/50%$CHCl_3$) were combined and submitted to repeated column chromatographies (SiO_2, 35–70 µm, 30 g) using the same gradient to isolate compounds **1** to **4**. The final steps of purification were done for each compound, with the exception of compound **2**, on reversed phase semi-preparative HPLC (Waters, Milford, MA, USA) to afford compound **1** (ACN/H_2O 0.5:0.5 to 0:1, v/v, flow rate 8

mL/min, t_R = 21 min), compound 3 (ACN/H_2O 0.6:0.4 to 0:1, *v/v*, flow rate 8 mL/min, t_R = 25 min) and compound **4** (ACN/H_2O 0.65:0.35 to 0:1, *v/v*, flow rate 8 mL/min, t_R = 17 min).

*Compound **1***

HRESIMS (Figure I7) m/z 530.9025, 532.8994, 534.8971, 536.8964 $[M + HCOO]^-$ (32:100:95:34) (calcd for $C_{16}H_{22}{}^{79}Br_3O_5$, 530.9018; $C_{16}H_{22}{}^{79}Br_2{}^{81}BrO_5$, 532.8997; $C_{16}H_{22}{}^{79}Br^{81}Br_2O_5$, 534.8977; $C_{16}H_{22}{}^{81}Br_3O_5$, 536.8956); m/z 484.8986, 486.8971, 488.8927, 490.8894 $[M - H]^-$ (4:10:11:4) (calcd for $C_{15}H_{20}{}^{79}Br_3O_3$, 484.8963; $C_{15}H_{20}{}^{79}Br_2{}^{81}BrO_3$, 486.8942; $C_{15}H_{20}{}^{79}Br^{81}Br_2O_3$, 488.8622; $C_{15}H_{20}{}^{81}Br_3O_3$, 490.8901); ^1H NMR and ^{13}C NMR, see Table 1.

*Compound **2***

HRESIMS (Figure I13) m/z 546.8997, 548.8940, 550.8935, 552.8925 $[M + HCOO]^-$ (20:50:58:18) (calcd for $C_{16}H_{22}{}^{79}Br_3O_6$, 546.8967; $C_{16}H_{22}{}^{79}Br_2{}^{81}BrO_6$, 548.8946; $C_{16}H_{22}{}^{79}Br^{81}Br_2O_6$, 550.8926; $C_{16}H_{22}{}^{81}Br_3O_6$, 552.8905); m/z 500.8911, 502.8882, 504.8881, 506.8855 $[M - H]^-$ (30:98:100:28) (calcd for $C_{15}H_{20}{}^{79}Br_3O_4$, 500.8912; $C_{15}H_{20}{}^{79}Br_2{}^{81}BrO_4$, 502.8891; $C_{15}H_{20}{}^{79}Br^{81}Br_2O_4$, 504.8871; $C_{15}H_{20}{}^{81}Br_3O_4$, 506.8851); ^1H NMR and ^{13}C NMR, see Table 1.

*Concinndiol (Compound **3**)*

HRESIMS (Figure I20) m/z 351.1681, 353.1664 $[M - 2OH - H]^+$ (98:100) (calcd for $C_{20}H_{32}{}^{79}Br$, 351.1687; $C_{20}H_{32}{}^{81}Br$, 353.1667); ^1H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) δ 5.91 (1H, dd, *J* = 17.3, 10.7, H-14), 5.23 (1H, dd, *J* = 17.3, 1.1, H-15a), 5.09 (1H, dd, *J* = 10.7, 1.1, H-15b), 4.05 (1H, dd, *J* = 12.0, 4.8, H-3), 2.15 (2H, m, H-2), 1.76 (1H, m, H-1a), 1.69 (1H, m, H-5), 1.67 (1H, m, H-11a), 1.63 (1H, m, H-6a), 1.63 (1H, m, H-12), 1.50 (1H, m, H-11b), 1.48 (1H, m, H-7a), 1.47 (1H, m, H-1a), 1.41 (1H, m, H-6b), 1.30 (3H, s, H-16), 1.09 (3H, s, H-19), 0.98 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, s, H-20), 0.86 (3H, d, *J* = 6.6, H-19); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 145.15 (CH, C-14), 111.92 (CH_2, C-15), 76.52 (C, C-9), 73.53 (C, C-13), 69.93 (CH, C-3), 47.06 (C, C-5), 43.48 (C, C-10), 39.65 (C, C-4), 37.05 (CH, C-12), 36.52 (CH, C-8), 33.83 (CH_2, C-1), 31.41 (CH_2, C-7), 31.01 (CH_2, C-2), 30.90 (CH_3, C-19), 27.96 (CH_2, C-11), 27.93 (CH_3, C-16), 23.18 (CH_2, C-6), 18.40 (CH_3, C-18), 16.43 (CH_3, C-17), 16.12 (CH_3,C-20).

*Compound **4***

HRESIMS (Figure I27 and I28) m/z 271.2427 $[M - 2OH - H]^+$ (calcd for $C_{20}H_{31}$, 271.2425); m/z 351.2537 $[M + HCOO]^-$ (calcd for $C_{21}H_{35}O_4$, 351.2535); ^1H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) δ 5.90 (1H, dd, *J* = 17.3, 10.7, H-14), 5.23 (1H, dd, *J* = 17.3, 1.2, H-15a), 5.07 (1H, dd, *J* = 10.7, 1.2, H-15b), 4.80 (1H, t, *J* = 1.8, H-8a), 4.44 (1H, t, *J* = 2.0), 2.52 (1H, br t, H-5), 2.50 (1H, br t, H-3), 2.02 (1H, td, *J* = 13.4, 4.3, H-1a), 1.83 (1H, m, H-8), 1.75 (1H, m, H-2a), 1.64 (1H, m, H-12), 1.62 (2H, m, H-11), 1.48 (1H, m, H-7a), 1.44 (1H, m, H-2b), 1.41 (2H, m, H-6), 1.29 (3H, s, C-16), 1.28 (1H, s, H-1b), 1.10 (3H, d, *J* = 7.2, H-19), 0.90 (3H, d, *J* = 6.6, H-17), 0.77 (3H, s, H-20); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 156.06 (C, C-4), 145.24 (CH, C-14), 111.84 (CH_2, C-15), 106.43 (CH_2, C-18), 76.42 (C, C-9), 73.48 (C, C-13), 45.17 (C, C-10), 38.77 (CH, C-5), 38.46 (CH, C-3), 37.24 (CH, C-12), 35.62 (CH, C-8), 30.42 (CH_2, C-7), 28.74 (CH_2, C-11*), 28.72 (CH_2, C-2*), 27.84 (CH_3, C-16), 26.54 (CH_2, C-1), 24.28 (CH_2, C-6), 19.77 (CH_3, C-19), 16.45 CH_3, C-17), 14.88 (CH_3, C-20).

Supplementary Materials: The following are available online. Figure I1–I6: 1D and 2D NMR spectra of **1** in $CDCl_3$, Figure I7: HRMS spectrum of **1** (Zoom) in negative ionization, Figure I8–I12: 1D and 2D NMR spectra of **2** in $CDCl_3$, Figure I13: HRMS spectrum of **2** (Zoom) in negative ionization, Figure I14–I19: 1D and 2D NMR spectra of **3** in acetone-d_6, Figure I20: HRMS spectrum of **3** (Zoom) in negative

ionization, Figure I21–I26: 1D and 2D NMR spectra of **4** in acetone-d_6, Figure I27: HRMS spectrum of **4** (Zoom) in positive ionization, Figure I28: HRMS spectrum of **4** (Zoom) in positive ionization, Figure I29: Structures of known compounds identified in *L. obtusa* extract. (Annexe I)

L'extrait de chacune des quatre populations a pu être caractérisé par RMN ^{13}C permettant d'identifier au total 56 molécules (*cf.* tableau suivant), par comparaison avec les données issues de la littérature ou par élucidation structurale (RMN 2D). Si quelques molécules ont été identifiées dans plusieurs populations, comme par exemple les snydérols α et β, le laurène ou la 3-*E*-laurényne, on peut toutefois noter que chacun des extraits étudiés est caractérisé par un groupe de molécules qui diffère d'une population à l'autre.

En effet, les proportions relatives des 3 types de métabolites étudiés (sesquiterpène, diterpène, C_{15} ACG) diffèrent d'une population à l'autre (*cf.* figure suivante). Ainsi, on peut remarquer que la population 3 est dominée par la présence de sesquiterpènes, notamment de type laurane, bien que le β-snydérol soit majoritaire de cet extrait.

Les proportions en sesquiterpènes et acétogénines sont relativement élevées pour chacun des extraits, en revanche le pourcentage de diterpènes varie beaucoup plus d'une population à l'autre. En effet, aucun diterpène n'a été identifié dans la population 2 tandis qu'ils sont présents en proportion équivalente à celle des sesquiterpènes dans la population 1.

Il est intéressant de noter que les populations 1 et 3, qui ont été échantillonnées sur le même point de récolte, possèdent des compositions chimiques différentes, même si ce sont les mêmes types de métabolites qui ont été identifiés (lauranes et ACG « en-yne » notamment).

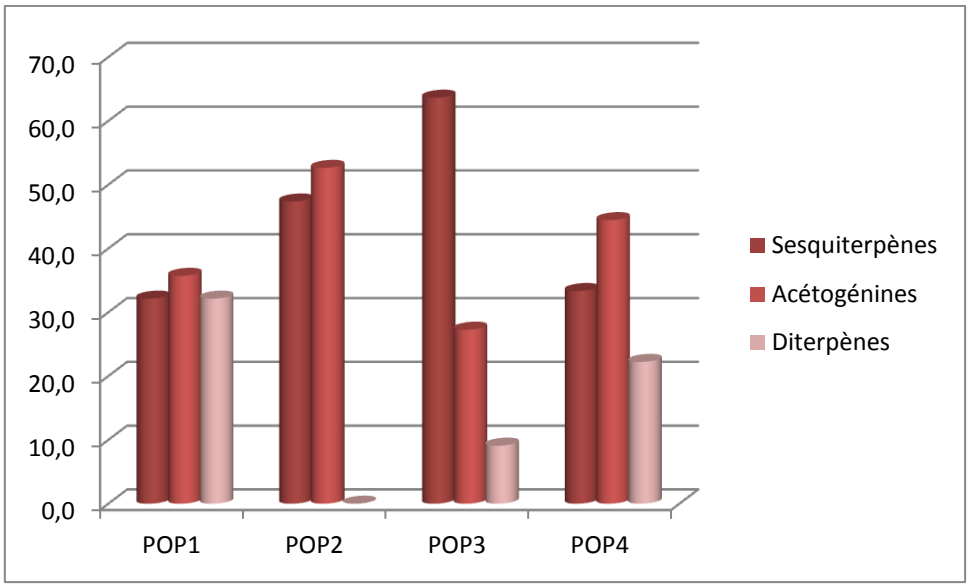


Figure 45 : Répartition des métabolites secondaires identifiés dans les 4 extraits étudiés

L'observation de cette très grande diversité chimique nous interpelle et amène de nombreux questionnements sur l'origine de celle-ci. Notre échantillonnage ne peut être considéré comme résultant de pieds individuels mais représente une communelle regroupant toutefois un nombre limité de pieds. Une très forte variabilité intra station pourrait donc créer des biais analytiques mais cette hypothèse est écologiquement peu probable.

La seconde hypothèse envisageable quant à cette variabilité chimique consiste à prendre en compte les conditions environnementales physico-chimiques du lieu de récolte (température de l'eau, aération, photopériode, etc.). Plusieurs études ont été menées, sur des pieds récoltés « en milieu naturel » et cultivés, afin d'évaluer l'influence environnementale sur la composition chimique des *Laurencia* [148], [149]. Les résultats ont démontré que la synthèse des terpènes halogénés des *Laurencia* est un phénomène conservatif qui n'est que peu voire pas du tout affecté par les facteurs physico-chimiques extérieurs. Ces observations confortent l'utilisation de la chimiotaxonomie comme outil d'aide à l'identification. En effet, l'application de la chimie à la taxonomie repose sur le principe que les métabolites secondaires utilisés pour les études de chimiotaxonomie soient quantitativement constants et indépendants des variations physico-chimiques extérieures.

Enfin, la dernière hypothèse que nous émettons est la possible existence de types chimiques au sein de l'espèce *L. obtusa*. Plusieurs études ont démontré la présence de types chimiques chez certaines espèces du complexe. Nous nous intéresserons donc, dans le chapitre suivant, à ces expériences ainsi qu'aux études de variablitié chimique des *Laurencia* afin d'apporter des éléments de réponse à ces questionnements. Nous présenterons également une méthode de discrimination de deux populations basée sur la métabolomique par RMN du proton.

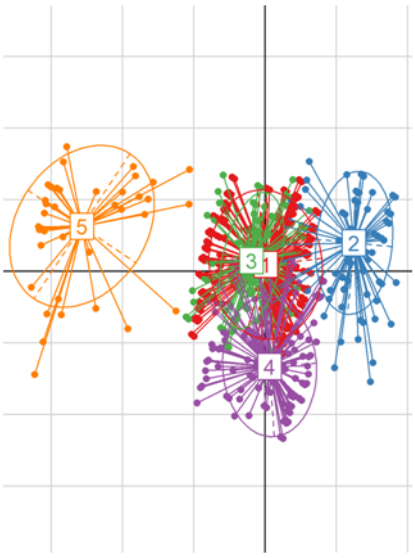
Tableau 37 : Composés identifiés dans les 4 populations de *L. obtusa*

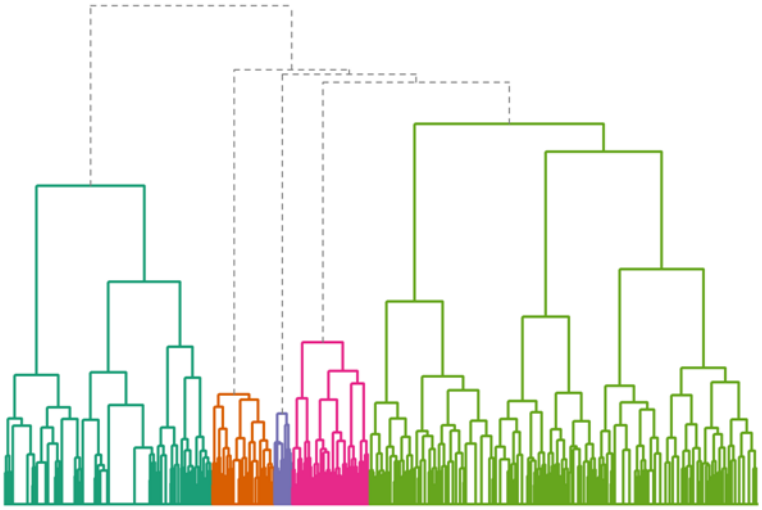
		POP 1	**POP 2**	**POP 3**	**POP 4**
Type	**Sesquiterpènes**				
Snydérane	α-snydérol	**+**	**+++**	**++**	-
	β-snydérol	**++**	**+**	**+++**	**++**
	dérivé d' α-snydérol (3)	-	**+**	-	-
	dérivé d' α-snydérol (4)	-	**+**	-	-
	8-hydroxy-β-snydérol	-	**+**	-	-
	8-kéto-10-déhydrobromo-β-snydérol	-	**+**	-	-
	8-kéto-10-déhydrobromo-β-snydérol	-	**+**	-	-
Laurane	laurène	**+**	-	**+**	**+**
	iso-laurénisol	**+**	-	**+**	-
	composé de type laurane	**+**	-	**+**	-
	composé de type laurane	-	-	**+**	-
	laurintérol (composé C)	**+**	-	**+**	-
	3,7-dihydroxydihydrolaurène	-	-	**+**	-
	11-iodolaurintérol	-	-	**+**	-
Brasilane	brasilénol	-	-	**++**	-
	épibrasilénol	-	-	**++**	-
	4-hydroxy-5-brasilène	-	-	**++**	-
Cuparane	α-bromocuparène	**+**	-	**+**	**+**
	α-isobromocuparène	-	-	**+**	-
	1-deacétoxy-8-déoxyalgoane	-	**+**	-	-
Obtusane	obtusénol	**++**	-	-	-
Sélinane	1β-bromosélin-3,11-diène	**+**	-	-	-
Chamigrane	9,15-dibromo-1,3(15)-chamigradiène-11-ol	-	**+**	-	-
Nombre		**9**	**9**	**14**	**3**

		POP 1	POP 2	POP 3	POP 4
	Acétogénines				
«èn-yne »	rogioloxépane A	+	-	-	-
	rogiolényne D	+	-	-	-
	srilankényne	+	-	-	-
	E-dihydrorhodophytine	+	-	+	-
	3-*E*-laurényne	+	+	+	-
	3-*Z*-laurényne	+	+	-	-
	trans-pinnatifidényne	-	+	-	-
	Z linéaire	-	-	+	-
	E linéaire	-	-	+	-
	13-épipinnatifidényne	-	-	+	-
	sagonényne	-	-	+	+
« Br-yne »	**Composé D**	+	+	-	-
	obtusine	-	++	-	-
	ACG THF/THF	-	++	-	-
	ACG THF	-	+	-	-
	ACG THP/THF	-	+	-	-
	ACG THF/oxocane	-	+	-	-
	Composé F	-	+	-	-
« Br-ène »	microcladallène A	+	-	-	+
	Composé E	+	-	-	-
	Compound 1 pop4	++	-	-	+++
Autre	**Compound 2 pop4**	-	-	-	+
Nombre		**10**	**10**	**6**	**4**
Type	**Diterpènes**				
Prévézane	prévézol B	+	-	-	-
	prévézol C	+	-	-	-
	prévézol E	+	-	-	-
	composé A	+	-	-	-
Neorogiolane	néorogioldiol	++	-	+	-
	O^{11},15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol	++	-	-	-
	compose B	+	-	-	-
Labdane	compose de type labdane	+	-	-	-
	compound 3 pop4	-	-	-	+
	concinndiol	-	-	-	+
Autre	obtusadiol	++	-	+	-
Nombre		**9**	**0**	**2**	**2**

+++ *: Composé majoritaire de l'extrait*
++ *: Composé identifié directement dans l'extrait*
+ *: Composé identifié dans les fractions ou sous-fractions*
- : Composé non identifié

CHAPITRE III
APPLICATIONS DE LA RMN EN MELANGE : APPROCHES METABOLOMIQUES





I METABOLOMIQUE

I.1. *Définition*

La métabolomique se définit comme l'étude de l'ensemble des métabolites (= métabolome), de faible poids moléculaire (< 1500Da) qui sont présents dans un échantillon biologique (cellule, tissu, organisme, etc.) Les premières études de métabolomique remontent aux années 1998-1999 avec notamment Nicholson et Oliver [164],[165]. Nicholson utilisait le terme de métabonomique pour définir la réponse métabolique d'un organisme à un stimulus biologique tandis que Oliver définissait la métabolomique comme étant l'analyse qualitative et quantitative de l'ensemble des métabolites d'un système biologique. Aujourd'hui, les deux termes semblent être indifféremment employés.

La métabolomique appliquée à l'étude des plantes peut entre autre mettre en évidence des conséquences environnementales ou des perturbations génétiques subies par l'organisme en question. Ces études jouent un rôle essentiel pour émettre un lien entre le génotype et le phénotype.

I.2. *Démarches analytiques*

L'objectif de la métabolomique réside donc en l'identification, la quantification et enfin l'analyse comparative des métabolites d'un organisme. Différentes approches peuvent être mises en œuvre et on en distingue deux principales : l'empreinte métabolique (metabolic fingerprinting) et le profilage métabolique (metabolic profiling) [176] :

- l'empreinte métabolique permet de comparer plusieurs métabolomes et de les discriminer en mettant en évidence des profils chimiques différents ;
- le profilage métabolique se focalise sur l'identification et la quantification de métabolites appartenant à une famille chimique définie.

Dans le cadre de l'étude métabolomique des plantes, il est souvent difficile d'identifier d'une manière globale et universelle l'ensemble des métabolites puisque les plantes sont susceptibles de synthétiser un nombre très important de molécules dont les structures sont très variées. Le profilage métabolique peut alors s'avérer coûteux en temps, et limité par l'absence de standard pour la quantification.

I.3. *Outils de la métabolomique*

Outils analytiques

Comme évoqué précédemment, la diversité structurale des métabolites étudiés ainsi que leurs différentes concentrations dans les échantillons constituent les principales difficultés de la métabolomique. De ce fait, les outils de la métabolomique sont nombreux et peuvent s'avérer complémentaires les uns des autres.

Les deux techniques les plus couramment utilisées sont la spectrométrie de masse (SM) et la RMN. La SM est la plupart du temps associée à une technique de séparation comme la chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou la chromatographie liquide haute performance (CLHP).

Le principal avantage de la CPG-SM réside dans sa haute résolution et sa grande sensibilité ainsi que l'existence de nombreuses banques de données commerciales. En revanche, cette technique se limite aux métabolites de faible polarité et de faible poids moléculaire (molécules volatiles).

La CLHP-SM permet d'analyser une plus grande gamme de molécules, tant du point de vue de la polarité que de la masse moléculaire, mais les effets de matrice et les conditions d'ionisation peuvent affecter la reproductibilité des analyses.

La RMN présente de nombreux avantages : c'est une technique non destructive, universelle, et dont les signaux fournissent des informations directes sur les structures chimiques. L'utilisation de la RMN comme outil métabolomique a quelque peu diminué ces derniers temps, notamment à cause de son manque de sensibilité, ce qui empêche de prendre en compte les molécules minoritaires des mélanges étudiés. L'utilisation de cryosondes ou d'aimants plus performants permet d'améliorer la sensibilité, et tend à redynamiser l'utilisation de la RMN, 1D ou 2D, pour l'étude métabolomique.

Outils statistiques

Quelle que soit la technique utilisée, les données obtenues sont très complexes et nécessitent l'utilisation de méthodes statistiques multivariées. Les méthodes les plus utilisées pour étudier les profils métabolomiques sont l'analyse en composante principale (ACP) et l'analyse discriminante par régression des moindres carrées partiels (PLS-DA) [177].

L'ACP est une méthode non supervisée qui repose sur l'étude des corrélations entre les variables. Le principe est de projeter les données des variables sur un espace de dimension inférieure tout en déformant le moins possible la réalité. On définit ainsi 2 ou 3 nouvelles variables autrement appelées composantes principales (PC1, PC2, PC3) qui sont utilisées pour représenter de manière plus aisée les données (elles forment les axes du graphique obtenu). La première composante est celle qui résume le mieux les données initiales, et qui concentre le plus d'informations. Les individus sont ensuite représentés sur le graphique en fonction de leurs coordonnées sur les axes [178]. On obtient alors un modèle facilement interprétable graphiquement grâce à des logiciels adaptés. De plus, dans le cas de la RMN ^{1}H, les déplacements chimiques des signaux discriminants peuvent être directement identifiés grâce aux loading plots [179].

La méthode PLS-DA est une méthode supervisée c'est-à-dire que les groupes sont a priori connus et pris en compte dès le début de l'analyse. Cette technique vise à optimiser la séparation entre ces différents groupes d'échantillons en reliant deux matrices de données X (données brutes) et Y (groupes). L'objectif ici est ensuite de mettre en évidence les facteurs qui contribuent à la discrimination [170],[171].

I.4. *Métabolomique par RMN ^{1}H*

Une approche classique de métabolomique utilisant la RMN du proton comprend plusieurs procédés : un pré-traitement des spectres, une étape de traitement des spectres permettant d'obtenir des données exploitables par des méthodes statistiques mutlivariées, ainsi qu'un traitement statistique par l'une des méthodes évoquées dans le paragraphe précédent [182].

Pré-traitement des spectres

Plusieurs étapes sont nécessaires avant de pouvoir analyser des spectres RMN :

- la transformée de Fourier permet de convertir la FID (Free Induction Decay) en un spectre représentant les déplacements chimiques des atomes ;
- la correction de la phase : le retard entre le pulse initial et le début de l'acquisition des données peut causer un décalage de la phase qui varie linéairement avec la fréquence. Cette « erreur » peut être facilement recifiée, manuellement ou automatiquement selon le logiciel de traitement des spectres utilisé ;
- la correction de la ligne de base constitue une étape cruciale pour obtenir des spectres de qualité exploitables pour des analyses métabolomiques. Une déformation de la ligne de base (due à la distorsion des premiers points de la FID) peut générer des difficultés dans l'identificaiton des pics, et des erreurs lors de leur quantification.

Traitement des spectres

Deux étapes sont nécessaires afin de convertir les spectres RMN obtenus en données exploitables par des analyses statistiques : le binning et la normalisation [182].

Le binning est une technique visant à diviser le spectre en plusieurs petites régions appelées bins ou buckets dont la largeur est définie par l'utilisateur (en général 0,04 ppm). Cette méthode permet de palier aux éventuels mauvais alignements / décalage des pics (causés par des variations instrumentales et/ou expérimentales). Ce procédé consiste donc en une réduction de la résolution des données générant un format exploitable pour une analyse statistique.

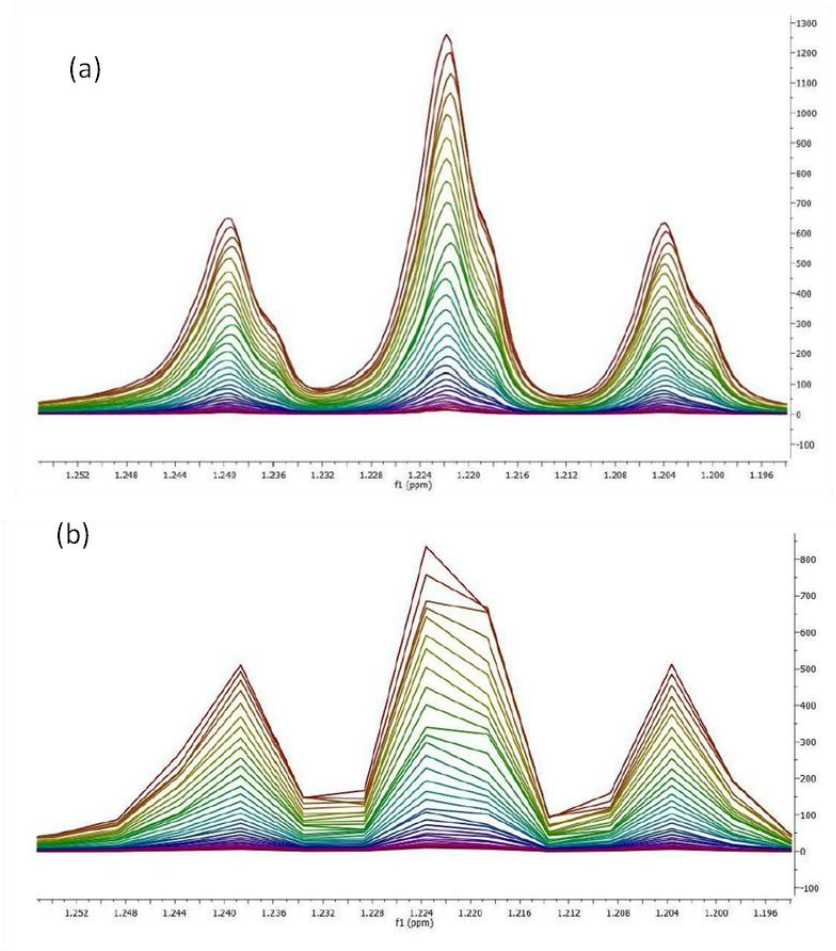


Figure 46 : **(a)** Superposition de spectres ^{1}H ; **(b)** Superposition de spectres ^{1}H après binning
Source : Manuel d'utilisation du logiciel Mestrenova

L'exemple ci-dessus représente un signal de triplet sur un spectre ^{1}H sur lequel on peut observer quelques variations mineures d'un spectre à l'autre (a). Le binning a été appliqué sur tous les spectres (ici 0,01 ppm) permettant de supprimer cet effet (b). Cependant il est important de souligner le fait que cette étape a également pour effet de réduire considérablement la résolution des données.

Le binning est souvent suivi d'une étape de normalisation. Celle-ci permet notamment de prendre en compte les éventuelles variations de concentration ou effets de dilution des différents échantillons. L'utilisateur peut selon le logiciel utilisé choisir entre différentes méthodes de normalisation, mais la méthode la plus courante en métabolomique est la normalisation par rapport à l'aire totale.

II.1. *La chimiotaxonomie, un outil de classification des végétaux*

Tous les végétaux, terrestres ou marins, produisent des métabolites secondaires (*i.e.* n'intervenant pas directement dans le développement de l'organisme). Les plantes sont classifiées selon des critères basés sur des observations morphologiques et anatomiques, ou plus récemment à l'aide de données moléculaires.

Une autre approche complémentaire permet de proposer une classification des plantes, il s'agit de la chimiotaxonomie. Le développement de cet outil se base sur le fait que les structures chimiques des métabolites secondaires, ainsi que leur voie de biosynthèse, sont souvent spécifiques et liées à un groupe de plantes. Néanmoins, il est important de garder en mémoire que ce type de classification repose uniquement sur des notions de similarité/différence de composition chimique et ne fournit pas d'informations sur la phylogénie des espèces. En définitive, la « vraie » taxonomie doit alors se baser sur les relations phylogénétiques *i.e.* sur des arbres phylogénétiques [173],[174].

La chimiotaxonomie doit donc être considérée comme un outil complémentaire aux méthodes de classification usuelle et peut contribuer à affiner celle-ci en mettant, entre autres, en évidence des groupes/types chimiques au sein d'une même espèce.

II.2. *Etudes chimiotaxonomiques du complexe Laurencia*

Plusieurs études se sont intéressées aux relations entre métabolites secondaires présents dans des populations de *Laurencia* et l'identification morphologique et/ou biologique de ces espèces.

Fenical et Norris ont comparé les profils CCM de trois populations présentes dans le Golfe de Californie, associées à l'espèce *L. pacifica* et présentant des morphologies variables. Les auteurs suggèrent qu'il s'agit de 3 espèces distinctes puisqu'elles présentent des profils chimiques différents. De plus, ces espèces ont été comparées à une population récoltée dans la localité référence de l'espèce (La Jolla, Californie). Aucun des 3 morphotypes étudiés ne présente un profil chimique semblable à celui de la localité type. Les auteurs suggèrent alors qu'aucune des 3 populations étudiées n'appartient à l'espèce *L. pacifica*. Ils sont également les premiers à affirmer que la plupart des espèces du complexe *Laurencia* sont caractérisées par au moins un composé spécifique absent dans les autres espèces [185].

Masuda *et al.* ont comparé la composition chimique de plusieurs échantillons appartenant à 2 espèces [186]. Lors de cette étude, ils ont mis en évidence que l'espèce *L. composita* produit essentiellement des sesquiterpènes de type chamigrane tandis que l'espèce *L. okamurai* est composée majoritairement de lauranes et cyclolauranes. Il est important de souligner également que les métabolites majoritaires dans une espèce sont absents dans l'autre. Les deux espèces, aisément différentiables sur des critères morphologiques peuvent également être séparées sur la base de critères chimiques. Les mêmes conclusions ont été formulées, une vingtaine d'années plus tard, par *Ji et al.* [187].

Guella *et al.* suggèrent quant à eux que la stéréochimie des sesquiterpènes pourrait refléter la phylogénie de certaines espèces et donc constituer un outil supplémentaire pour les distinguer [188].

En 1997, Masuda *et al.* évoquent le fait que si une espèce de *Laurencia* produit des groupes de métabolites secondaires variés, elle doit inclure différentes variétés ou différentes espèces ce qui implique que son statut taxonomique soit réexaminé. Trois explications peuvent expliquer ces observations : *i)* l'espèce inclut en fait une entité différente, qui est rare ou peu/mal décrite, similaire d'un point de vue morphologique mais distincte de l'espèce en question, *ii)* plusieurs espèces « sœurs » non distinguables d'un point de vue morphologique sont incluses dans la même espèce, *iii)* l'espèce est mal identifiée. Les auteurs, après l'étude chimique de plusieurs populations cultivées ou à l'état sauvage, ont mis en évidence qu'il existe plusieurs types chimiques dans l'espèce *L. nipponica* [149].

Le même groupe a, par la suite, étudié les caractères morphologiques et la composition chimique de trois espèces présentes dans les Canaries. Ils soulignent qu'il est nécessaire d'associer les études morphologiques à la chimie afin d'éviter des confusions sur l'identification des populations étudiées. Par exemple, des sesquiterpènes halogénés ont été décrits dans *L. perforata* à Fuerteventura tandis que dans la population étudiée par les auteurs (Gran Canaria) il n'y a ni corps en cerise, ni sesquiterpène halogéné. Les auteurs suggèrent alors que l'espèce collectée à Fuerteventura a fait l'objet d'une mauvaise identification [163], même si la composition chimique d'une espèce donnée n'est pas forcément constante.

Plus récemment, l'étude chimique de *L. nangii* a mis en évidence la présence de bromoallènes. Aucun métabolite de ce type n'avait été précédemment isolé à partir de cette espèce. Les auteurs suggèrent alors qu'il existe deux types chimiques de *L. nangii* : un qui produit des acétylènes et l'autre des bromoallènes [189].

Machin-Sanchez *et al.* ont utilisé pour la première fois le couplage électrophorèse capillaire/spectrométrie de masse (EC-SM) pour caractériser et différencier plusieurs populations du complexe *Laurencia* récoltées à Tenerife. Leurs résultats montrent que le profil chimique de chaque espèce est constant selon le point de colllecte [190].

Plusieurs études concernant la composition chimique et la distribution géographique des *Laurencia* ont été réalisées. Notamment, l'étude de populations de *L. nangii* sur l'île Bornéo (Asie du sud-est) a démontré que cette espèce existe sous la forme de 3 types chimiques, chacun étant caractérisé par un groupe de métabolites secondaires [132]. Il en est de même pour *L. dendroidea* : l'étude statistique (Classification ascendante hiérarchique, CAH) a révélé la présence de 3 groupes chimiques. L'analyse en composantes principales (ACP) a permis de montrer que la variabilité chimique observée entre les différentes populations est largement influencée par la présence de 4 métabolites : la triquinane, le rogiolol, l'obtusol et l'élatol [191].

Enfin, les auteurs d'une revue récente sur les acétogénines identifiées dans le complexe *Laurencia* suggèrent que c'est le type de structure (linéaire *vs.* cyclique) associée à la taille des cycles éthers qui serait plus discriminant que la nature de la terminaison (acétylène ou bromoalllène). En revanche, on peut quand même noter que les acétogénines qui possèdent la terminaison « Br-yne » n'ont été reportées que dans l'espèce *L. obtusa* [139].

En résumé, les études chimiotaxonomiques sur le complexe *Laurencia* sont nombreuses et des caractéristiques chimiques associées à certaines espèces ont été mises en évidence. La synthèse bibliographique montre une situation excessivement complexe pour *Laurencia* justifiant pleinement le vocable de « complexe *Laurencia* ». En ce qui concerne l'espèce *L. obtusa* aucune étude chimiotaxonomique n'a, à notre connaissance, été réalisée. Toute étude comparative de données issues de la litterature avec celles obtenues pour la composition chimique des 4 populations étudiées dans le chapitre précédent s'avèrent impossible.

De plus, la plupart des études chimiques menées sur le complexe *Laurencia* font le choix de se focaliser sur une série de composés chimiques, correspondant souvent à de nouvelles structures et/ou des activités biologiques, et non pas à la composition chimique totale comme on le retrouve fréquemment dans l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles, pour laquelle une liste allant d'une dizaine à plus d'une centaine de métabolites identifiés est fournie.

Nous avons alors souhaité mettre au point une méthode métabolomique basée sur la RMN ^{1}H qui permettrait de *i)* mettre en évidence des groupes chimiques entre les différentes populations de *Laurencia* récoltées en Corse, *ii)* comparer les groupes obtenus avec un arbre phylogénétique pour mettre en évidence les éventuelles corrélations entre type chimique et relations phylogénétiques et *iii)* mettre en évidence les composés impliqués dans la constitution des groupes formés.

Dans le chapitre précédent, nous avons observé que la variabilité chimique au sein de l'espèce *Laurencia obtusa* est probablement importante. Aussi, pour réaliser une première approche métabolomique, nous avons selectionné deux types de population, dont la numéro 3 étudiée dans le chapitre précédent pour laquelle les critères phénotypiques et en particulier la couleur sont bien marqués et stables dans le temps.

II.3. ***Développement d'une méthode de discrimination de deux populations***

A titre d'exemple, nous avons choisi de voir s'il était possible, sur la base de profils RMN ^{1}H, de discriminer deux genres au sein du complexe *Laurencia*. Pour cela, plusieurs populations appartenant à deux espèces distinctes (*L. obtusa* et *Laurenciella* sp.) ont été étudiées dans le but :

- d'étudier la variabilié géographique et temporelle de ces deux espèces ;
- d'observer après analyses statistiques la formation ou non de deux groupes cohérents avec l'identification des populations ;
- d'identifier les molécules discriminantes en mettant en œuvre la RMN ^{13}C en mélange.

Ainsi, l'enregistrement des spectres de RMN ^{1}H des 21 populations sélectionnées suivi d'analyses statistiques (ACP) nous a permis de mettre en évidence deux groupes chimiques. Tous les échantillons du premier groupe correspondent à l'espèce *L. obtusa* tandis que tous les autres échantillons ont été identifiés comme appartenant à une espèce du genre *Laurenciella*.

La superposition des spectres ^{1}H montre clairement que chacun des groupes est dominé par la présence d'un composé majoritaire. L'analyse par RMN ^{13}C en mélange a permis d'identifier ce composé majoritaire pour les deux espèces : la 3-*E*-laurényne pour *Laurenciella* sp. et le β-snydérol pour *L. obtusa*. L'analyse des loading ploats et l'enregistrement de spectre HSQC ont permis de confirmer que ces deux composés sont en grande partie responsables de la discrimination des deux groupes chimiques.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal Chemistry & Biodiversity.

Discrimination and Characterization of Two Mediterranean Species from the *Laurencia* Complex (Rhodomelacea) Using an NMR-Based Metabolomic Approach

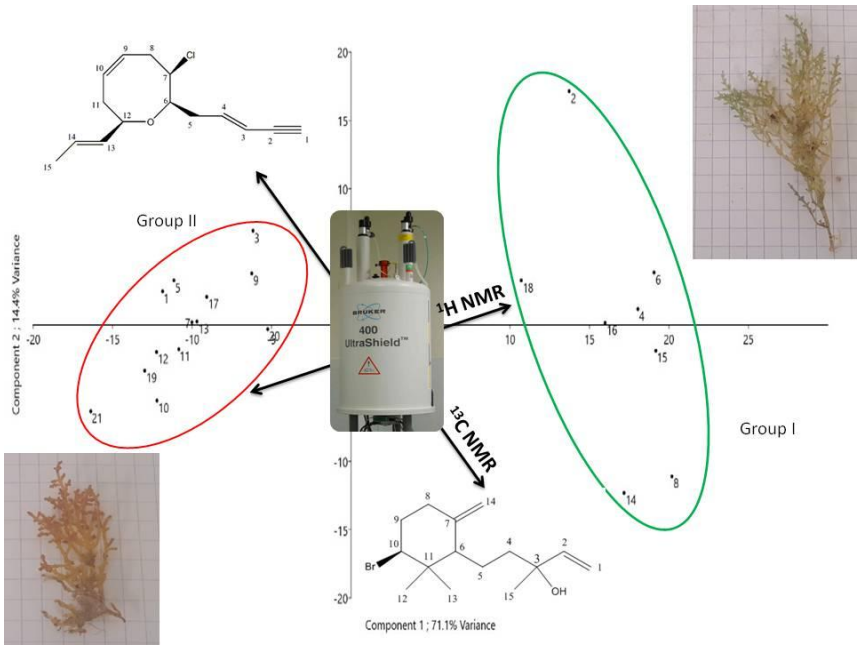
Sylvain Sutour,[1] Hélène Esselin,[1] Ange Bighelli,[1] Joseph Casanova,[1] Line Le Gall,[2] and Félix Tomi*[1]

[1]UMR 6134, CNRS, SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Université de Corse, 2000 Ajaccio, France, e-mail: felix.tomi@univ-corse.fr

[2]UMR 7205, CNRS, MNHN, UPMC, EPHE, Muséum National d'Histoire Naturelle, 75005 Paris, France

Abstract: Generic and specific determination among the *Laurencia* complex is a challenging task. DNA barcoding combined with phenotypic investigations are mandatory for species differentiation. In this study, two morphologically different members of the *Laurencia* complex were investigated using untargeted ^{1}H-NMR-based metabolomics. Twenty-one population samples were collected in order to evaluate both temporal and geographical homogeneity. Data obtained from ^{1}H-NMR analysis followed by statistical analysis allowed a clear separation of all the samples into two groups. DNA mitochondrial tests confirmed this pattern and identified the two species as *Laurenciella* sp. and *Laurencia obtusa*. In addition, metabolites responsible of this discrimination were investigated directly in crude extracts by ^{13}C NMR using an in-house computer-assisted method. The combination of both untargeted (^{1}H) and targeted (^{13}C) NMR-based metabolomic approaches proves to be a powerful and complementary approach to discriminate species from the *Laurencia* complex.

Keywords: Metabolomics, ^{1}H NMR fingerprint, *Laurencia obtusa*, *Laurenciella* sp., Corsica.



Introduction

Laurencia are red macroalgae widely distributed from temperate to tropical seas up to 65 m deep [9]. In Corsica, two species from the genus *Laurencia* co-exist: *Laurencia microcladia* KÜTZING and *Laurencia obtusa* (HUDSON) J.V. LAMOUROUX [9]. The number of species among the genus *Laurencia* are subject to permanent revaluation as the taxonomy of the *Laurencia* complex has been revised several times, initially based on additional morphological criteria, and more recently based on molecular phylogenies [8]. Plasticity of the morphological characteristics reported for certain species, including color adaptation, complicates species discrimination and has frequently led to erroneous species identification [17]. Therefore, the use of DNA barcoding appears essential to reliably identify species and phylogenetic relationships. Another approach only sporadically employed for marine organisms consists in identifying specific chemicals present in given species which are poorly distributed or totally absent from others. Such an approach was pioneered by Fenical and Norris [185], who classified three distinct populations previously assembled under *Laurencia pacifica* from the Gulf of California into three separate species.

Since then, various studies have investigated inter and/or intraspecific relationships within the *Laurencia* complex by studying the metabolome [124],[168],[116],[132],[115],[133],[193],[186],[188]. Thus, characterization of metabolome for discrimination and/or identification of members of the *Laurencia* complex appears to be a complementary approach to phenotypic and DNA barcoding investigation.

Metabolomic investigation aims to describe all metabolites in a given biological sample in a comprehensive and non-selective manner. Usually, two techniques are thought to be most suited for metabolomic analysis, namely NMR and GC or LC/MS. Both approaches possess advantages and disadvantages. Despite its low sensitivity, NMR allows for the detection of a very high variety of compounds and is non-destructive [176]. Moreover, NMR is extremely reproducible which is a key aspect for data processing, statistical analysis, and comparison with spectral databases [182].

In this study, we aimed to assess the chemical profiles of two different populations from the *Laurencia* complex grown along the coast of Corsica (France) based on ^{1}H-NMR untargeted metabolomics. Identification of key metabolites by a ^{13}C-NMR computer assisted method developed in our laboratory was further performed to obtain additional insight into the metabolomic features responsible for the discrimination between both populations. Finally, DNA barcoding was employed to ascertain species determination.

Results and Discussion

Two macroalga populations exhibiting different morphological characteristics were observed on the Corsican coastline. One phenotype (G-phenotype) exhibited a flashy green color, and was tall (up to 15 cm) and elongated, whereas the other phenotype (R-phenotype) was red to dark yellow, small (up to 7 cm) and bushy (Fig. 1). Microscopic analysis revealed the presence of corps en cerise and secondary pit connections characteristic of *Laurencia* sensu stricto species [194]. In order to establish chemical profiles of both populations, as well as to estimate temporal and geographical variations, 21 samples were collected. Eight samples of the G-phenotype and seven from R-phenotype were collected at different locations (Fig. 1), and we studied temporal variation of G-phenotype by collecting them within a defined interval (Figures J1-J2). All samples were collected in a rocking photophilic but protected from strong current intertidal zone up to 1 m deep. To assist species discrimination and identification, a detailed investigation of the metabolomes of the two population phenotypes based on NMR was conducted on samples 10 and 2.

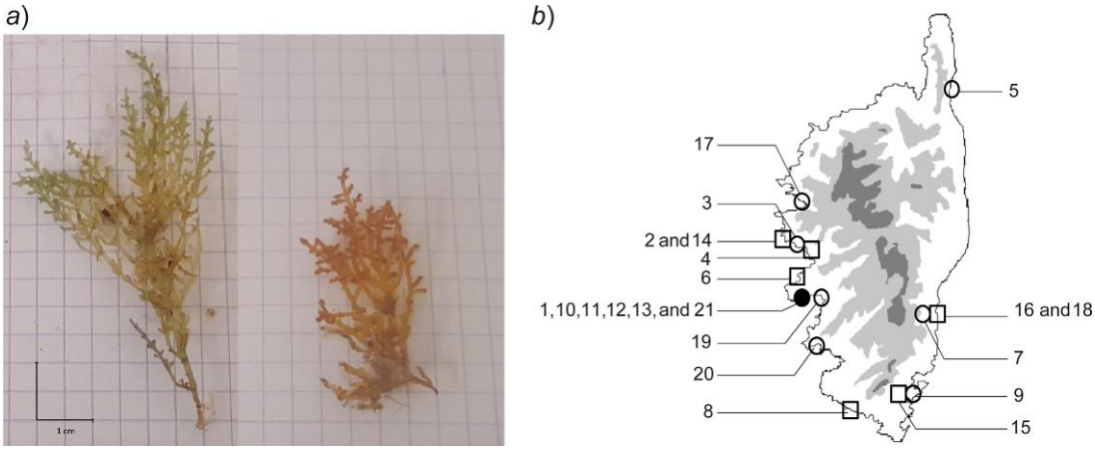


Figure 1. *a) Laurencia* specimens exhibiting a green phenotype (left) and the red phenotype (right) collected in Corsica. *b)* Locations of specimens collection. Empty rings and squares show respectively R- and G-phenotype geographical collection. Filled ring represent the place of temporal collection of G-phenotype.

Chemical Composition (^{13}C-NMR)

A computer-assisted method previously developed in our laboratory which is based on ^{13}C-NMR spectroscopy of crude extracts was applied [156], [158], [195]. An in-house library containing spectral data of components (about 2000) from marine macro algae was consulted. One extract sample of each phenotype of population species was subjected to ^{13}C-NMR analysis and chemical shift data were treated by the developed algorithm. Three parameters were taken into account: *i)* the number of observed carbons (at least 70% of the total carbon signals must be identified for a single molecule), *ii)* the number of overlapped signals (ranging from 0 to 2 per molecule), and *iii)* the difference in chemical shift of each signal in the mixture spectrum and in the reference spectrum (variation in chemical shift of max. 0.1 ppm for at least 70% of the signals is accepted). This procedure enabled the unambiguous identification of several individual compounds in the mixture (Tables J5-J6; Figures J7-J8).

The computer-assisted analysis of the G-phenotype extract highlighted the occurrence of several sesquiterpenes with brasilane and snyderane skeletons. The most intense series of ^{13}C-NMR chemical shifts was due to β-snyderol, the main component of this extract. α-Snyderol, epibrasilenol, brasilenol, and 4-hydroxy-5-brasilene were identified as minor compounds [37], [41], [43]. Analysis of the R-phenotype extract highlighted the presence of several sesquiterpenes and C_{15} acetogenins. According to the relative intensities of the peaks, the C_{15} acetogenin 3-(*E*)-laurenyne was the major component of this extract. Seven more components could also be identified, namely 3-(*Z*)- laurenyne, obtusallene I, (*E*)-pinnatifidenyne, 9,15-dibromo-1,3-chamigadien-11-ol, dihydrolaurene, laurene, and cholesterol (Fig. 2) [133][75], [101], [105], [131][196], [197]. The two phenotypes exhibited different chemical composition. The R-phenotype was able to biosynthesize acetogenins and sesquiterpenes whereas the G-phenotype only sesquiterpenes.

Chemical investigation from *L. obtusa* from the Red Sea (Egypt) published in 1990 revealed the occurrence of halogenated metabolites. Among a series of acetogenins and sesquiterpenes, β-snyderol was identified as the major metabolite [26]. (3*E*)-laurenyne was previously isolated from *L. obtusa* from the Agean Sea [92]. According to chemical specificities, our phenotypes from Corsica appear both closely related to previously characterized of *L. obtusa*. Constant taxonomic revision, together with partial species identification, questioned about the relation of these phenotypes with the obtusa species. The role in species discrimination of the previous compounds identified was investigated based on a ^{1}H-

NMR untargeted approach. A special attention was dedicated to temporal and geographical influences in the chemical profile of the two phenotypes.

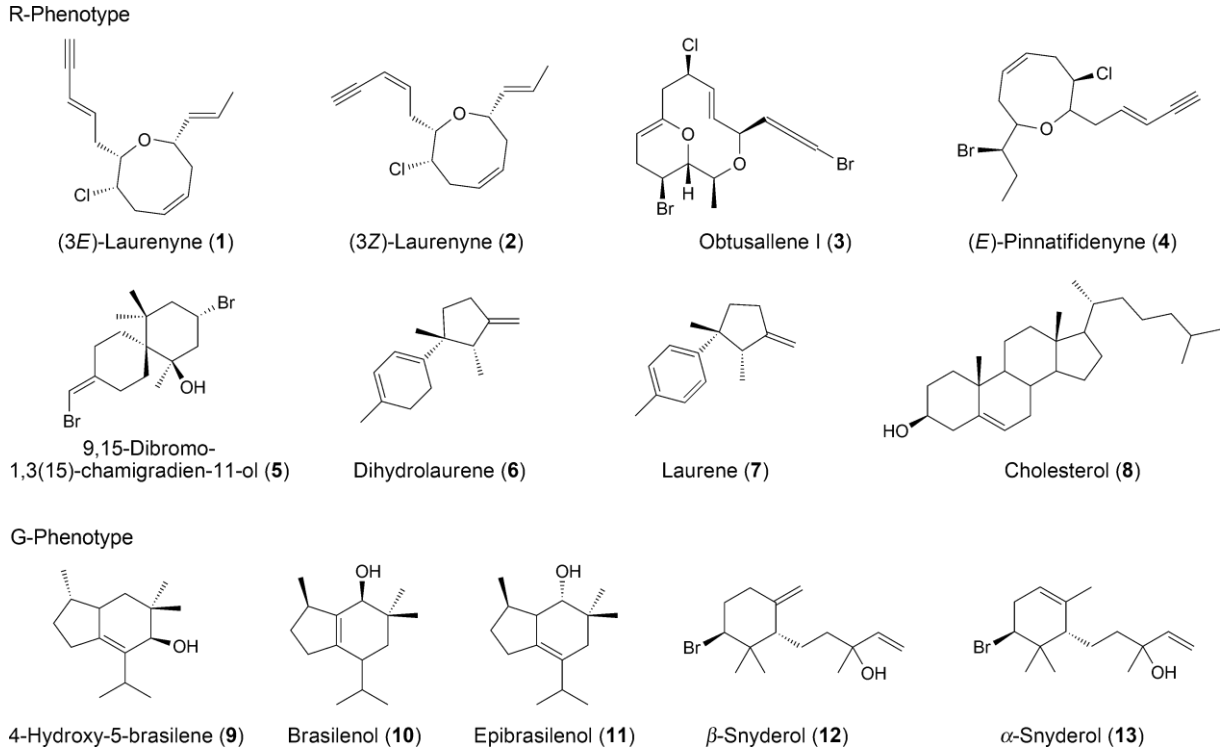


Figure 2. Metabolites identified by computer assisted ^{13}C-NMR from the R- and G-phenotype pentane extracts.

Chemical Fingerprint (^{1}H-NMR)

In order to establish a fingerprint for each sample, the 21 extracts were analyzed by ^{1}H-NMR in the most abundant and less overlapped area (3.30 – 6.60 ppm) and data obtained after treatment (see Experimental Section) were submitted to principal component analysis (PCA). Scatter plots were used to evaluate chemical shift values involved in the population discrimination of both phenotypes, as well as to estimate temporal and geographical variations of each group. Spectra of all extracts were stacked and exhibited for all the samples of the same phenotype a profile characterized by identical series of abundant peaks (1 and 2 in Supporting Information) characteristic of a single major component.

The plot of PCA sample scores discriminated both population through their projections in the first two principal components, PC1 and PC2, which respectively accounted for 71.1% and 14.4% of variance. Two groups were obtained in accordance with observed phenotypes (Fig. 3). Group I contains all samples exhibiting G-phenotype (8 samples) whereas all R-phenotype samples (13) belong to Group II. This was corroborated by a MANOVA test: Pillai trace = 0.82; approximate $F_{42,234}$ = 3.9; P = 1.4 9 10^{-11}.

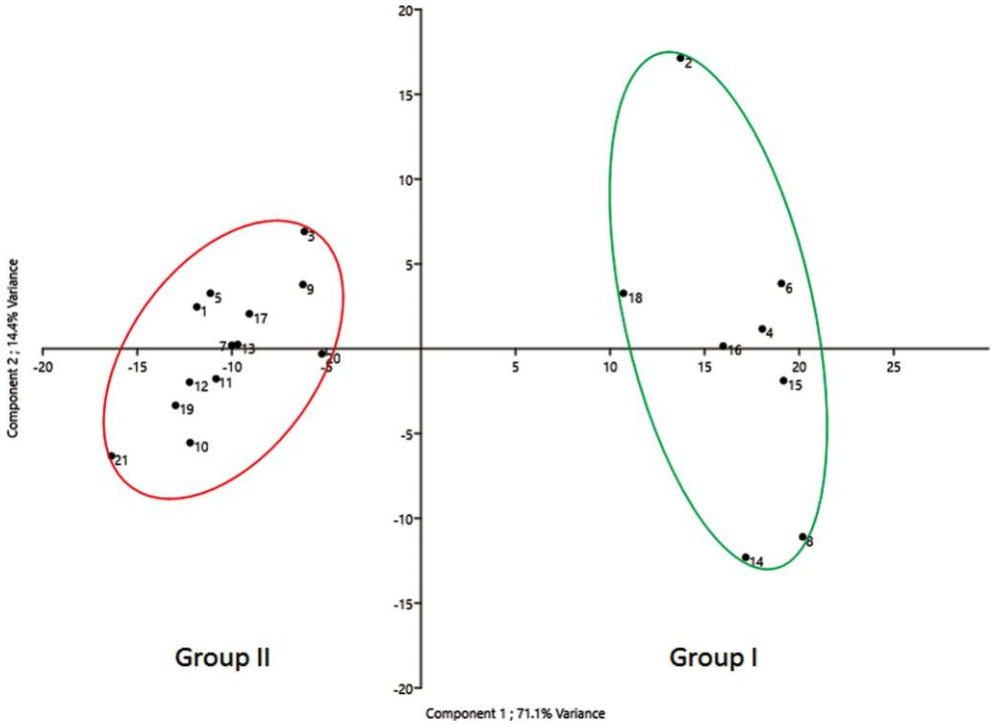


Figure 3. Principal component analysis of the 21 extract samples from the G-phenotype (Group I) and the R-phenotype (Group II) collected around Corsica.

To correlate ^{1}H-NMR chemical shift values involved in the population discrimination to their ^{13}C-NMR values, an HSQC sequence was recorded for one sample of each group (Figures J9-J10). PC1 loadings along ^{1}H-NMR chemical shift values (Figure J11) revealed that only two compounds were responsible for the population discrimination. The R-phenotype was characterized by the presence of (3*E*)-laurenyne whose identification was ascertained based on its complete NMR data (Table J12). Indeed, typical chemical shifts of an enyne unit at 6.15 – 6.23 ppm and methines bonded with either a halogen or O-atom (3.70 – 3.96 ppm) together with double bonds (5.53 – 5.74 ppm) were observed. By contrast, the most significant chemical shift values related to the G- phenotype were assigned to β-snyderol (Figure J11) which displayed two protons of the exocyclic methylene (4.62 and 4.92 ppm), protons of the terminal double bound in a-position of an alcohol function (5.07, 5.23, and 5.94 ppm), and a bromomethine (4.11 ppm). Chemical shift values with scores at the positive side along PC2 were mainly related to methine involved in double bonds of fatty acids and proton of cholesterol double bond.

Intraspecific variability of each group was further examined using the same protocol. Both intraspecific group data were submitted to PCA. Geographical and temporal influences were investigated on the R-phenotype (Figure J13). Population samples of macroalgae exhibiting the R-phenotype were collected at the same location each month from June to September 2014 (samples 10 – 13), as well asin June 2015 and 2016 (samples 1, 21). Samples 10, 12, and 13 were distributed on a straight line directed toward the positive side of PC1 axis. Seasonal variation (June – September 2014), except for sample 11, was found to be influenced by the quantity of cholesterol and unsaturated fatty acids (chemical shift and surrounding of 5.38 ppm). Sample 11 exhibited a high content in obtusallene I and probably unidentified obtusallene derivatives. The most intense positive scores along the PC2 axis was mainly due to the chemical shift and surrounding of 4.25 ppm, an intense overlapped signal consisting of one methine bearing chlorine and the other one a bromine. Samples collected during three years (June 2014, 2015, and 2016) exhibited variation in minor compounds, but no common trend influenced the fingerprints. Sample 21 possesses only traces of cholesterol and a high content in (3*E*)-laurenyne.

Metabolomic profile and phenotypic characteristics of this species were homogenous over time. The R-phenotype was thus not prone to plasticity and color variation usually induced by environmental factors. (3*E*)-laurenyne remained by far the most abundant compound of the R-phenotype samples extract. Metabolome from the R-phenotype was not influenced by the geographical position of sample collections. No trends among the variation could be correlated to the collection loca- tion. Cholesterol together with obtusallenes appeared to be the only minor compounds identified previously by ^{13}C-NMR to impact the repartition of the samples along respectively X and Y axis.

Concerning the G-phenotype (Figure J14), variation of sample scores along the PC1 axis was mainly due to the difference of minor compounds content. Indeed, chemical shift values of β-snyderol (main compound) were observed with a positive score whereas those from minor compounds were observed on the negative side, especially hydroxymethine of epibrasilenol (3.45 ppm) and double bond of unsaturated fatty acids (5.38 ppm). Samples 14 and 18 contained a large amount of α-snyderol (two dd at 5.09 and 5.23 ppm overlapping β-snyderol signals. Samples 2 and 8 are opposite on the scatter plot mainly due to the presence of a singlet at 3.45 ppm for 2 (CH-OH of epibrasilenol) against an almost total absence of signal at the same chemical shift value for 8. No relation between the chemical variability of minor compounds and the collect location could be established. For instance, samples 18 and 16, collected in the same area (See Experimental Section), as well as samples 2 and 14 weren't grouped by pair according to their location.

Finally, to obtain unambiguous identification, both phenotypes were authenticated by DNA barcoding (Figure J15). Specimens exhibiting the G-phenotype were assigned to *L. obtusa*, whereas specimens exhibiting the R-phenotype were identified as a *Laurenciella* species. Indeed, only one *Laurenciella* species namely *Laurenciella marilzae*, initially described from the Canary Islands, has been taxonomically accepted. *Laurenciella* populations have been observed in the Mediterranean Sea but were proved to be genetically different from the first species [8][198].

Conclusions

Botanical identification of species of the genus *Laurencia* is a challenging task. Each member of the *Laurencia* complex biosynthesized a unique set of metabolites considered as a fingerprint. The combined use of computer aided ^{13}C-NMR spectrum analysis and ^{1}H-NMR metabolomic approach is an efficient method to obtain a quick and clear picture of the *Laurencia* metabolome. Computer-aided ^{13}C-NMR allowed the identification of the main compounds of each species. In the *Laurenciella* sp. extract a C_{15} acetogenin, (3*E*)-laurenyne, was predominant, while in the *L. obtusa* extract β-snyderol occurred as the major component. ^{1}H-NMR analyses followed by statistical analysis on samples collected in Corsica of two different phenotypes allowed a clear differentiation of each phenotypic population. The chemical composition remained stable over the season and from year to year, as well as around the entire Corsica coastline. Homogeneity of samples from the R-phenotype was influenced by the quantitative variation of cholesterol, unsaturated fatty acids, and obtusallene I. Relative quantity of cholesterol and unsaturated fatty acids increased along the season. G-phenotype was influenced by the quantitative variation of α-snyderol and epibrasilenol. Among compounds identified by ^{13}C-NMR, two major compounds were responsible for the discrimination of each species (3*E*)-laurenyne *vs*. β-snyderol); four minor compounds play a role in the intraspecific dispersion of sample: cholesterol/obtusal- lene I and α-snyderol/epibrasilenol, respectively, from the R- and G-phenotype. A quarter century and around 4000 km separate, two comprehensive chemical investigations of *L. obtusa* with the same identification of β-snyderol as main compound. This is the first report of an intraspecific chemical homogeneity among the *Laurencia* complex in a limited area around Corsica.

Experimental Section

Material

A population of *Laurenciella* sp. (R-phenotype) was collected at the same location in Ajaccio bay (41°54.4160'N, 8°39.6100'E) each month from June to September 2014 (samples 10 – 13) and then in June 2015 and 2016 (samples 1 and 21). Fifteen population's samples of both *Laurenciella* sp. (7 samples) and *L. obtusa* (8 samples) were collected in various locations all around Corsica coastline during August 2015 (Fig. 1).

Laurenciella sp. (R-phenotype) GPS point: (41°54.416'N, 8°39.610'E): sample 1, 10, 11, 12, 13, 21, (42°06.068'N, 8°42.473'E): sample 3, (42°43.260'N, 9°27.403'E): 5, (41°42.762'N, 9°24.278'E): 7, (41°31.754'N, 9°16.953'E): 9, (42°16.690'N, 8°41.382'E): 17, (41°44.363'N, 8°46.739'E): 20, (41°54.494'N,8°43.156'E): 19.

Laurencia obtusa (G-phenotype) GPS point: (42°3.936'N, 008°44.204'E): sample 4, (41°59.144'N, 008°40.171'E): 6, (41°29.671'N, 008°55.927'E):8, (42°06.432'N, 008°40.278'E): 2 and 14, (41°31.754'N,009°16.953'E): 15, (41°42.762'N, 009°24.278'E): 16 and 18.

The epiphytes were removed from algae; selected specimens were washed with tap water, lyophilized, reduced into a fine powder with liquid N_2 and then extracted with pentane for 4 h. The extracts were concentrated under vacuum with a yield from 0.32% to 0.92% for *L. obtusa* and from 0.19% to 0.66% for *Laurenciella* sp. Samples 1 and 2 are deposited with the Verlaque Herbarium under the registration number H8316 (*Laurenciella* sp.) and H8314 (*L. obtusa*) and authenticated by Dr. Marc Verlaque (Institut Méditerranéen d'Océanologie – Université d'Aix Marseille) based on morphological parameters. Key morphological parameters were investigated for specimen of each population collected. Identification was then performed by Line Le Gall based on molecular phylogenies. To assess the phylogenetic affinities of the two specimens studied, their CO1 sequences were generated and included in the alignment analyzed by Rousseau et al [8]. (Figure J15) Bayesian and ML analyses were performed using MrBayes v. 3.2.6 [199] and RAxML v.8.2.0 [200] on the Cipres portal with the same parameters as in Rousseau et al.[8].

NMR

NMR Spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer operating at 400.13 MHz for ^{1}H and 100.13 MHz for ^{13}C, equipped with a 5 mm probe, in deuterated chloroform ($CDCl_3$), with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). ^{1}H-NMR Spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW), 4 µs (flip angle 30°); acquisition time, 2.56 s for 32 K data table with a spectral width (SW) of 7 000 Hz (17.5 ppm). The number of accumulated scans was 32 for each population extracts 5.0 (0.1) mg of the sample in 0.5 ml of $CDCl_3$. ^{13}C-NMR Spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW), 4 µs (flip angle 45°); acquisition time, 2.7 s for 128 K data table with a spectral width (SW) of 24 000 Hz (240 ppm); CPD mode decoupling; digital resolution 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3000 for each extract (40 mg of the sample in 0.5 ml of $CDCl_3$).

Statistical Analysis

Raw FID were imported to MestreNova (Mestrelabs version 9.0.0). Stacked spectra were submitted to automated routines for Fourier transform, phase and base line correction. The TMS signal was plotted to 0.00 ppm. A 0.05 ppm binning was then applied, and normalization was done to the most

representative part of the spectra between 3.30 and 6.30 ppm. Processed data were generated and imported to Past 3 software. MANOVA test and PCA were performed using automated function. The principal component analysis (variance-covariance matrix) was used to visualize differences in ^{1}H-NMR profiles that were statistically tested by MANOVA (Pillai trace = 0.82; approximate $F_{42,234}$ = 3.9; P = 1.4 9 10^{-11}).

Supplementary Material: Supporting information for this article is available on the WWW under https://doi.org/10.1002/cbdv.201700226 (Annexe J)

III PERSPECTIVES : DISCRIMINATION D'ESPECES AU SEIN DU MEME GENRE

Nous avons vu, à travers l'étude précédente, que les populations appartenant à deux genres différents au sein du complexe *Laurencia* ont pu être discriminées sur la base des profils chimiques des populations analysées.

Nous avons également pu observer, à travers le chapitre II, que les quatre populations étudiées, qui sont regroupées sous la même espèce (*L. obtusa*), possèdent des groupes de métabolites qui diffèrent d'une population à l'autre.

Il serait alors intéressant de poursuivre les travaux de métabolomique initiés dans le chapitre III afin d'étudier la variabilité chimique de l'espèce *L. obtusa*.

En effet, la présence de ces quatre profils chimiques suggère l'existence de types chimiques au sein de la même espèce.

A ce titre, une étude parallèle des relations phylogénétiques et de la variabilité chimique d'un plus grand nombre d'échantillons permettrait éventuellement de valider cette hypothèse. L'association des profils chimiques (RMN ^{1}H) et de l'analyse en mélange par RMN ^{13}C permettrait également de mettre en évidence les composés responsables de la discrimination des populations dans le cas ou elles se diviseraient en plusieurs groupes chimiques.

CONCLUSION

Les algues sont des organismes capables de synthétiser des composés appartenant à des familles chimiques très diverses, et dont les voies de biosynthèse sont souvent inconnues dans le milieu terrestre. L'originalité de la composition chimique des algues, et en particulier celle des algues rouges, réside en la présence de nombreux composés halogénés. Cette chimiodiversité importante a fait des espèces du complexe *Laurencia* les plus étudiées parmi les algues rouges. Les composés extraits de ces ressources possèdent des structures originales et sont la plupart du temps pourvus d'activités biologiques significatives. Les métabolites secondaires jouent également un rôle important dans la phylogénie des *Laurencia*, ce qui contribue à l'intérêt porté à ces organismes.

Dans ce contexte, ce travail a été mené selon deux grands axes, avec d'une part la caractérisation chimique de quatre populations de *L. obtusa*, et d'autre part une introduction à la chimiotaxonomie des *Laurencia*.

Les extraits aux solvants se présentent généralement sous la forme de mélanges complexes. Leur caractérisation, qui passe par la connaissance la plus complète possible de leur composition chimique, est un facteur déterminant en vue de leur valorisation. Pour cela, deux stratégies sont traditionnellement utilisées. La première s'appuie sur l'association « individualisation-identification » et utilise le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique (CPG, CLHP, etc), permettant l'individualisation des constituants, et d'une technique spectroscopique d'identification (SM, IRFT, etc.). Une autre démarche utilise l'association « purification-identification » et s'apparente à celle employée lors de l'analyse structurale d'une nouvelle molécule. La purification est réalisée à l'aide de différentes techniques chromatographiques alors que l'identification est assurée par la comparaison de leurs caractéristiques spectrales avec celles de produits de référence. Les informations sont souvent obtenues par la spectrométrie de masse (SM) mais surtout par la RMN ^{1}H et de plus en plus, par la RMN ^{13}C.

Afin de réaliser l'étape cruciale de détermination de la composition chimique de ces mélanges complexes naturels, l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse a mis au point et développé une méthode analytique, complémentaire de la SM, axée sur l'utilisation de la RMN ^{13}C pour l'identification des constituants des mélanges naturels, et plus particulièrement les huiles essentielles, sans individualisation préalable des constituants. Un logiciel d'aide à l'analyse, conçu à l'Université de Corse, permet de comparer les déplacements chimiques des carbones du spectre du mélange avec ceux de composés de référence contenus dans les bibliothèques de spectres. Plus d'une centaine de publications réalisées ces dix dernières années attestent du potentiel de cette méthode.

Pour l'étude des extraits de *L. obtusa*, la stratégie analytique utilisée associe deux voies :

- la méthode d'analyse basée sur la RMN ^{13}C développée au laboratoire pour identifier les constituants des mélanges complexes sans séparation préalable, ou avec une séparation réduite ;

- l'association purification-identification (chromatographies sur colonne puis analyse par RMN 1D, 2D et SM) pour l'identification de molécules nouvelles, mais aussi de molécules dont les données spectrales ne sont pas présentes dans les bibliothèques de spectres commerciales ou construites dans nos laboratoires.

Dans le premier chapitre nous avons réalisé une synthèse bibliographique des différents métabolites secondaires présents dans l'espèce *L. obtusa*. Cette étape a été nécessaire à la caractérisation chimique des populations étudiées puisque la méthode d'analyse développée au laboratoire requiert la

compilation des données spectrales de composés de référence dans des bibliothèques de spectres. Cette étape, initiée lors du projet « Marina Cosmétique » de l'Université de Corse, a été effectuée tout au long de notre étude afin d'enrichir constamment notre banque de données.

En introduction du second chapitre nous avons exposé la démarche analytique utilisée pour la caractérisation chimique des extraits issus des quatre populations étudiées. La méthode d'identification du laboratoire, qui a jusqu'à présent essentiellement été utilisée dans l'analyse d'huile essentielle, a été adaptée à nos extraits. En effet, les deux paramètres qui permettent de valider l'identification d'un composé (variation de déplacements chimiques et nombre de carbones observés par rapport au nombre de carbones attendus) ont été adaptés.

La suite de ce chapitre s'articule ensuite autour de quatre parties qui exposent les composés identifiés dans chacune des populations étudiées.

Ainsi, l'analyse directe de l'extrait brut issu de la population 1 nous a permis d'identifier 5 composés à savoir 2 sesquiterpènes, le β-snydérol et l'obtusénol et 3 diterpènes, le néorogioldiol, l'obtusadiol et l'O^{11},15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol. Nous notons également dans le spectre ^{13}C de cet extrait la présence d'une série de 15 raies de résonnance appartenant à un bromoallène absent de nos bibliothèques de spectres. Celui-ci est majoritaire de la population 4 et son isolation et analyse structurale ont donc été effectuées à partir de cette population. La complexité de cet extrait nous a mené à fractionner celui-ci sur colonne de silice afin d'identifier un plus grand nombre de métabolites. Ainsi, nous avons pu identifier 18 composés supplémentaires : un snydérane, quatre lauranes, un cuparane, un sélinane, six acétogénines de type « én-yne », un acétogénine de type « Br-ène », trois prévézanes ainsi qu'un labdane. La mise en œuvre des fractionnements de cet extrait a révélé la présence de quatre composés non identifiés par nos bibliothèques de spectres. En effet, nous avons pu mettre en évidence la présence d'un ACG « Br-yne (Composé D), d'un ACG « Br-ène », d'un prévézane (composé A), et d'un néorogioloane (composé B). L'insuffisance de quantité de ces composés a limité leur analyse structurale (notamment l'enregistrement des spectres HMBC, NOESY et spectrométrie de masse). Les structures proposées pour ces composés n'ont alors pas pu être entièrement validées.

L'extrait issu de la seconde population est majoritairement composé d'α-snydérol. Deux autres composés ont été directement identifiés dans l'extrait, il s'agit de deux acétogénines possédant une terminaison « Br-yne ». A nouveau, le fractionnement de cet extrait nous a permis d'identifier des molécules supplémentaires grâce à notre logiciel d'aide à l'identification. Nous avons identifié cinq snydéranes, un cuparane, un chamigrane, trois acétogénines de type « én-yne » et trois acétogénines de type « Br-yne ». Aucun diterpène n'a été détecté dans les fractions de cet extrait. Ce fractionnement a également mis en évidence la présence de deux composés absents de nos bibliothèques de spectres : le composé D, identifié dans la première population, et le composé F, une acétogénine de type « Br-yne ». Comme pour la population précédente, la quantité obtenue de ce composé après l'avoir isolé ne nous a pas permis d'enregistrer toutes les données nécessaires à la validation de sa structure. Par ailleurs, nous avons également mis en évidence la présence d'un sesquiterpène présentant le squelette du γ-snydérane. Celui-ci a été isolé et entièrement caractérisé par RMN 1D, 2D et SM.

La troisième population est dominée par la présence de sesquiterpènes avec le β-snydérol comme composé majoritaire, l'α-snydérol, le brasilénol, l'épibrasilénol et le 4-hydroxy-5-brasilène identifiés directement à partir de l'extrait. Les fractionnements mis en œuvre sur cet extrait nous ont permis d'identifier 16 molécules connues supplémentaires à savoir sept lauranes, deux cuparanes, cinq acétogénines de type « én-yne », un néorogiolane et un obtusane. Au cours de ces fractionnements, nous avons pu mettre en évidence la présence d'un composé non identifié par les bibliothèques de

spectres du laboratoire. Ce composé a été isolé et entièrement caractérisé par RMN 1D, 2D et SM. Il s'agit d'une acétogénine de type « én-yne » qui a la particularité de posséder un unique cycle tétrahydropyranique. Ce type de composé est assez rare dans le complexe *Laurencia.* Enfin, l'extrait total a été soumis à des tests d'activités biologiques afin de déterminer sa cytotoxicité sur plusieurs cellules cancéreuses. L'extrait s'est montré particulièrement actif sur la lignée cellulaire THP-1.

Enfin, le spectre ^{13}C de la quatrième et dernière population était caractérisé par la présence de 15 raies de résonance non attribuées par le logiciel d'aide à l'identification. Seul le β-snydérol a alors pu être identifié à partir de l'extrait total. Le fractionnement de celui-ci a mis en évidence la présence de nombreux composés non identifiés par nos bibliothèques de spectres. Seuls cinq composés connus ont été identifiés : un laurane, un cuparane, une acétogénine « én-yne », une acétogénine « Br-ène » et un labdane. L'étude sur cette population s'est alors centrée sur l'isolation et la caractérisation des molécules inconnues. Ainsi nous avons pu identifier deux acétogénines qui possèdent la même structure, un tétrahydrofurane lié à un tétrahydropyrane par un méthylène, mais qui diffèrent par leur terminaison : un bromoallène pour le composé majoriaire de l'extrait, et un aldéhyde α,β-insaturé pour le second composé. Nous avons également pu caractériser un nouveau composé qui possède un squelette de type 19(4→3)*abeo*-labdane. Cette structure est reportée pour la première fois dans une espèce du complexe *Laurencia*.

L'extrait de chacune des quatre populations a ainsi pu être caractérisé par RMN ^{13}C permettant d'identifier au total 56 molécules, par comparaison avec les données issues de la littérature ou par élucidation structurale (RMN 2D). Nous constatons que chacun des extraits étudiés est caractérisé par un groupe de molécules qui diffère d'une populaiton à l'autre puisque les proportions relatives des 3 types de métabolites étudiés (sesquiterpène, diterpène, C_{15} ACG) varient d'une population à l'autre.

Cette variation de composition chimique nous mène à émettre l'hypothèse de la présence de plusieurs types chimiques au sein de l'espèce *L. obtusa*. Afin d'apporter des éléments de réponse à cette question, nous nous sommes intéressés dans le dernier chapitre aux études de variabilité chimique menées sur le complexe *Laurencia*.

La RMN du proton semble être une méthode de choix pour étudier la variabilité chimique des extraits végétaux. Nous avons alors mis en oeuvre une méthode de discrimination de deux populations basée sur la métabolomique par RMN ^{1}H. Ainsi, l'enregistrement de spectres de RMN ^{1}H de 21 populations appartenant à deux espèces distinctes, suivi d'analyses statistiques (ACP), a permis de séparer les échantillons en deux groupes en accord avec l'identification des populations. En effet, les deux espèces possèdent des profils chimiques différents entre elles, mais constants d'une population à l'autre. Chacun des deux profils de RMN ^{1}H est caractérisé par la présence d'une molécule majoritaire. L'analyse des extraits par notre méthode de RMN ^{13}C a permis d'identifier ces composés majoritaires : les populations appartenant à l'espèce *L. obtusa* sont dominées par la présence du β-snydérol, tandis que *Laurenciella* sp. est caractérisée par la 3-*E*-laurényne.

Ainsi, ce travail de thèse a permis d'obtenir une somme de données importantes relatives à la composition chimique de plusieurs populations appartenant à l'espèce *L. obtusa* qui n'avaient jamais fait l'objet d'investigation autour de la Corse. A travers ces exemples, nous avons pu montrer l'intérêt de la RMN ^{13}C tant pour l'identification de constituants en mélange que pour l'élucidation structurale de composés nouveaux, ainsi que de la RMN ^{1}H pour la discrimination de profils chimiques par des méthodes métabolomiques.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel végétal

Les populations 1, 2 et 4 ont été récoltées en juin 2016 et la population 3 en juillet 2015. Les lieux de récolte sont les suivants : Tiuccia (42°06.432'N, 8°40.278'E) pour les populations 1 et 3, Ajaccio (41°54.444'N, 8°39.740'E) pour la population 2 et Erbalunga (41°44.473'N, 9°27.699'E) pour la population 4. Les zones de récolte ont été définies dans des rayons d'environ 1m avec une profondeur d'eau comprise entre 0 et 50cm.

Identification

Les populations étudiées ont été identifiées au Museum National d'Histoire Naturelle avec l'aide des outils de la systématique moléculaire. Les séquences CO1 de chaque spécimen ont été générées et incluses dans un arbre phylogénétique précédemment établi.

Extraction

Les extraits ont été obtenus par macérations successives (3 fois) dans l'acétate d'éthyle à température ambiante et sous agitation magnétique. Le solvant résiduel a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les rendements d'extraction sont compris entre 0,57 et 0,95%.

Chromatographie sur colonne de silice

Les fractionnements réalisés, sur les extraits totaux ou fractions obtenues, ont été réalisés sur des colonnes ouvertes de silice avec des gradients de polarité croissante. Les solvants suivants ont été utilisés : Pentane, Hexane, DCM, $CHCl_3$, AcOEt, MeOH. Les extraits ont été fractionnées sur une silice de granulométrie 63–200 µm, et les fractions et sous fractions avec une silice plus fine de granulométrie 35-70 µm.

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN de l'extrait brut et des différentes fractions ont été enregistrés sur un appareil Bruker 400 Avance, 9,4 Tesla, opérant à 400,132 MHz pour le proton et à 100,623 MHz pour le carbone-13. Les spectres ont été enregistrés avec une sonde de 5 mm. Le solvant est le $CDCl_3$ additionné de tétraméthylsilane (TMS). Les déplacements chimiques sont donnés en ppm (δ) par rapport au TMS pris comme référence interne. Les spectres de RMN ont été enregistrés en dissolvant dans 0,5 mL de $CDCl_3$, de 40 à 60 mg d'extrait et de 1 à 50 mg de fraction de chromatographie. Pour le noyau ^{13}C, les données du signal de précession libre (FID) sont multipliées avant la transformée de Fourrier par une fonction exponentielle (LB = 1,0 Hz). Pour le noyau ^{1}H, aucun traitement mathématique du signal n'est appliqué avant la transformée de Fourier.

Les spectres RMN ^{1}H ont été enregistrés avec les paramètres suivants : angle d'impulsion 30° ; temps d'acquisition = 2,6 s, correspondant à une acquisition de 32 K avec une largeur spectrale (SW) de 6400 Hz environ (16 ppm)

Les spectres de RMN ^{13}C ont été enregistrés avec les paramètres suivants : angle d'impulsion 45° ; temps d'acquisition = 2,7 s, correspondant à une acquisition de 128 K avec une largeur spectrale (SW) de 24000 Hz (240 ppm) ; résolution digitale de 0,183 Hz/pt. Le nombre d'accumulations est compris entre 3000 et 5000 pour chaque enregistrement.

Pour l'enregistrement des spectres de RMN 2D (HSQC, HMBC, COSY et NOESY) nous avons utilisé les séquences impulsionnelles définies par les programmes Bruker.

BIBLIOGRAPHIE

[1] D. Garbary and J. Harper, “A phylogenetic analysis of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae) of the red algae,” *Cryptogam. Algol.*, vol. 19, pp. 185–200, 1998.
[2] Y. Metti, A. J. K. Millar, and P. Steinberg, “A new molecular phylogeny of the *Laurencia* complex (Rhodophyta, Rhodomelaceae) and a review of key morphological characters result in a new genus, *Coronaphycus*, and a description of *C. novus*,” *J. Phycol.*, vol. 51, no. 5, pp. 929–942, 2015.
[3] J. V. F. Lamouroux, “Essai sur les genres de la famille des thalassiophytes non articulées,” *Ann. du Muséum d’Histoire Nat.*, vol. 20, pp. 21–293, 1813.
[4] V. Cassano, M. C. Oliveira, M. C. Gil-Rodríguez, A. Sentíes, J. Díaz-Larrea, and M. T. Fujii, “Molecular support for the establishment of the new genus *Laurenciella* within the *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta),” *Bot. Mar.*, vol. 55, no. 4, pp. 349–357, 2012.
[5] K. W. Nam, C. A. Maggs, and D. J. Garbary, “Resurrection of the genus *Osmundea* with an emendation of the generic delineation of *Laurencia* (Ceremiales, Rhodophyta),” *Phycologia*, vol. 33, no. 5, pp. 384–395, 1994.
[6] K. W. Nam, “Validation of the Generic Name *Palisada* (Rhodomelaceae , Rhodophyta),” *Algae*, vol. 22, no. 2, pp. 53–55, 2007.
[7] J. Martin-Lescanne, F. Rousseau, B. de Reviers, C. Payri, A. Couloux, and L. Le Gall, “Phylogenetic analyses of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae, Ceramiales) support recognition of five genera: *Chondrophycus*, *Laurencia*, *Osmundea*, *Palisada* and *Yuzurua* stat. nov,” *Eur. J. Phycol.*, vol. 45, no. 1, pp. 51–61, 2010.
[8] F. Rousseau *et al.*, “Molecular phylogenies support taxonomic revision of three species of *Laurencia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta), with the description of a new genus,” *Eur. J. Taxon.*, no. 269, pp. 1–19, 2017.
[9] M. D. Guiry and G. M. Guiry, “AlgaeBase.,” *World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway*, 2018. [Online]. Available: http://www.algaebase.org. [Accessed: 31-May-2018].
[10] N. J. Turland *et al.*, *International code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzen Code) adopted by the nineteenth international botanical congress Shenzen, China, July 2017*. Koeltz Botanical Books, 2018.
[11] J. Martin-Lescanne, “Phylogénie et biogéographie des morphotypes du complexe *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta),” Museum National d’Histoire Naturelle, 2009.
[12] T. Van Meter, “Diversification spatio-temporelle au sein du complexe *Laurencia*,” Museum National d’Histoire Naturelle, 2016.
[13] J.-M. Kornprobst, *Substances naturelles d’origine marine*, Lavoisier. 2005.
[14] J. Person, “Algues, Filière du Future - Livre Turquoise,” *Actes du Colloq. Adebiotech 17-19 Novembre 2010, Romainville.*, 2010.
[15] Y. Obota and S. Fukushi, “Essential oil in *Laurencia glandulifera*, a red alga,” *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, vol. 27, p. 331, 1953.
[16] K. L. Erickson, “Constituents of *Laurencia*,” in *Marine Natural Products : Chemical and biological Perspectives*, London, UK, 1983, pp. 131–257.
[17] M. Harizani, E. Ioannou, and V. Roussis, “The *Laurencia* paradox: an endless source of chemodiversity,” in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, vol. 102, 2016, pp. 91–252.
[18] W. M. Alarif, S. S. Al-Lihaibi, S. E. N. Ayyad, M. H. Abdel-Rhman, and F. A. Badria, “Laurene-type sesquiterpenes from the Red Sea red alga *Laurencia obtusa* as potential antitumor-antimicrobial agents,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 55, pp. 462–466, 2012.
[19] B. M. Howard and W. Fenical, “Structures and chemistry of two new halogen-containing chamigrene derivatives from *Laurencia*,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 21, pp. 1687–1690, 1975.
[20] D. J. Kennedy, I. A. Selby, and R. H. Thomson, “Chamigrane metabolites from *Laurencia obtusa* and *L. scoparia*,” *Phytochemistry*, vol. 27, no. 6, pp. 1761–1766, 1988.

[21] A. G. González, J. Darias, A. Diaz, J. D. Fourneron, J. D. Martin, and C. Perez, "Evidence for the biogenesis of halogenated chamigrenes from the red alga *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 35, pp. 3051–3054, 1976.
[22] M. R. Brennan, K. L. Erickson, D. A. Minott, and K. O. Pascoe, "Chamigrane metabolites from a Jamaican variety of *Laurencia obtusa*," *Phytochemistry*, vol. 26, no. 4, pp. 1053–1057, 1987.
[23] J. J. Sims, H. Y. George, and R. M. Wing, "Marine natural products X Elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata*," *Tetrahedron Lett.*, no. 39, pp. 3487–3490, 1974.
[24] I. Brito, M. Cueto, A. R. Díaz-Marrero, J. Darias, and A. San Martín, "Oxachamigrenes, new halogenated sesquiterpenes from *Laurencia obtusa*," *J. Nat. Prod.*, vol. 65, no. 6, pp. 946–948, 2002.
[25] S. M. Waraszkiewicz and K. L. Erickson, "Halogenated sesquiterpenoids from the Hawaiian marine alga *Laurencia nidifica*: nidificene and nidifidiene," *Tetrahedron*, no. 23, pp. 2003–2003, 1976.
[26] S. E. N. Ayyad, A.-A. M. Dawidar, H. W. Dias, R. A. Howie, J. Jakupovic, and R. H. Thomson, "Three Halogenated metabolites from *Laurencia obtusa*," *Phytochemistry*, vol. 29, no. 10, pp. 3193–3196, 1990.
[27] A. G. Gonzalez, J. D. Martin, V. S. Martin, and M. Norte, "A new polyhalogenated sesquiterpne from *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron Lett.*, no. 23, pp. 2035–2036, 1978.
[28] W. H. Gerwick, A. Lopez, R. Davila, and R. Albors, "Two New Chamigrene Sesquiterpenoids From the tropical red alga *Laurencia obtusa*," *J. Nat. Prod.*, vol. 50, no. 6, pp. 1131–1135, 1987.
[29] J. D. Martin, P. Caballero, J. J. Fernandez, M. Norte, R. Perez, and M. L. Rodriguez, "Metabolites from *Laurencia obtusa*," *Phytochemistry*, vol. 28, no. 12, pp. 3365–3367, 1989.
[30] E. Dorta, A. R. Díaz-Marrero, M. Cueto, L. D'Croz, J. L. Maté, and J. Darias, "Chamigrenelactone, a polyoxygenated sesquiterpene with a novel structural type and devoid of halogen from *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 45, no. 38, pp. 7065–7068, 2004.
[31] D. Iliopoulou, V. Roussis, C. Pannecouque, E. De Clercq, and C. Vagias, "Halogenated sesquiterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron*, vol. 58, no. 33, pp. 6749–6755, 2002.
[32] A. G. Gonzalez, J. M. Aguiar, J. D. Martin, and M. Norte, "Three new sesquiterpenoids from the marine alga *Laurencia perforata*," *Tetrahedron Lett.*, no. 29, pp. 2499–2502, 1975.
[33] A. G. Gonzalez, J. Darias, and J. D. Martin, "Biomimetic interconversions of two new types of metabolite from *Laurencia perforata*," *Tetrahedron Lett.*, no. 38, pp. 3375–3378, 1977.
[34] A. G. Gonzalez *et al.*, "Perforenol, a new polyhalogenated sesquiterpene from *Laurencia perforata*," *Tetrahedron Lett.*, no. 41, pp. 3931–3934, 1978.
[35] M. Kladi, H. Xenaki, C. Vagias, P. Papazafiri, and V. Roussis, "New cytotoxic sesquiterpenes from the red algae *Laurencia obtusa* and *Laurencia microcladia*," *Tetrahedron*, vol. 62, no. 1, pp. 182–189, 2006.
[36] A. D. Wright, E. Goclik, and G. M. König, "Three new sesquiterpenes from the red alga *Laurencia perforata*," *J. Nat. Prod.*, vol. 66, no. 3, pp. 435–437, 2003.
[37] M. O. Stallard, W. Fenical, and J. S. Kittredge, "The brasilenols, rearranged sesquiterpene alcohols isolated from the marine opisthobranch *Aplysia brasiliana*," *Tetrahedron*, vol. 34, no. 14, pp. 2077–2081, 1978.
[38] D. Iliopoulou, C. Vagias, D. Galanakis, D. Argyropoulos, and V. Roussis, "Brasilane-type sesquiterpenoids from *Laurencia obtusa*," *Org. Lett.*, vol. 4, no. 19, pp. 3263–3266, 2002.
[39] B. M. Howard and W. Fenical, "Obtusadiol, a unique bromoditerpenoid from the marine alga *Laurencia obtusa*," no. 28, pp. 2453–2456, 1978.
[40] S. Caccamese, V. Amico, and P. Neri, "Two new rearranged sesquiterpenoids from the red alga *Laurencia obtusa*," *J. Nat. Prod.*, vol. 53, no. 5, pp. 1287–1296, 1990.
[41] V. Amico, S. Caccamese, P. Neri, G. Russo, and M. Foti, "Brasilane-type sesquiterpenoids from

the mediterranean red alga *Laurencia obtusa*," *Phytochemistry*, vol. 30, no. 6, pp. 1921–1927, 1991.
[42] Z. Aydoğmuş, S. Imre, L. Ersoy, and V. Wray, "Halogenated secondary metabolites from *Laurencia obtusa*," *Nat. Prod. Res.*, vol. 18, no. 1, pp. 43–49, 2004.
[43] B. M. Howard and W. Fenical, "α- and β-snyderol; new bromo-monocyclic sesquiterpenes from the seaweed *Laurencia*," *Tetrahedron Lett.*, no. 1, pp. 41–44, 1976.
[44] G. Topcu *et al.*, "Brominated sesquiterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*," *J. Nat. Prod.*, vol. 66, no. 11, pp. 1505–8, 2003.
[45] D. J. Faulkner, "3β-bromo-8-epicaparrapi oxide, the major metabolite of *Laurencia obtusa*," *Phytochemistry*, vol. 15, pp. 1993–1994, 1976.
[46] S. E. N. Ayyad, J. Jakupovic, and M. Abdel-Mogib, "A sesquiterpene ether from *Laurencia obtusa*," *Phytochemistry*, vol. 36, no. 4, pp. 1077–1078, 1994.
[47] R. F. Angawi, W. M. Alarif, I. Hamza, Rehab, A. Badria, Farid, and S. E. N. Ayyad, "New Cytotoxic Laurene- , Cuparene- , and Laurokamurene-Type Sesquiterpenes from the Red Alga *Laurencia obtusa*," *Helv. Chim. Acta*, vol. 97, pp. 1388–1395, 2014.
[48] S. J. Wratten and D. J. Faulkner, "Metabolites of the Red Alga *Laurencia subopposita*," *J. Org. Chem.*, vol. 42, no. 21, pp. 3343–3349, 1977.
[49] G. M. Konig and A. D. Wright, "New C_{15} acetogenins and sesquiterpenes from the red alga *Laurencia* sp. cf. *L. gracilis*," *J. Nat. Prod.*, vol. 57, no. 4, pp. 477–485, 1994.
[50] G. M. Konig and A. D. Wright, "Sesquiterpene content of the antibacterial dichloromethane extract of the marine red alga *Laurencia obtusa*," *Planta Med.*, vol. 63, no. 2, pp. 186–187, 1997.
[51] J. T. Vazquez, M. Chang, K. Nakanishi, J. D. Martin, V. S. Martin, and R. Perez, "Puertitols: novel sesquiterpenes from *Laurencia obtusa*. Structure elucidation and absolute configuration and conformation based on circular dichroism," *J. Nat. Prod.*, vol. 51, no. 6, pp. 1257–1260, 1988.
[52] A. G. Gonzalez, J. D. Martin, M. Norte, P. Rivera, and J. Z. Ruano, "Two new C_{15} acetylenes from the marine red alga *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron*, vol. 40, no. 18, pp. 3443–3447, 1984.
[53] A. G. Gonzalez, J. Darias, and J. D. Martin, "Caespitol, a new halogenated sesquiterpene from *Laurencia caespitosa*," *Tetrahedron Lett.*, no. 26, pp. 2381–2384, 1973.
[54] A. G. Gonzalez, J. Darias, J. D. Martín, and C. Perez, "Isocaespitol, a new halogenated sesquiterpene from *Laurencia caespitosa*," *Tetrahedron*, vol. 31, pp. 2449–2452, 1975.
[55] A. G. Gonzalez, J. Darias, J. D. Martin, and C. Perez, "Revised structure of caespitol and its correlation with isocaespitol," *Tetrahedron Lett.*, no. 14, pp. 1249–1250, 1974.
[56] A. G. Gonzalez *et al.*, "X-ray structure determination of new brominated metabolites isolated from the red seaweed *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 24, no. 38, pp. 4143–4146, 1983.
[57] N. O. Bawakid *et al.*, "Antimicrobial sesquiterpenoids from *Laurencia obtusa* Lamouroux," *Open Chem.*, no. 15, pp. 219–224, 2017.
[58] W. M. Alarif *et al.*, "The role of new eudesmane-type sesquiterpenoid and known eudesmane derivatives from the red alga *Laurencia obtusa* as potential antifungal-antitumour agents," *Nat. Prod. Res.*, vol. 30, no. 10, pp. 1150–1155, 2016.
[59] S. Imre, S. Islimyeli, A. Oztunc, and R. H. Thomsonc, "Obtusenol, a sesquiterpene from *Laurencia obtusa*," *Phytochemistry*, vol. 20, no. 4, pp. 833–834, 1981.
[60] I. Brito, M. Cueto, E. Dorta, and J. Darias, "Bromocyclococanol, a halogenated sesquiterpene with a novel carbon skeleton from the red alga *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 43, no. 14, pp. 2551–2553, 2002.
[61] S. Caccamese, V. Amico, P. Neri, and M. Foti, "The structure of laurobtusol, a new rearranged sesquiterpenoid from the mediterranean red alga *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron*, vol. 47, no. 48, pp. 10101–10108, 1991.

[62] J. T. Blanchfield, S. Chow, P. V. Bernhardt, C. H. L. Kennard, and W. Kitching, "Concerning the proposed structure of (+)-laurobtusol: Spectral discrepancies with synthetic, racemic stereoisomers," *Aust. J. Chem.*, vol. 57, no. 7, pp. 673–676, 2004.

[63] A. G. Gonzalez, J. D. Martin, V. S. Martin, R. Perez, S. A. Drexler, and J. Clardy, "Structure of guimarediol, a new rearranged sesquiterpenoid from the red alga *Laurencia* sp.," *Chem. Lett.*, pp. 1865–1866, 1984.

[64] M. D. Higgs and D. John Faulkner, "A diterpene from *Laurencia obtusa*," *Phytochemistry*, vol. 21, no. 3, pp. 789–791, 1982.

[65] F. J. Schmitz *et al.*, "Recent developments in research on metabolites from Caribbean marine invertebrates," *Pure Appl. Chem.*, vol. 51, no. 4, pp. 853–865, 1981.

[66] D. Iliopoulou, N. Mihopoulos, V. Roussis, and C. Vagias, "New Brominated Labdane Diterpenes from the Red Alga *Laurencia obtusa*," *J. Nat. Prod.*, vol. 66, no. 9, pp. 1225–1228, 2003.

[67] N. Mihopoulos, C. Vagias, E. Mikros, M. Scoullos, and V. Roussis, "Prevezols A and B: New brominated diterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 42, no. 22, pp. 3749–3752, 2001.

[68] D. Iliopoulou, N. Mihopoulos, C. Vagias, P. Papazafiri, and V. Roussis, "Novel cytotoxic Brominated Labdane Diterpenes from the Red Alga *Laurencia obtusa*," *J. Org. Chem.*, vol. 68, pp. 7667–7674, 2003.

[69] G. Guella and F. Pietra, "A new-skeleton diterpenoid, new prenylbisabolanes, and their putative biogenetic precursor, from the red seaweed *Laurencia microcladia* from Il Rogiolo: Assigning the absolute configuration when two chiral halves are connected by single bonds," *Helv. Chim. Acta*, vol. 83, no. 11, pp. 2946–2952, 2000.

[70] S. Caccamese, R. M. Toscano, S. Cerrini, and E. Gavuzzo, "Laurencianol, a new halogenated diterpenoid from the marine alga *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 23, no. 33, pp. 3415–3418, 1982.

[71] T. Suzuki, M. Hasegawa, Y. Hirayama, Y. Takahashi, and Y. Matsuo, "The structure of squalene-derived polyether, 15(28)-anhydrothyrsiferyl 23-acetate isolated from the marine red alga *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. J Hokkaido," *Univ Ed Sect II A*, vol. 46, p. 57, 1995.

[72] M. Norte, J. J. Fernández, and J. Z. Ruano, "Three new bromo ethers from the red alga *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron*, vol. 45, no. 18, pp. 5987–5994, 1989.

[73] M. Norte, J. J. Fernández, J. Z. Ruano, L. Matías, and R. P. Rodríguez, "Graciosin and graciosallene, two bromoethers from *Laurencia obtusa*," *Phytochemistry*, vol. 27, no. 11, pp. 3537–3539, 1988.

[74] B. M. Howard, W. Fenrcal, E. V Arnold, and J. Clardy, "Obtusin, a unique bromine-containing polycyclic ketal from the red marine alga *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron Lett.*, no. 31, pp. 2841–2844, 1979.

[75] A. G. González *et al.*, "Non-terpenoid C-15 metabolites from the red seaweed *Laurencia pinnatifida*," *Tetrahedron*, vol. 38, no. 7, pp. 1009–1014, 1982.

[76] E. Kurosawa, A. Fukuzawa, and T. Irie, "Trans- and cis-laurediol, unsaturated glycols from *Laurencia nipponica* Yamada," *Tetrahedron Lett.*, no. 21, pp. 2121–2124, 1972.

[77] S. Imre, Z. Aydoğmuş, H. Güner, H. Lotter, and H. Wagner, "Polybrominated Non-Terpenoid C_{15} Compounds from *Laurencia paniculata* and *Laurencia obtusa*," *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, vol. 50, no. 11–12, pp. 743–747, 1995.

[78] S. Caccamese and R. M. Toscano, "Neoobtusin, a new brominated ketal from the marine red alga *Laurencia obtusa*," *Gazz. Chim. Ital.*, no. 116, pp. 177–179, 1986.

[79] S. M. Waraszkiewicz, H. H. Sun, and K. L. Erickson, "C_{15}-halogenated compounds from the Hawaiian marine alga *Laurencia nidifica*. V. The maneones," *Tetrahedron Lett.*, no. 35, pp. 3021–3024, 1976.

[80] S. M. Waraszkiewicz, H. H. Sun, K. L. Erickson, J. Finer, and J. Clardy, "C_{15} Halogenated Compounds from the Hawaiian Marine Alga *Laurencia nidifica*. Maneonenes ans

isomaneonenes," *J. Org. Chem.*, vol. 43, no. 16, pp. 3194–3204, 1978.
[81] S.-E. N. Ayyad *et al.*, "Bioactive C_{15} Acetogenins from the Red Alga *Laurencia obtusa*," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).*, vol. 59, no. 10, pp. 1294–1298, 2011.
[82] J. W. Blunt, B. R. Copp, R. A. Keyzers, M. H. G. Munro, and M. R. Prinsep, "Marine natural products," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 30, no. 2, pp. 237–323, 2013.
[83] N. O. Bawakid, W. M. Alarif, A. I. Ismail, M. E. El-Hefnawy, K. O. Al-Footy, and S. S. Al-Lihaibi, "Bio-active maneonenes and isomaneonene from the red alga *Laurencia obtusa*," *Phytochemistry*, vol. 143, pp. 180–185, 2017.
[84] N. O. Bawakid *et al.*, "Isolaurenidificin and bromlaurenidificin, two new C_{15}-acetogenins from the red alga *Laurencia obtusa*," *Molecules*, vol. 22, no. 5, pp. 1–8, 2017.
[85] M. Suzuki, Y. Takahashi, M. D. Guiry, and M. Masuda, "Scanlonenyne, a novel halogenated C_{15} acetogenin from the red alga *Laurencia obtusa* in Irish waters," *Tetrahedron*, vol. 53, no. 12, pp. 4271–4278, 1997.
[86] S. Imre, A. Oztunc, and S. Islimyeli, "Chemical investigation of some marine organisms from Turkish waters," *Turk. Kim. Derg.*, vol. 11, p. 119, 1987.
[87] N. Mihopoulos, C. Vagias, M. Scoullos, and V. Roussis, "Laurencienyne B, a new acetylenic cyclic ether from the red alga *Laurencia obtusa*," *Nat. Prod. Lett.*, vol. 13, no. 2, pp. 151–156, 1999.
[88] F. Giordano, L. Mayol, G. Notaro, V. Piccialli, and D. Sica, "Structure and absolute configuration of two new polybrominated C_{15} acetogenins from the sponge *Mycale rotalis*," *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, pp. 1559–1561, 1990.
[89] Y. Gopichand, F. J. Schmitz, J. Shelly, A. Rahman, and D. van der Helm, "Marine Natural Products: Halogenated Acetylenic Ethers from the Sea Hare *Aplysia Dactylomela*," *J. Org. Chem.*, vol. 46, no. 25, pp. 5192–5197, 1981.
[90] S. Caccamese, R. Azzolina, E. N. Duesler, C. Paul, Iain, and K. L. Rinehart, "Laurencienyne, a new acetylenic cyclic ether from the marine red alga *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 21, pp. 2299–2302, 1980.
[91] G. Guella, F. Pietra, I. Chimica, S. Mfn, and U. Trento, "5 . Rogiolenyne A , B , and C : the First Branched Marine C_{15} Acetogenins . Isolation from the Red Seaweed *Laurencia microcladia* or the Sponge *Spongia zimocca* of Il Rogiolo," *Helv. Chim. Acta*, vol. 74, pp. 47–54, 1991.
[92] C. P. Falshaw, T. J. King, S. Imre, S. Islimyeli, and R. H. Thomson, "Laurenyne, a new acetylene from *Laurencia obtusa*: crystal structure and absolute configuration," *Tetrahedron Lett.*, vol. 21, pp. 4951–4954, 1980.
[93] E. Manzo *et al.*, "Structure and absolute stereochemistry of novel C_{15}-halogenated acetogenins from the anaspidean mollusc *Aplysia dactylomela*," *Tetrahedron*, vol. 61, no. 31, pp. 7456–7460, 2005.
[94] D. Iliopoulou, C. Vagias, C. Harvala, and V. Roussis, "C_{15} Acetogenins from the red alga *Laurencia obtusa*," *Phytochemistry*, vol. 59, pp. 111–116, 2002.
[95] S. Imre, H. Lotter, H. Wagner, and R. H. Thomson, "Epoxy-trans-isodihydrorhodophytin, ein neuer Metabolit aus *Laurencia obtusa*," *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, vol. 42c, pp. 507–509, 1987.
[96] Z. Aydoğmuş and S. Imre, "A new halogenated C_{15} non-terpenoid compound from the marine red alga *Laurencia obtusa*," *Acta Pharm. Turc.*, vol. 41, p. 93, 1999.
[97] T. J. King, S. Imre, A. Oztunq, and R. H. Thomson, "Obtusenyne, a new acetylenic nine-membered cyclic ether from *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron Lett.*, no. 16, pp. 1453–1454, 1979.
[98] P. J. Cox and R. H. Thomson, "Obtusallene I, a new halogenated allene from *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 23, no. 5, pp. 579–580, 1982.
[99] A. Öztunç, S. Imre, H. Lotter, and H. Wagner, "Two C_{15} bromoallenes from the red alga *Laurencia obtusa*," *Phytochemistry*, vol. 30, no. 1, pp. 255–257, 1991.
[100] A. Oztunc, S. Imre, H. Wagner, M. Norte, J. J. Fernandez, and R. Gonzalez, "A new haloether

from *Laurencia* possessing a lauroxacyclododecane ring. Structural and conformational studies," *Tetrahedron*, vol. 47, no. 12/13, pp. 2273–2276, 1991.
[101] G. Guella, G. Chiasera, I. Mancini, A. Oztunq, and F. Pietra, "Twelve-memberd *O*-bridged cyclic ethers of red seaweeds in the genus *Laurencia* exist in solution as slowly interconverting conformers," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 3, no. 8, pp. 1223–1231, 1997.
[102] G. Guella, I. Mancini, A. Öztunç, and F. Pietra, "Conformational bias in macrocyclic ethers and observation of high solvolytic reactivity at a masked furfuryl (=2-furylmethyl) C-atom," *Helv. Chim. Acta*, vol. 83, no. 2, pp. 336–348, 2000.
[103] A. Oztunc, S. Imre, H. Wagner, M. Norte, J. J. Fernández, and R. Gonzalez, "A new and highly oxygenated bromoallene from a marine source," *Tetrahedron Lett.*, vol. 32, no. 34, pp. 4377–4380, 1991.
[104] M. Kobayashi, O. Murata, I. N. Rao, R. Chavakula, and N. S. Sarma, "Marine sterols 23. 2a-oxa-2-oxo-5α-hydroxy-3,4-dinorcholestane from the arabian sea red alga *Laurencia obtusa*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 33, no. 4, pp. 519–520, 1992.
[105] M. Wessels, G. M. Konig, and A. D. Wright, "New natural product isolation and comparison of the secondary metabolite content of three distinct samples of the sea hare *Aplysia dactylomela* from Tenerife," *J. Nat. Prod.*, vol. 63, no. 7, pp. 920–928, 2000.
[106] E. G. Juagdan, R. Kalidindi, and P. Scheuer, "Two new chamigranes from an Hawaiian red alga, *Laurencia cartilaginea*," *Tetrahedron*, vol. 53, no. 2, pp. 521–528, 1997.
[107] D. R. Appleton, R. C. Babcock, and B. R. Copp, "Novel tryptophan-derived dipeptides and bioactive metabolites from the sea hare *Aplysia dactylomela*," *Tetrahedron*, vol. 57, no. 51, pp. 10181–10189, 2001.
[108] P. D. N. Hebert, S. Ratnasingham, and J. R. de Waard, "Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 270, no. Suppl_1, pp. S96–S99, 2003.
[109] N. D. Fajarningsih, "Internal Transcribed Spacer (ITS) as DNA Barcoding to Identify Fungal Species: a Review," *Squalen Bull. Mar. Fish. Postharvest Biotechnol.*, vol. 11, no. 2, p. 37, 2016.
[110] F. Pompanon and W. Shehzad, "Code-barres ADN pour caractériser la biodiversité," pp. 5–9, 2018.
[111] T. Decaëns, D. Porco, and R. Rougerie, "Le barcoding ADN: un outil pour étudier la biodiversité des invertébrés terrestres," 2013. [Online]. Available: https://www.sfecologie.org/regard/r50-barcoding-adn-decaens-et-al/#Introduction.
[112] H. Günther, G. Ourisson, and J. J. Suffert, *La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nuclaire du proton et du carbone-13 en chimie.*, First edit. 1994.
[113] R. Chatter *et al.*, "Neorogioltriol: A brominated diterpene with analgesic activity from *Laurencia glandulifera*," *Phytochem. Lett.*, vol. 2, no. 1, pp. 25–28, 2009.
[114] A. E. Leung, R. Rubbiani, G. Gasser, and K. L. Tuck, "Enantioselective total syntheses of the proposed structures of prevezol B and evaluation of anti-cancer activity," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 12, no. 41, pp. 8239–8246, 2014.
[115] A. E. Leung, M. Blair, C. M. Forsyth, and K. L. Tuck, "Synthesis of the proposed structures of Prevezol C," *Org. Lett.*, vol. 15, no. 9, pp. 2198–2201, 2013.
[116] G. Guella, F. Marchetti, and F. Pietra, "52. Rogioldiol A, a new obtusane diterpene, and rogiolal, a degraded derivative, of the red seaweed *Laurencia microcladia* from Il Rogiolo along the Coast of Tuscany: a synergism in structural elucidation," *Helv. Chim. Acta*, vol. 80, pp. 684–694, 1997.
[117] T. Suzuki, M. Suzuki, and E. Kurosawa, "α-bromocuparene and α-isobromocuparene, new bromo compounds from *Laurencia* species," *Tetrahedron Lett.*, vol. 35, pp. 3057–3058, 1975.
[118] M. Kladi, C. Vagias, P. Papazafiri, G. Furnari, D. Serio, and V. Roussis, "New sesquiterpenes from the red alga *Laurencia microcladia*," *Tetrahedron*, vol. 63, no. 32, pp. 7606–7611, 2007.
[119] T. Irie, Y. Yasunari, T. Suzuki, N. Imai, E. Kurosawa, and T. Masamune, "A new sesquiterpene

hydrocarbon from *Laurencia glandulifera*," *Tetrahedron Lett.*, no. 40, pp. 3619–3624, 1965.
[120] T. Irie, T. Suzuki, S. Ito, and E. Kurosawa, "The absolute configuration of laurene and α-cuparenone," *Tetrahedron Lett.*, no. 33, pp. 3187–3189, 1967.
[121] R. Kazlauskas, P. T. Murphy, R. J. Quinn, and R. J. Wells, "New laurene derivatives from *Laurencia filiformis*," *Aust. J. Chem.*, vol. 29, no. 11, pp. 2533–2539, 1976.
[122] M. Suzuki and E. Kurosawa, "New aromatic sesquiterpenoids from the red alga *Laurencia okamurai* Yamada," *Tetrahedron*, no. 28, pp. 2503–2506, 1978.
[123] N. Y. Ji, X. M. Li, L. P. Ding, and B. G. Wang, "Halogenated eudesmane derivatives and other terpenes from the marine red alga *Laurencia pinnata* and their chemotaxonomic significance," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 64, pp. 1–5, 2016.
[124] J. Zhang, L. P. Ding, H. Liang, X. Y. Guo, and Q. Y. Zhang, "Sesquiterpenes from the red alga *Laurencia tristicha*," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 60, pp. 116–119, 2015.
[125] G. Guella, I. Mancini, G. Chiasera, and F. Pietra, "26. Rogiolenyne D, the likely immediate precursor of rogiolenyne A and B, branched C_{15} acetogenins isolated from the red seaweed *Laurencia microcladia* of Il Rogiolo. Conformation and absolute configuration in the whole series," *Helv. Chim. Acta*, vol. 75, pp. 303–309, 1992.
[126] G. Guella, I. Mancini, G. Chiasera, and F. Pietra, "27. On the unusual propensity by the red seaweed *Laurencia microcladia* of Il Rogiolo to form C_{15} oxepanes: isolation of rogioloxepane A, B, C, and their likely biogenetic acyclic precursor, prerogioloxepane," *Helv. Chim. Acta*, vol. 75, pp. 310–322, 1992.
[127] E. D. de Silva, R. E. Schwartz, and P. J. Scheuer, "Srilankenyne, a New Metabolite from the Sea Hare *Aplysia oculifera*," *J. Org. Chem.*, vol. 48, no. 3, pp. 395–396, 1983.
[128] M. Norte, J. J. Fernandez, F. Cataldo, and A. G. Gonzalez, "E-Dihydrorhodophytin, A C_{15} acetogenin from the red alga *Laurencia pinnatifida*," *Phytochemistry*, vol. 28, no. 2, pp. 647–649, 1989.
[129] D. J. Kennedy, I. A. Selby, H. J. Cowe, P. J. Cox, and R. H. Thomson, "Bromoallenes from the alga *Laurencia microcladia*," *J. Am. Chem. Soc.*, pp. 153–155, 1984.
[130] M. Suzuki *et al.*, "Brominated labdane-type diterpenoids from an Okinawan *Laurencia* sp.," *J. Nat. Prod.*, vol. 65, no. 6, pp. 801–804, 2002.
[131] Y. Takahashi, M. Daitoh, M. Suzuki, T. Abe, and M. Masuda, "Halogenated metabolites from the new Okinawan red alga *Laurencia yonaguniensis*," *J. Nat. Prod.*, vol. 65, no. 3, pp. 395–398, 2002.
[132] C. S. Vairappan, I. I. Zanil, and T. Kamada, "Structural diversity and geographical distribution of halogenated secondary metabolites in red algae, *Laurencia nangii* Masuda (Rhodomelaceae, Ceramiales), in the coastal waters of North Borneo Island," *J. Appl. Phycol.*, vol. 26, no. 2, pp. 1189–1198, 2014.
[133] R. K. Boeckman, J. Zhang, and M. R. Reeder, "Synthetic and Mechanistic Studies of the Retro-Claisen Rearrangement 4. An Application to the Total Synthesis of (+)-Laurenyne," *Org. Lett.*, vol. 4, no. 22, pp. 3891–3894, 2002.
[134] E. Pretsch, P. Bühlmann, and M. Badertscher, *Structure Determination of Organic Compounds*, Springer. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009.
[135] M. Suzuki, Y. Takahashi, Y. Mitome, T. Itoh, T. Abe, and M. Masuda, "Brominated metabolites from an Okinawan *Laurencia intricata*," *Phytochemistry*, vol. 60, no. 8, pp. 861–867, 2002.
[136] M. J. Kim, T. I. Sohn, D. Kim, and R. S. Paton, "Concise substrate-controlled asymmetric total syntheses of dioxabicyclic marine natural products with 2,10-dioxabicyclo-[7.3.0]dodecene and 2,9-dioxabicyclo[6.3.0]undecene skeletons," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 49, pp. 20178–20188, 2012.
[137] S. M. Al-Massarani, "Phytochemical and Biological Properties of Sesquiterpene Constituents From the Marine Red Seaweed *Laurencia*: A Review," *Nat. Prod. Chem. Res.*, vol. 2, no. 5, 2014.

[138] B. G. Wang, J. B. Gloer, N. Y. Ji, and J. C. Zhao, "Halogenated organic molecules of rhodomelaceae origin: Chemistry and biology," *Chem. Rev.*, vol. 113, no. 5, pp. 3632–3685, 2013.
[139] T. Wanke, A. C. Philippus, G. A. Zatelli, L. F. O. Vieira, C. Lhullier, and M. Falkenberg, "C_{15} acetogenins from the *Laurencia* complex: 50 years of research– An overview," *Brazilian J. Pharmacogn.*, vol. 25, no. 6, pp. 569–587, 2015.
[140] S. Sutour, H. Esselin, A. Bighelli, J. Casanova, L. Le Gall, and F. Tomi, "Discrimination and Characterization of Two Mediterranean Species from the *Laurencia* Complex (Rhodomelacea) Using an NMR-Based Metabolomic Approach," *Chem. Biodivers.*, vol. 14, no. 11, pp. 1–7, 2017.
[141] H. Esselin, F. Tomi, A. Bighelli, and S. Sutour, "New metabolites isolated from a *Laurencia obtusa* population collected in Corsica," *Molecules*, vol. 23, no. 4, pp. 1–10, 2018.
[142] H. Esselin *et al.*, "Chemical composition of *Laurencia obtusa* extract and isolation of a new C_{15}-acetogenin," *Molecules*, vol. 22, no. 5, pp. 1–11, 2017.
[143] J. A. Findlay and G. Li, "Novel terpenoids from the sea hare *Aplysia punctata*," *Can. J. Chem.*, vol. 80, no. 9, pp. 1697–1707, 2002.
[144] M. Norte, R. Gonzalez, A. Padilla, J. J. Fernandez, and J. T. Vazquez, "New halogenated sesquiterpenes from the red alga *Laurencia caespitosa*," *Can. J. Chem.*, no. 69, pp. 518–520, 1991.
[145] K. Palaniveloo and C. S. Vairappan, "Chemical relationship between red algae genus *Laurencia* and sea hare (*Aplysia dactylomela* Rang) in the North Borneo Island," *J. Appl. Phycol.*, vol. 26, no. 2, pp. 1199–1205, 2014.
[146] A. Butler and J. N. Carter-Franklin, "The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 21, no. 1, p. 180, 2004.
[147] L. E. Wolinsky and D. J. Faulkner, "A biomimetic approach to the synthesis of *Laurencia* metabolites. Synthesis of 10-bromo-α-chamigrene," *J. Org. Chem.*, vol. 41, no. 4, pp. 597–600, 1976.
[148] B. M. Howard, A. M. Nonomura, and W. Fenical, "Chemotaxonomy in marine algae: Secondary metabolite synthesis by *Laurencia* in unialgal culture," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 8, no. 4, pp. 329–336, 1980.
[149] M. Masuda, T. Abe, S. Sato, T. Suzuki, and M. Suzuki, "Diversity of halogenated secondary metabolites in the red alga *Laurencia nipponica* (Rhodomelaceae, Ceremiales)," *J. Phycol.*, vol. 33, pp. 196–208, 1997.
[150] K. L. McPhail, M. T. Davies-Coleman, R. C. B. Copley, and D. S. Eggleston, "New halogenated sesquiterpenes from South African specimens of the circumtropical sea hare *Aplysia dactylomela*," *J. Nat. Prod.*, vol. 62, no. 12, pp. 1618–1623, 1999.
[151] G. Guella, I. Mancini, and F. Pietra, "C_{15} acetogenins and terpenes of the dictyoceratid sponge *Spongia zimocca* of Il Rogiolo: A case of seaweed-metabolite transfer to, and elaboration within, a sponge?," *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.*, vol. 103, no. 4, pp. 1019–1023, 1992.
[152] C. Lhullier *et al.*, "Cytotoxic halogenated metabolites from the Brazilian red alga *Laurencia catarinensis*," *J. Nat. Prod.*, vol. 73, no. 1, pp. 27–32, 2010.
[153] M. Kladi, C. Vagias, G. Furnari, D. Moreau, C. Roussakis, and V. Roussis, "Cytotoxic cuparene sesquiterpenes from *Laurencia microcladia*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 46, no. 34, pp. 5723–5726, 2005.
[154] S. Sutour *et al.*, "Chemical composition of extracts from Chaetomorpha linum (Miller) Kütz. A potential use in the cosmetic Industry," *Int. J. Phytocosmetics Nat. Ingredients*, vol. 2, no. 1, pp. 5–5, 2015.
[155] T. Xu *et al.*, "Rapid Screening of Chemical Compositions of Gracilaria dura and Hypnea mucisformis (Rhodophyta) from Corsican Lagoon.," *Int. J. Phytocosmetics Nat. Ingredients*, vol. 2, no. 1, p. 8, 2015.
[156] F. Tomi and J. Casanova, "^{13}C-NMR as a tool for identification of individual components of

essential oils from Labiatae A review," *Acta Hortic.*, no. 723, pp. 185–192, 2006.
[157] O. Bazzali *et al.*, "Integrated analysis of the wood oil from Xanthocyparis vietnamensis Farjon & Hiep. by chromatographic and spectroscopic techniques," *Molecules*, no. 21, p. 840, 2016.
[158] S. Rezzi, A. Bighelli, V. Castola, and J. Casanova, "Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using ^{13}C-NMR spectroscopy," *J. Appl. Spectrosc.*, vol. 56, pp. 312–317, 2002.
[159] M. C. Blanc, P. Bradesi, M. J. Gonçales, L. Salgueiro, and J. Casanova, "Essential oil of Dittrichia viscosa ssp. viscosa: analysis by ^{13}C-NMR and antimicrobial activity," *Flavour Fragr. J.*, vol. 21, pp. 324–332, 2006.
[160] M. Gonny, P. Bradesi, and J. Casanova, "Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using ^{13}C-NMR spectroscopy," *Flavour Fragr. J.*, vol. 19, pp. 424–433, 2006.
[161] M. Suzuki, S. Nakano, Y. Takahashi, T. Abe, and M. Masuda, "Bisezakyne-A and -B, halogenated C_{15} acetogenins from a Japanese Laurencia species," *Phytochemistry*, vol. 51, no. 5, pp. 657–662, 1999.
[162] J. D. and W. A. König, *The Atlas of spectral data of sesquiterpenes hydrocarbons*, E.B.-Verla. Hambourg, Germany, 1998.
[163] M. Masuda, K. Kogame, S. Arisawa, and M. Suzuki, "Morphology and Halogenated Secondary Metabolites of Three Gran Canarian Species of *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta)," *Bot. Mar.*, vol. 41, no. 3, pp. 265–277, 1998.
[164] M. Suzuki and C. S. Vairappan, "Halogenated secondary metabolites from Japanese species of the red algal genus *Laurencia* (Rhodomelaceae, Ceremiales)," *Curr. Top. Phytochem.*, vol. 7, pp. 1–34, 2005.
[165] A. Dellai, S. Laajili, V. Le Morvan, J. Robert, and A. Bouraoui, "Antiproliferative activity and phenolics of the Mediterranean seaweed *Laurencia obusta*," *Ind. Crops Prod.*, vol. 47, no. January 2016, pp. 252–255, 2013.
[166] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, and F. Pognan, "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, pp. 5421–5426, 2000.
[167] L. R. De Carvalho, J. N. Farias, P. Riul, and M. T. Fujii, "An Overview of Global Distribution of the Diterpenes Synthesized by the Red Algae *Laurencia* Complex (Ceramiales, Rhodomelaceae)," *Mar. Algae Extr. Process. Prod. Appl.*, vol. 1–2, no. August, pp. 245–266, 2015.
[168] V. M. Dembitsky, A. G. Tolstikov, and G. A. Tolstikov, "Natural Halogenated Non-Terpenic C_{15} - Acetogenins of Sea Organisms," *Chem. Sustain. Dev.*, vol. 11, pp. 329–339, 2003.
[169] B. M. Howard and W. Fenical, "Isoconcinndiol, a brominated diterpenoid from *Laurencia snyderae* var. *guadalupensis*," *Phytochemistry*, vol. 19, pp. 2774–2776, 1980.
[170] J. J. Sims, G. H. Y. Lin, R. M. Wing, and W. Fenical, "Marine natural products. Concinndiol, a bromo-diterpene alcohol from the red alga, *Laurencia concinna*.," *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, no. 470, pp. 470–471, 1973.
[171] G. Corriero, A. Madaio, L. Mayol, V. Piccialli, and D. Sica, "Rotalin A and B, two novel diterpene metabolites from the encrusting mediterranean sponge *Micale rotalis* (Bowerbank)," *Tetrahedron*, vol. 45, no. 1, pp. 277–288, 1989.
[172] R. E. Moore, "Algal Nonisoprenoids," in *Marine Natural Products : Chemical and biological Perspectives*, London, UK, 1978, pp. 44–121.
[173] H. Kigoshi, Y. Shizuri, H. Niwa, and K. Yamada, "Four new C_{15} acetylenic polyenes of biogenetic significance from the red alga *Laurencia okamurai*: structures and synthesis," *Tetrahedron*, vol. 42, no. 14, pp. 3781–3787, 1986.
[174] J. K. Nicholson, J. C. Lindon, and E. Holmes, "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to path physiological stimul via multivariate statistical analysis of

biological NMR spectroscopic data," *Xenobiotica*, vol. 29, no. 11, pp. 1181–1189, 1999.
[175] S. Oliver *et al.*, "Systematic functional analysis of the yeast genome," *Trends Biotechnol.*, vol. 16, no. 9, pp. 373–378, 1998.
[176] D. Rollin *et al.*, "Metabolomics Coming of Age with Its Technological Diversity," in *Advances in botanical research*, First Edit., A. Press, Ed. Elsevier, 2013, pp. 1–66.
[177] G. A. Nagana Gowda and D. Raftery, *Advances in NMR-Based Metabolomics*, 1st ed., vol. 63. Elsevier B.V., 2014.
[178] P. E. Glèlè Kakaï R, Salako VK, "Méthodes statistiques multivariées utilisées en écologie," *Ann. des Sci. Agron.*, vol. 20, no. April, pp. 139–157, 2016.
[179] H. K. Kim, Y. H. Choi, and R. Verpoorte, "NMR-based metabolomic analysis of plants," *Nat. Protoc.*, vol. 5, no. 3, pp. 536–549, 2010.
[180] A. Kalivodová, K. Hron, P. Filzmoser, L. Najdekr, H. Janečková, and T. Adam, "PLS-DA for compositional data with application to metabolomics," *J. Chemom.*, vol. 29, no. 1, pp. 21–28, 2015.
[181] P. S. Gromski *et al.*, "A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding," *Anal. Chim. Acta*, vol. 879, pp. 10–23, 2015.
[182] J. L. Izquierdo-García *et al.*, "Descriptive review of current NMR-based metabolomic data analysis packages," *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 59, no. 3, pp. 263–270, 2011.
[183] R. Singh, "Chemotaxonomy: A Tool for Plant Classification," *J. Med. Plants Stud.*, vol. 4, no. 2, pp. 90–93, 2016.
[184] M. Wink, F. Botschen, C. Gosmann, H. Schäfer, and P. G. Watermann, "Chemotaxonomy seen from a phylogenetic perspective and evolution of secondary metabolism," in *Annual plant reviews, Biochemistry of plant secondary metabolism*, John Wiley & Sons, Ed. 2011.
[185] W. Fenical and J. N. Norris, "Chemotaxonomy in marine algae: chemical separation of some *Laurencia* species (Rhodophyta) from the gulf of California," *J. Phycol.*, vol. 11, pp. 104–108, 1975.
[186] M. Masudai, T. Abe, T. Suzuki, and M. Suzuki, "Morphological and chemotaxonomic studies on *Laurencia composita* and *L. okamurae* (Ceramiales, Rhodophyta)," *Phycologia*, vol. 35, no. 6, pp. 550–562, 1996.
[187] N. Y. Ji, X. M. Li, K. Li, J. B. Gloer, and B. G. Wang, "Halogenated sesquiterpenes and non-halogenated linear C_{15}-acetogenins from the marine red alga *Laurencia composita* and their chemotaxonomic significance," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 36, no. 12, pp. 938–941, 2009.
[188] G. Guella, A. Öztunç, I. Mancini, and F. Pietra, "Stereochemical features of sesquiterpene metabolites as a distinctive trait of red seaweeds in the genus *Laurencia*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 38, no. 47, pp. 8261–8264, 1997.
[189] T. Kamada and C. S. Vairappan, "A new bromoallene-producing chemical type of the red alga *Laurencia nangii* Masuda," *Molecules*, vol. 17, no. 2, pp. 2119–2125, 2012.
[190] M. Machín-Sánchez, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, and M. C. Gil-Rodríguez, "CE-MS fingerprinting of *Laurencia* complex algae (Rhodophyta)," *J. Sep. Sci.*, vol. 37, no. 6, pp. 711–716, 2014.
[191] F. L. da S. Machado, H. M. Duarte, L. M. S. Gestinari, V. Cassano, C. R. Kaiser, and A. R. Soares, "Geographic Distribution of Natural Products Produced by the Red Alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh," *Chem. Biodivers.*, vol. 13, no. 7, pp. 845–851, 2016.
[192] A. Tsuyoshi, M. Masuda, T. Suzuki, and M. Suzuki, "Chemical races in the red alga *Laurencia nipponica* (Rhodomelaceae, Ceramiales)," *Phycol. Res.*, vol. 47, no. 2, pp. 87–95, 1999.
[193] M. Masuda, "A new species of *Laurencia*, *L. omaezakiana* (Ceramiales, Rhodophyta), from Japan," *Phycological Research*, vol. 45, no. 3. pp. 123–131, 1997.
[194] G. Furnari, M. Cormaci, and D. Serio, "The Laurencia complex (Rhodophyta, Rhodomelaceae) in the Mediterranean Sea: An overview," *Cryptogam. Algol.*, vol. 22, no. 4, pp. 331–373, 2001.

[195] Z. A. Ouattara *et al.*, “The key role of ^{13}C-NMR analysis in the identification of individual components of *Polyathia longifolia* leaf oil,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 29, no. 371–379, 2014.
[196] R. Kazlauskas, P. T. Murphy, R. J. Wells, J. J. Daly, and W. E. Oberhänsli, “Heterocladol, a halogenated selinane sesquiterpene of biosynthetic significance from the red alga *Laurencia filiformis*: its isolation, crystal structure and absolute configuration,” *Aust. J. Chem.*, vol. 30, pp. 2679–2687, 1977.
[197] W. K. Wilson, R. M. Sumpter, J. J. Warren, P. S. Rogers, B. Ruan, and G. J. Schroepfer, “Analysis of unsaturated C27 sterols by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy,” *J. liped Res.*, vol. 37, pp. 1529–1555, 1996.
[198] M. C. Gil-Rodríguez, A. Sentíes, J. Díaz-Larrea, V. Cassano, and M. T. Fujii, “*Laurencia marilzae* SP. Nov. (ceramiales, rhodophyta) from the canary Islands, Spain, based on morphological and molecular evidence,” *J. Phycol.*, vol. 45, no. 1, pp. 264–271, 2009.
[199] F. Ronquist *et al.*, “Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space,” *Syst. Biol.*, vol. 61, pp. 539–542, 2012.
[200] A. Stamatakis, “RAxML Version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies,” *Bioinformatics*, vol. 30, pp. 1312–1313, 2014.

ANNEXES

Annexe A : Spectres de RMN 1D et 2D du composé A

Figure A1 : Spectre ^{1}H du compose A
Figure A2 : Spectre ^{13}C du composé A
Figure A3 : DEPT 135 du composé A
Figure A4 : Spectre HSQC du composé A
Figure A5 : Spectre COSY du composé A
Figure A6 : Spectre HMBC du composé A

Figure A1 : Spectre ^{1}H du compose A

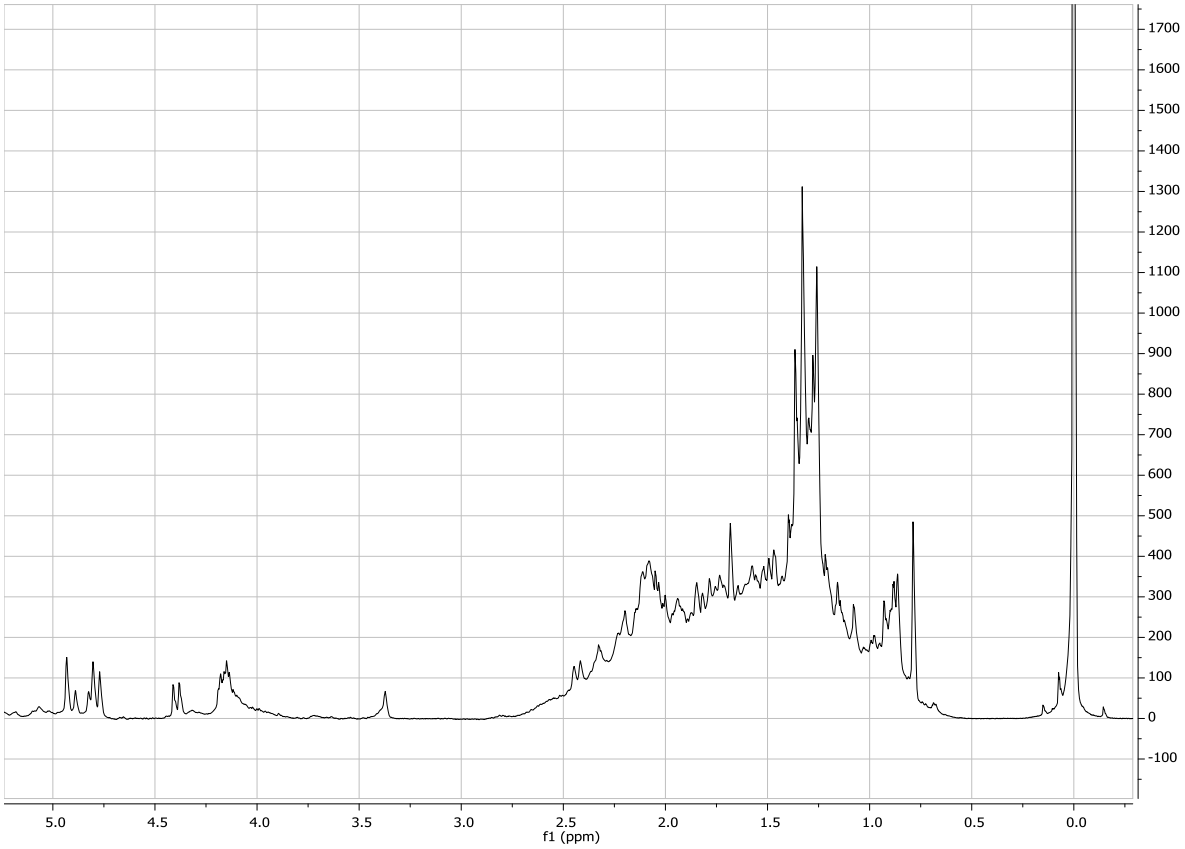


Figure A2 : Spectre ^{13}C du composé A

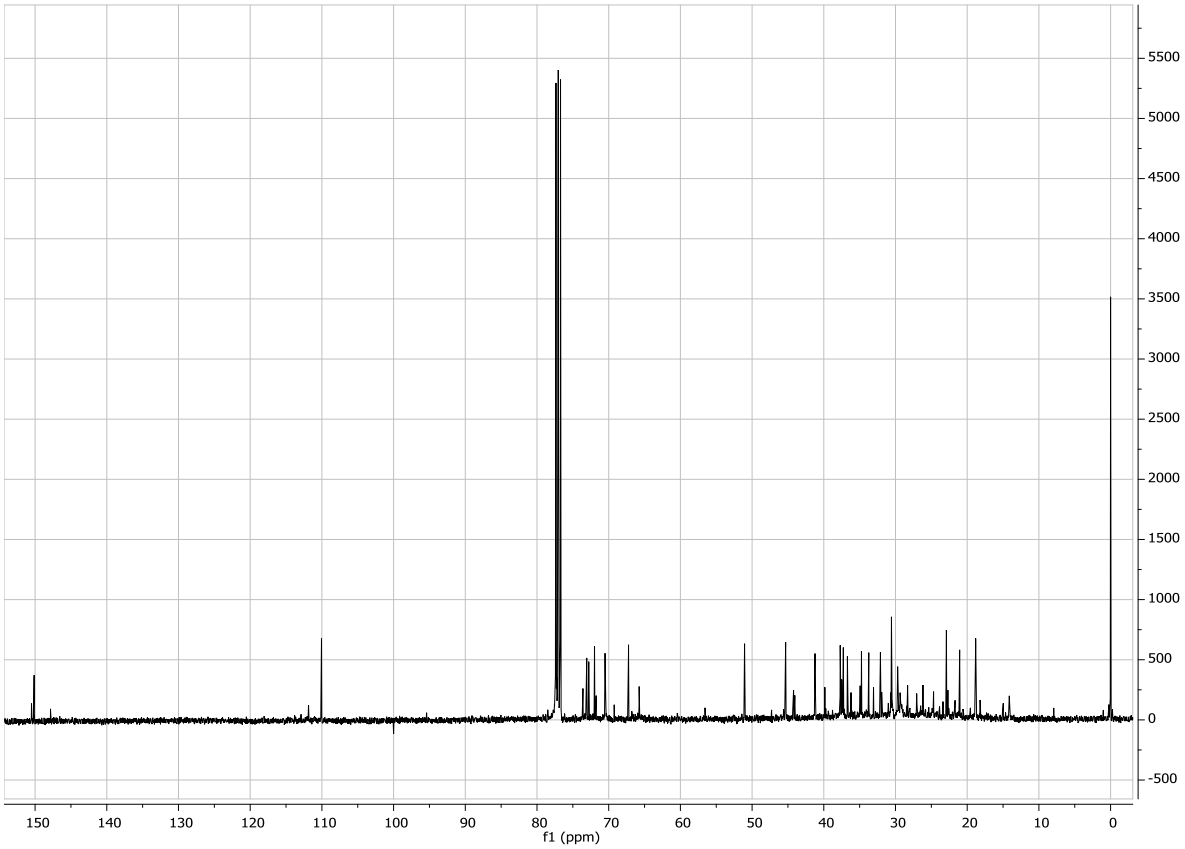


Figure A3 : DEPT 135 du composé A

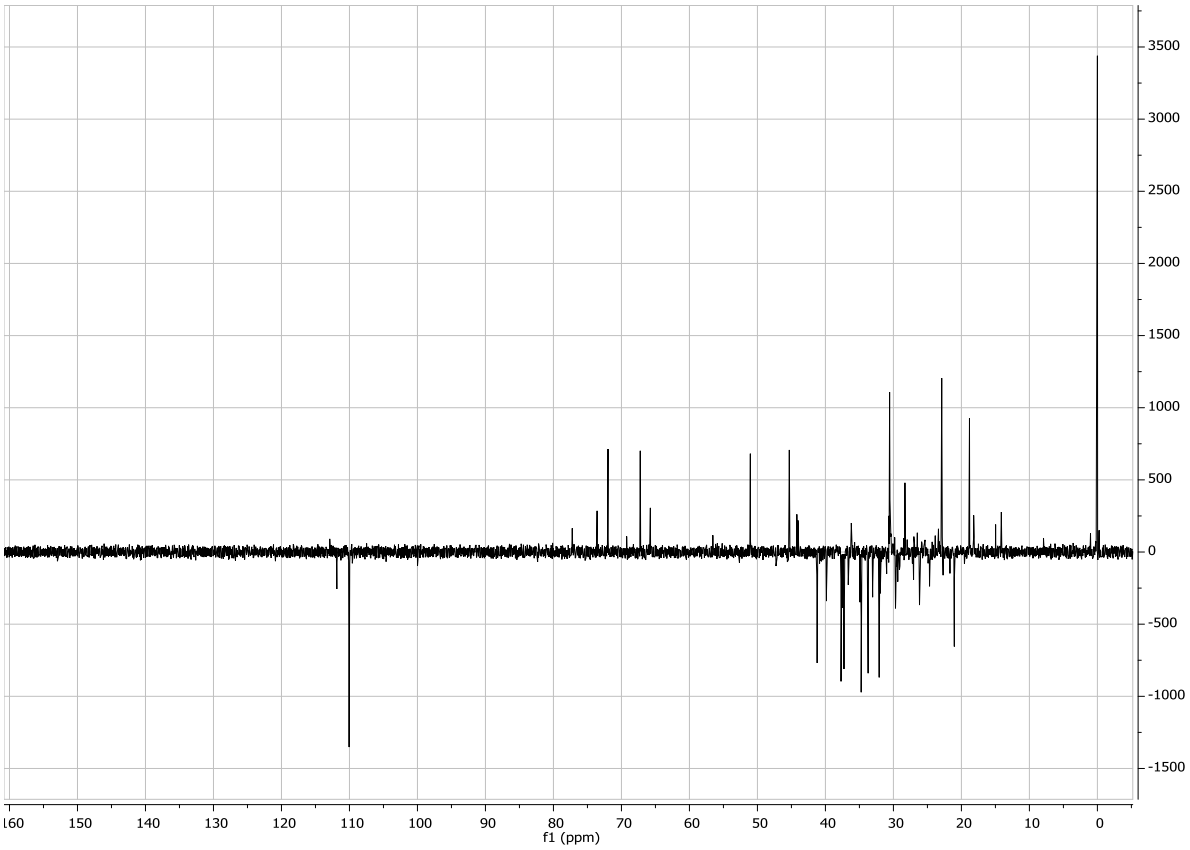


Figure A4 : Spectre HSQC du composé A

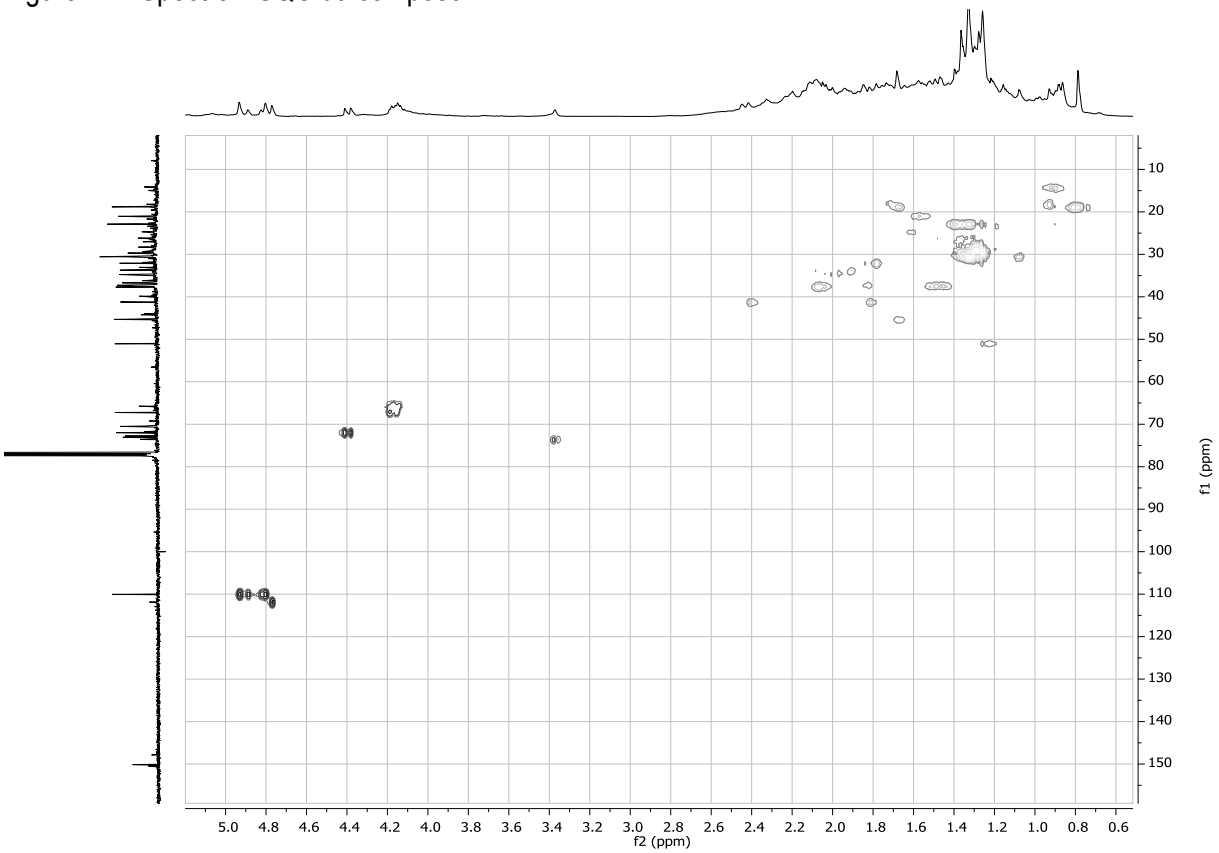


Figure A5 : Spectre COSY du composé A

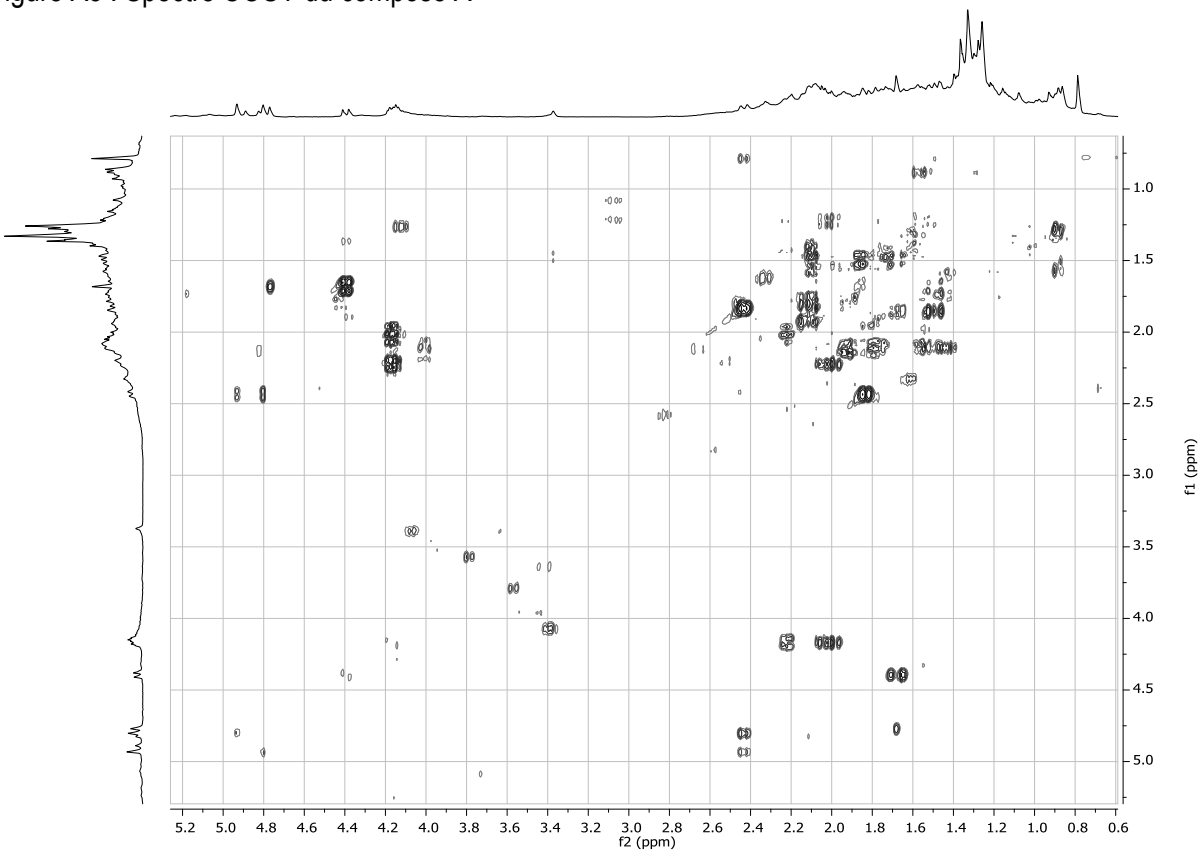
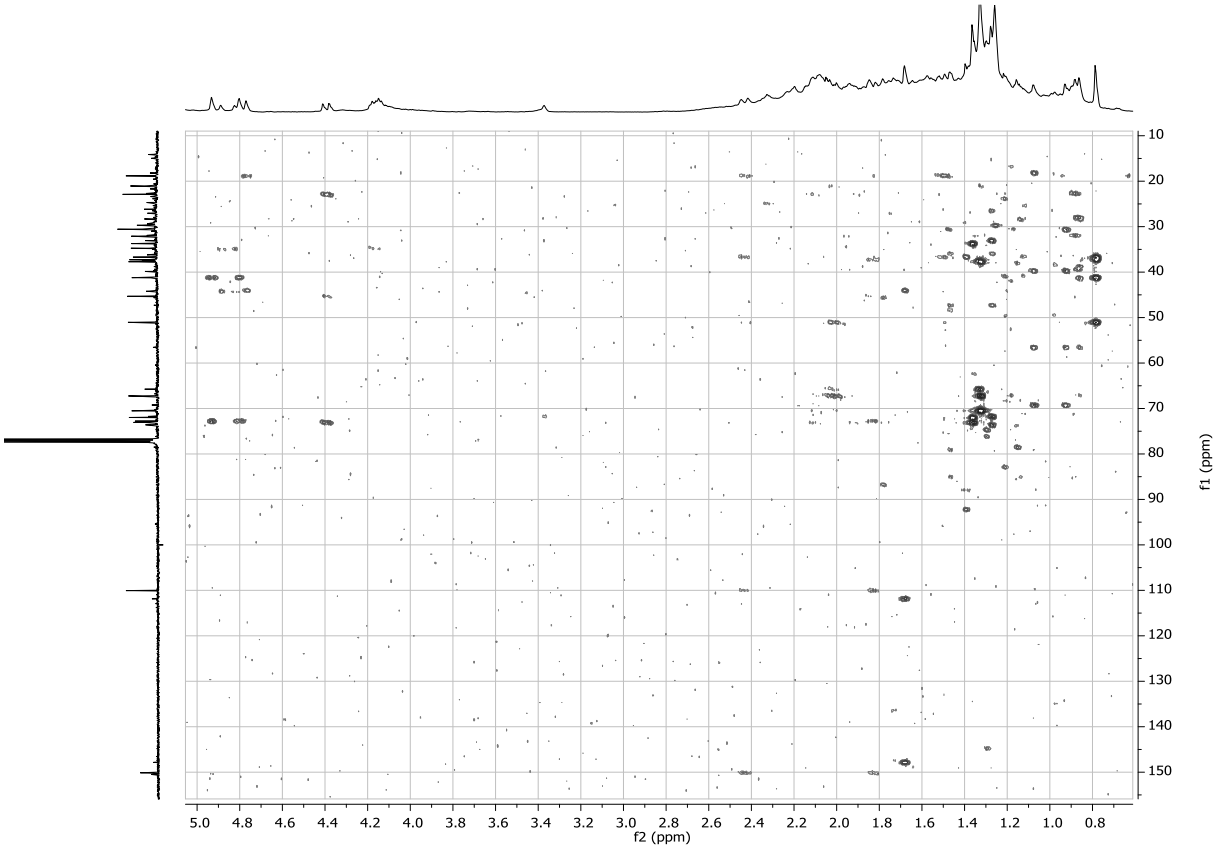


Figure A6 : Spectre HMBC du composé A



Annexe B : Spectres de RMN 1D et 2D du composé B

Figure B1 : Spectre ^{1}H du compose B
Figure B2 : Spectre ^{13}C du composé B
Figure B3 : DEPT 135 du composé B
Figure B4 : Spectre HSQC du composé B
Figure B5 : Spectre COSY du composé B
Figure B6 : Spectre HMBC du composé B
Figure B7 : Spectre NOESY du composé B

Figure B1 : Spectre ^{1}H du compose B

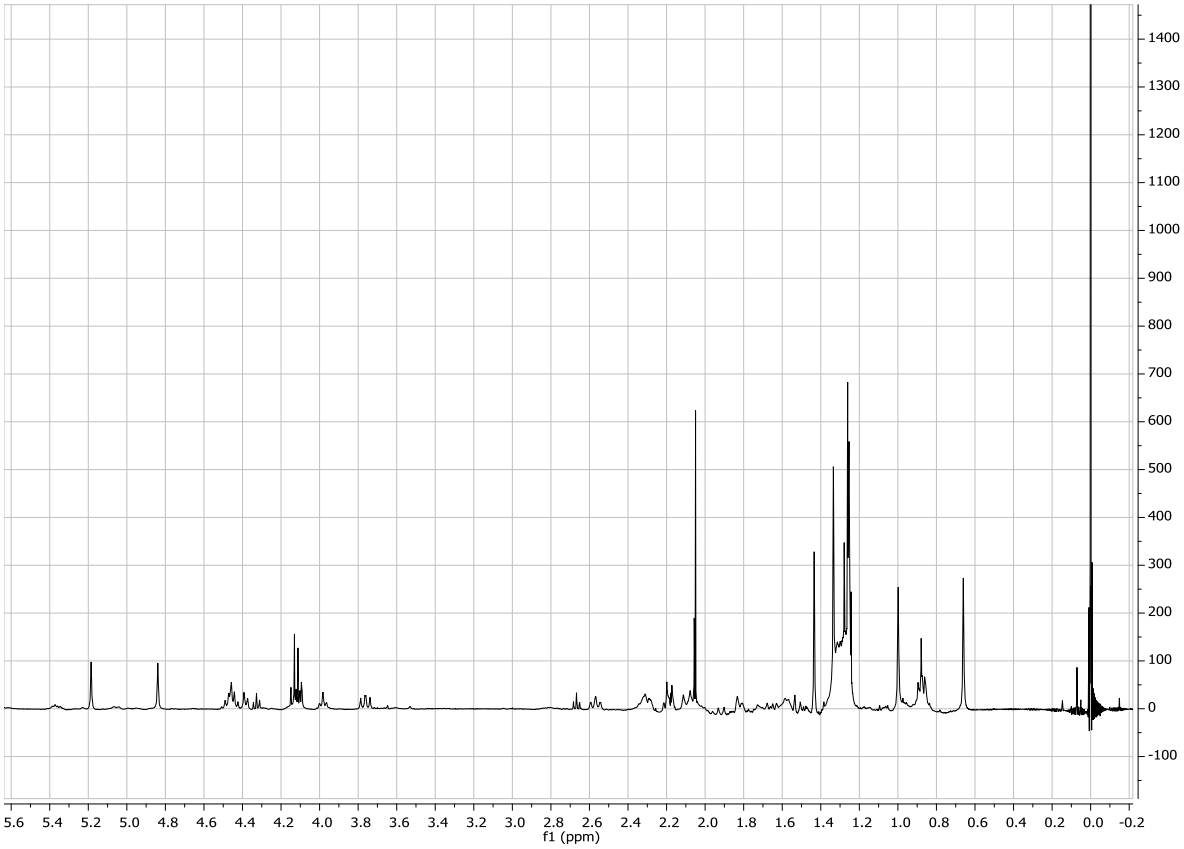


Figure B2 : Spectre ^{13}C du composé B

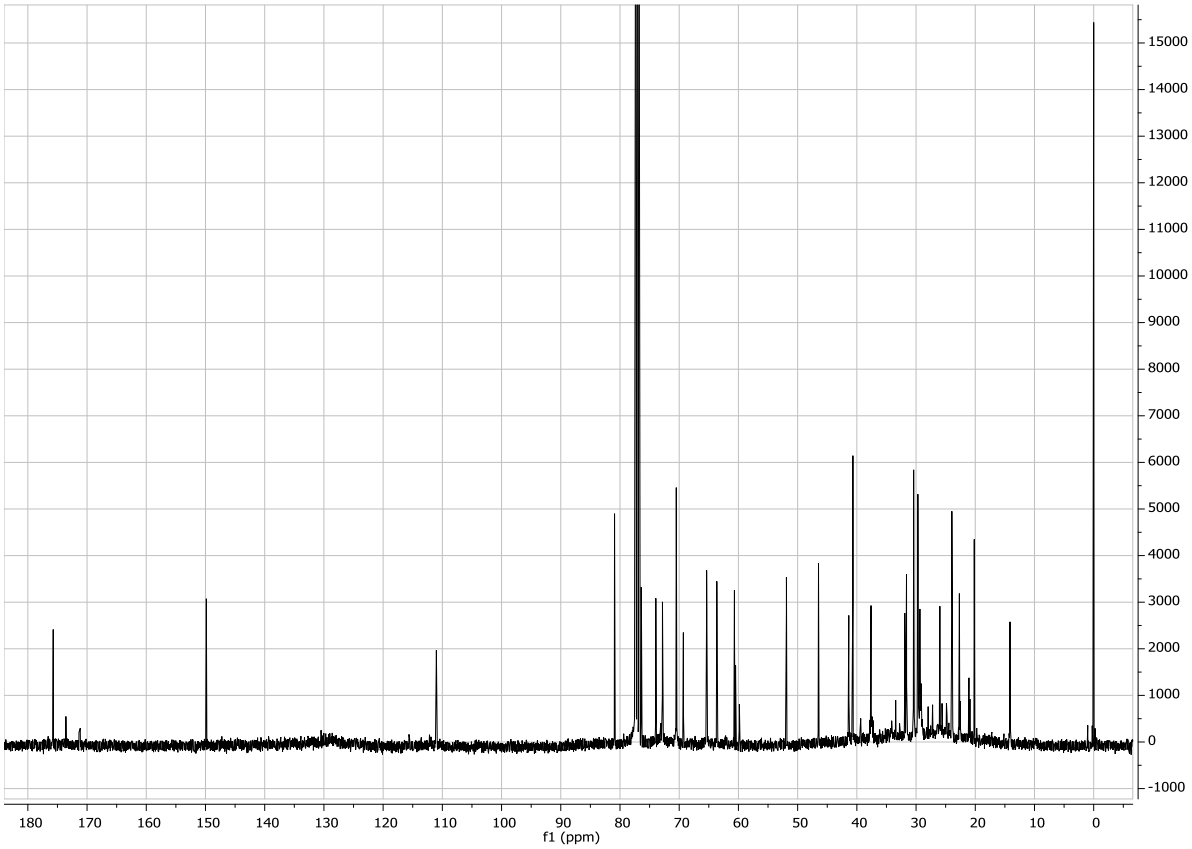


Figure B3 : DEPT 135 du composé B

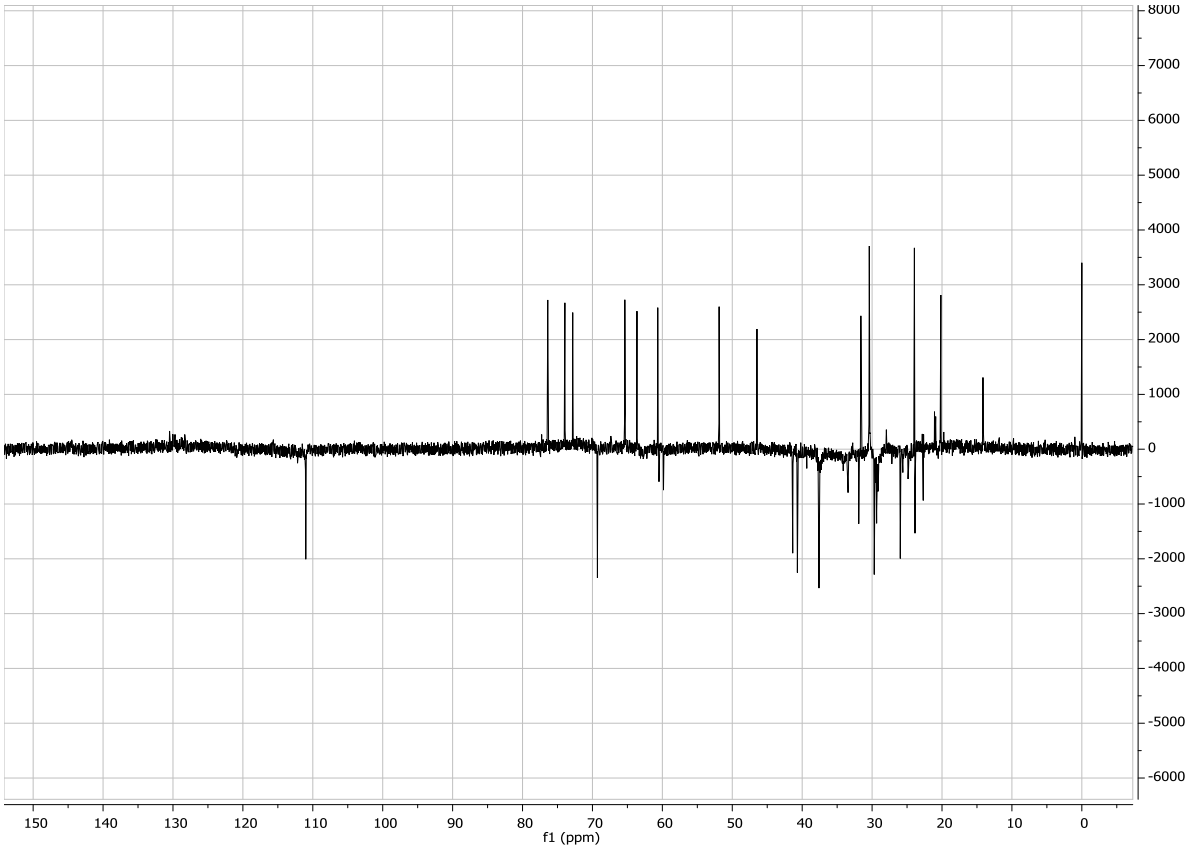


Figure B4 : Spectre HSQC du composé B

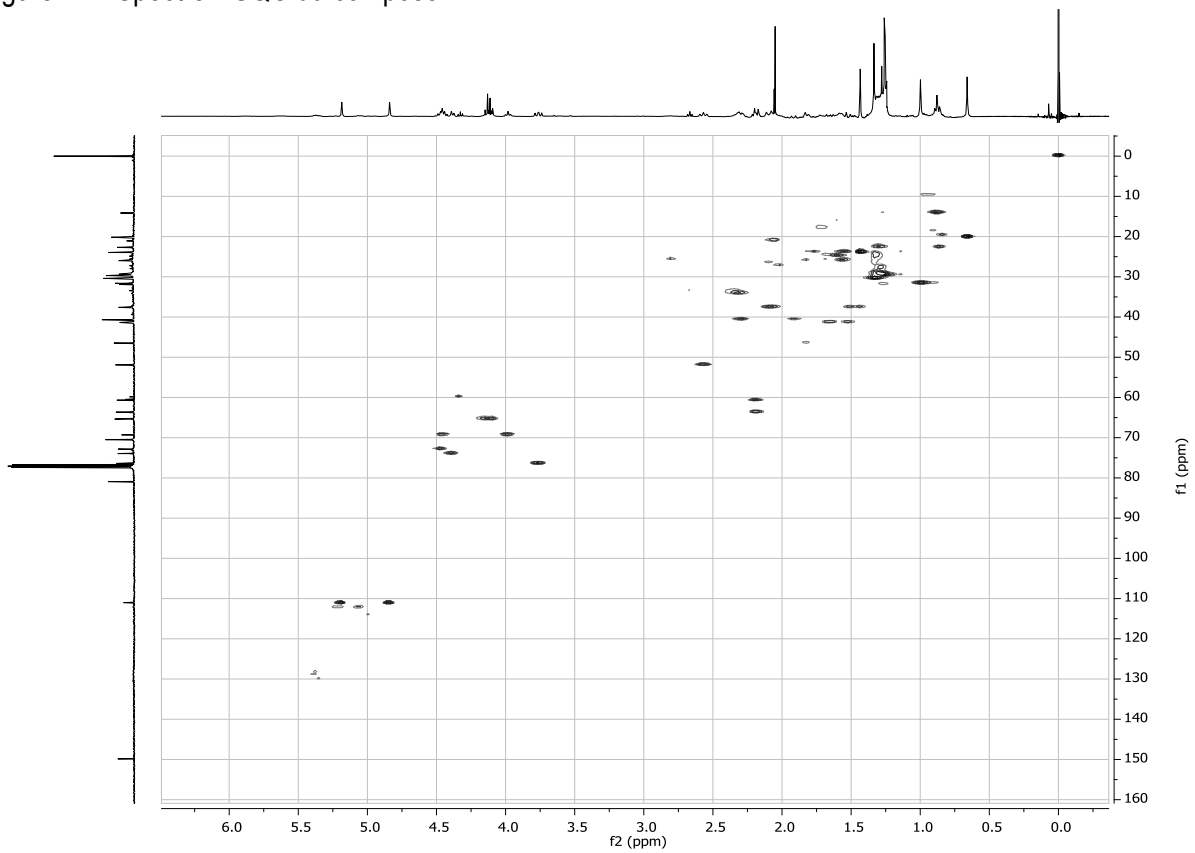


Figure B5 : Spectre COSY du composé B

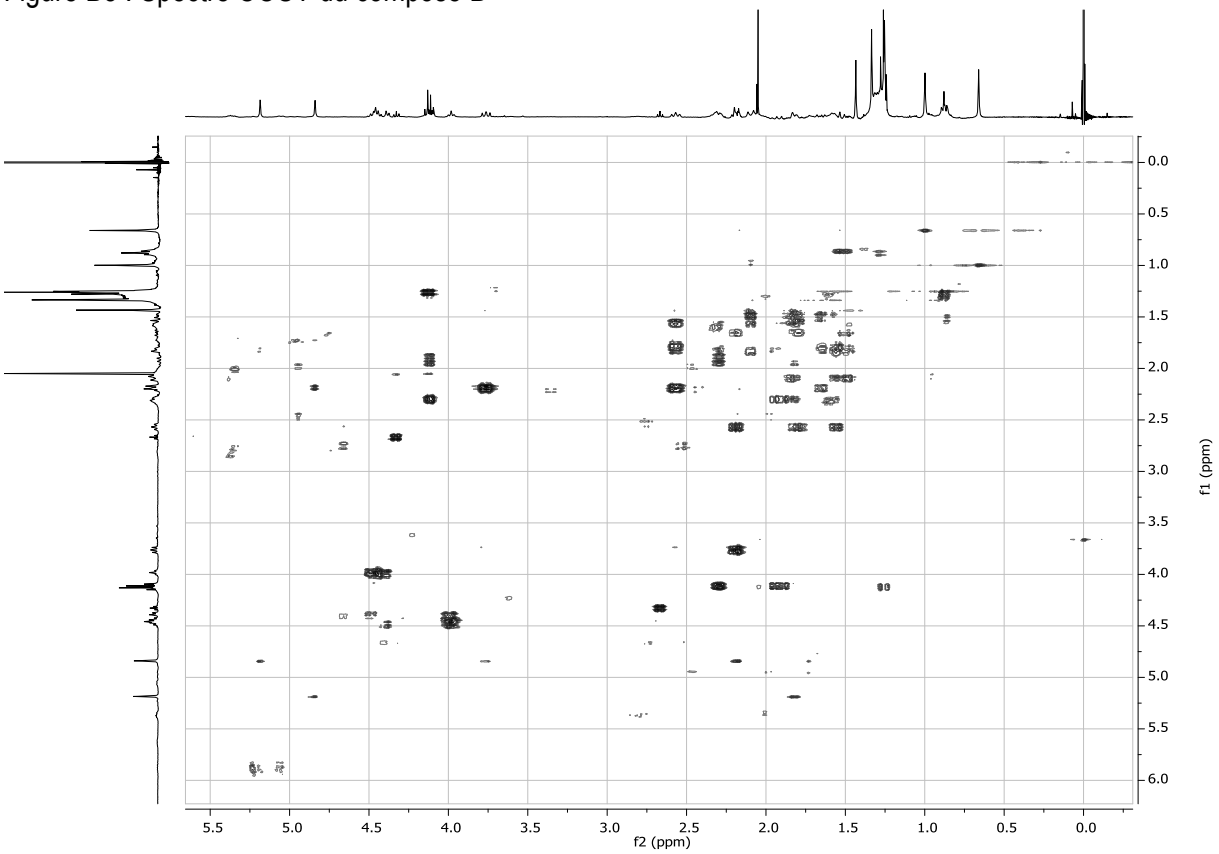


Figure B6 : Spectre HMBC du composé B

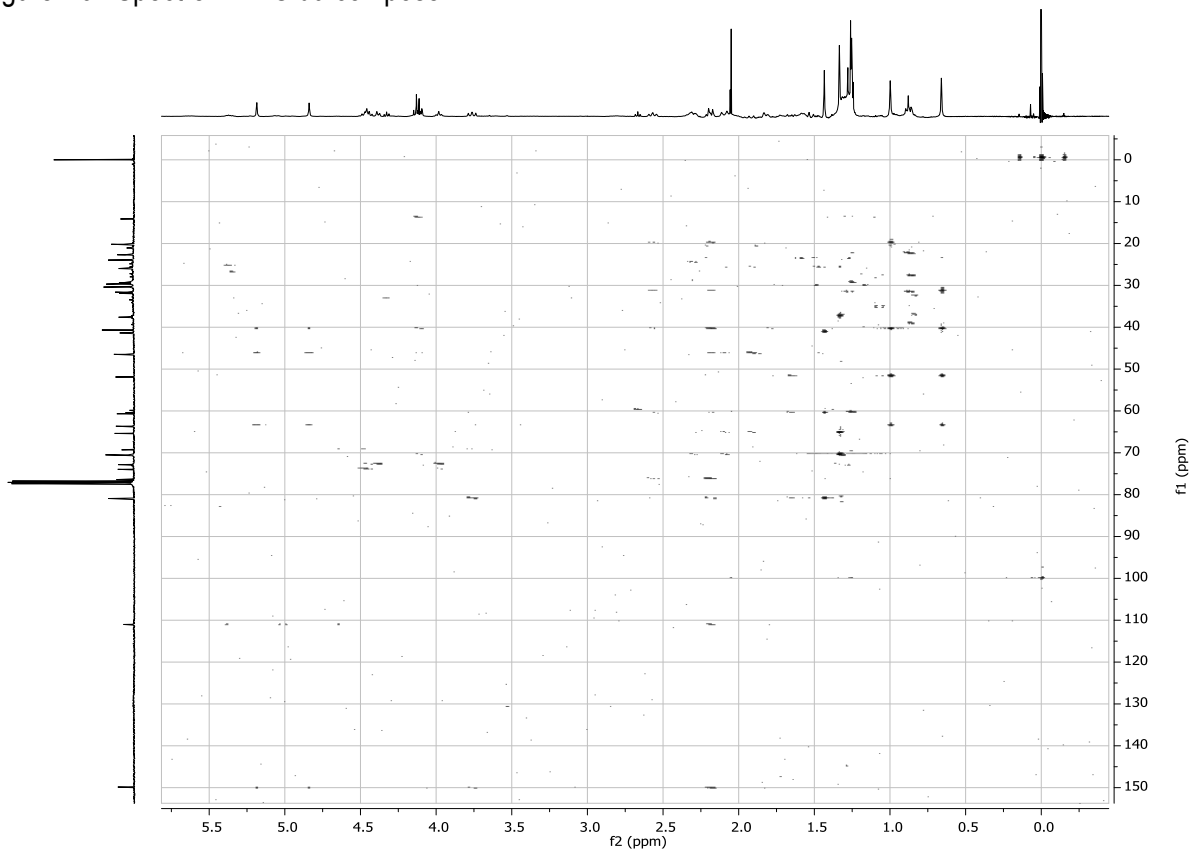
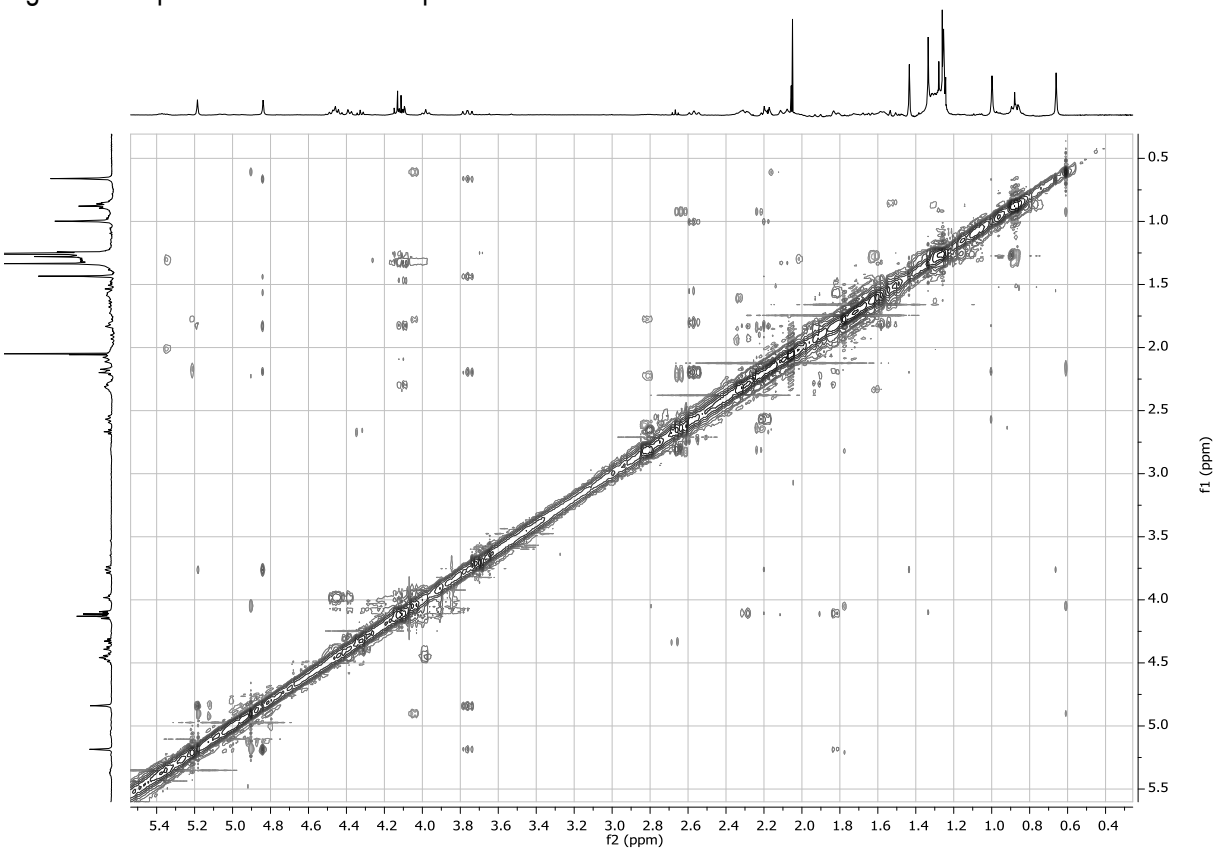


Figure B7 : Spectre NOESY du composé B



Annexe C : Spectres de RMN 1D et 2D du composé C

Figure C1 : Spectre ^{1}H du compose C
Figure C2 : Spectre ^{13}C du composé C
Figure C3 : DEPT 135 du composé C
Figure C4 : Spectre HSQC du composé C
Figure C5 : Spectre COSY du composé C
Figure C6 : Spectre HMBC du composé C

Figure C1 : Spectre ^{1}H du compose C

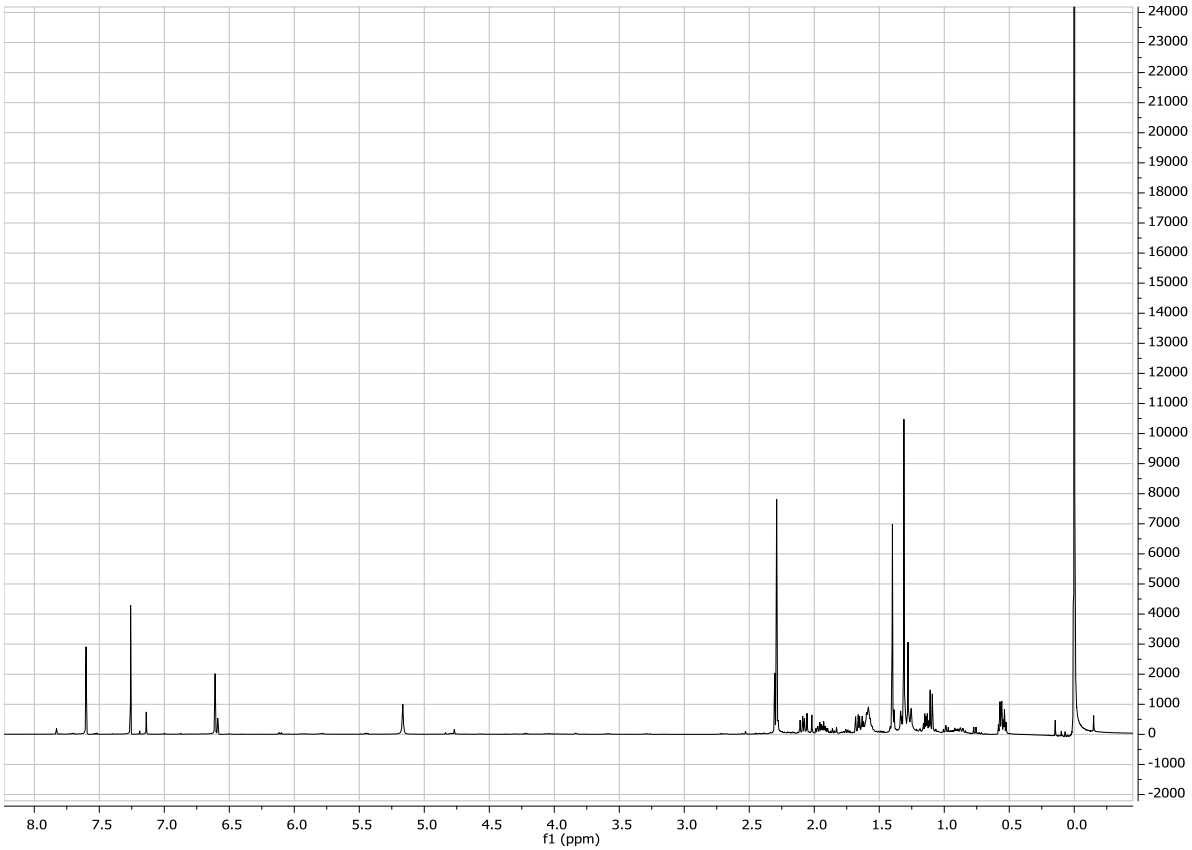


Figure C2 : Spectre ^{13}C du composé C

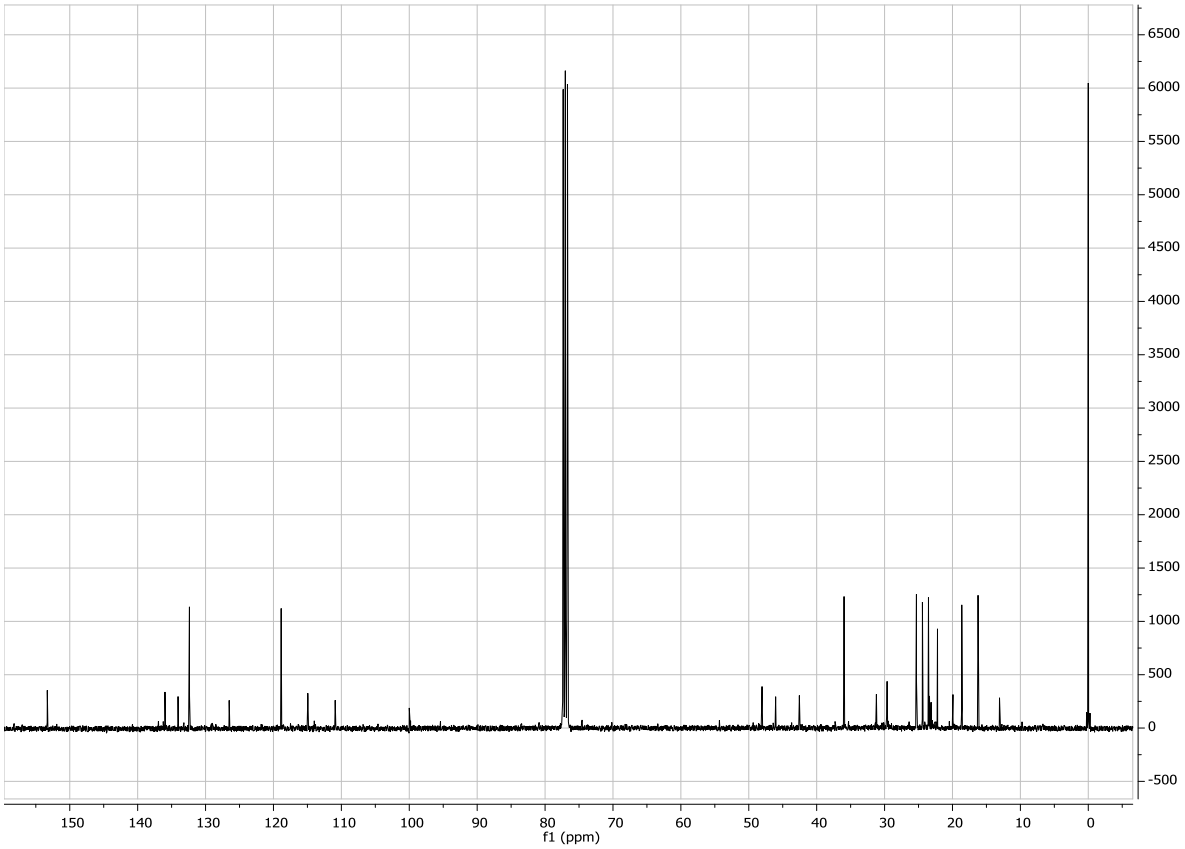


Figure C3 : DEPT 135 du composé C

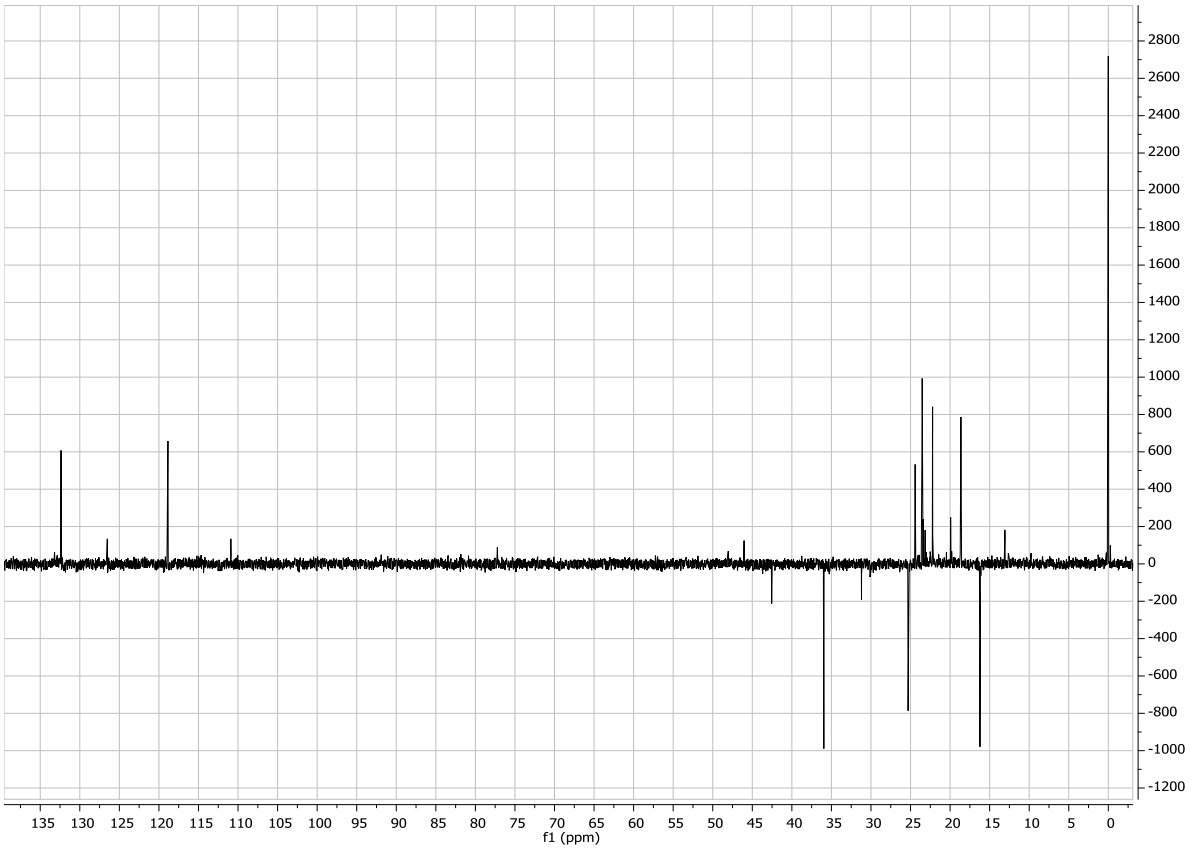


Figure C4 : Spectre HSQC du composé C

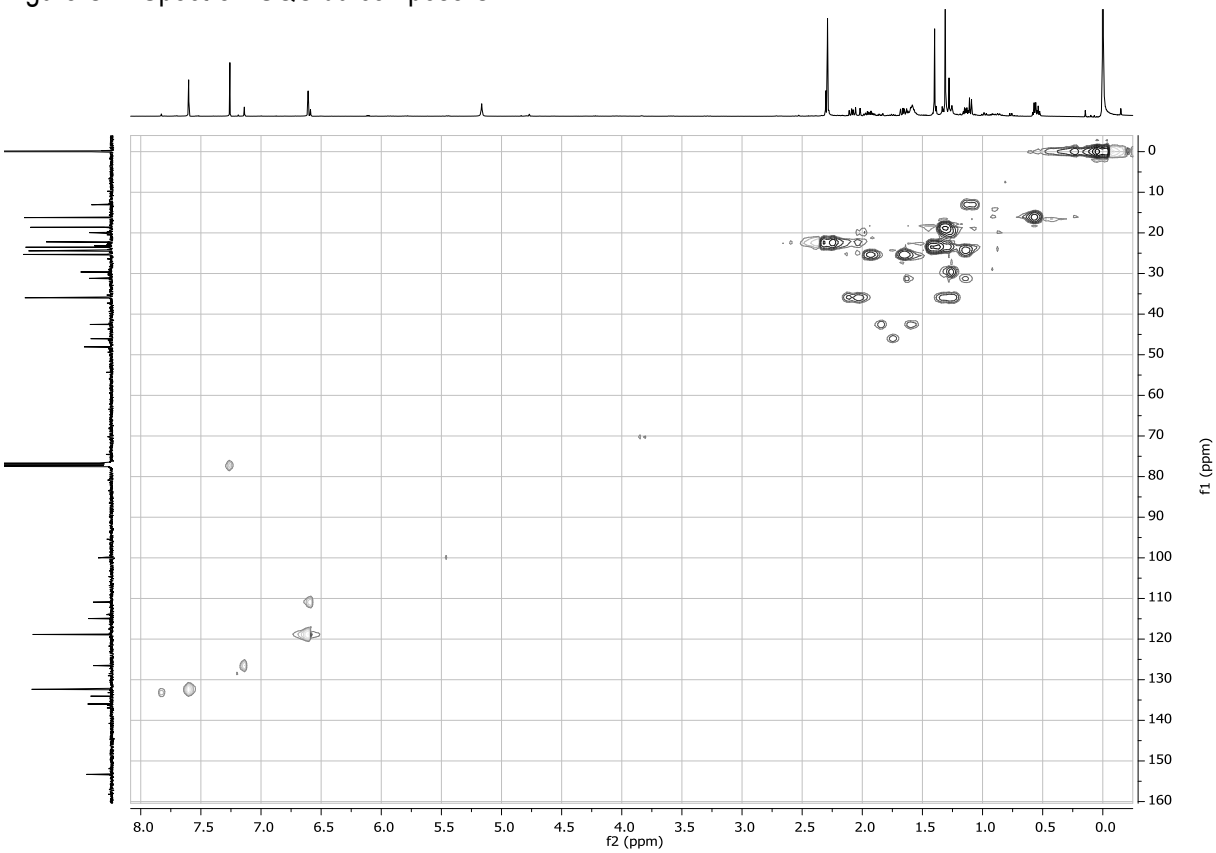


Figure C5 : Spectre COSY du composé C

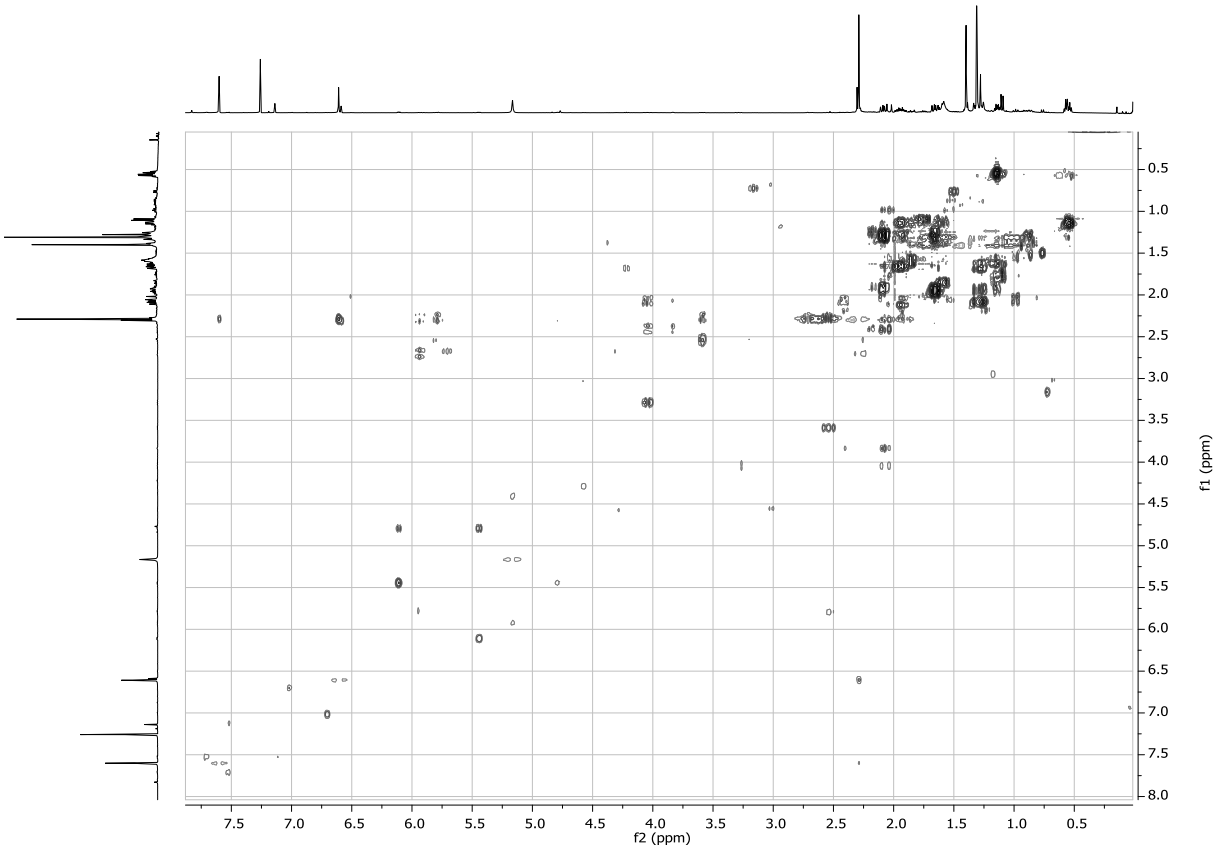
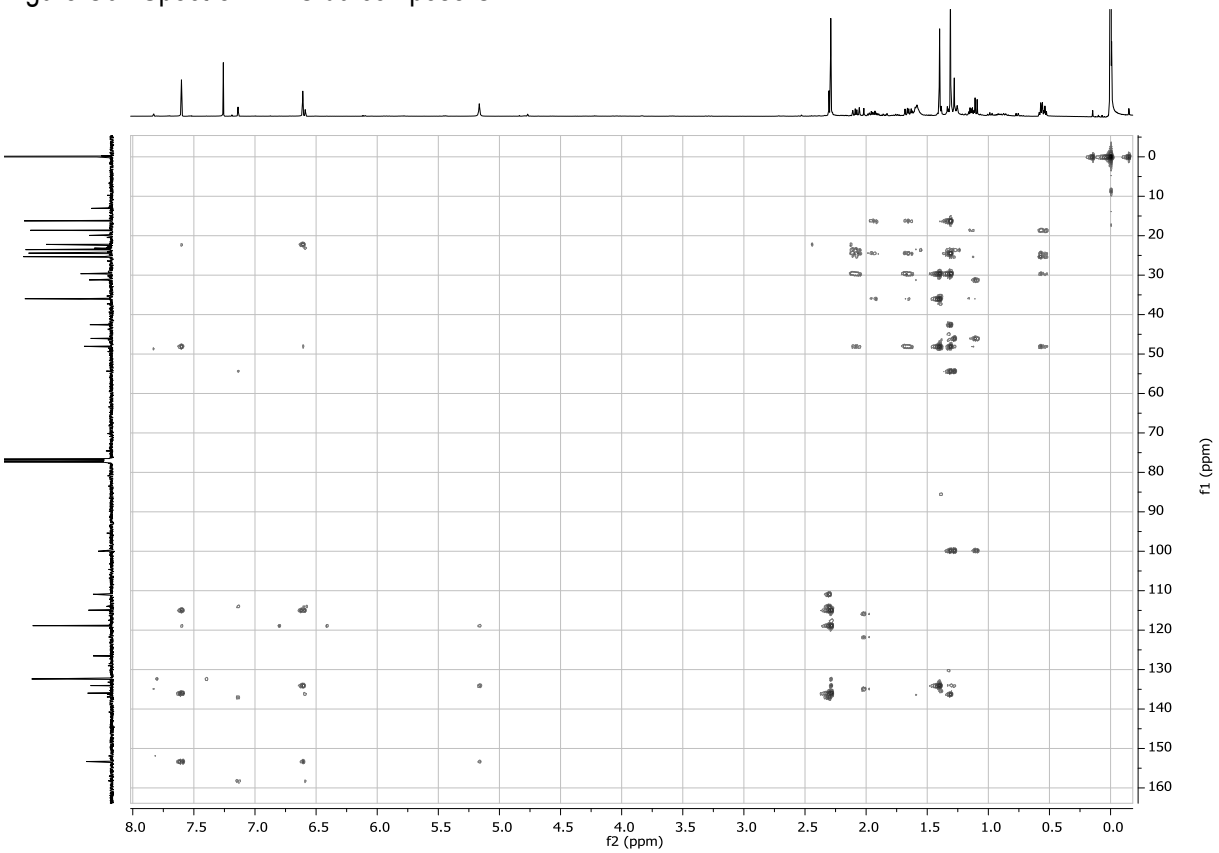


Figure C6 : Spectre HMBC du composé C



Annexe D : Spectres de RMN 1D et 2D du composé D

Figure D1 : Spectre ^{1}H du compose D
Figure D2 : Spectre ^{13}C du composé D
Figure D3 : DEPT 135 du composé D
Figure D4 : Spectre HSQC du composé D
Figure D5 : Spectre COSY du composé D
Figure D6 : Spectre HMBC du composé D

Figure D1 : Spectre ^{1}H du compose D

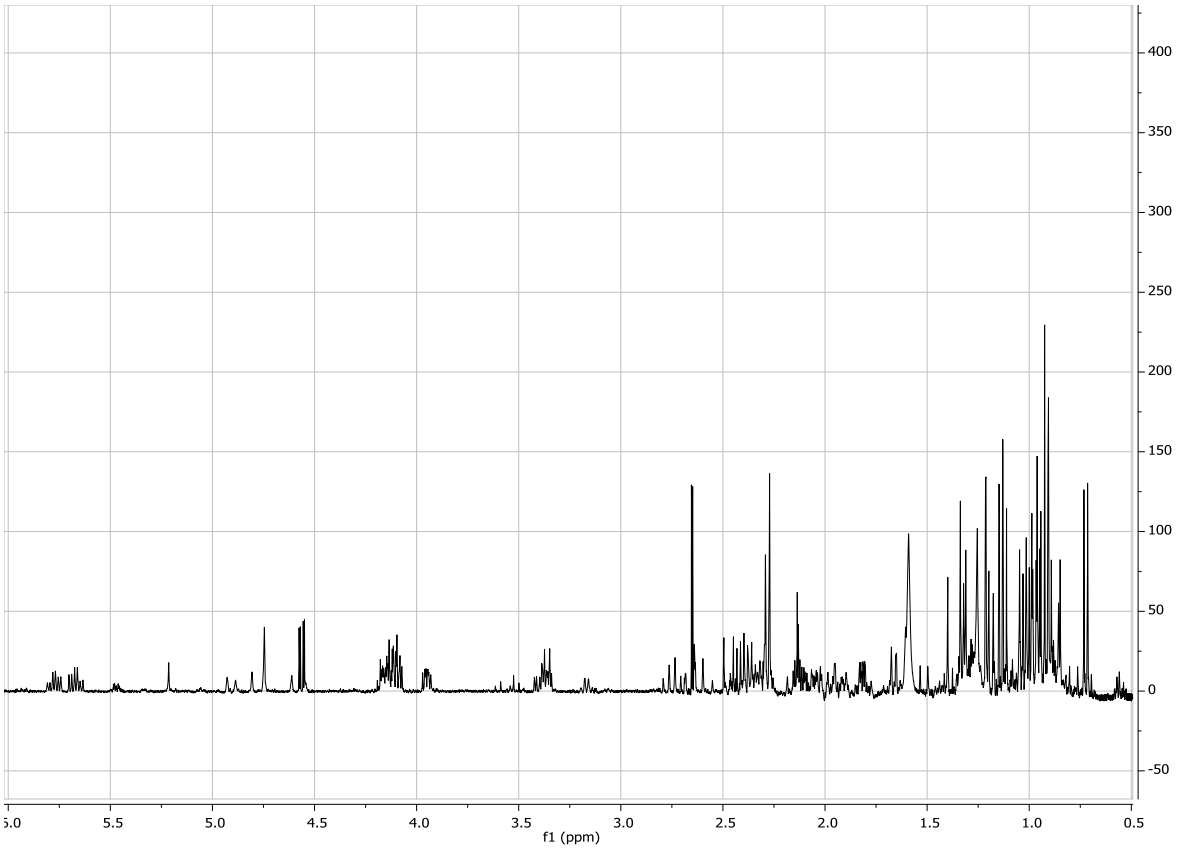


Figure D2 : Spectre ^{13}C du composé D

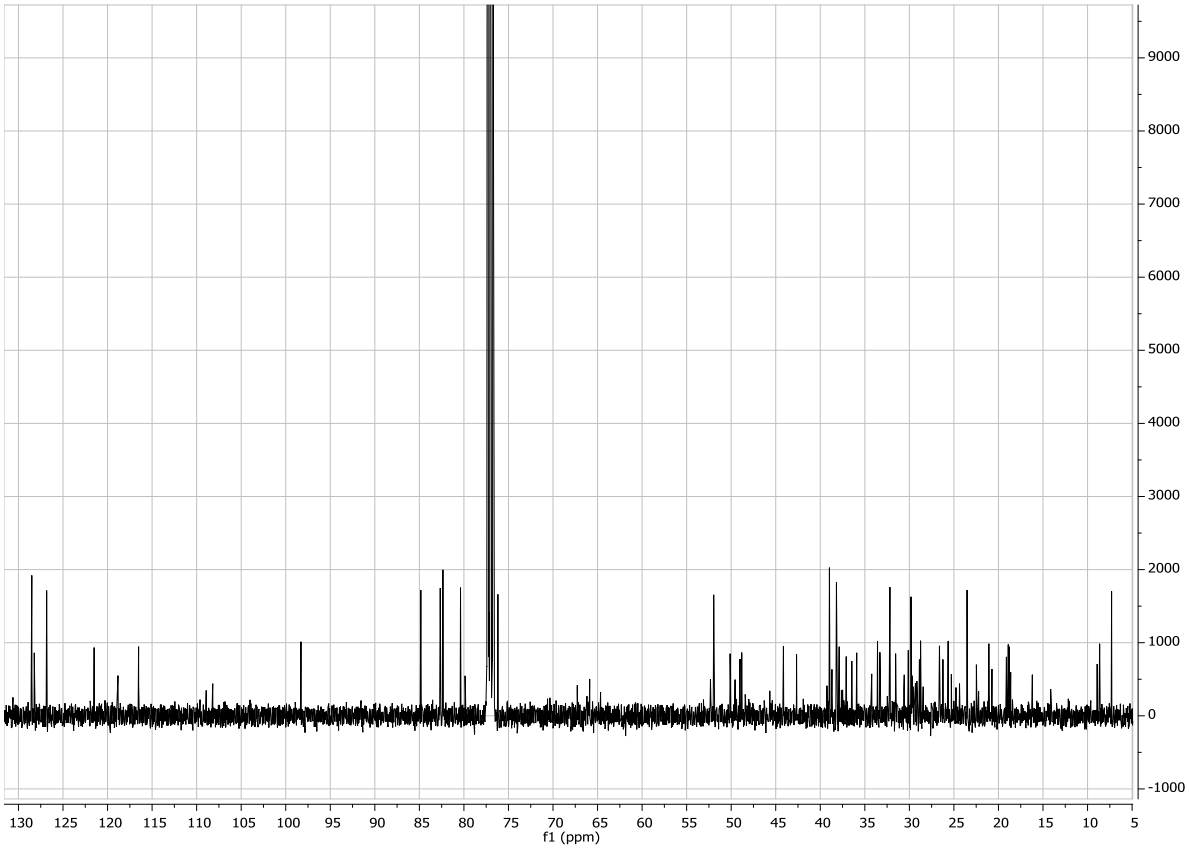


Figure D3 : DEPT 135 du composé D

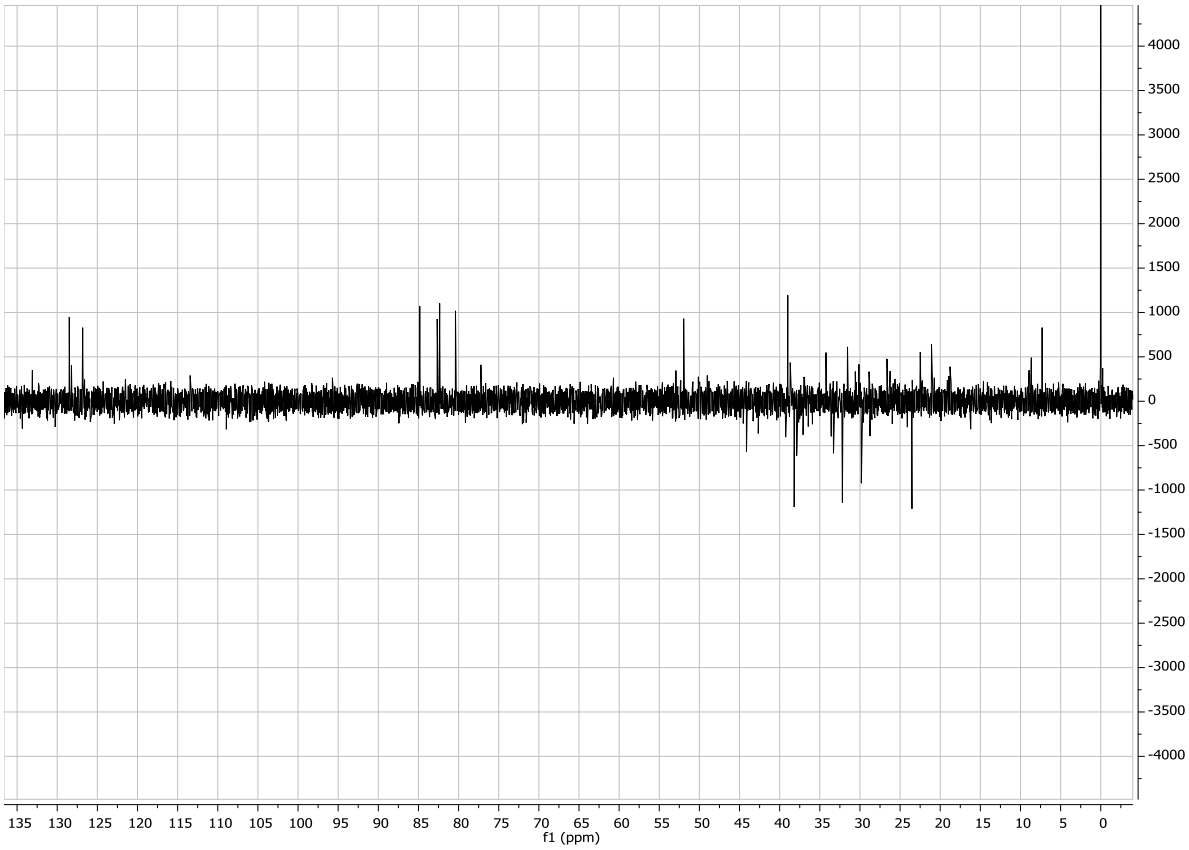


Figure D4 : Spectre HSQC du composé D

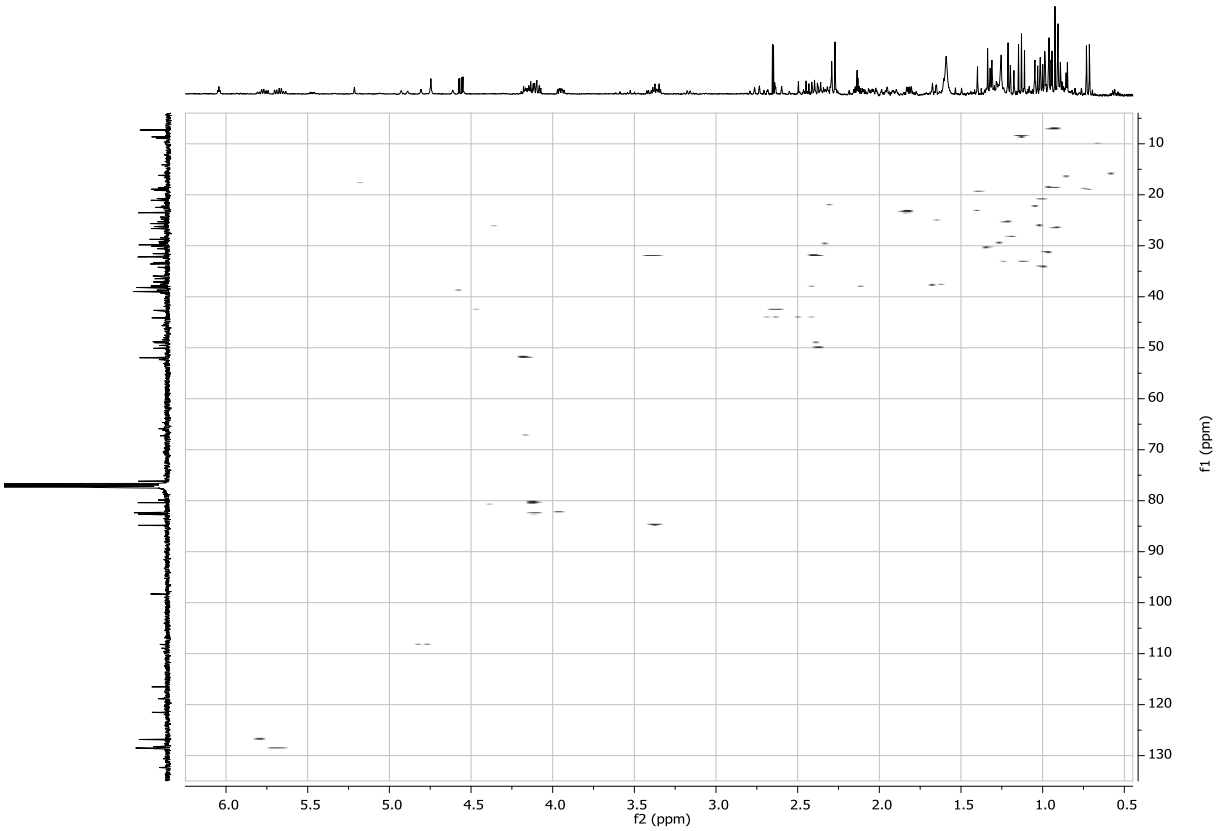


Figure D5 : Spectre COSY du composé D

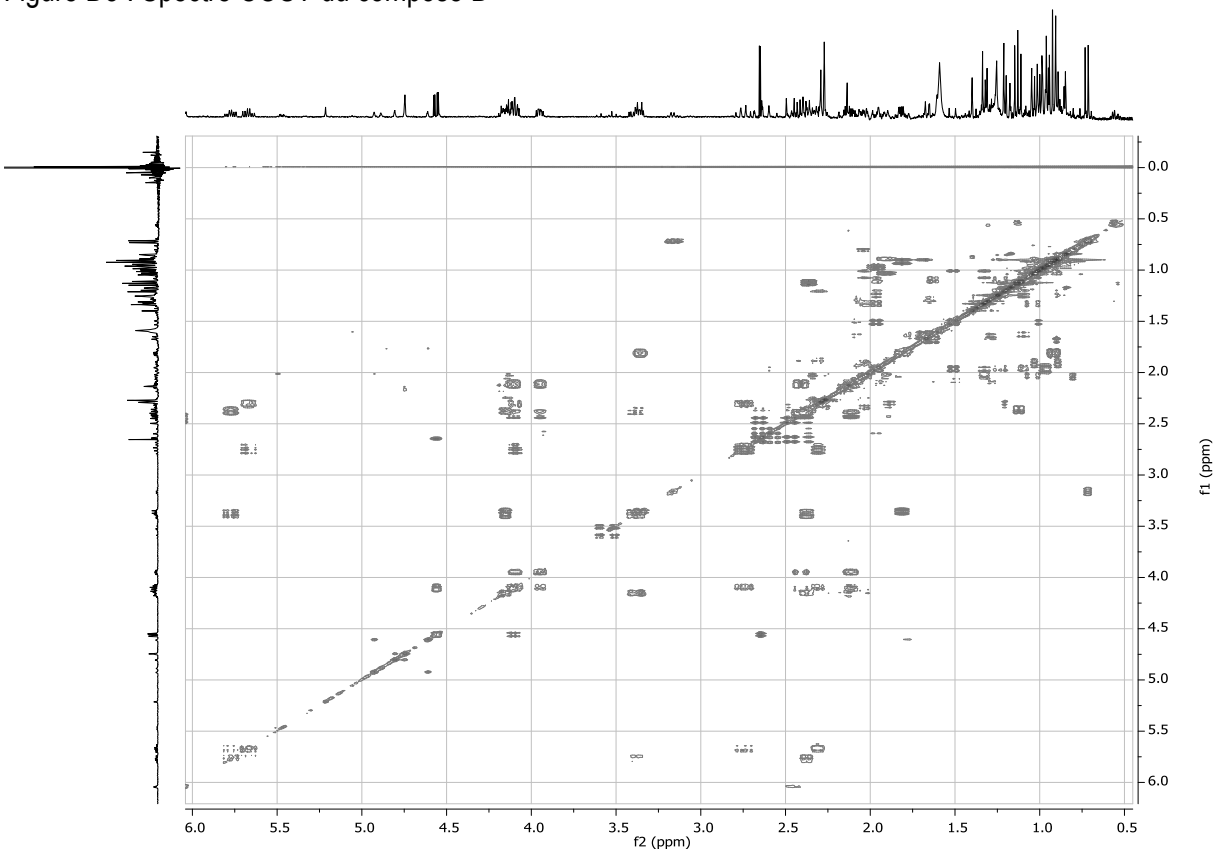
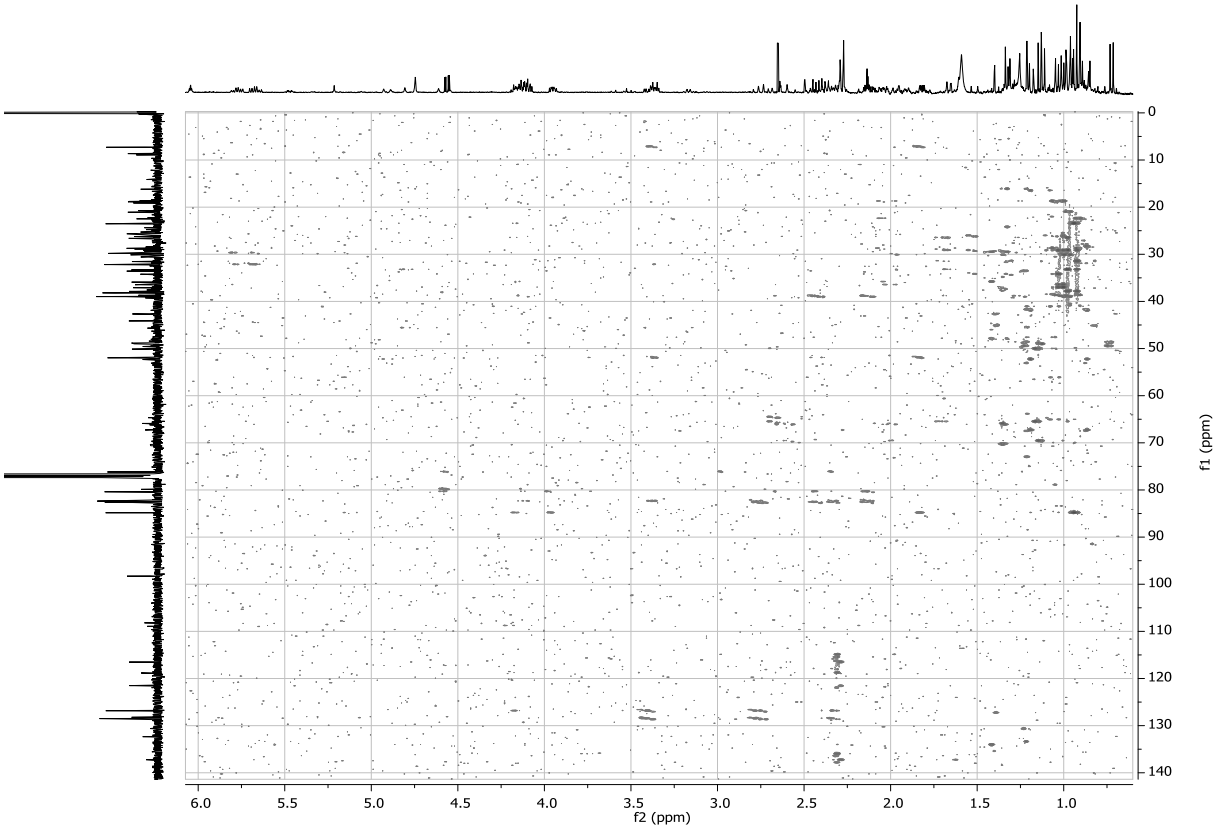


Figure D6 : Spectre HMBC du composé D



Annexe E : Spectres de RMN 1D et 2D du composé E

Figure E1 : Spectre ^{1}H du compose E
Figure E2 : Spectre ^{13}C du composé E
Figure E3 : Spectre HSQC du composé E
Figure E4 : Spectre COSY du composé E

Figure E1 : Spectre ^{1}H du compose E

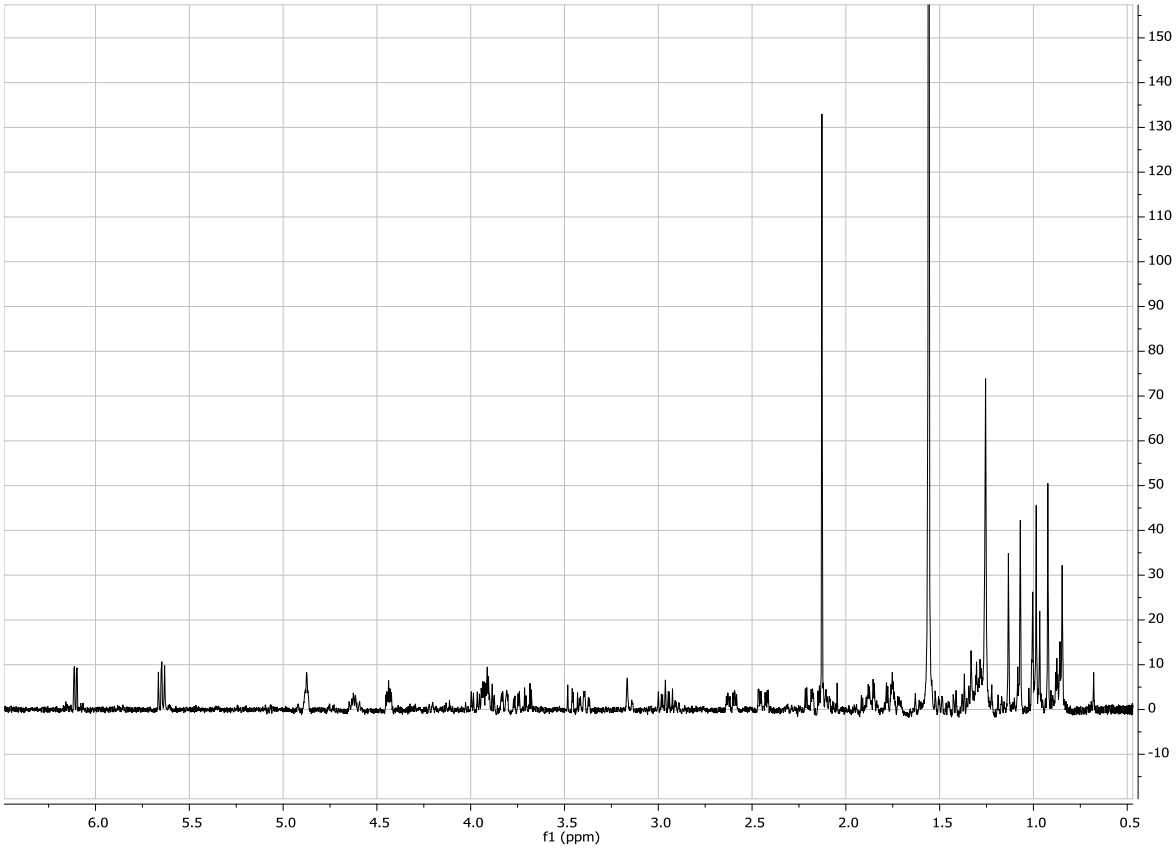


Figure E2 : Spectre ^{13}C du composé E

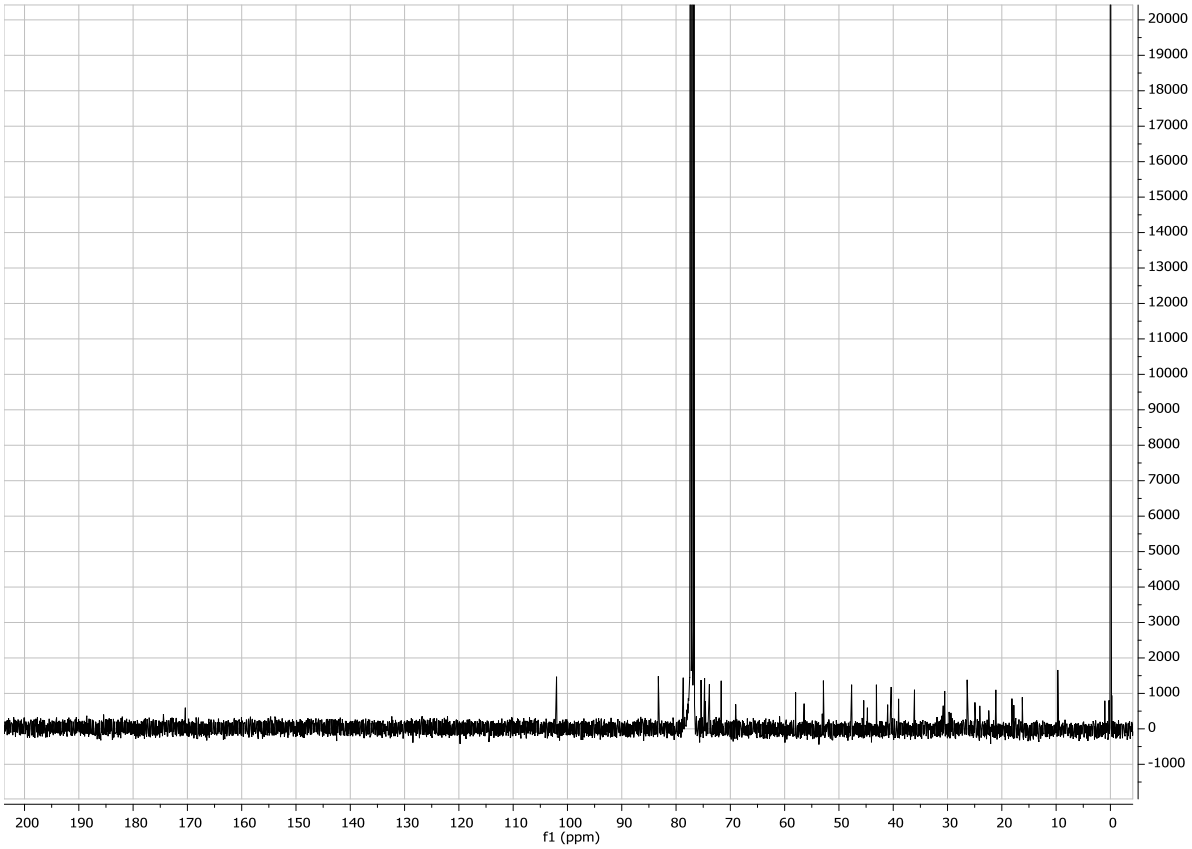


Figure E3 : Spectre HSQC du composé E

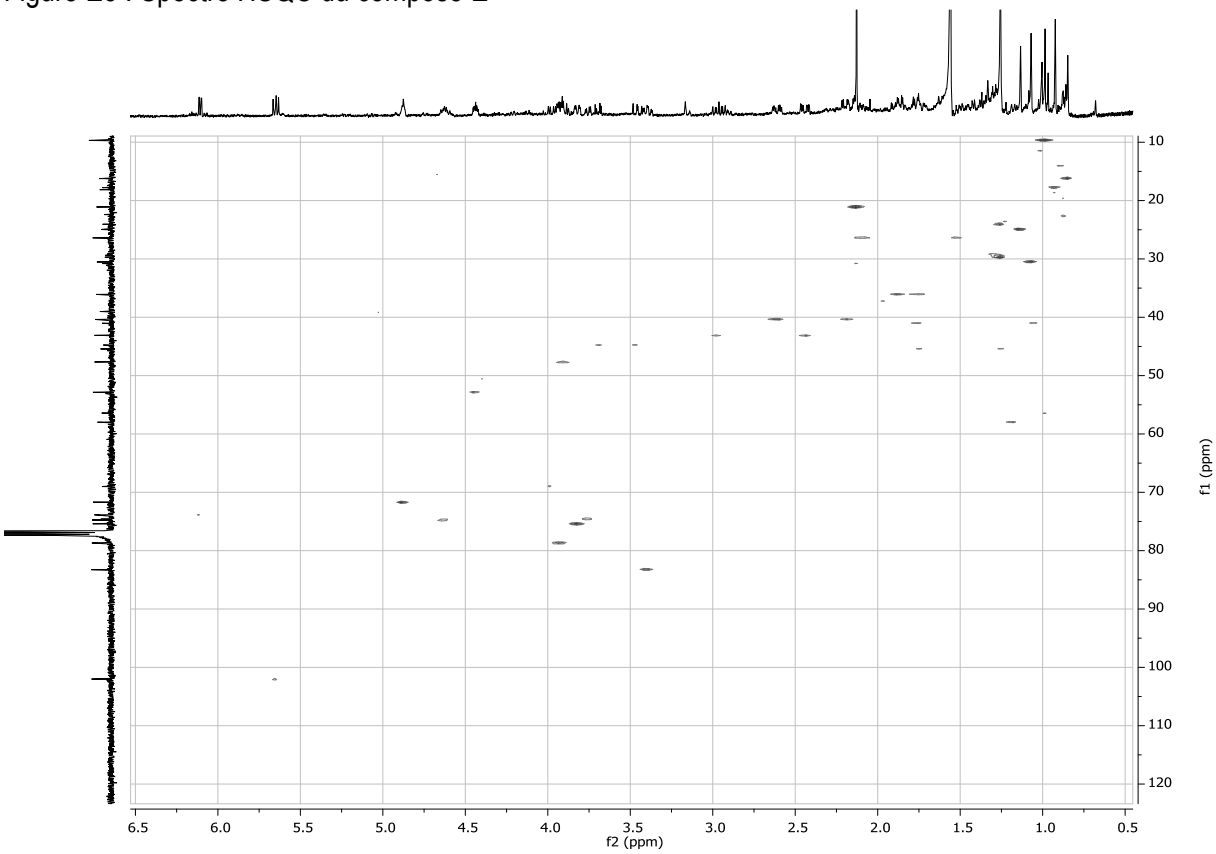
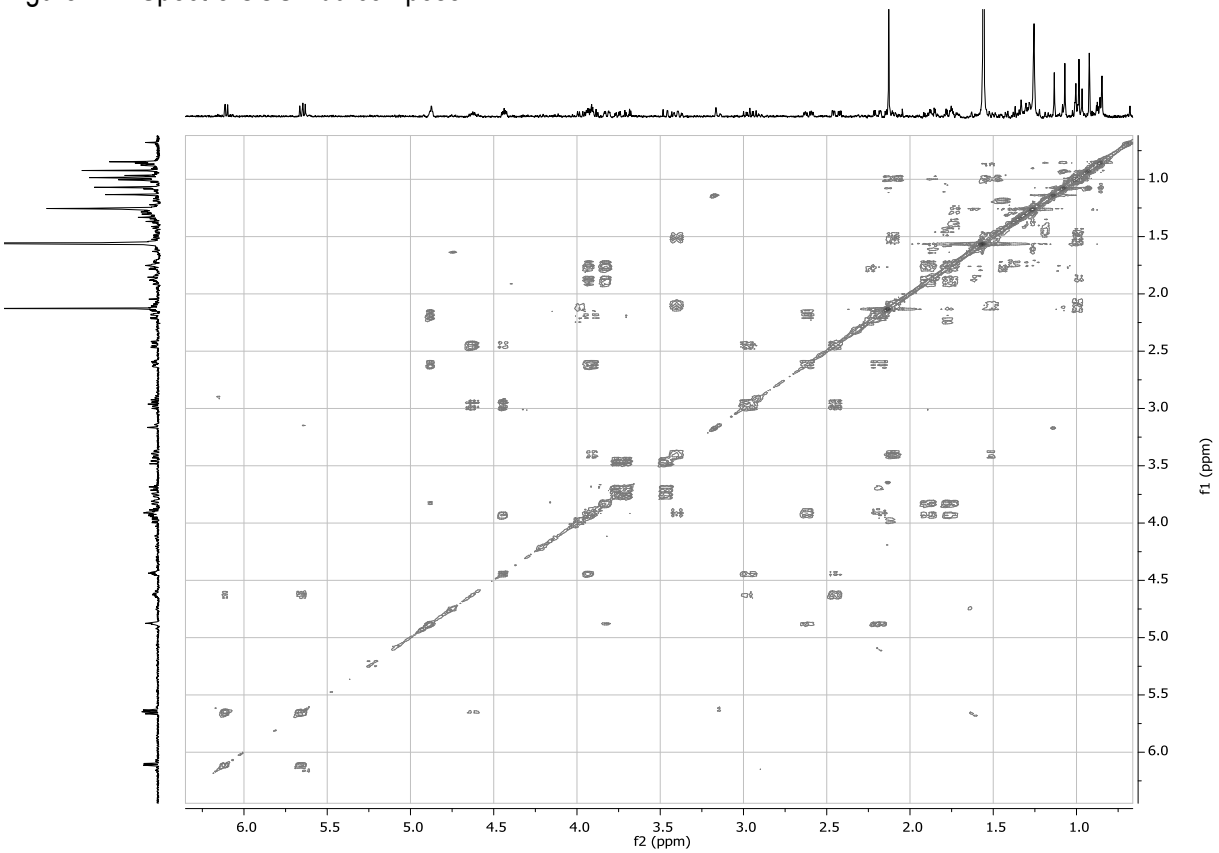


Figure E4 : Spectre COSY du composé E



Annexe F: Annexes de l'article 1 « Snyderol derivatives from *Laurencia obtusa* collected in Corsica »

Figure F1 : ^{13}C NMR spectrum of compound **1** ($CDCl_3$).
Figure F2 : ^{1}H NMR spectrum of compound **1** ($CDCl_3$).
Figure F3 : COSY spectrum of compound **1** ($CDCl_3$).
Figure F4 : HSQC spectrum of compound **1** ($CDCl_3$).
Figure F5 : HMBC spectrum of compound **1** ($CDCl_3$).
Figure F6 : HRMS spectrum of compound **1** (Zoom) in negative ionization.

Figure F1 : ^{13}C NMR spectrum of compound **1** ($CDCl_3$).

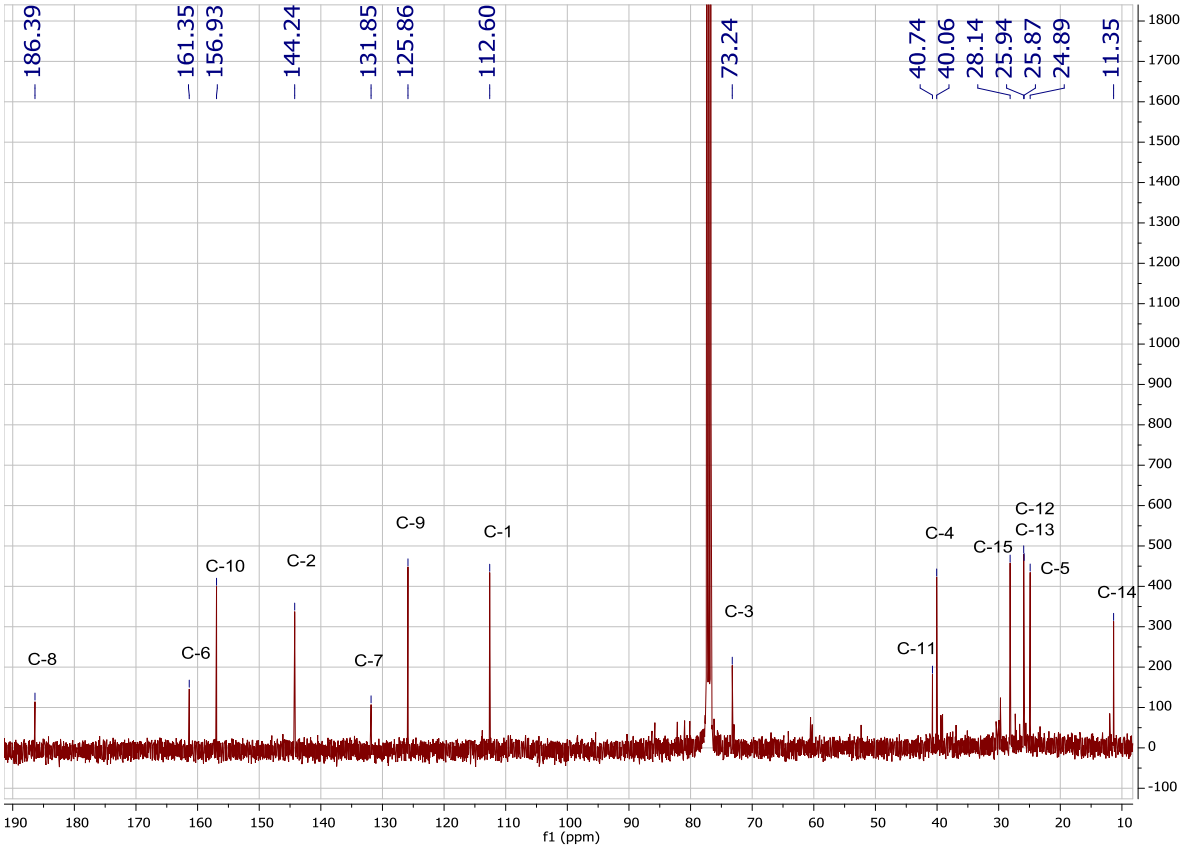


Figure F2 : ^{1}H NMR spectrum of compound **1** ($CDCl_3$).

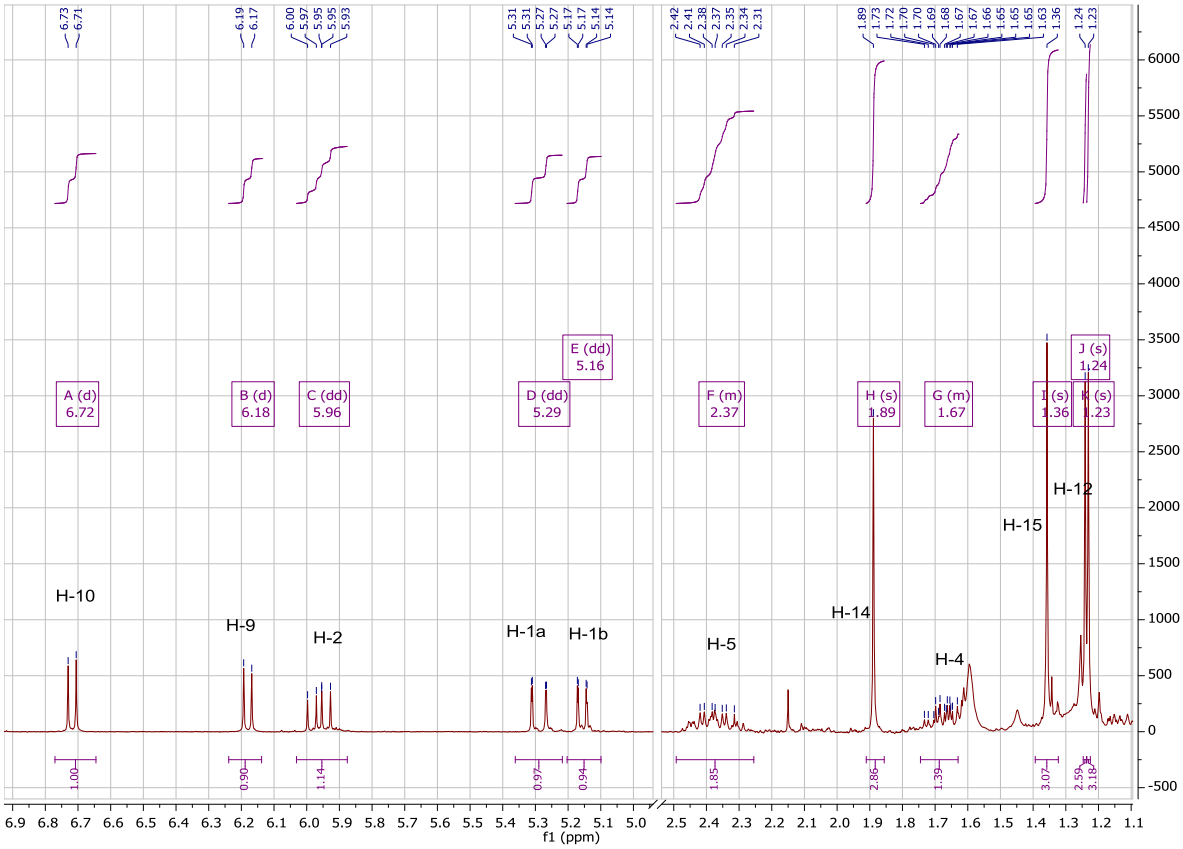


Figure F3 : COSY spectrum of compound **1** ($CDCl_3$).

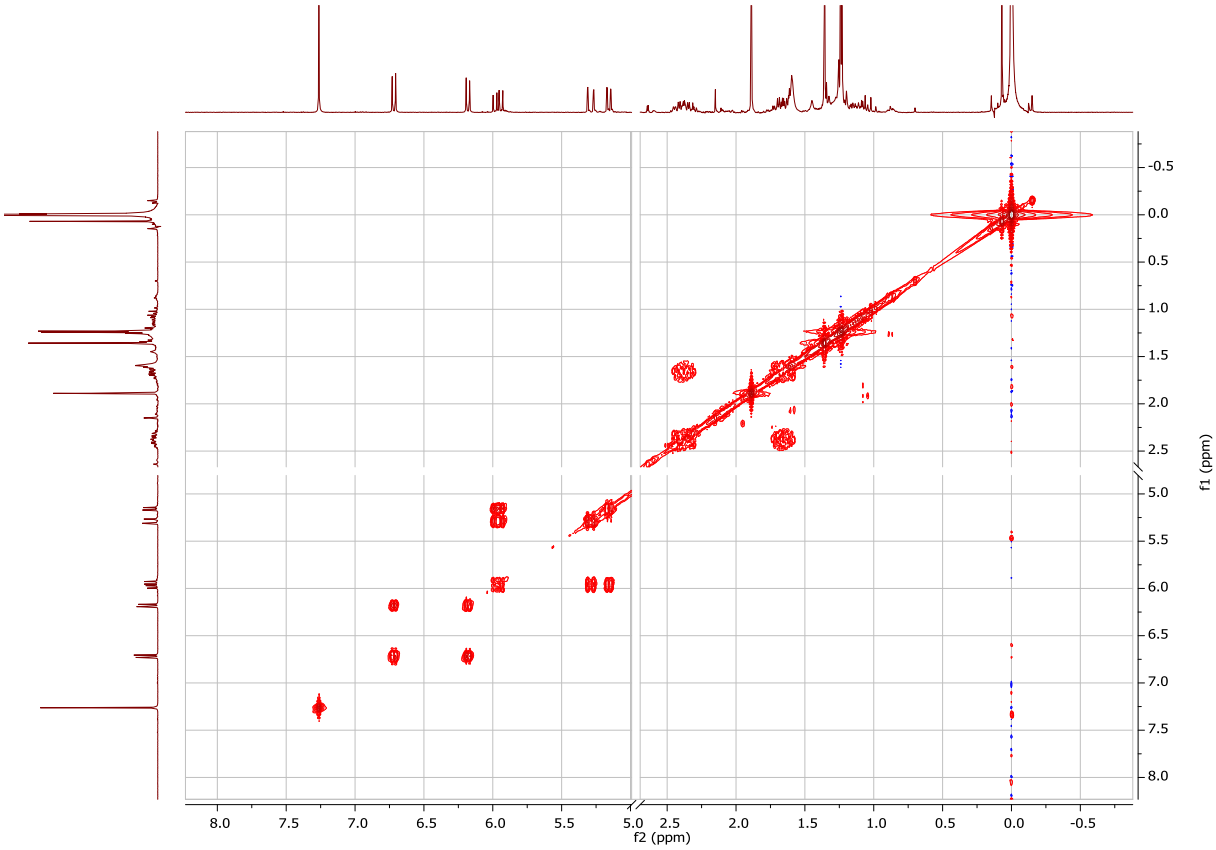


Figure F4 : HSQC spectrum of compound **1** ($CDCl_3$).

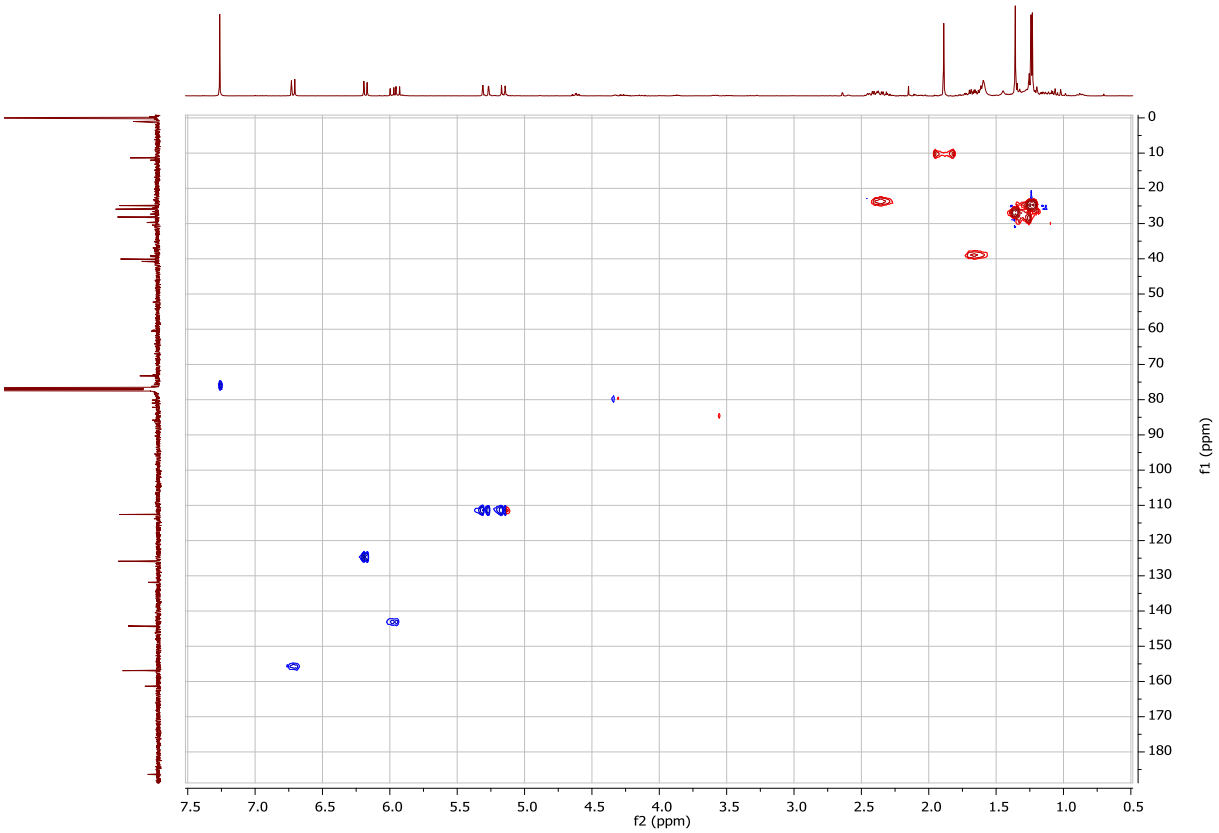


Figure F5 : HMBC spectrum of compound **1** ($CDCl_3$).

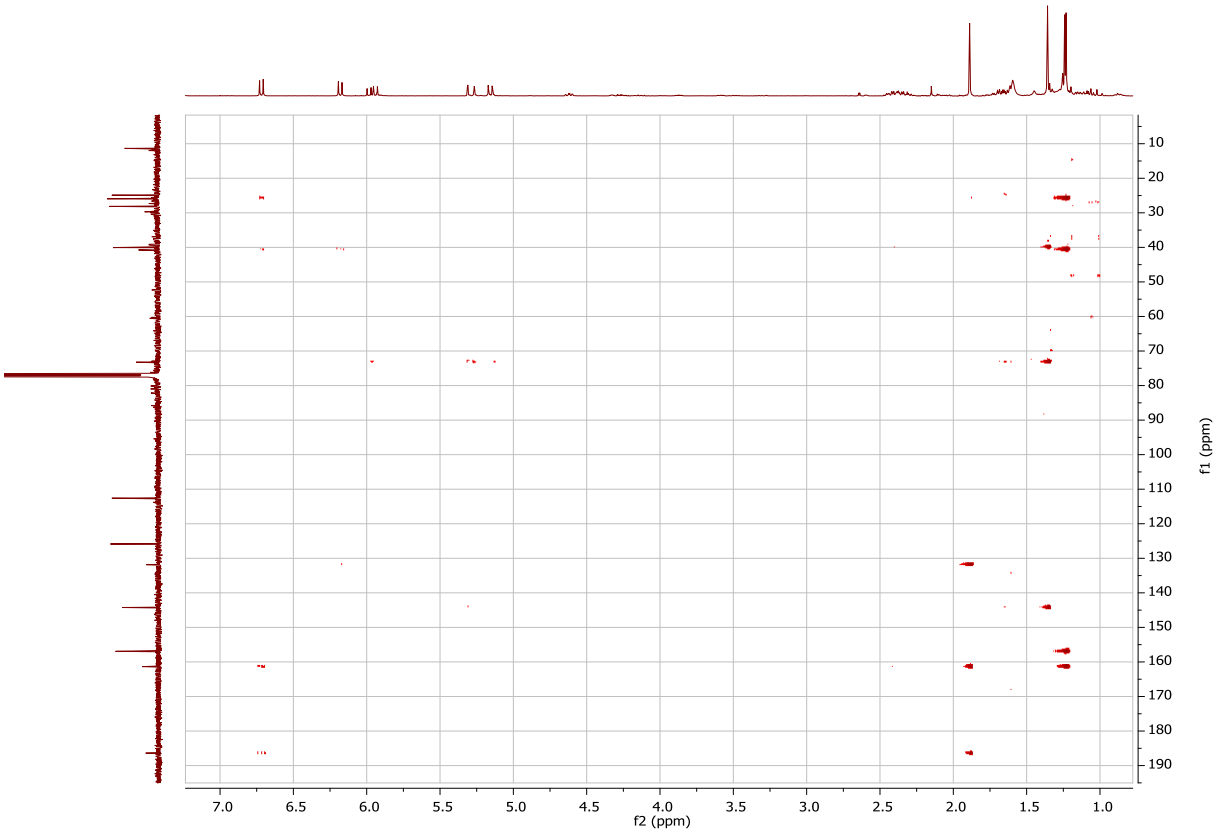
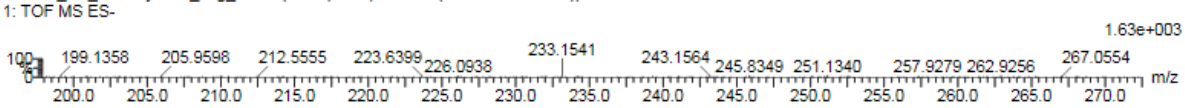


Figure F6 : HRMS spectrum of compound **1** (Zoom) in negative ionization.

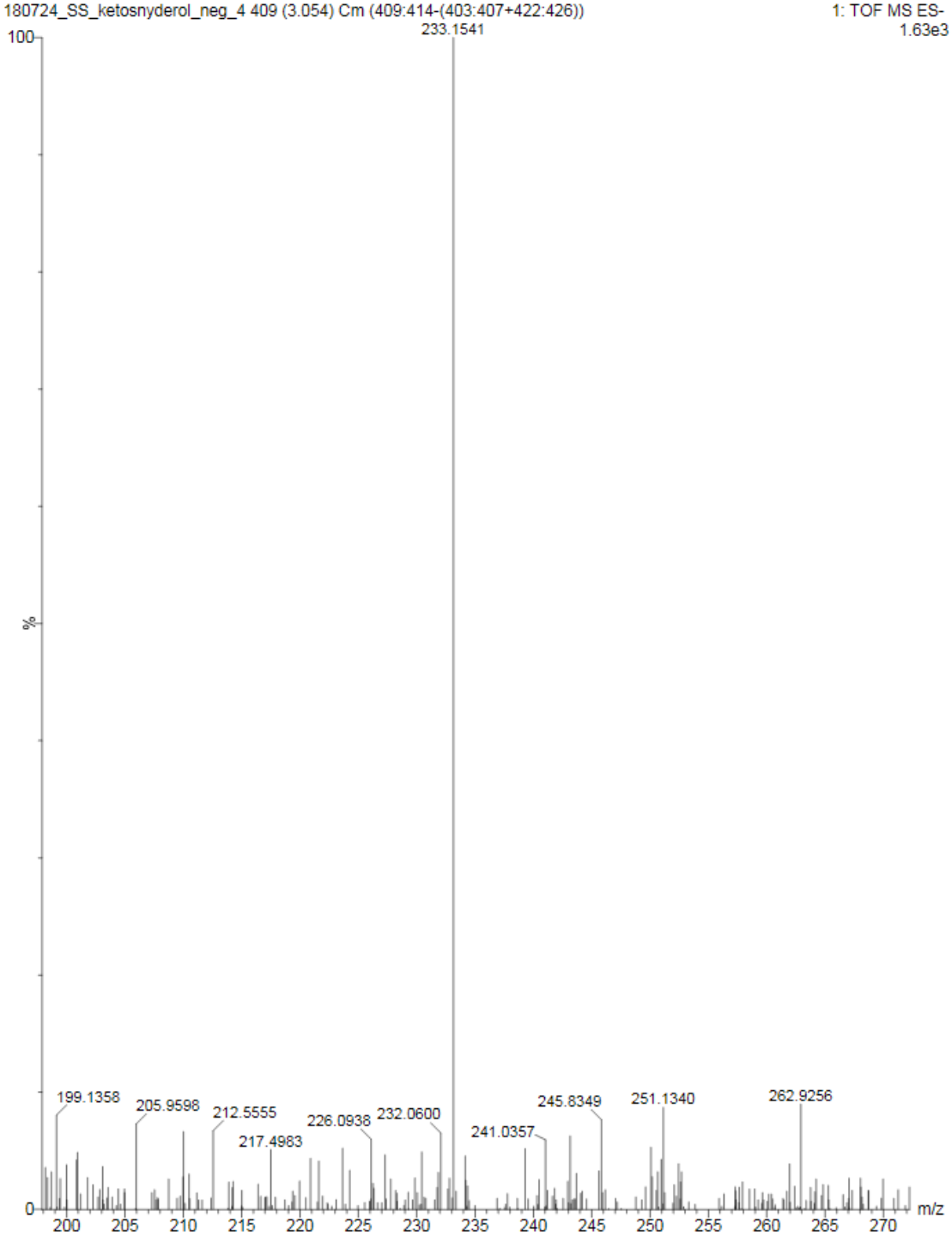
Elemental Composition Report **Page 1**

Single Mass Analysis
Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
Element prediction: Off
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
373 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)
Elements Used:
C: 0-95 H: 0-182 N: 0-6 O: 0-40 Na: 0-1
180724_SS_ketosnyderol_neg_4 409 (3.054) Cm (409:414-(403:407+422:426))
1: TOF MS ES-



Minimum:				-1.5				
Maximum:		1.0	5.0	50.0				
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
233.1541	233.1542	-0.1	-0.4	5.5	52.0	n/a	n/a	C15 H21 O2


180724_SS_ketosnyderol_neg_4 409 (3.054) Cm (409:414-(403:407+422:426))
1: TOF MS ES-
1.63e3
233.1541
100
%
0
199.1358
205.9598
212.5555
217.4983
226.0938
232.0600
241.0357
245.8349
251.1340
262.9256
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
m/z

Annexe G : Spectres de RMN 1D et 2D du composé F

Figure G1 : Spectre ^{1}H du compose F
Figure G2 : Spectre ^{13}C du composé F
Figure G3 : DEPT 135 du composé F
Figure G4 : Spectre HSQC du composé F
Figure G5 : Spectre COSY du composé E
Figure G6 : Spectre HMBC du composé F
Figure G7 : Spectre NOESY du composé F

Figure G1 : Spectre ^{1}H du compose F

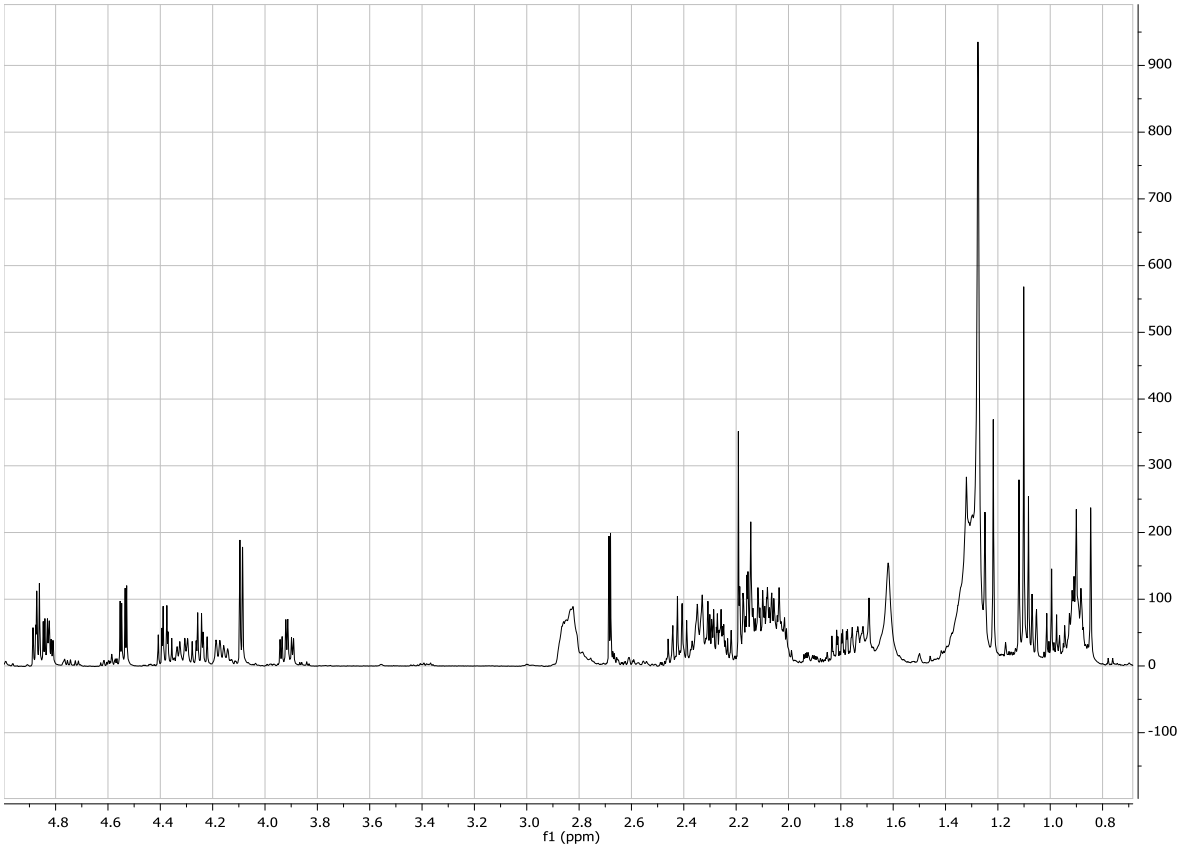


Figure G2 : Spectre ^{13}C du composé F

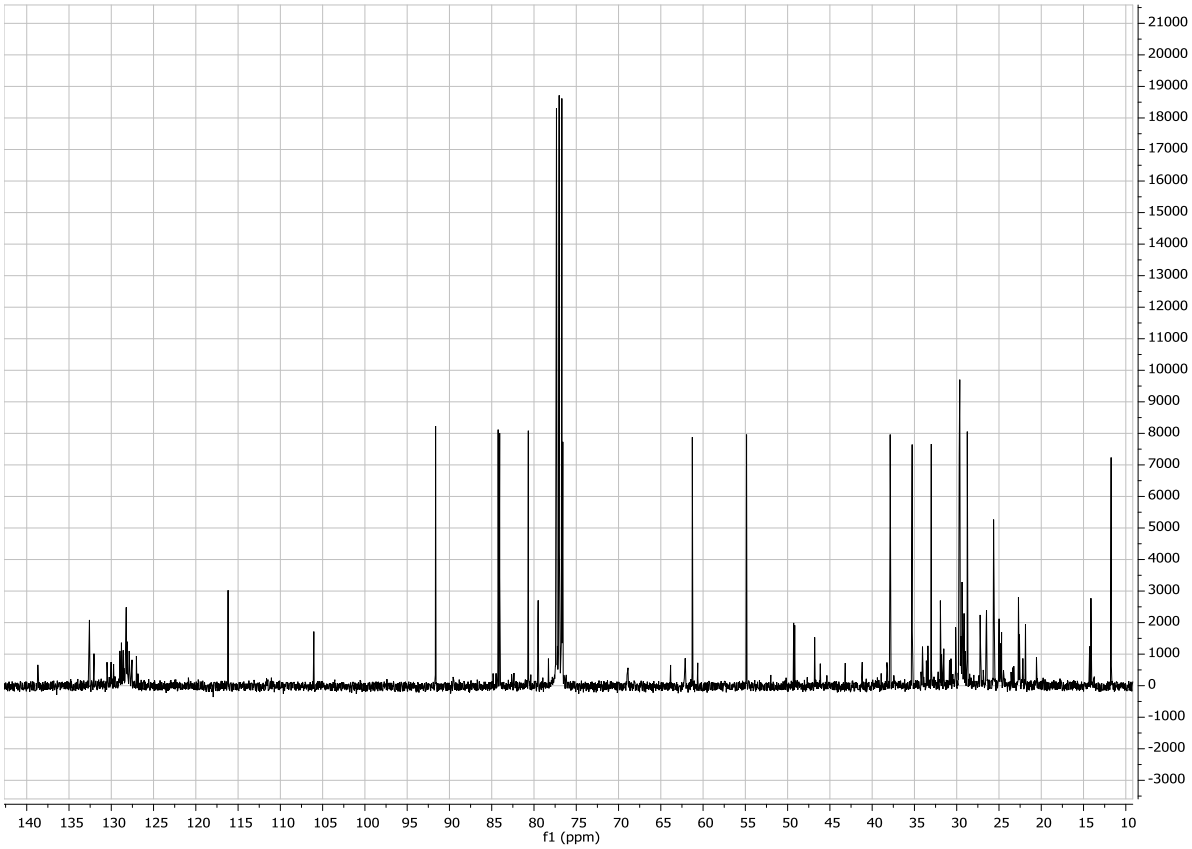


Figure G3 : DEPT 135 du composé F

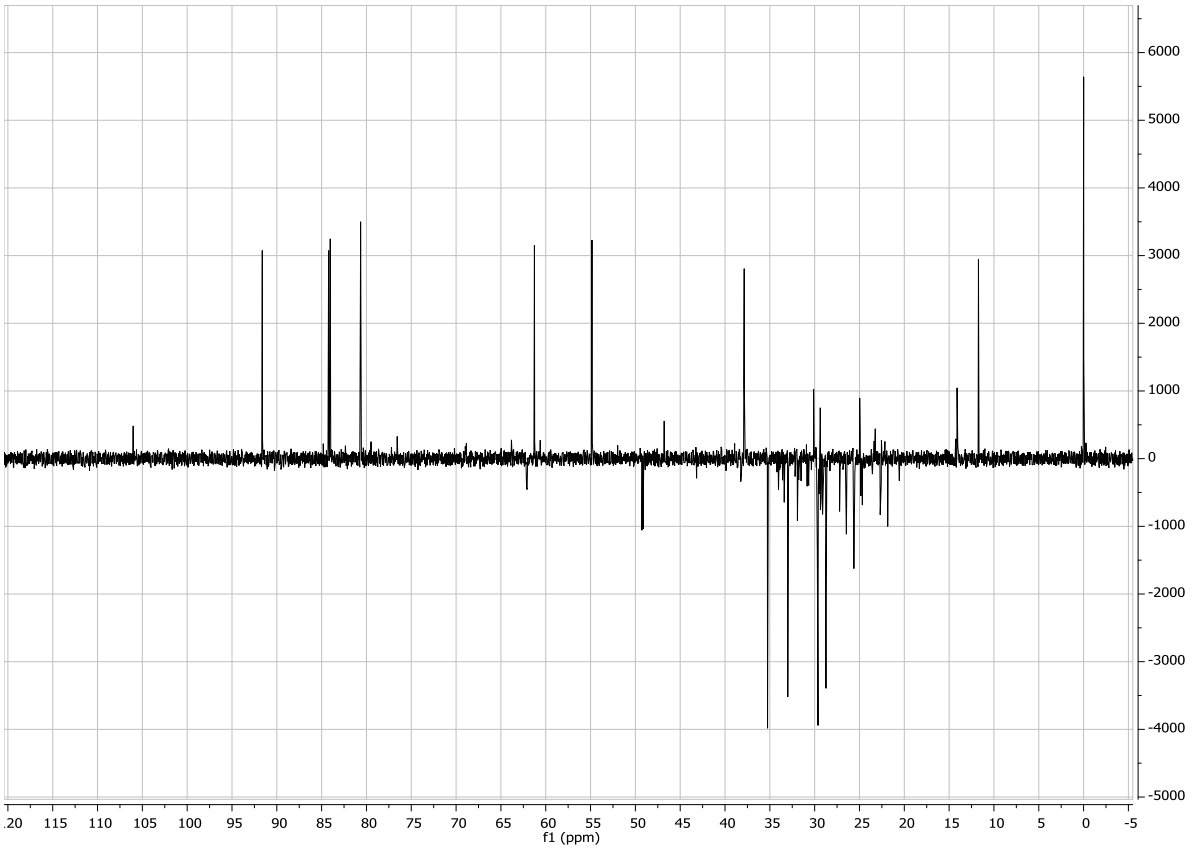


Figure G4 : Spectre HSQC du composé F

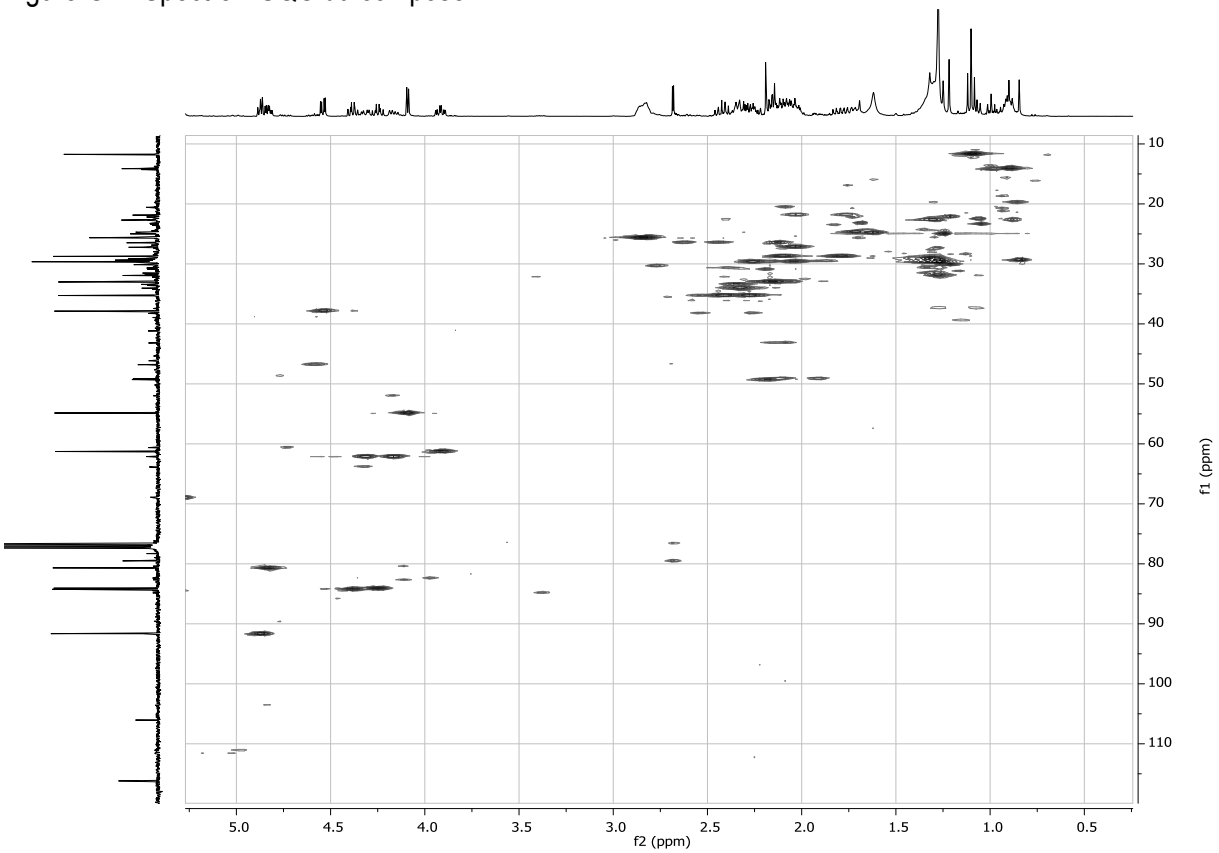


Figure G5 : Spectre COSY du composé F

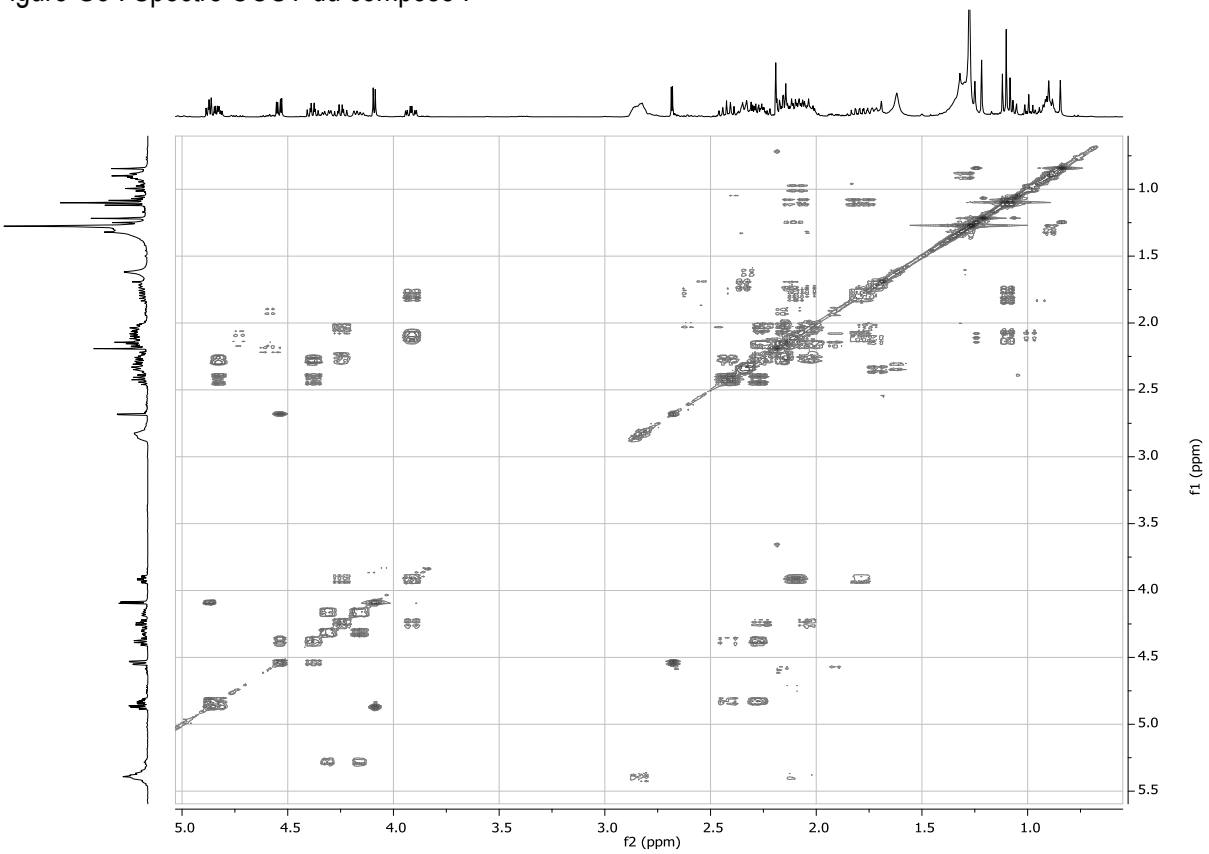


Figure G6 : Spectre HMBC du composé F

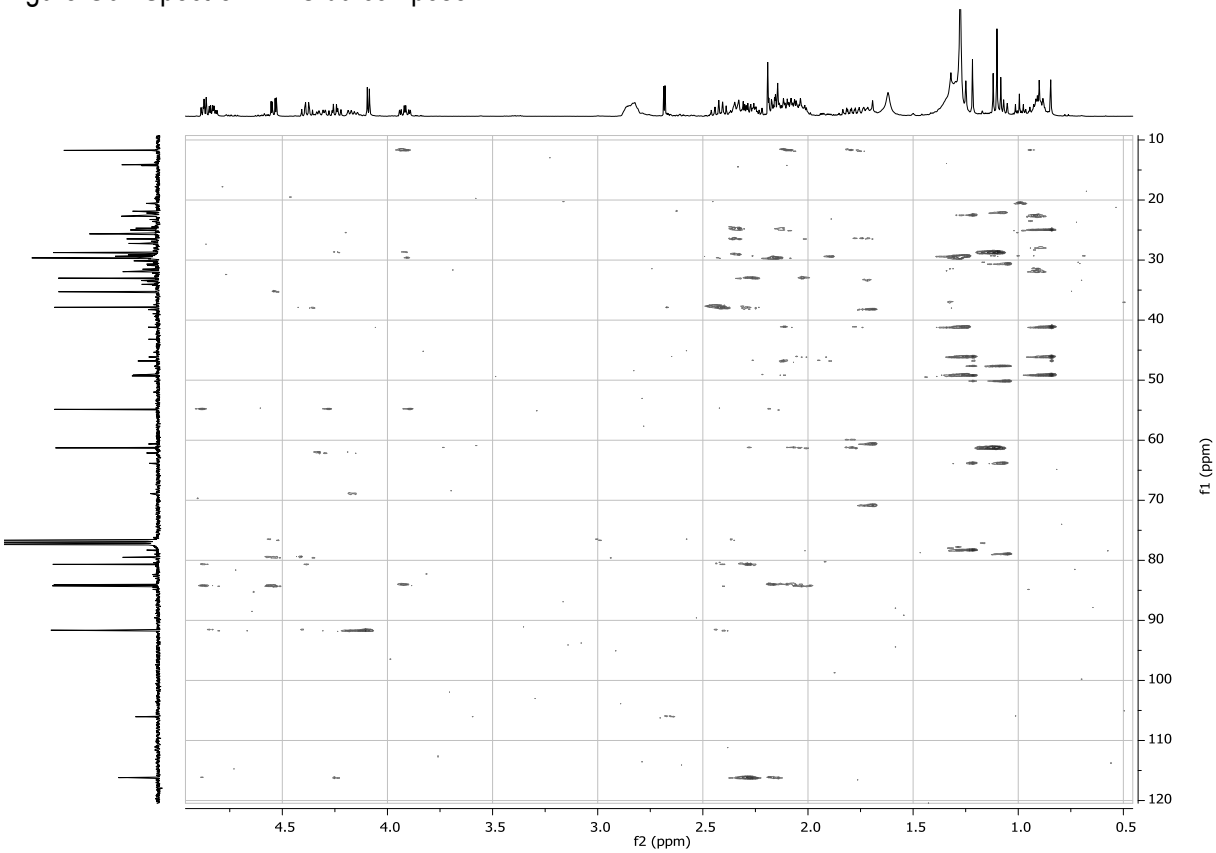
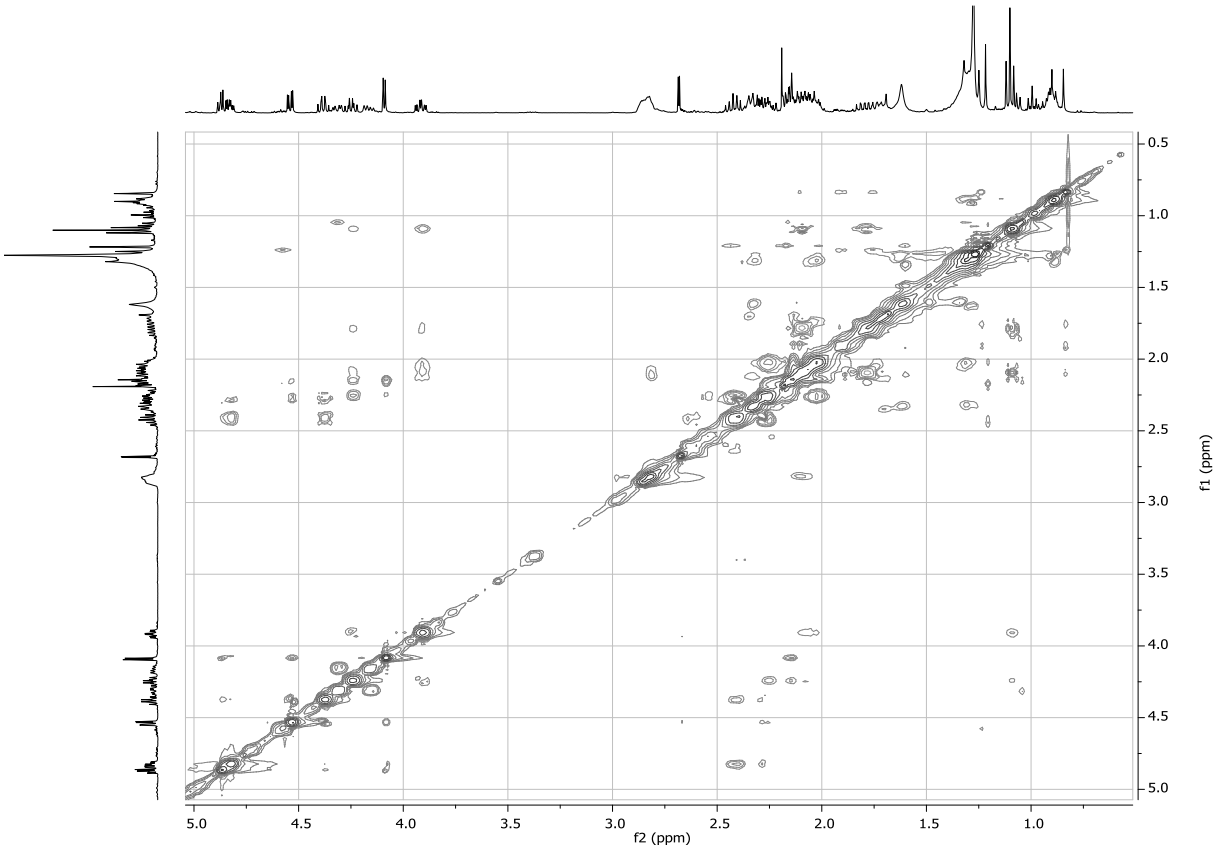


Figure G7 : Spectre NOESY du composé F



Annexe H : Annexes de l'article 2 «Chemical Composition of *Laurencia obtusa* Extract and Isolation of a New C_{15}-Acetogenin»

Figure H1: ^{1}H-^{1}H COSY spectrum of sagonenyne (compound **20**)
Figure H1': HMQC spectrum of sagonenyne (compound **20**)
Figure H1'': HMBC spectrum of sagonenyne (compound **20**)
Figure H2: ESI Mass spectrum of sagonenyne (compound **20**)
Figure H3: Structures of compounds identified in the crude extract

Figure H1: ^{1}H-^{1}H COSY spectrum of sagonenyne (compound **20**)

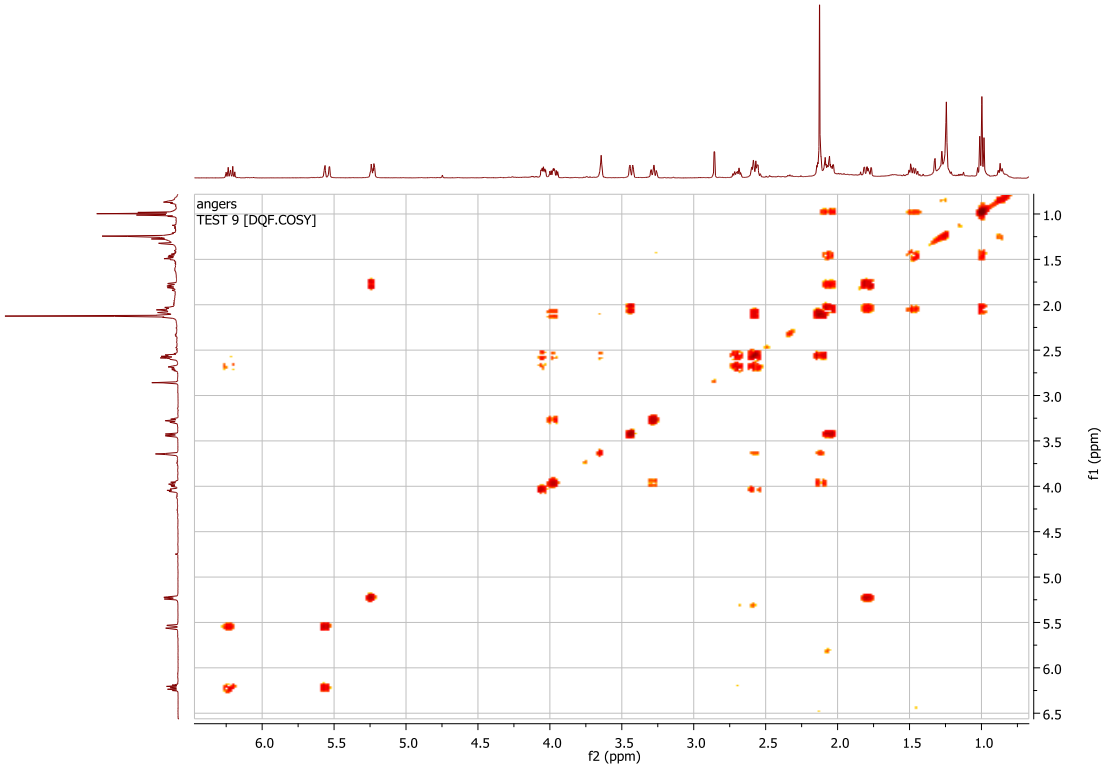


Figure H1': HMQC spectrum of sagonenyne (compound **20**)

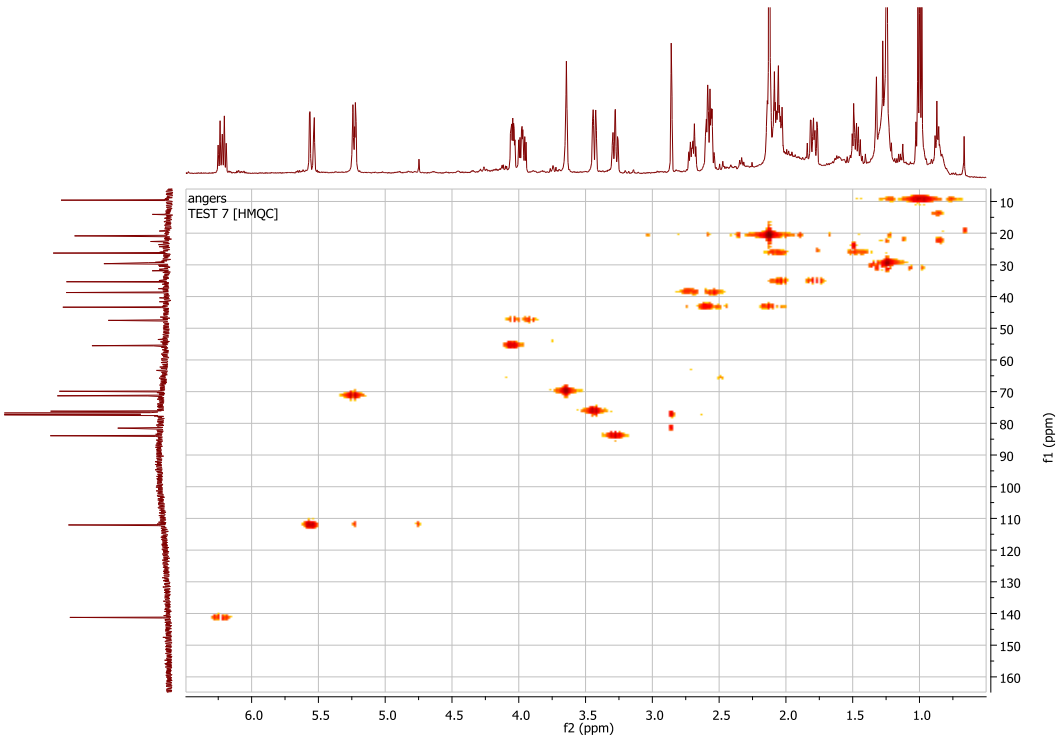


Figure H1'': HMBC spectrum of sagonenyne (compound **20**)

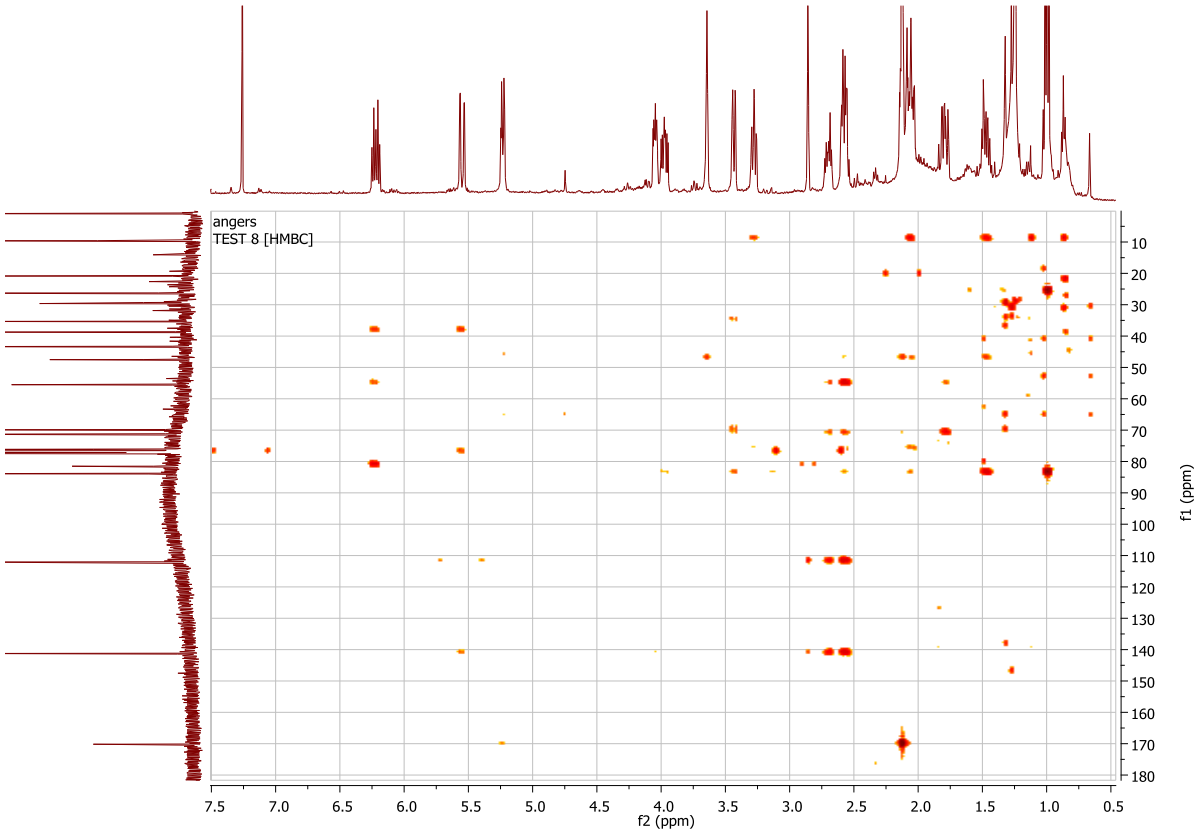


Figure H2: ESI Mass spectrum of sagonenyne (compound **20**)

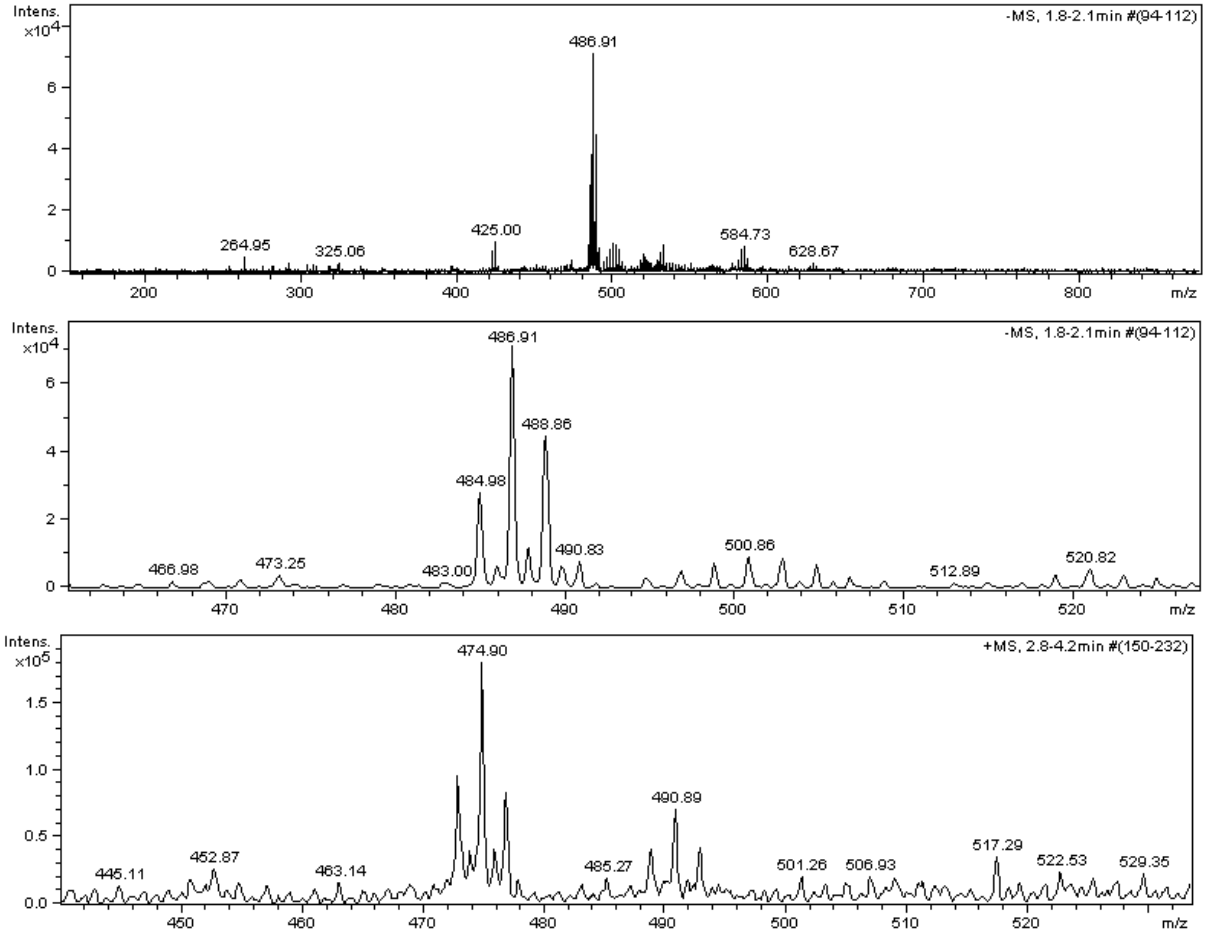
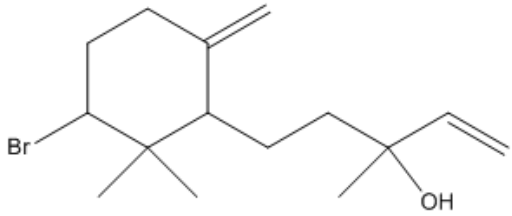
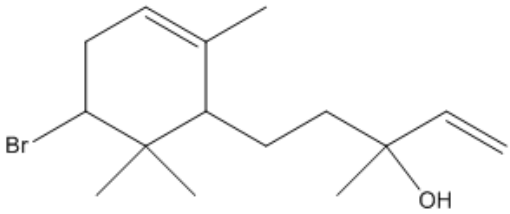


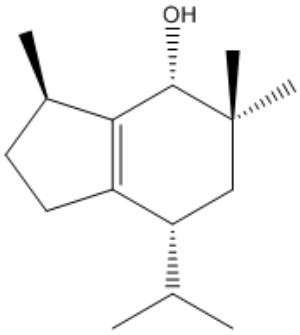
Figure H3: Structures of compounds identified in the crude extract



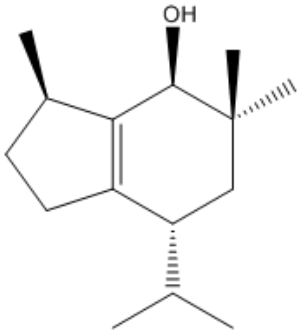
β-snyderol (**1**)



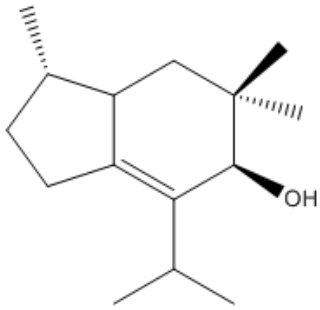
α-snyderol (**2**)



epibrasilenol (**3**)



brasilenol (**4**)



4-hydroxy-5-brasilene (**5**)

Annexe I : Annexes de l'article 3 « New Metabolites Isolated from a *Laurencia obtusa* Population Collected in Corsica »

Figure I1: ^{1}H NMR spectrum of **1** in $CDCl_3$ (400 MHz).
Figure I2: ^{13}C NMR spectrum of **1** in $CDCl_3$ (100 MHz).
Figure I3: HSQC spectrum of **1** in $CDCl_3$.
Figure I4: HMBC spectrum of **1** in $CDCl_3$.
Figure I5: ^{1}H-^{1}H COSY spectrum of **1** in $CDCl_3$.
Figure I6: NOESY spectrum of **1** in $CDCl_3$.
Figure I7: HRMS spectrum of **1** (Zoom) in negative ionization.
Figure I8: ^{1}H NMR spectrum of **2** in $CDCl_3$ (400 MHz).
Figure I9: ^{13}C NMR spectrum of **2** in $CDCl_3$ (100 MHz).
Figure I10: HSQC spectrum of **2** in $CDCl_3$.
Figure I11: HMBC spectrum of **2** in $CDCl_3$.
Figure I12: ^{1}H-^{1}H COSY spectrum of **2** in $CDCl_3$.
Figure I13: HRMS spectrum of **2** (Zoom) in negative ionization.
Figure I14: ^{1}H NMR spectrum of **3** in acetone-d_6 (400 MHz).
Figure I15: ^{13}C NMR spectrum of **3** in acetone-d_6 (100 MHz).
Figure I16: HSQC spectrum of **3** in acetone-d_6.
Figure I17: HMBC spectrum of **3** in acetone-d_6.
Figure I18: ^{1}H-^{1}H COSY spectrum of **3** in acetone-d_6.
Figure I19: NOESY spectrum of **3** in acetone-d_6.
Figure I20: HRMS spectrum of **3** (Zoom) in negative ionization.
Figure I21: ^{1}H NMR spectrum of **4** in acetone-d_6 (400 MHz).
Figure I22: ^{13}C NMR spectrum of **4** in acetone-d_6 (100 MHz).
Figure I23: HSQC spectrum of **4** in acetone-d_6.
Figure I24: HMBC spectrum of **4** in acetone-d_6.
Figure I25: ^{1}H-^{1}H COSY spectrum of **4** in acetone-d_6.
Figure I26: NOESY spectrum of **4** in acetone-d_6.
Figure I27: HRMS spectrum of **4** (Zoom) in positive ionization.
Figure I28: HRMS spectrum of **4** (Zoom) in positive ionization.
Figure I29: Structures of known compounds identified in *L. obtusa* extract

Figure I1: ^{1}H NMR spectrum of **1** in $CDCl_3$ (400 MHz).

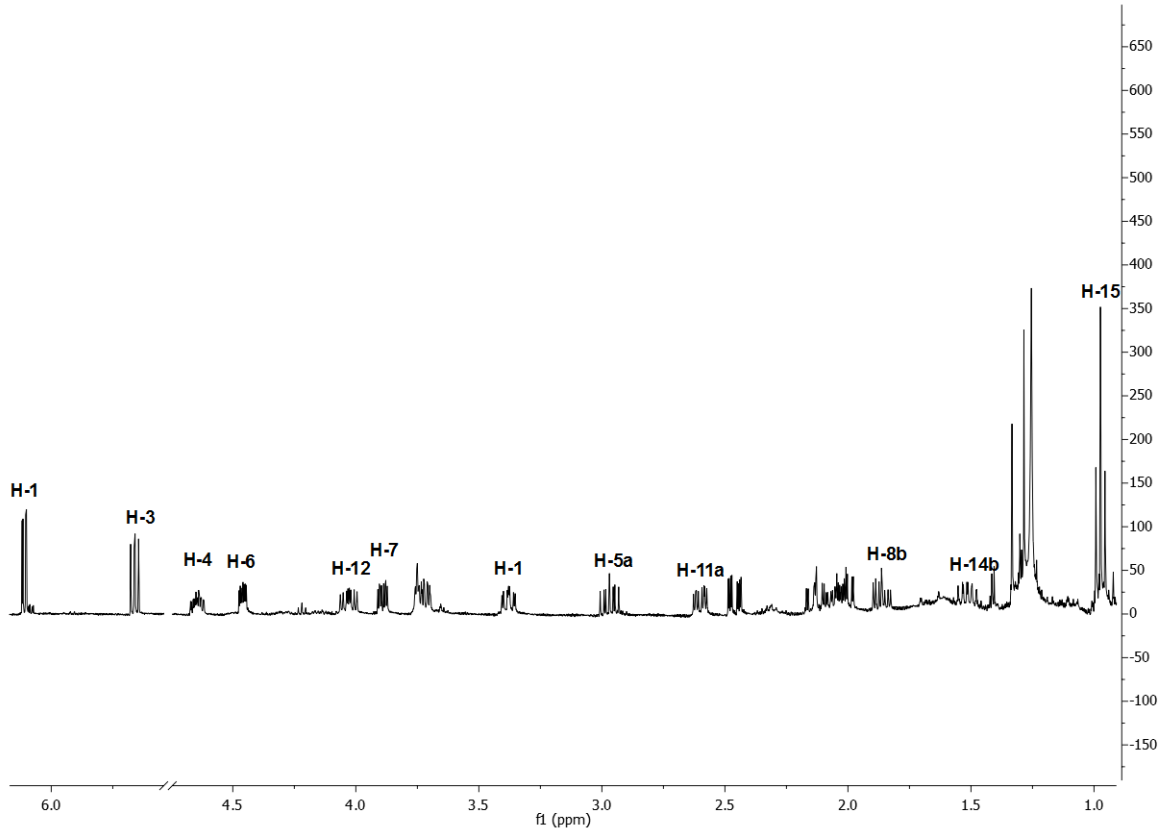


Figure I2: ^{13}C NMR spectrum of **1** in $CDCl_3$ (100 MHz).

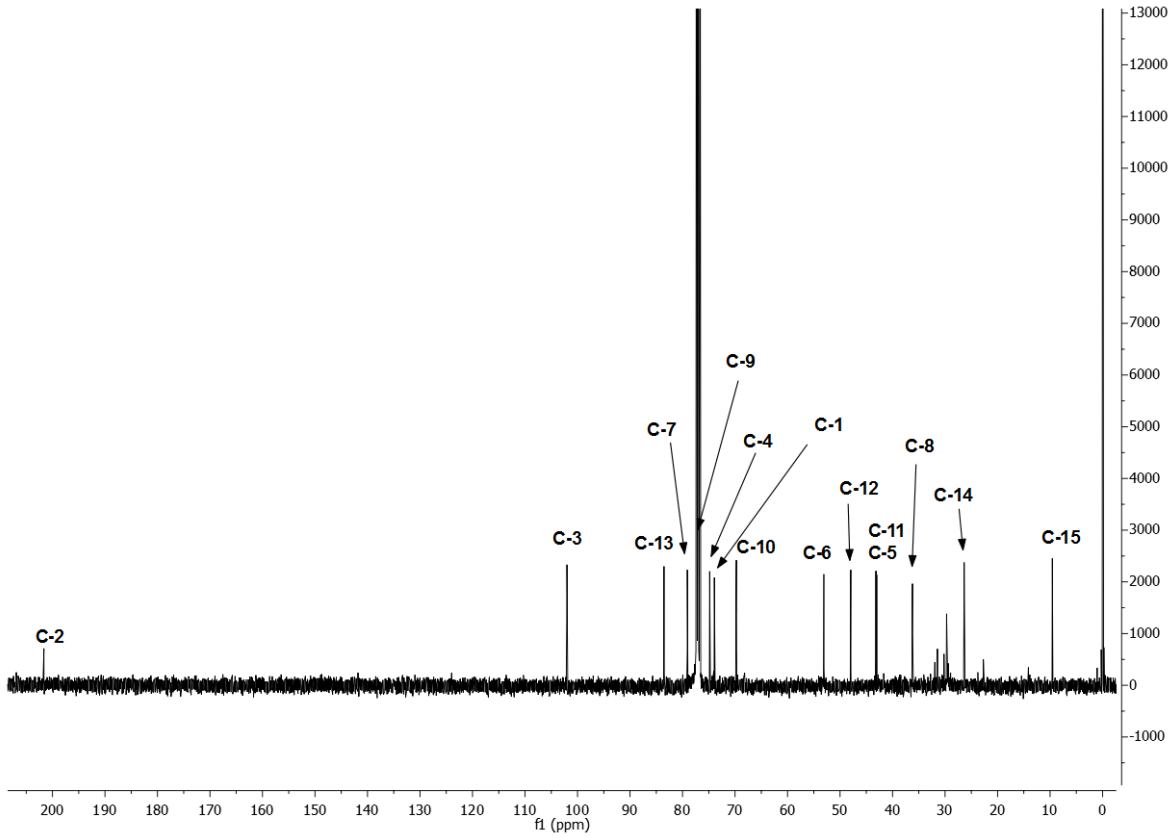


Figure I3: HSQC spectrum of **1** in $CDCl_3$.

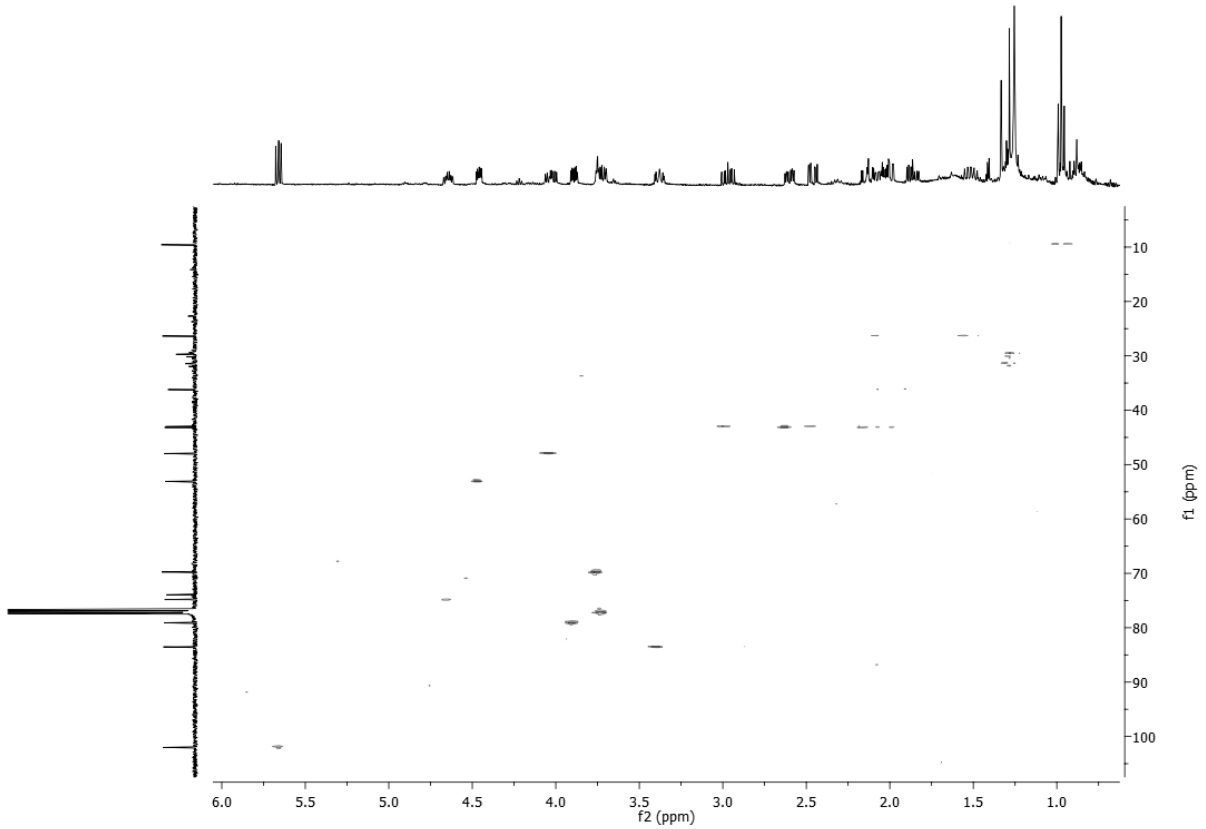


Figure I4: HMBC spectrum of **1** in $CDCl_3$.

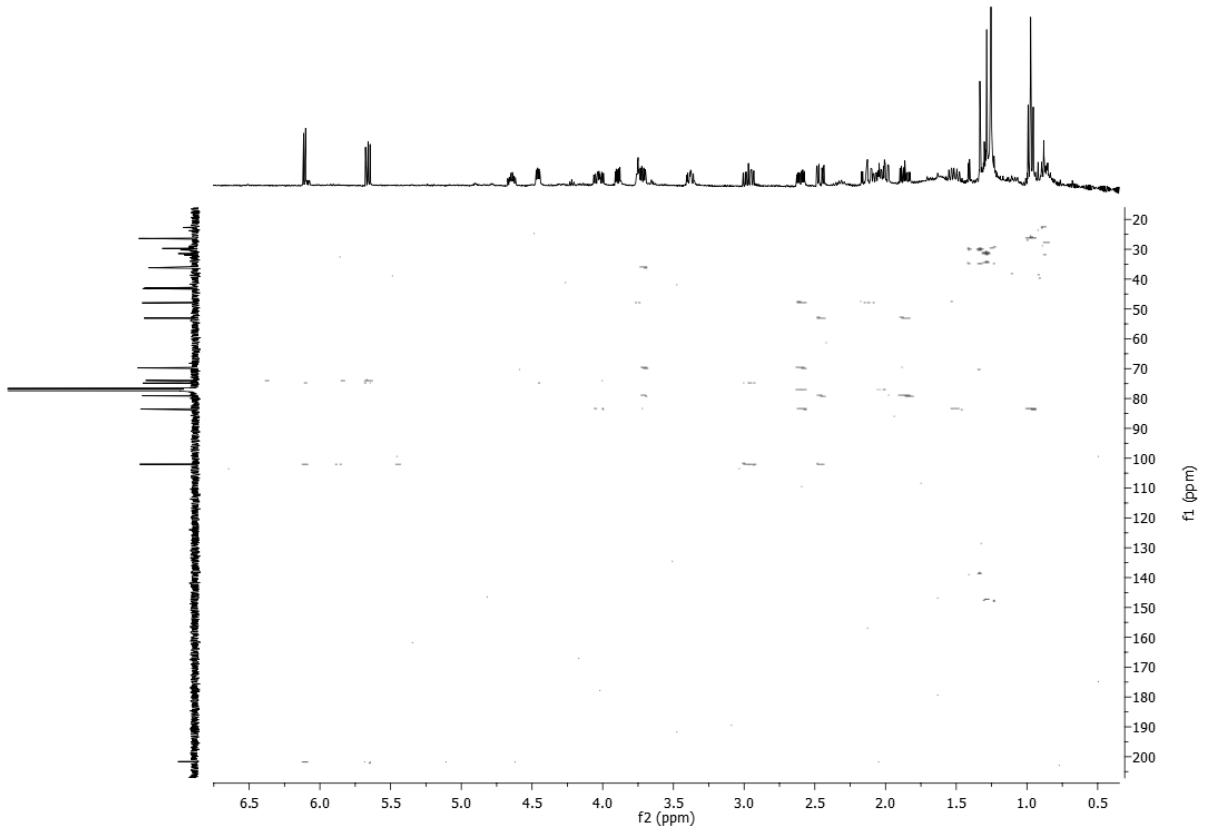


Figure I5: ^{1}H-^{1}H COSY spectrum of **1** in $CDCl_3$.

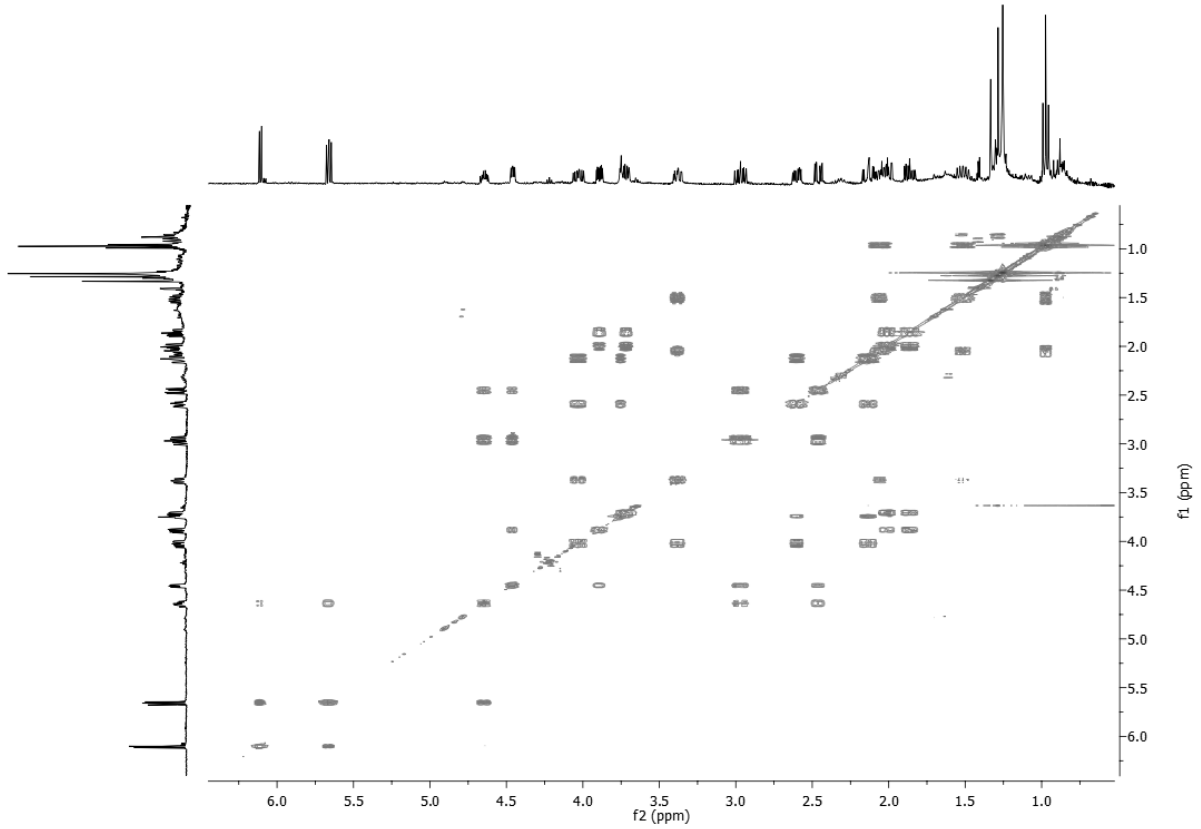


Figure I6: NOESY spectrum of **1** in $CDCl_3$.

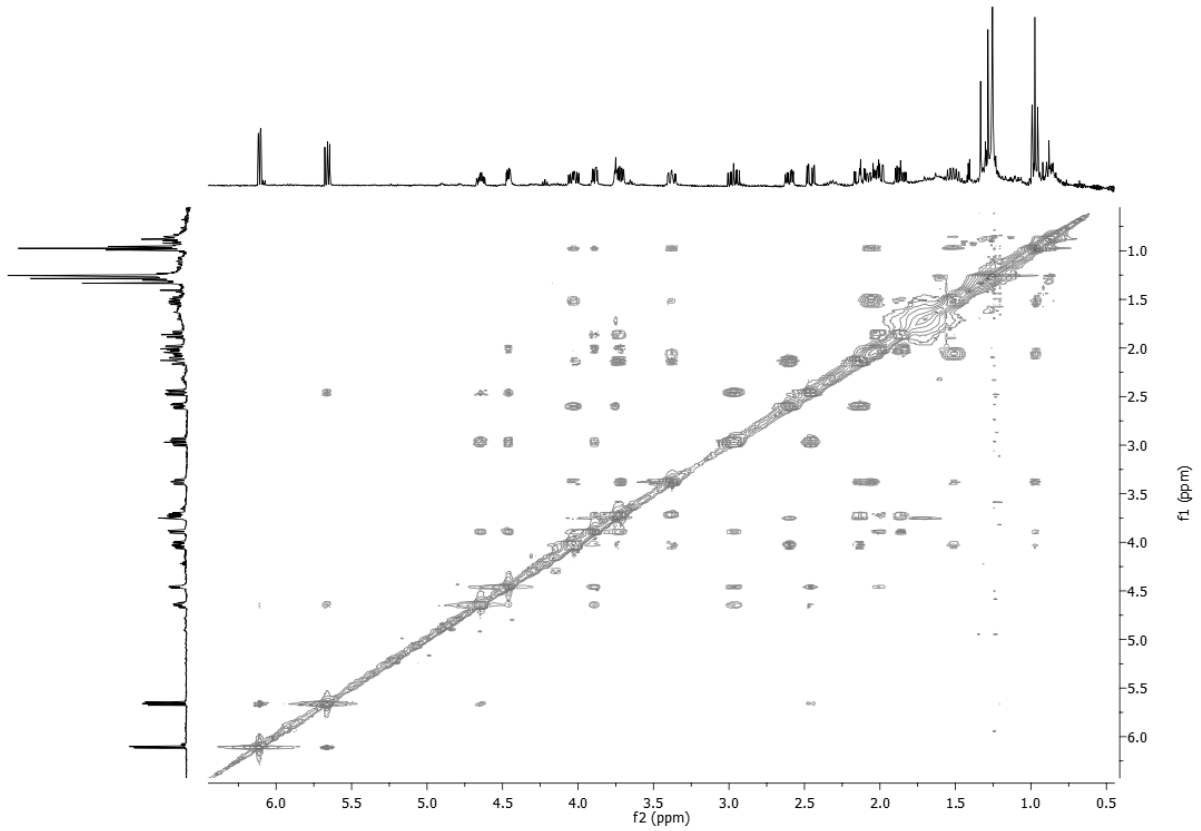


Figure I7: HRMS spectrum of **1** (Zoom) in negative ionization.

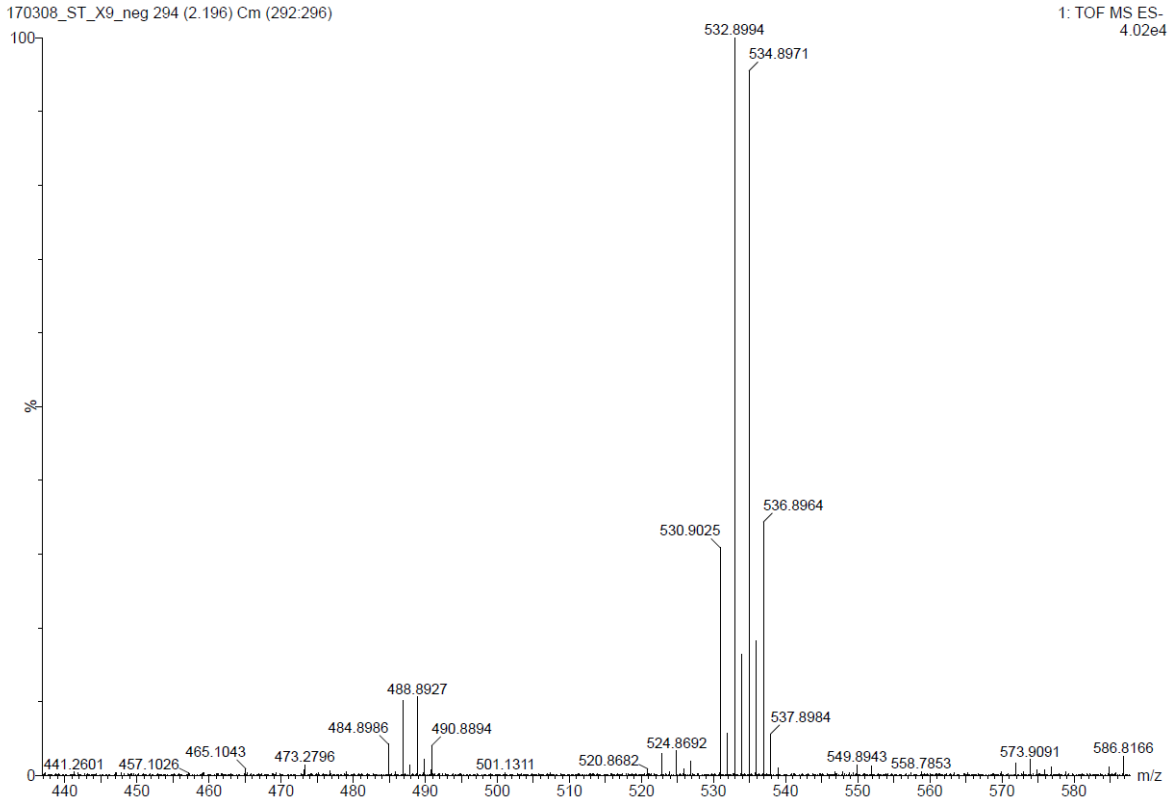


Figure I8: ^{1}H NMR spectrum of **2** in $CDCl_3$ (400 MHz).

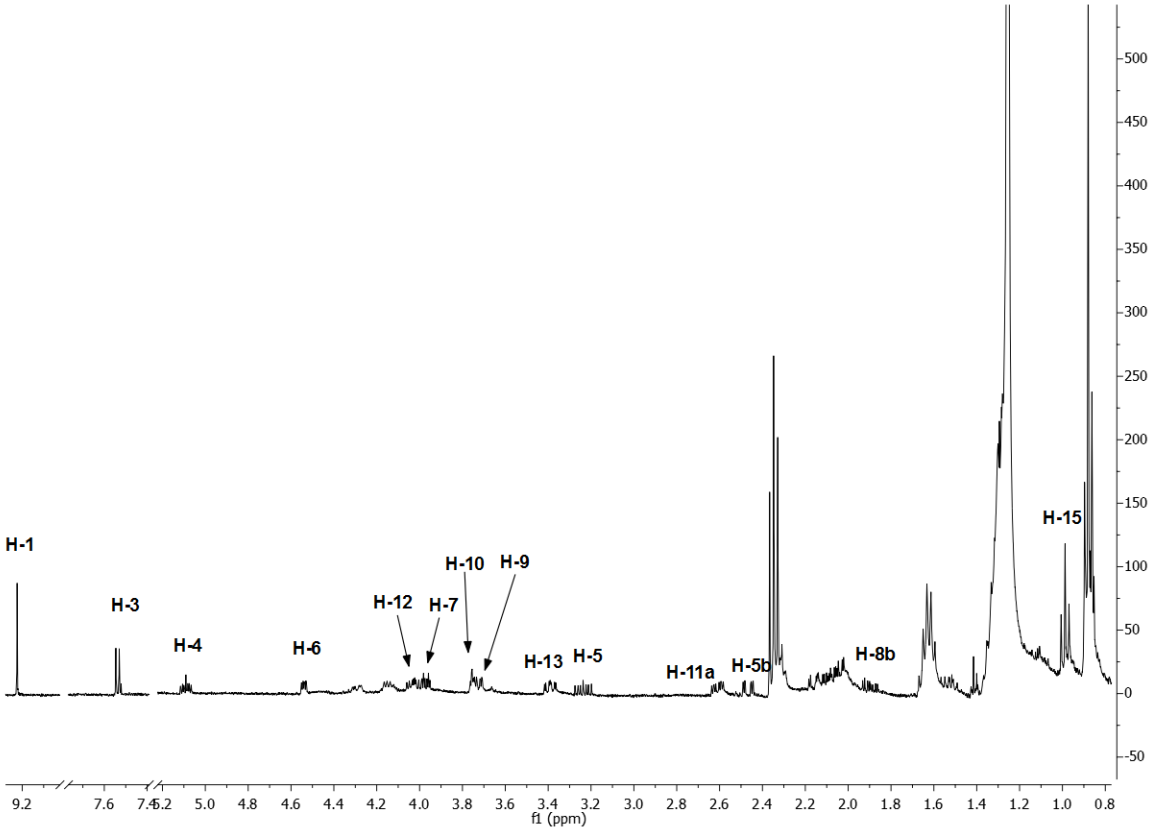


Figure I9: ^{13}C NMR spectrum of **2** in $CDCl_3$ (100 MHz).

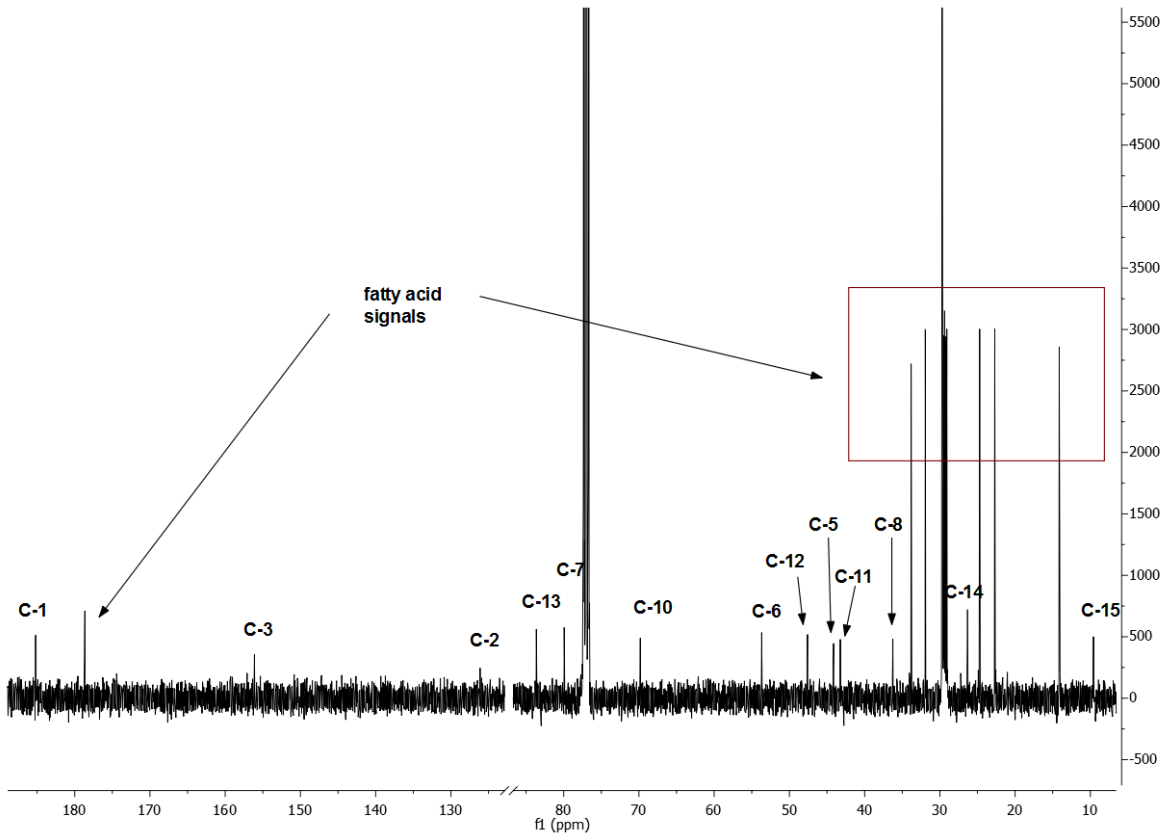


Figure I10: HSQC spectrum of **2** in $CDCl_3$.

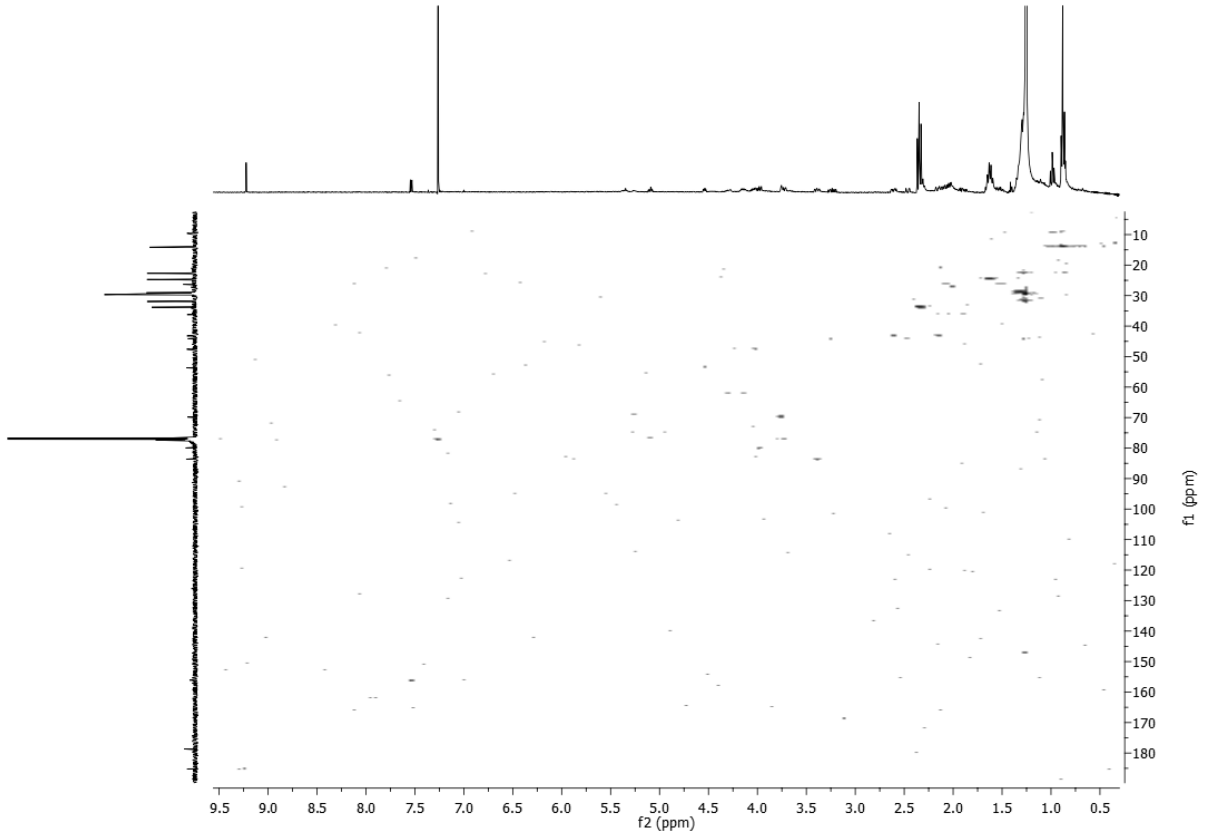


Figure I11: HMBC spectrum of **2** in $CDCl_3$.

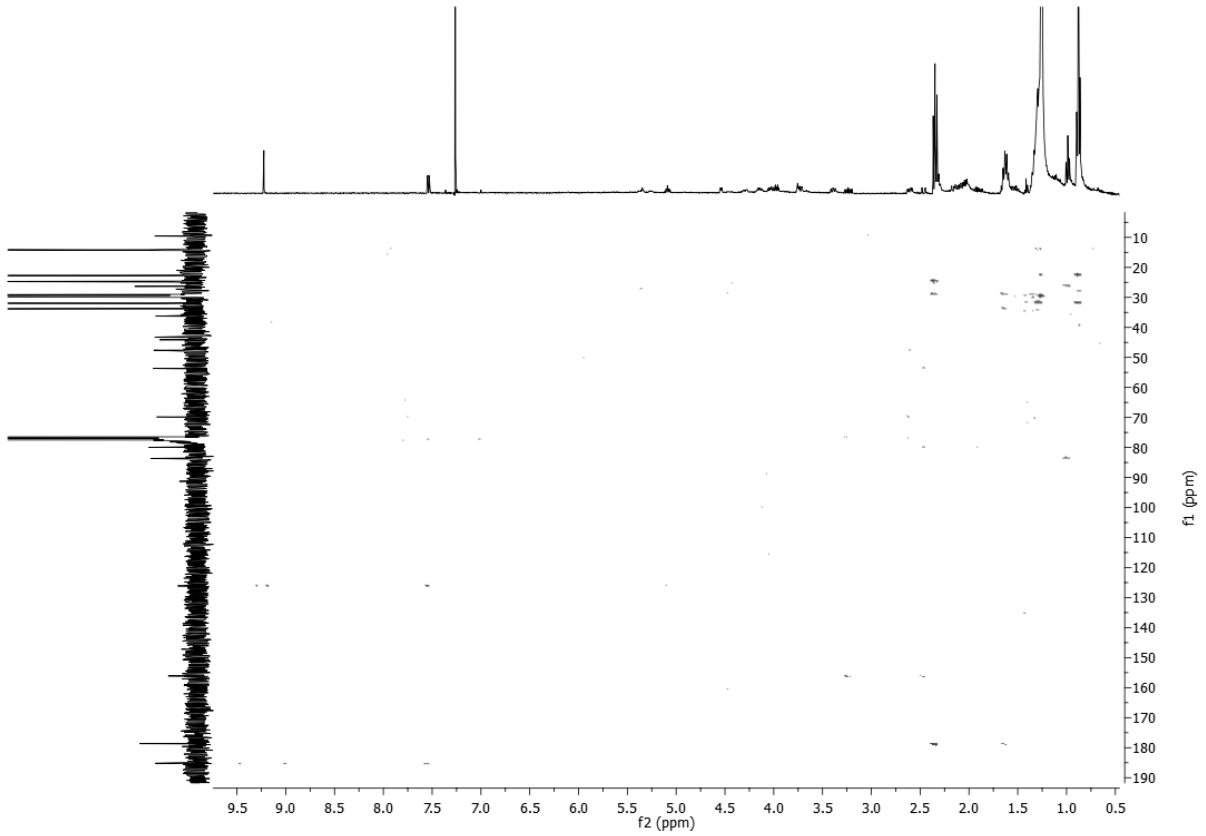


Figure I12: ^{1}H-^{1}H COSY spectrum of **2** in $CDCl_3$.

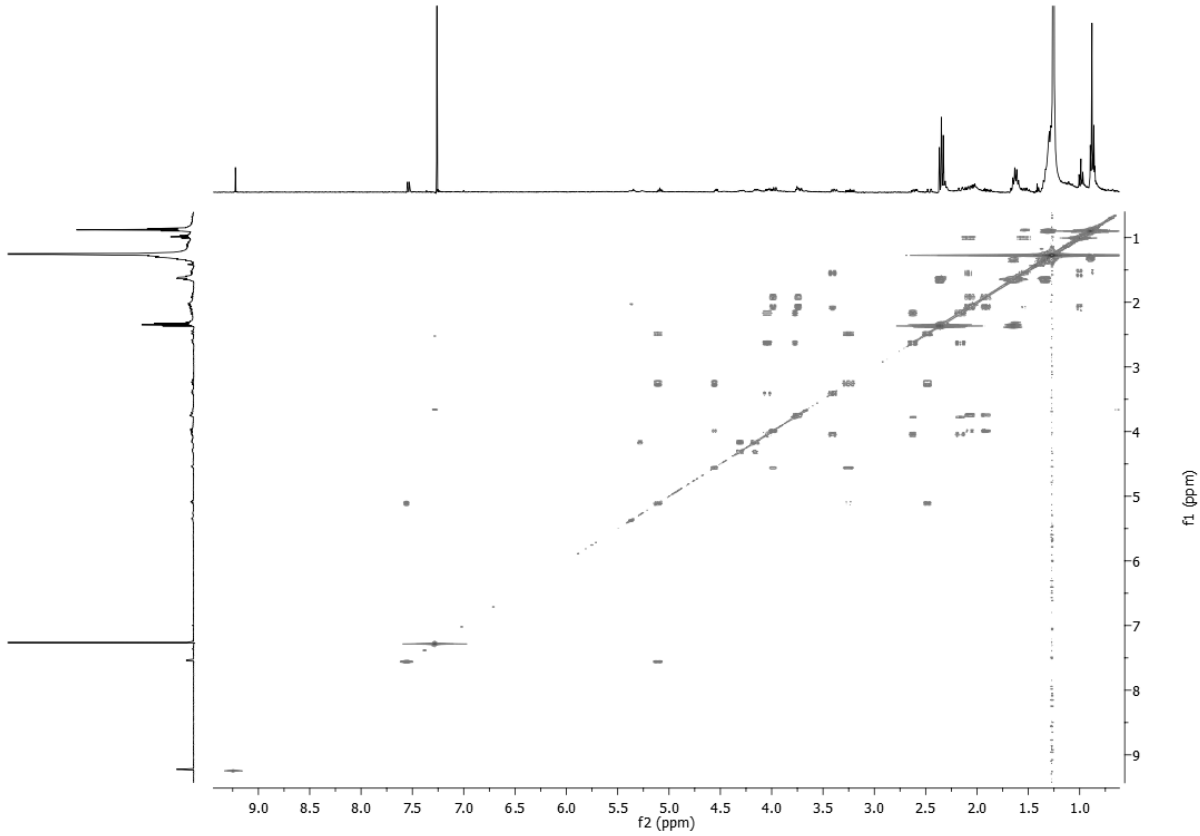


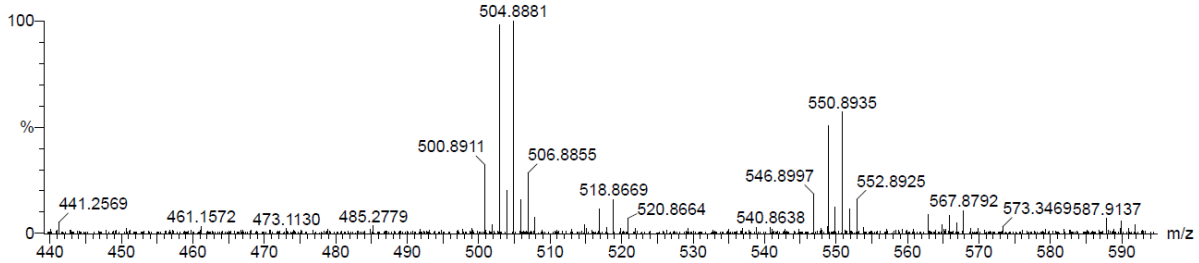
Figure I13: HRMS spectrum of **2** (Zoom) in negative ionization.

Elemental Composition Report **Page 1**

Single Mass Analysis
Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
Element prediction: Off
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
2012 formula(e) evaluated with 20 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)
Elements Used:
C: 0-95 H: 0-182 O: 0-40 Na: 0-1 Cl: 0-3 Br: 0-8

170308_ST_X15_neg 272 (2.029) Cm (269:272) 1: TOF MS ES- 4.94e+003



Minimum:				-1.5				
Maximum:		5.0	5.0	50.0				
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
500.8911	500.8888	2.3	4.6	1.5	137.1	0.131	87.75	C13 H21 O4 Na Br3
	500.8912	-0.1	-0.2	4.5	139.1	2.147	11.68	C15 H20 O4 Br3

Figure I14: ^{1}H NMR spectrum of **3** in acetone-d_6 (400 MHz).

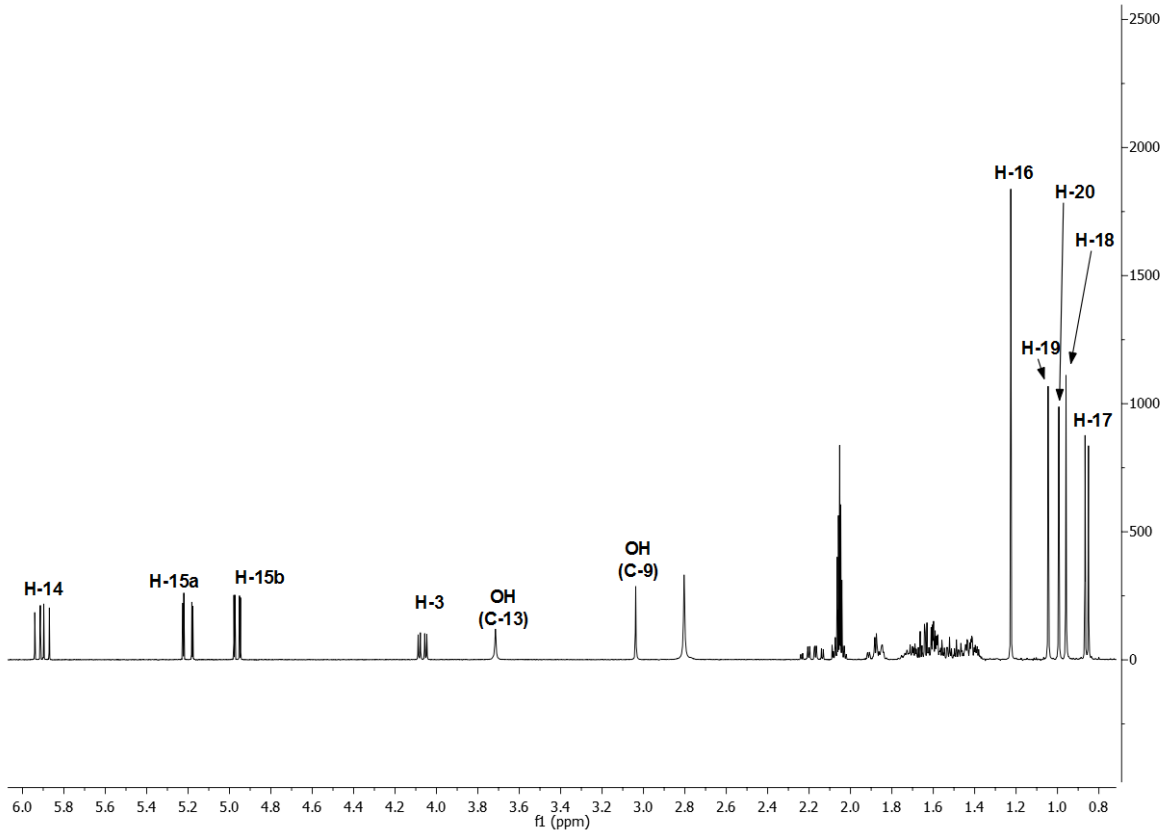


Figure I15: ^{13}C NMR spectrum of **3** in acetone-d_6 (100 MHz).

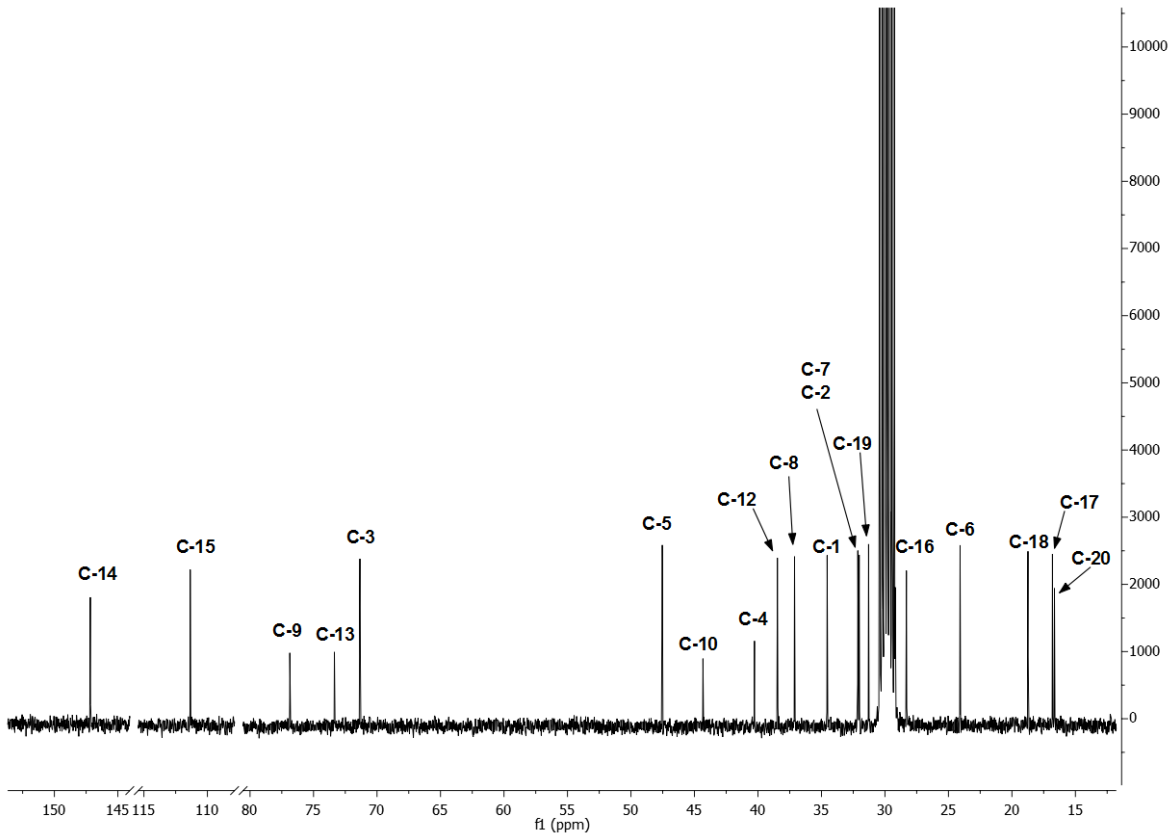


Figure I16: HSQC spectrum of **3** in acetone-d_6.

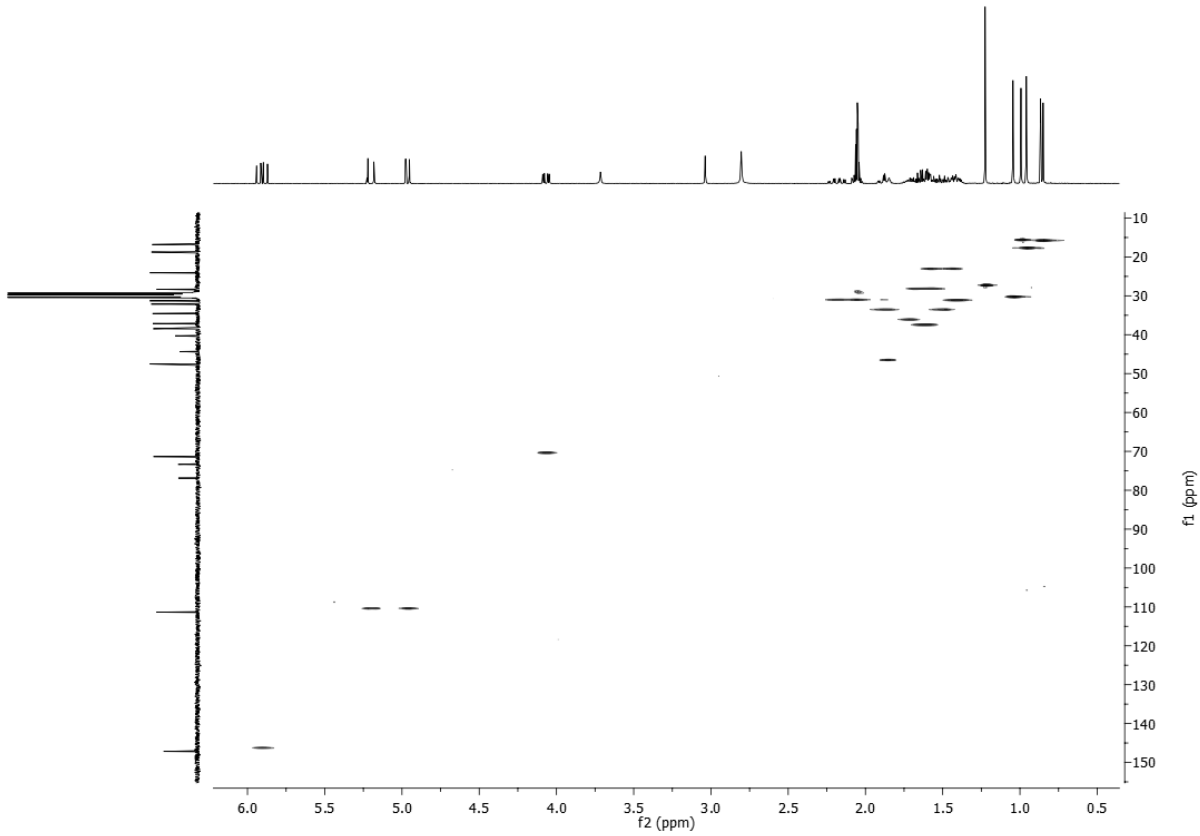


Figure I17: HMBC spectrum of **3** in acetone-d_6.

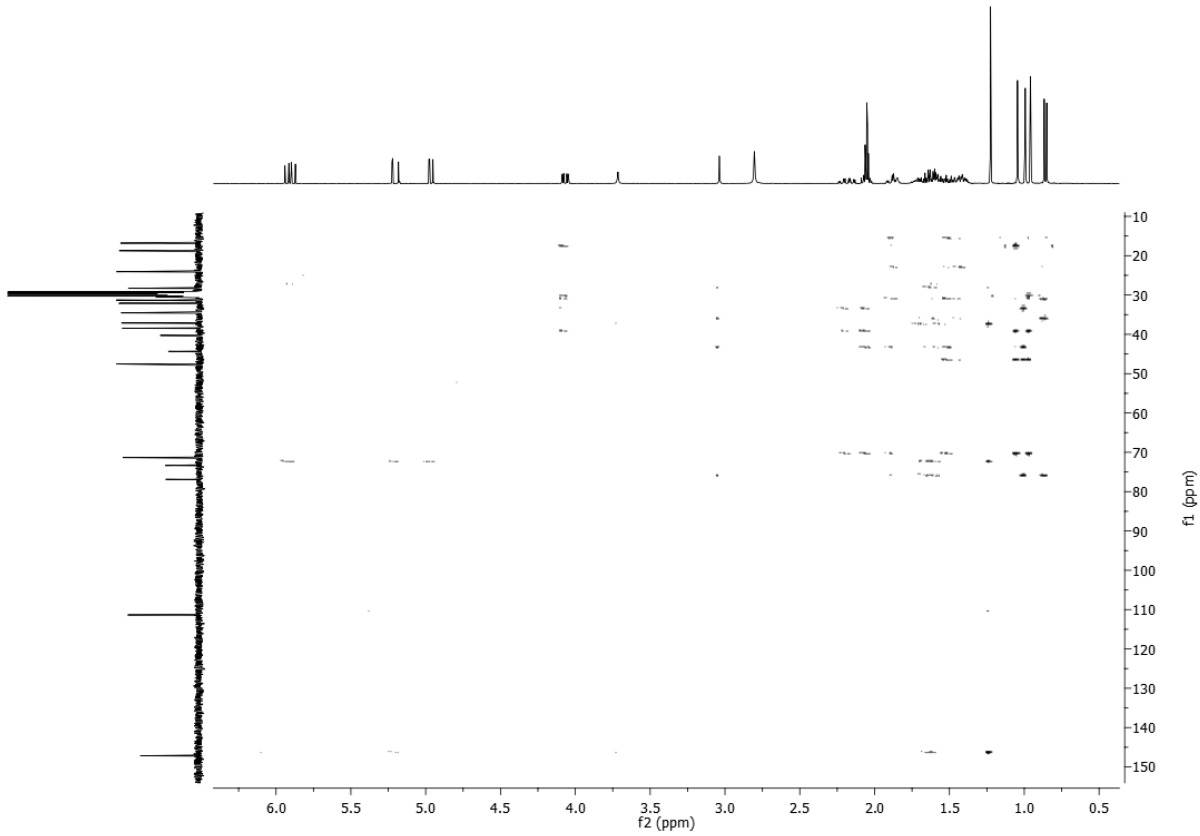


Figure I18: ^{1}H-^{1}H COSY spectrum of **3** in acetone-d_6.

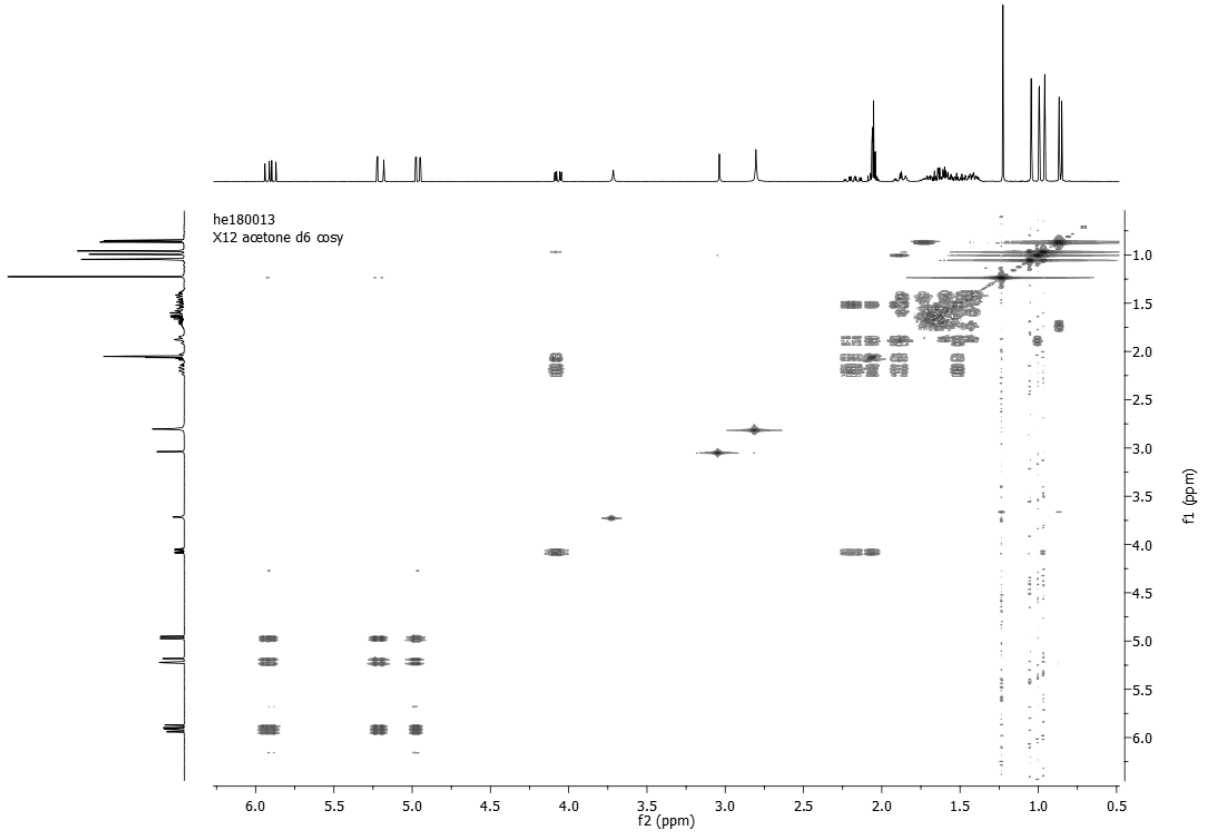


Figure I19: NOESY spectrum of **3** in acetone-d_6.

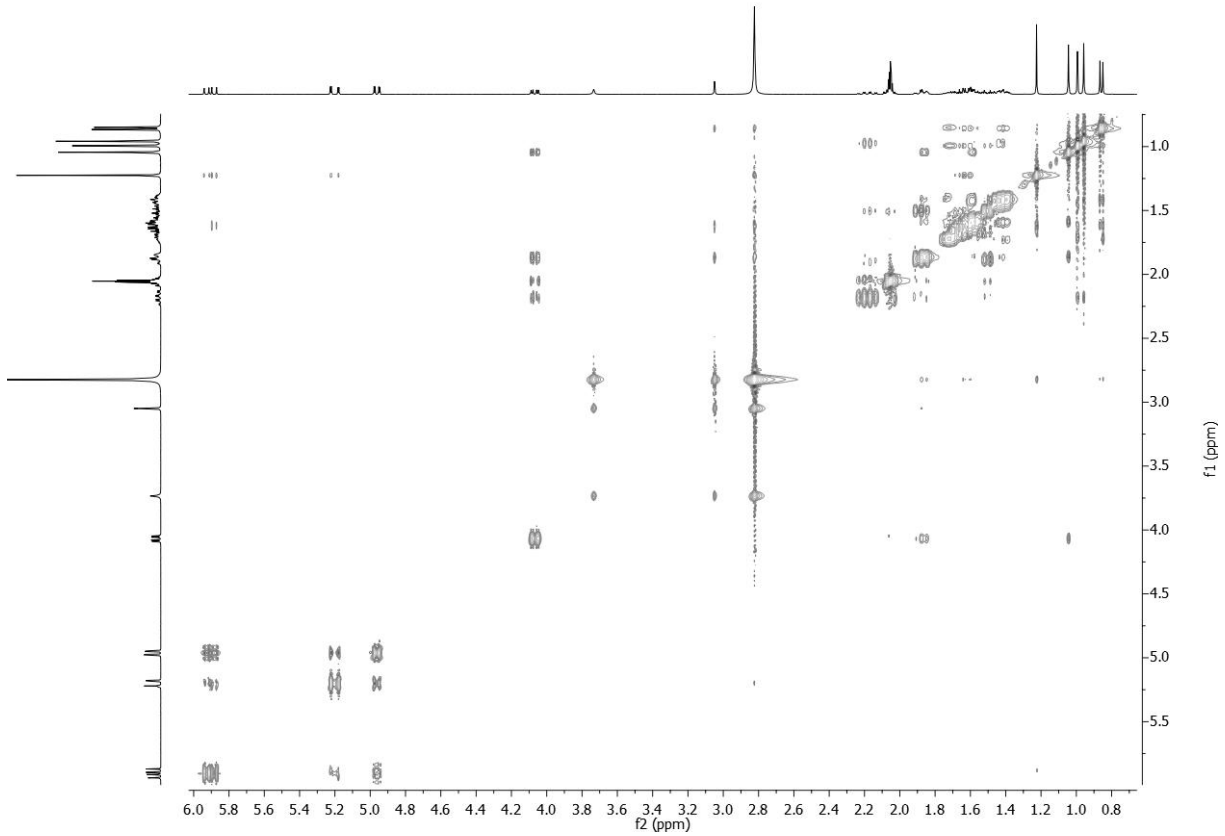


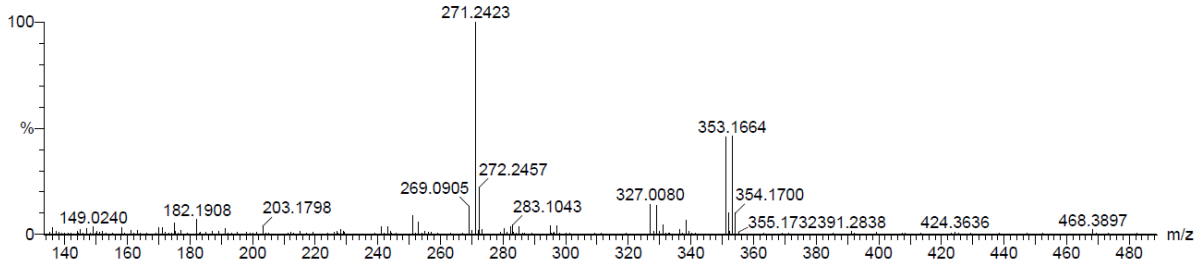
Figure I20: HRMS spectrum of **3** (Zoom) in negative ionization.

Elemental Composition Report **Page 1**

Single Mass Analysis
Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
Element prediction: Off
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
767 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)
Elements Used:
C: 0-95 H: 0-182 O: 0-40 Na: 0-1 Cl: 0-3 Br: 0-8

170308_ST_X12_pos 343 (2.565) Cm (341:348) 1: TOF MS ES+ 1.14e+006



Minimum:				-1.5				
Maximum:		5.0	5.0	50.0				
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
351.1681	351.1687	-0.6	-1.7	4.5	629.3	n/a	n/a	C20 H32 Br

Figure I21: ^{1}H NMR spectrum of **4** in acetone-d_6 (400 MHz).

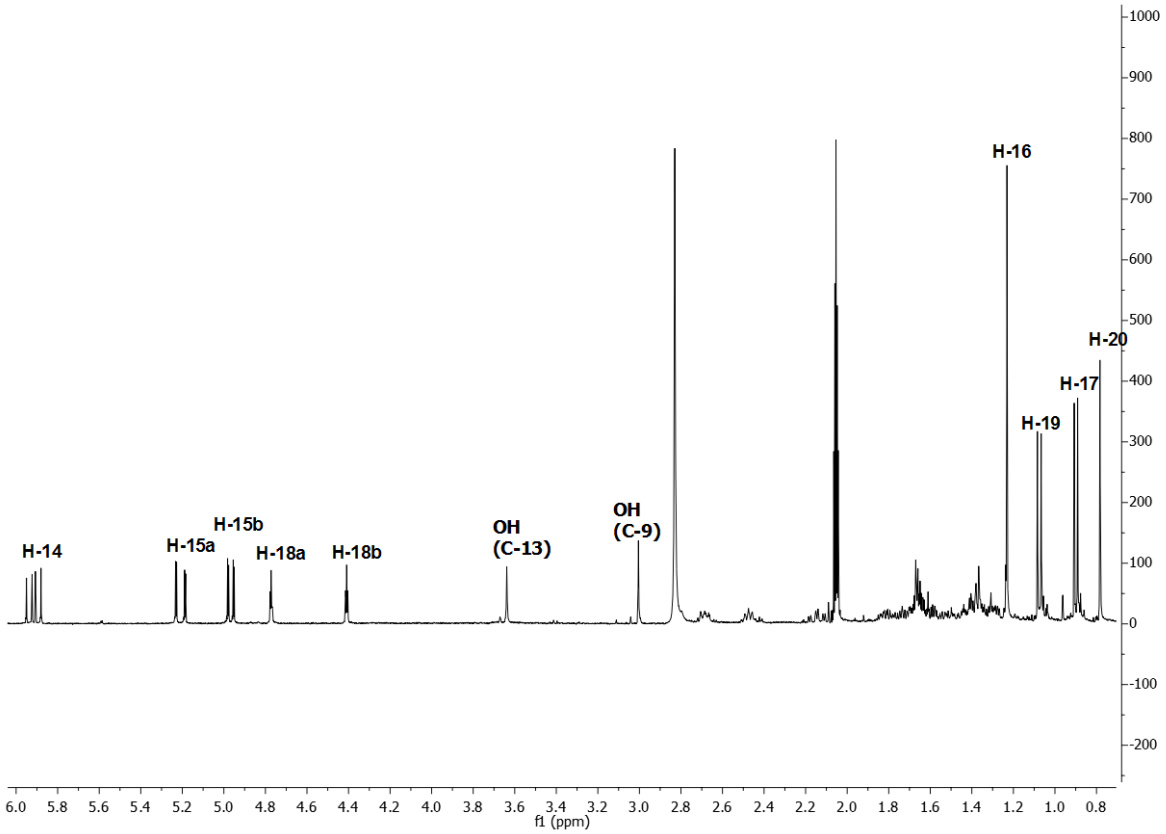


Figure I22: ^{13}C NMR spectrum of **4** in acetone-d_6 (100 MHz).

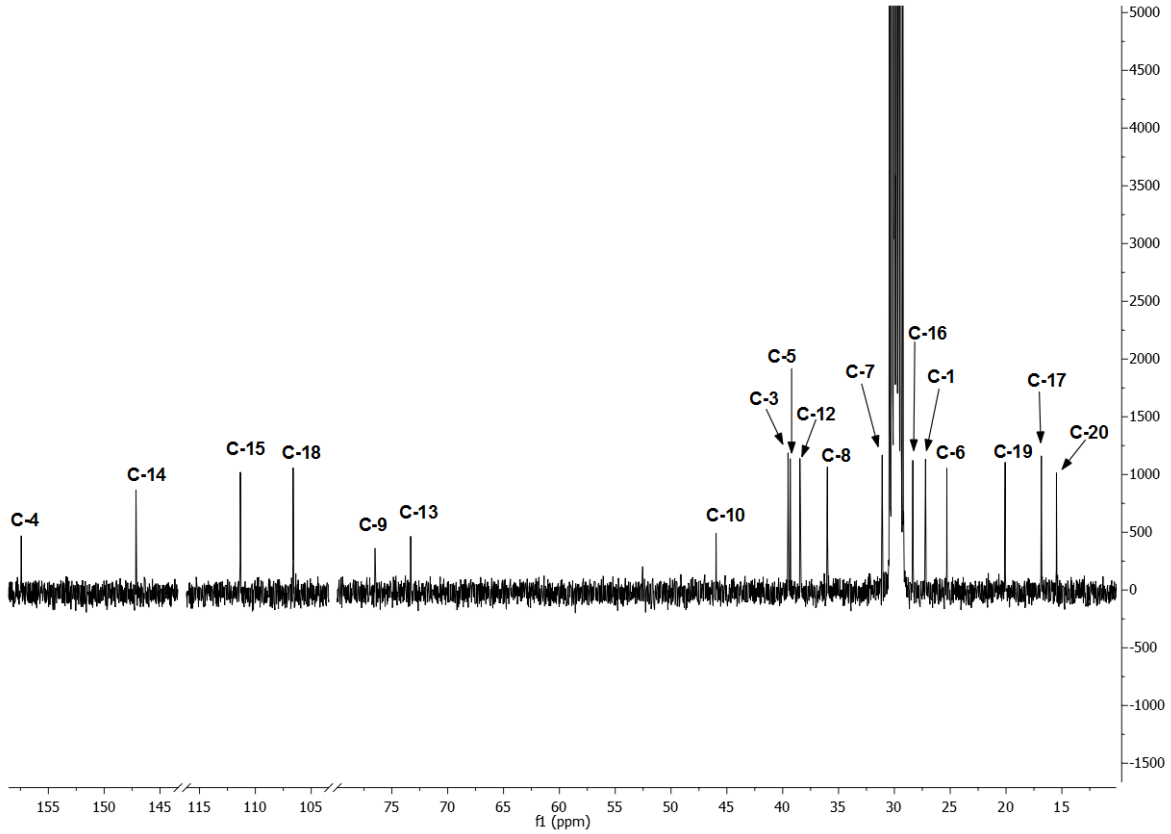


Figure I23: HSQC spectrum of **4** in acetone-d_6.

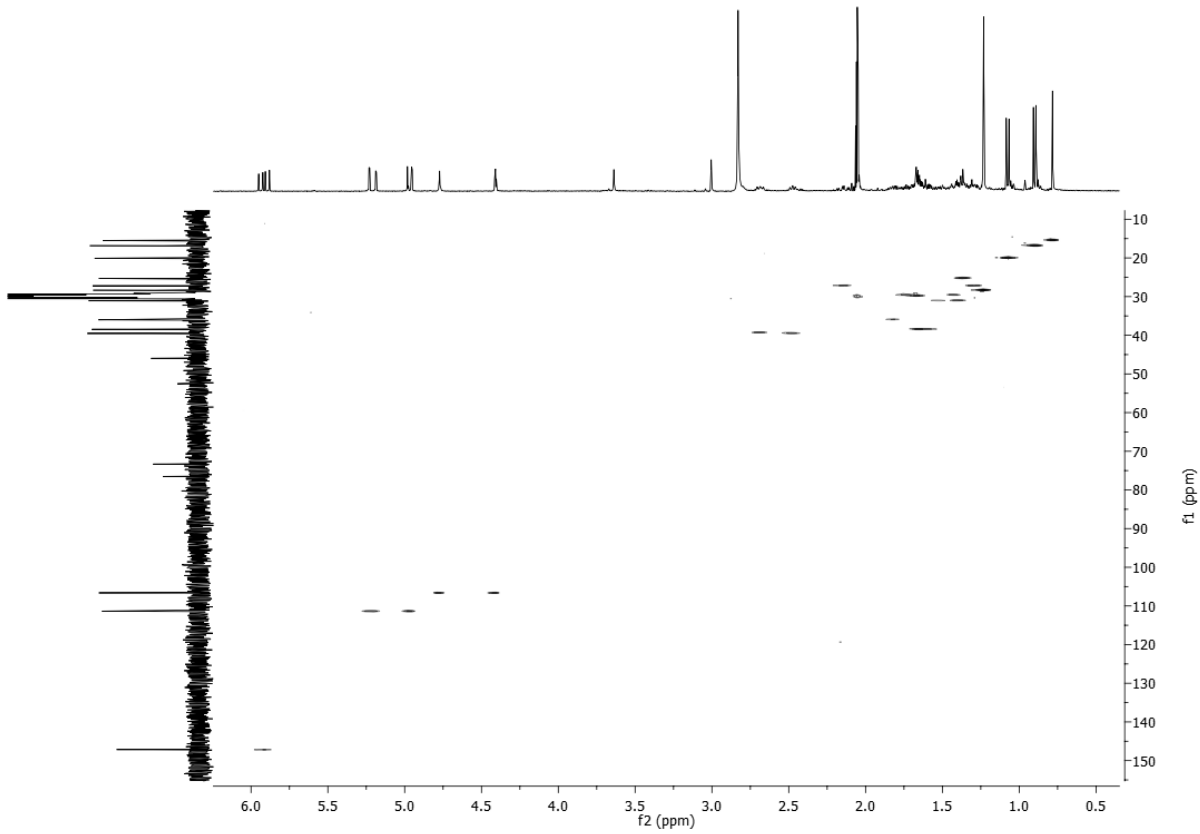


Figure I24: HMBC spectrum of **4** in acetone-d_6.

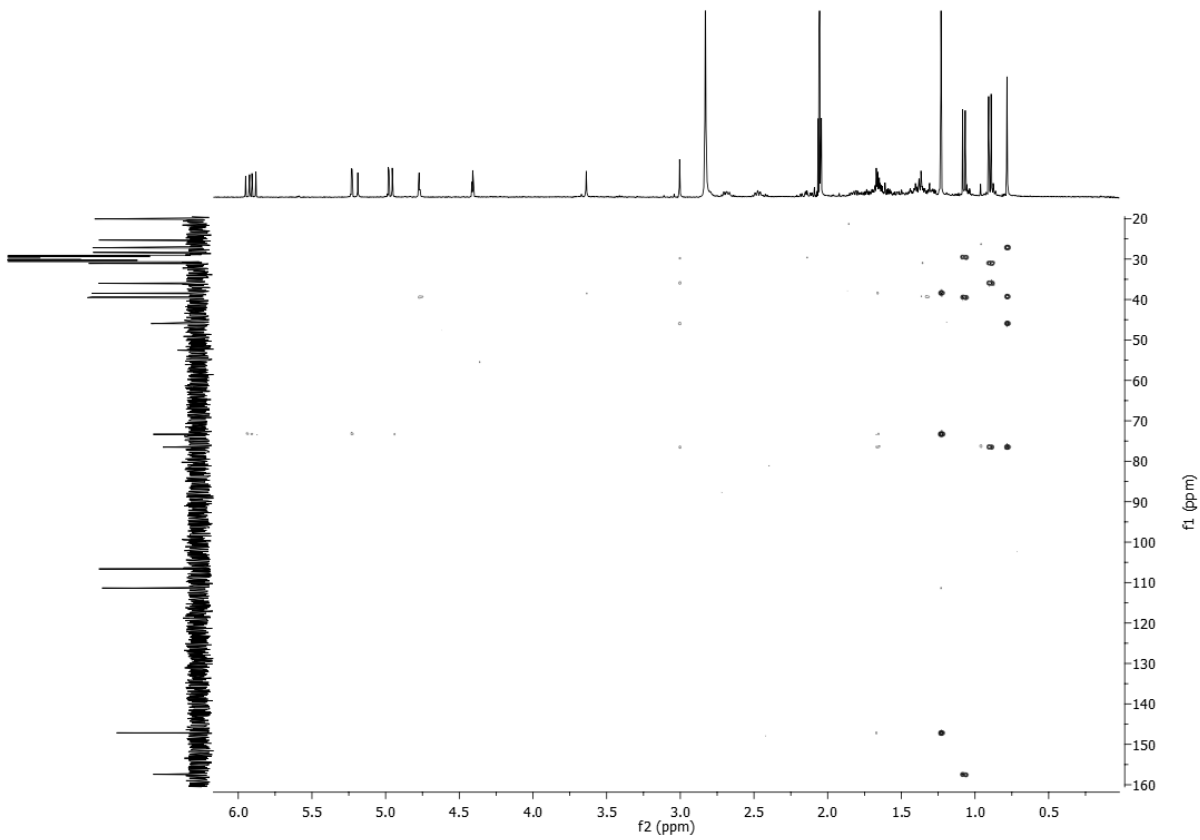


Figure I25: ^{1}H-^{1}H COSY spectrum of **4** in acetone-d_6.

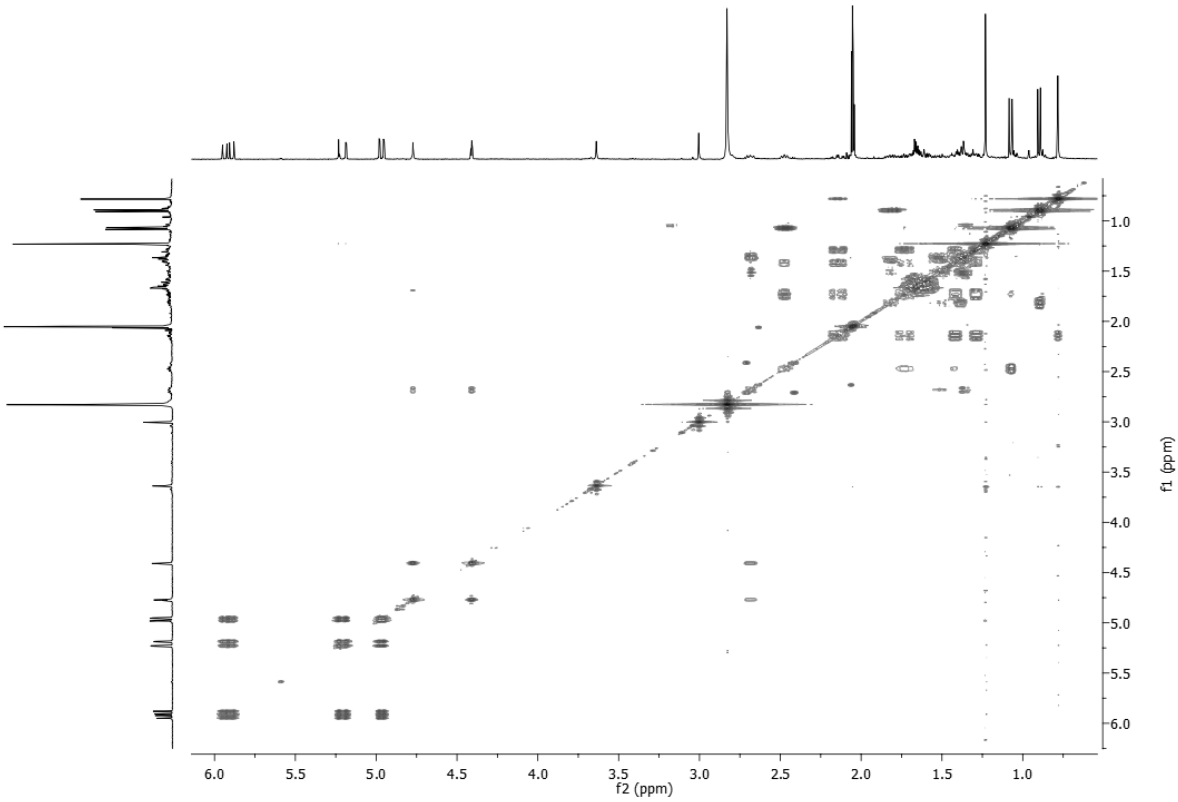


Figure I26: NOESY spectrum of **4** in acetone-d_6.

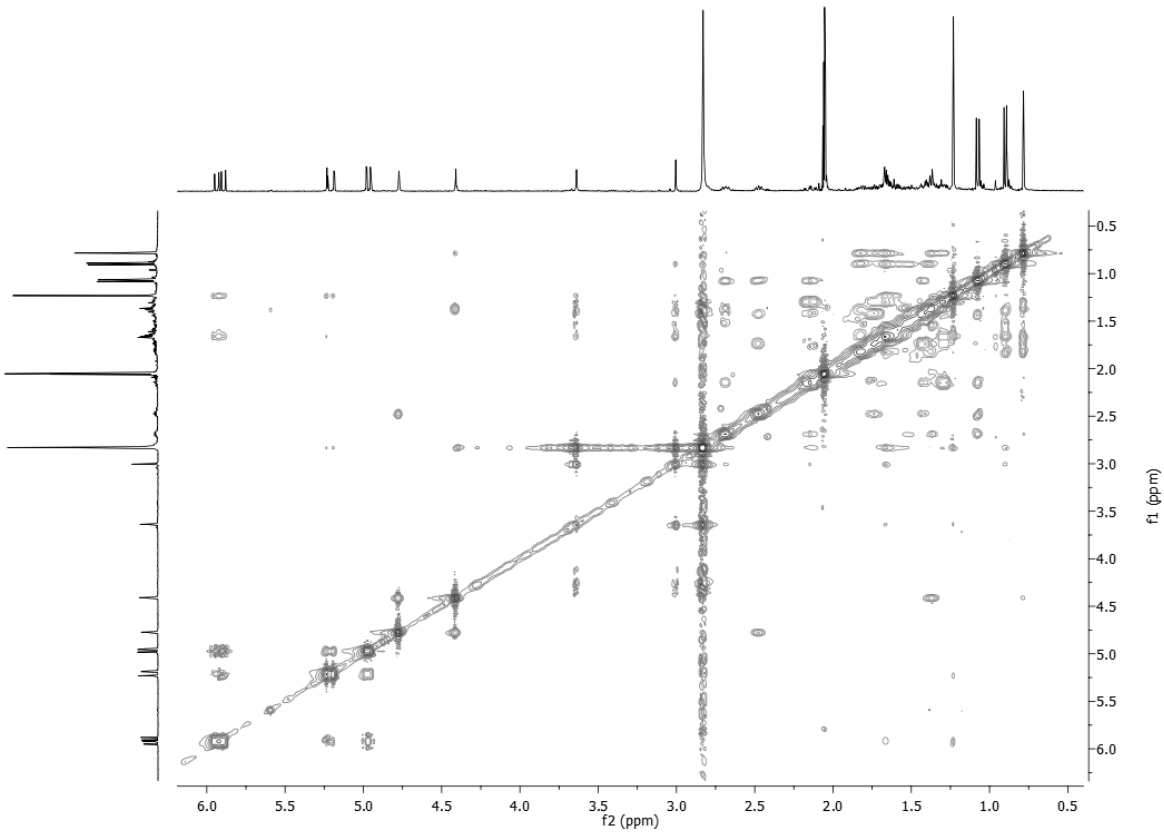


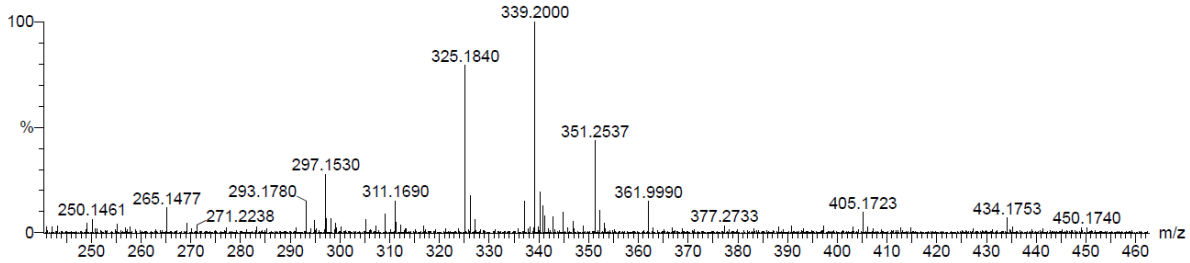
Figure I27: HRMS spectrum of **4** (Zoom) in positive ionization.

Elemental Composition Report **Page 1**

Single Mass Analysis
Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
Element prediction: Off
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
769 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)
Elements Used:
C: 0-95 H: 0-182 O: 0-40 Na: 0-1 Cl: 0-3 Br: 0-8

170308_ST_X13_neg 333 (2.483) Cm (331:335) 1: TOF MS ES- 2.36e+004



Minimum:				-1.5				
Maximum:		5.0	5.0	50.0				
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
351.2537	351.2535	0.2	0.6	4.5	207.0	n/a	n/a	C21 H35 O4

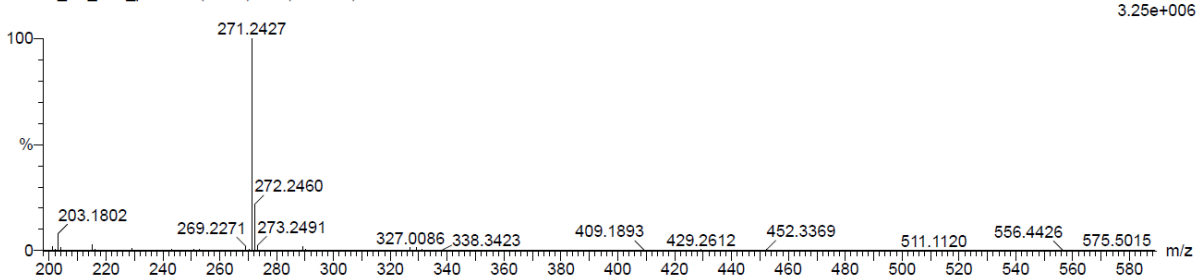
Figure I28: HRMS spectrum of **4** (Zoom) in positive ionization.

Elemental Composition Report **Page 1**

Single Mass Analysis
Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
Element prediction: Off
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

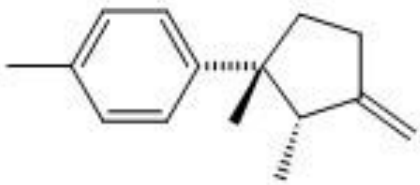
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
387 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)
Elements Used:
C: 0-95 H: 0-182 O: 0-40 Na: 0-1 Cl: 0-3 Br: 0-8

170308_ST_X13_pos 333 (2.483) Cm (329:337) 1: TOF MS ES+ 3.25e+006

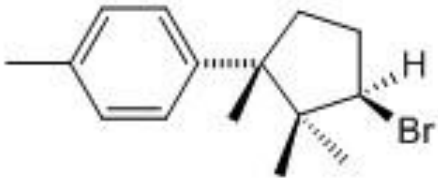


Minimum:				-1.5				
Maximum:		5.0	5.0	50.0				
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
271.2427	271.2426	0.1	0.4	5.5	709.3	n/a	n/a	C20 H31

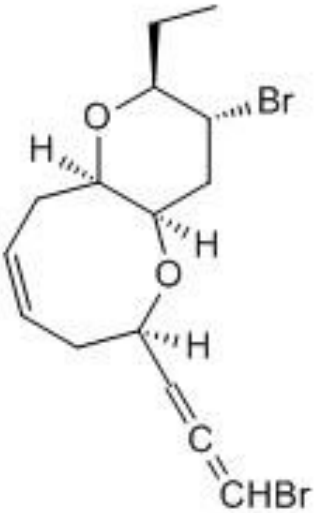
Figure I29: Structures of known compounds identified in *L. obtusa* extract.



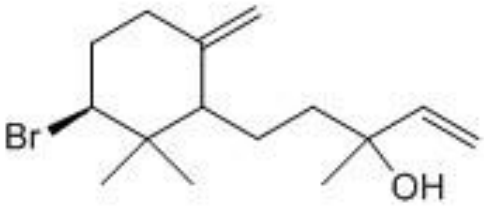
laurene (**6**)



α-bromocuparene (**7**)



microcladallene A (**8**)



β-snyderol (**9**)

Annexe J : Annexes de l'article 4 « Discrimination and Characterization of Two Mediterranean Species from the *Laurencia* Complex (Rhodomelacea) Using an NMR-Based Metabolomic Approach »

Table J1: R-phenotype samples used to estimate temporal variation
Table J2: Both R- and G-phenotype samples used to estimate geographical homogeneity.
Figure J3: Computer aided identification of the individual components.
Figure J4: Zoom of ^{13}C NMR spectrum of Laurenciella sp.pentane extract highlighting identified components.
Table J5: Metabolites identified from pentane extract of *Laurenciella* sp.
Table J6: Metabolites identified from pentane extract of *Laurencia obtusa*.
Figure J7: ^{1}H NMR Fingerprints of pentane extracts of R-phenotype: *Laurenciella* sp.($CDCl_3$, 400 MHz).
Figure J8: ^{1}H NMR Fingerprints of pentane extracts of G-phenotype: *Laurencia obtusa* (CDCl3, 400 MHz).
Figure J9: Zoom of HSQC spectrum of *Laurencia obtusa* pentane extract highlighting correlations representative of β-snyderol
Figure J10: Zoom of HSQC spectrum of *Laurenciella* sp. pentane extract highlighting correlations representative of 3-(*E*)-laurenyne
Figure J11: Scatter plot and loading plot (PC1 and PC2) of R- and G-phenotype samples
Table J12: ^{13}C and ^{1}H NMR of 3-(*E*)-laurenyne and β-snyderol
Figure J13: Scatter plot and loading plot (PC1 and PC2) of R-phenotype samples
Figure J14: Scatter plot and loading plot (PC1) of G-phenotype samples
Figure J15: Phylogenetic tree showing the relationship among members of the *Laurencia* complex. Tree was constructed by raxML. Strongly supported nodes (Bayesian support > 95, ML bootstrap > 80 are indicated in bold).

Table J1: R-phenotype samples used to estimate temporal variation

Sample number[a]	Date	Sample number[a]	Date
1	06/2015	12	08/2014
10	06/2014	13	09/2014
11	07/2014	21	06/2016
[a]All samples were collected in the same location (Ajaccio, Route des sanguinaires, 41°54.416'N, 8°39.610'E)			

Table J2: Both R- and G-phenotype samples used to estimate geographical homogeneity.

Phenotype	Sample number[a]	Location (see map)	Phenotype	Sample number[a]	Location (see map)
G	2	(42°06.432'N,8°40.278'E)	G	14	(42°06.432'N,8°40.278'E)
R	3	(42°06.068'N,8°42.473'E)	G	15	(41°31.754'N,9°16.953'E)
G	4	(42°3.936'N,8°44.204'E)	G	16	(41°42.762'N,9°24.278'E)
R	5	(42°43.260'N,9°27.403'E)	R	17	(42°16.690'N,8°41.382'E)
G	6	(41°59.144'N,8°40.171'E)	G	18	(41°42.762'N,9°24.278'E)
R	7	(41°42.762'N,9°24.278'E)	R	19	(41.54.494'N,8°43.156'E)
G	8	(41°29.671'N,8°55.927'E)	R	20	(41°44.363'N,8°46.739'E)
R	9	(41°31.754'N,9°16.953'E)	G		
[a]All samples were collected at the same period (08/2015)					

Figure J3: Computer aided identification of the individual components.

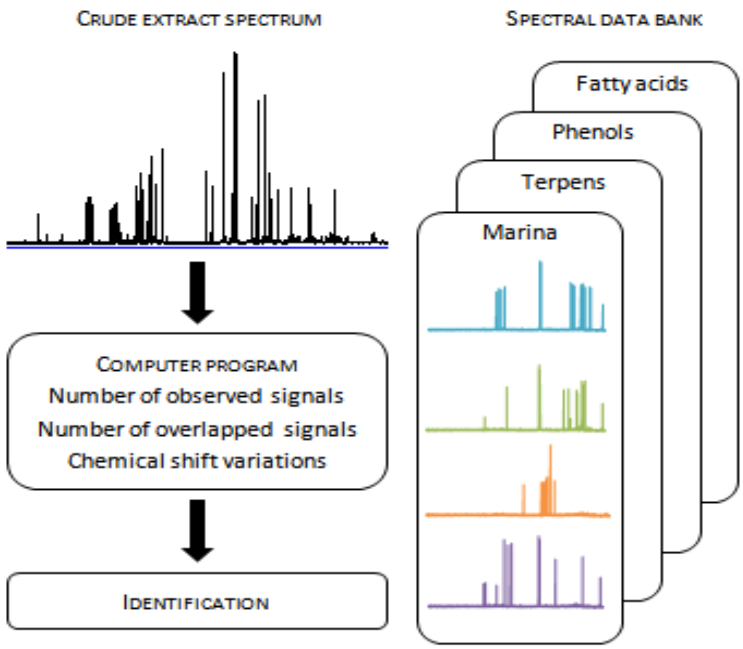


Figure J4: Zoom of ^{13}C NMR spectrum of Laurenciella sp.pentane extract highlighting identified components.

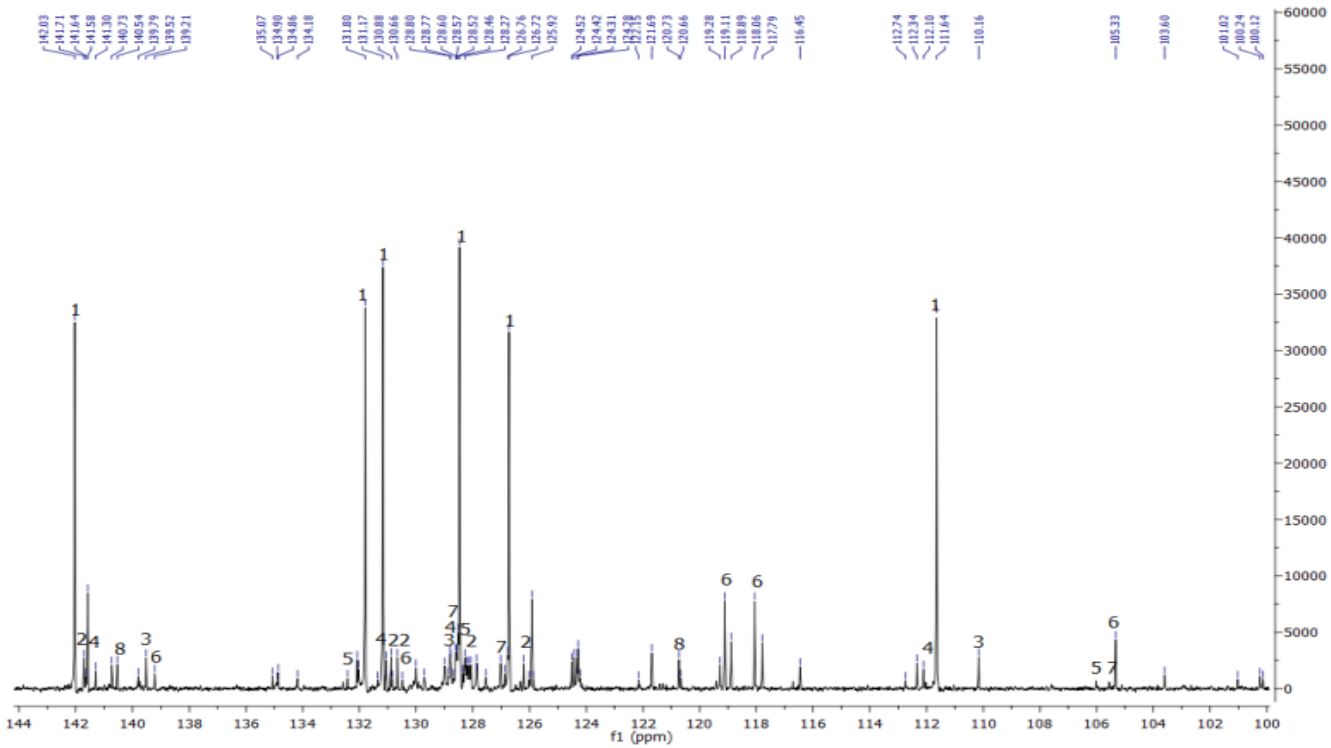


Table J5: Metabolites identified from pentane extract of *Laurenciella* sp.

	Components	NMR[a]	Overlap[b]
	Acetogenins		
1	3-(*E*)-laurenyne	15 / 15	2
2	3-(*Z*)-laurenyne	15 / 15	2
3	Obtusallene I	15 / 15	1
4	(*E*)-Pinnatifidenyne	15 / 15	1
	Sesquiterpenes		
5	9,15-dibromo-1,3(15)-chamigradien-11-ol	13 / 15	1
6	Dihydrolaurene	15 / 15	2
7	Laurene	11 / 15	0
	Sterol		
8	Cholesterol	27 / 27	1

[a]Number of observed signals compared to number of expected signals; measured in NMR spectrum of the crude extract

[b]Number of overlapped signals; measured in NMR spectrum of the crude extract

Table J6: Metabolites identified from pentane extract of *Laurencia obtusa*.

	Components	NMR[a]	Overlap[b]
	Sesquiterpens		
9	4-hydroxy-5-brasilane	15 / 15	1
10	Brasilenol	13 / 15	1
11	Epibrasilenol	15 / 15	1
12	β-snyderol	15 / 15	4
13	α-snyderol	12 / 15	3

[a]Number of observed signals compared to number of expected signals; measured in NMR spectrum of the crude extract

[b]Number of overlapped signals; measured in NMR spectrum of the crude extract

Figure J7: ^{1}H NMR Fingerprints of pentane extracts of R-phenotype: *Laurenciella* sp.($CDCl_3$, 400 MHz).

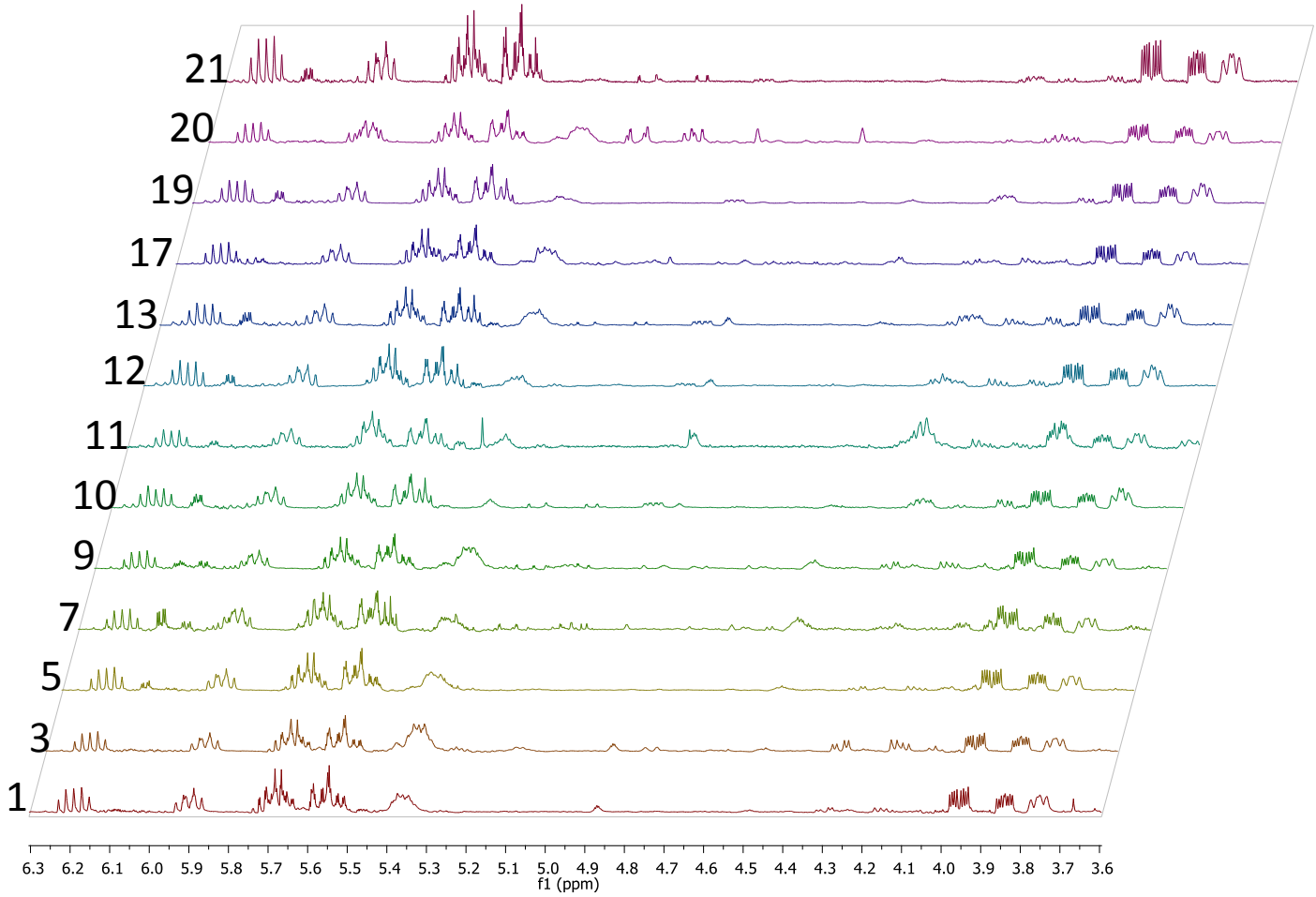


Figure J8: ^{1}H NMR Fingerprints of pentane extracts of G-phenotype: *Laurencia obtusa* (CDCl3, 400 MHz).

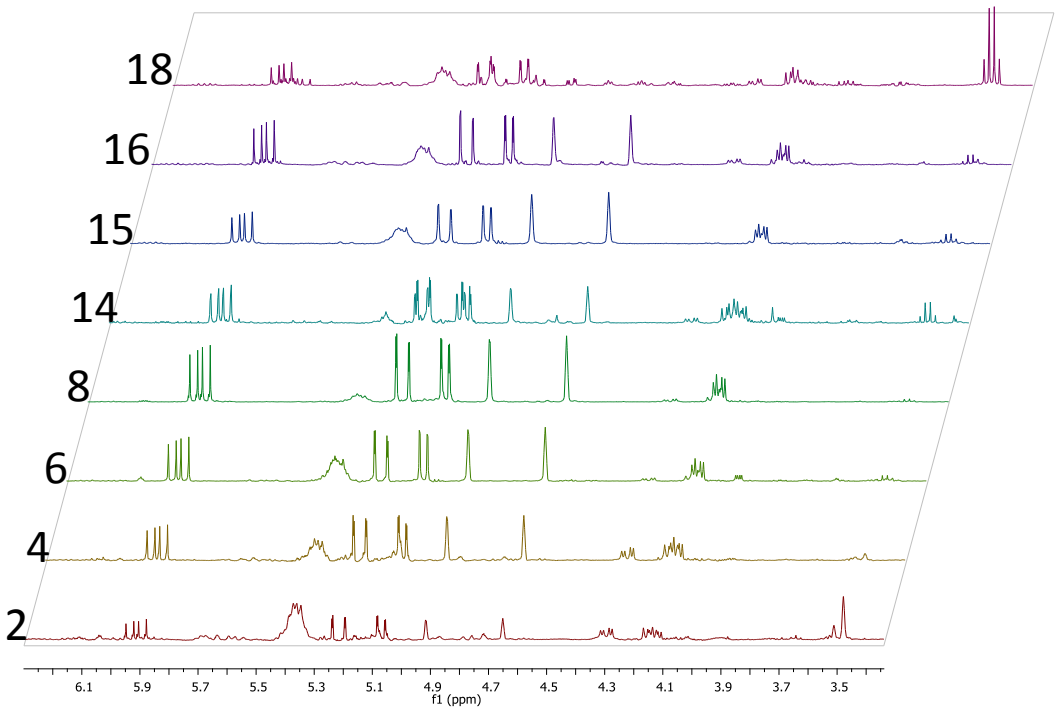


Figure J9: Zoom of HSQC spectrum of *Laurencia obtusa* pentane extract highlighting correlations representative of β-snyderol

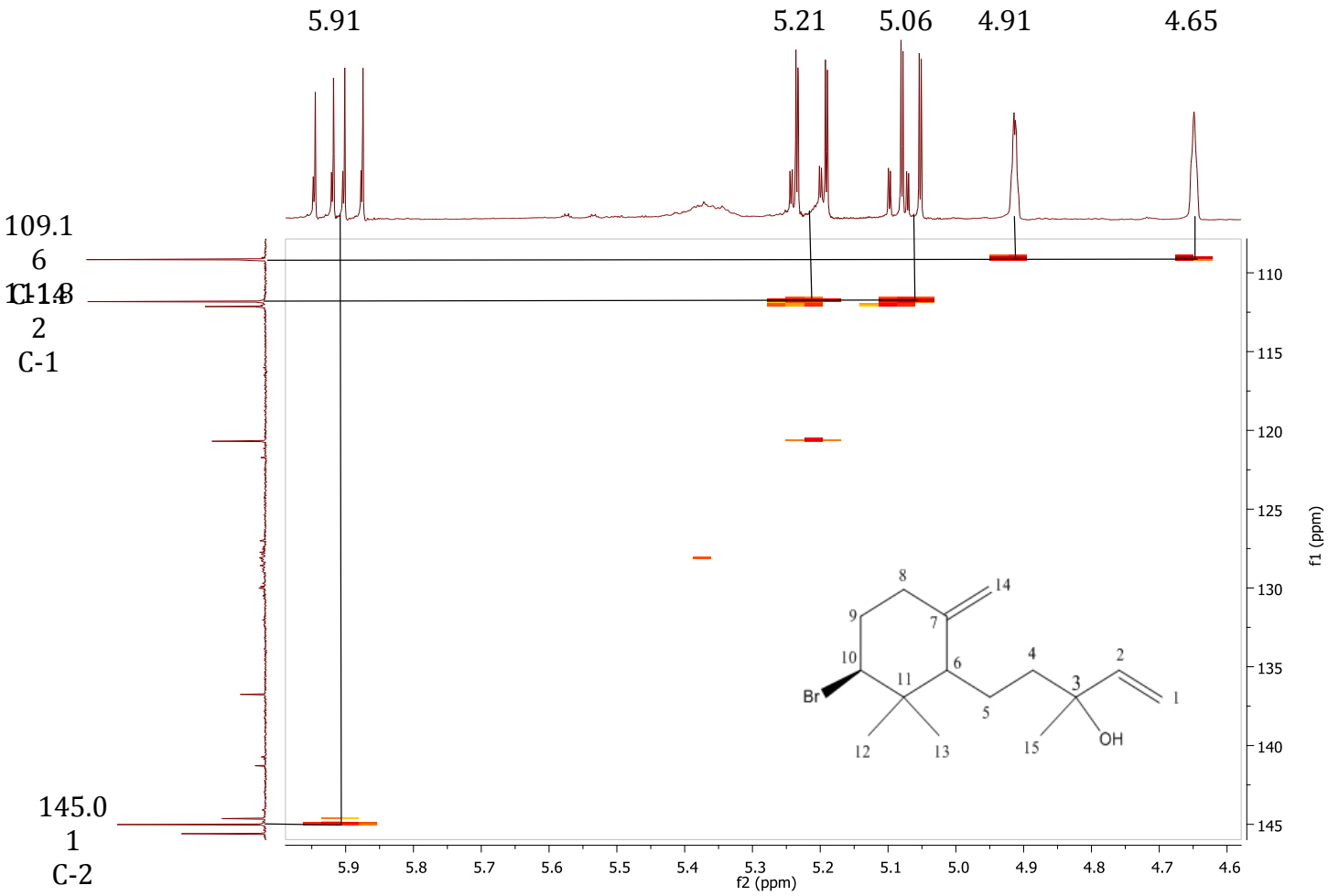


Figure J10: Zoom of HSQC spectrum of *Laurenciella* sp. pentane extract highlighting correlations representative of 3-(*E*)-laurenyne

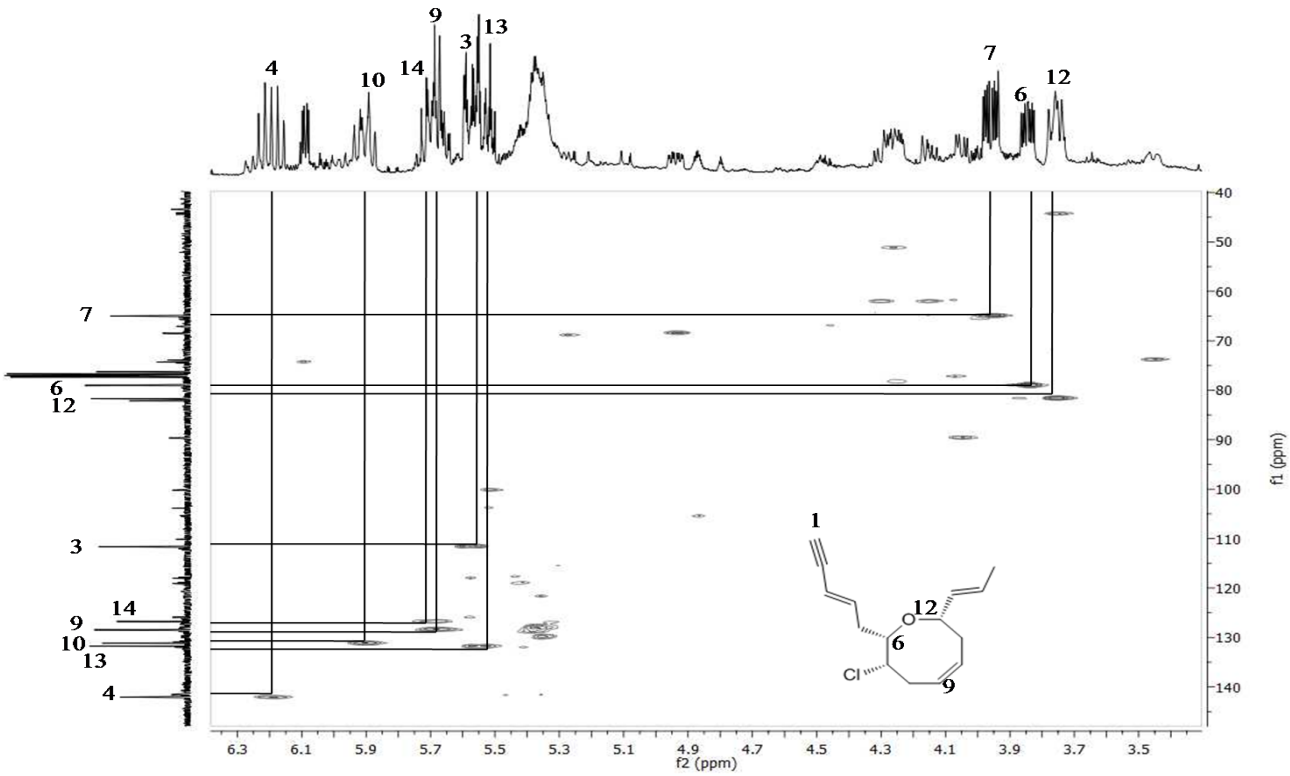
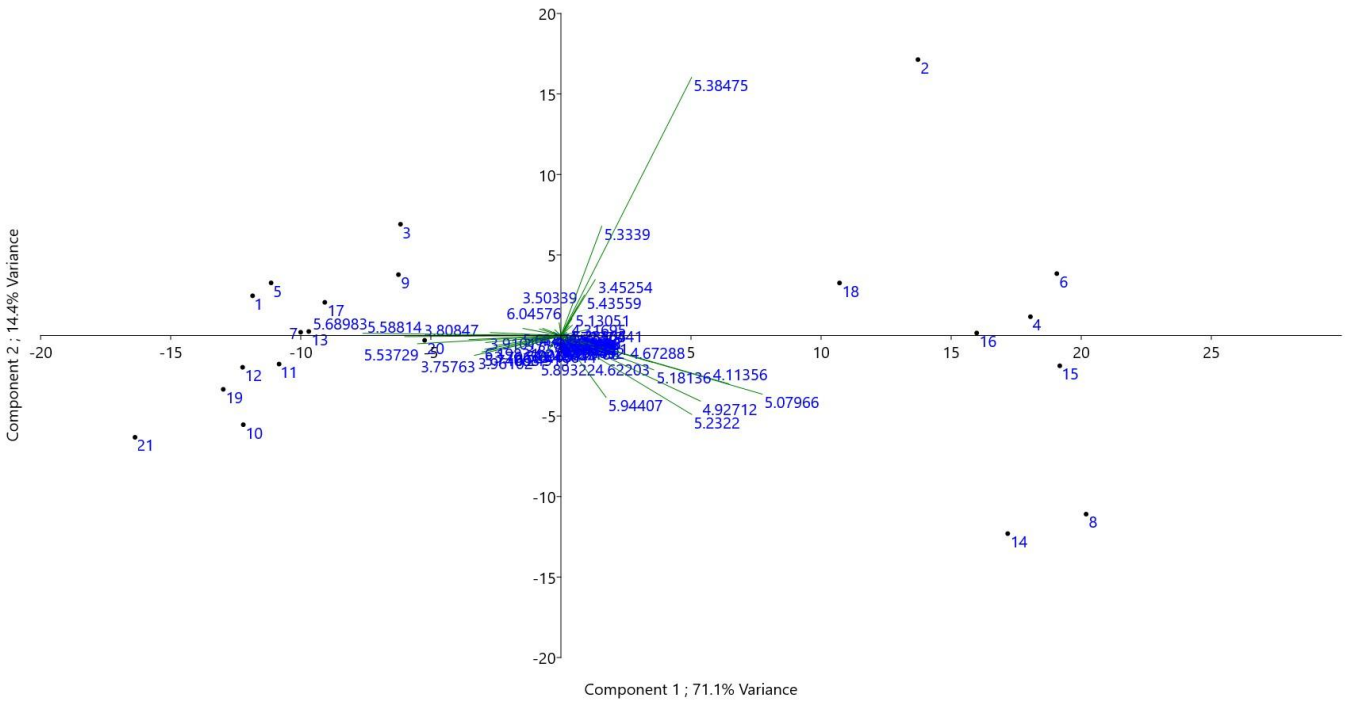
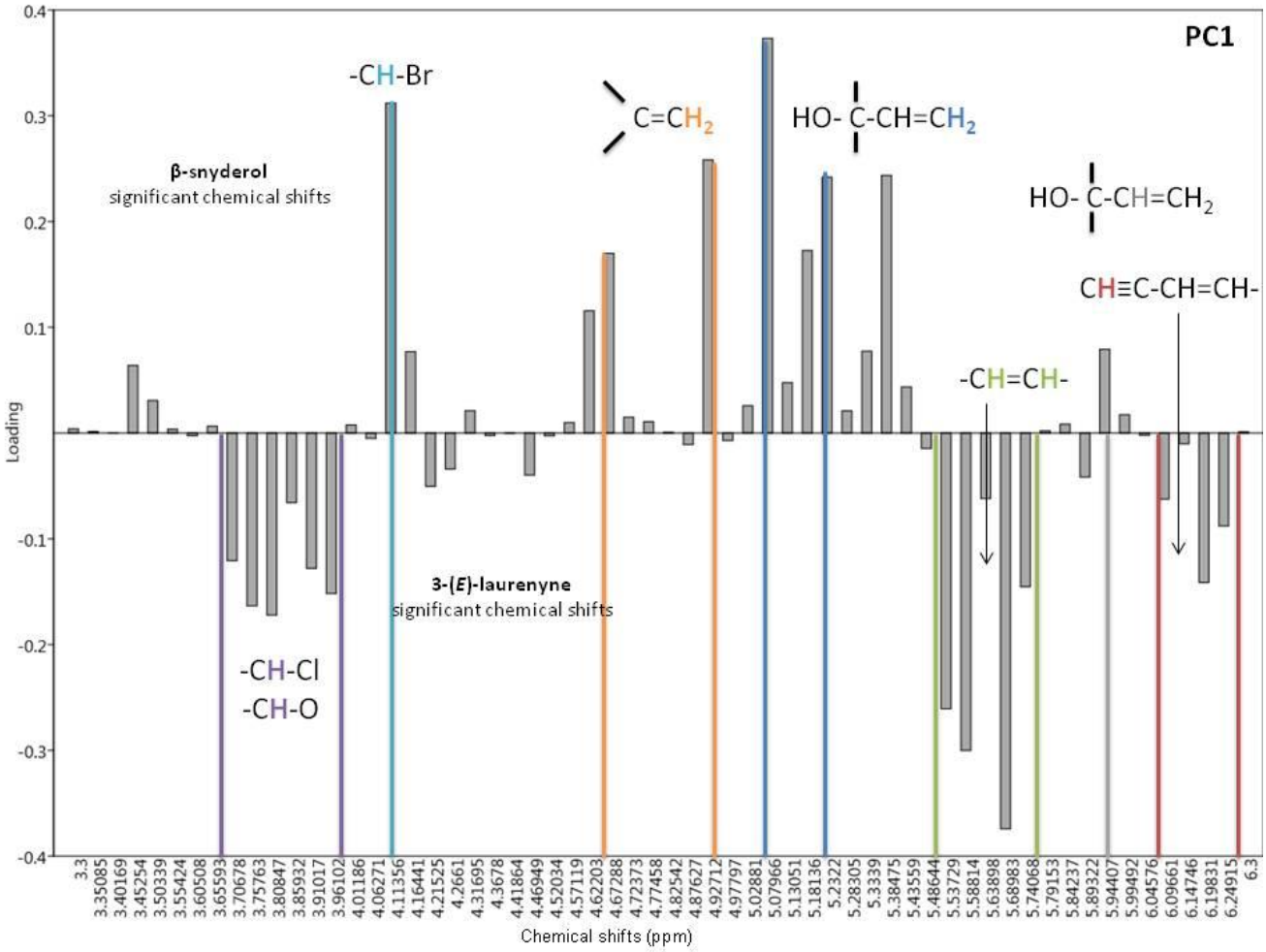


Figure J11: Scatter plot and loading plot (PC1 and PC2) of R- and G-phenotype samples




PC1
-CH-Br
C=CH2
HO- C-CH=CH2
HO- C-CH=CH2
CH≡C-CH=CH-
-CH=CH-
β-snyderol
significant chemical shifts
3-(E)-laurenyne
significant chemical shifts
-CH-Cl
-CH-O
Loading
Chemical shifts (ppm)

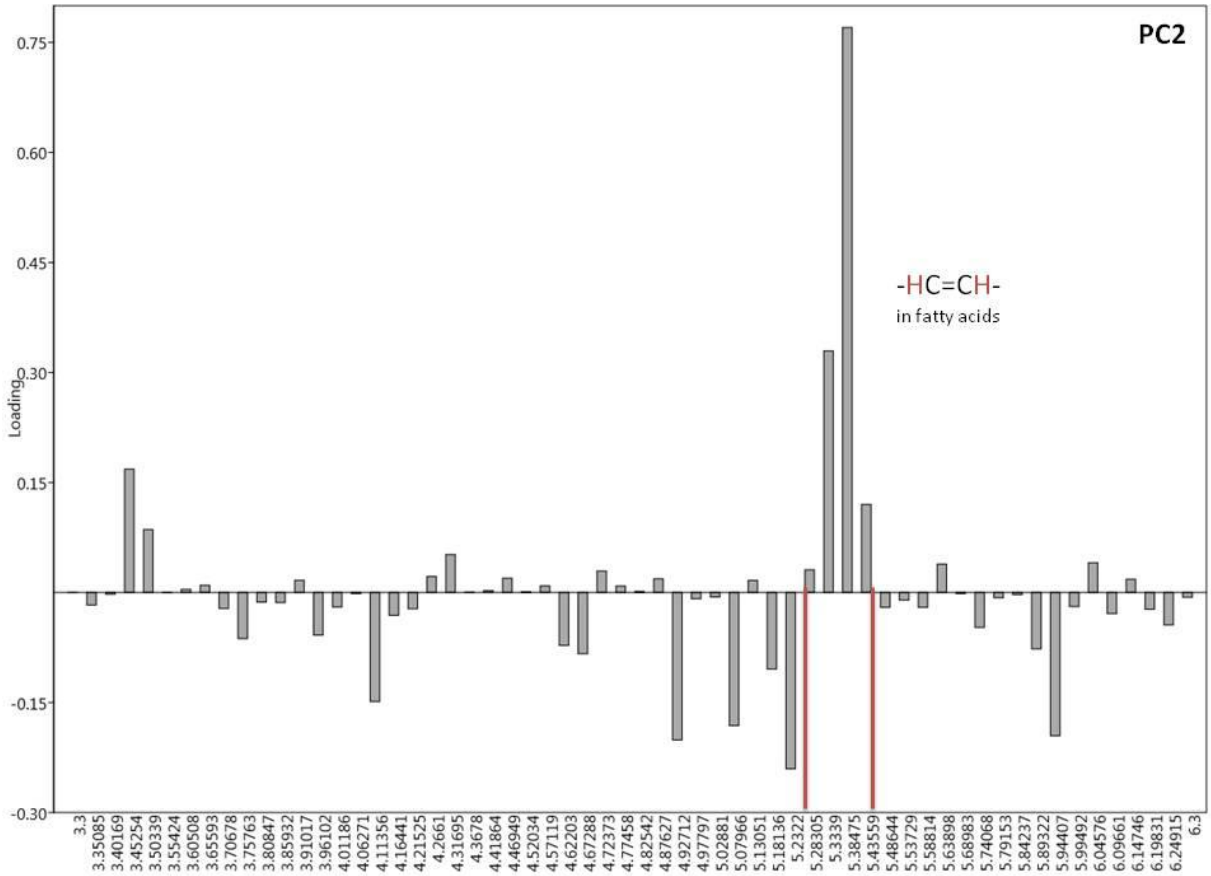
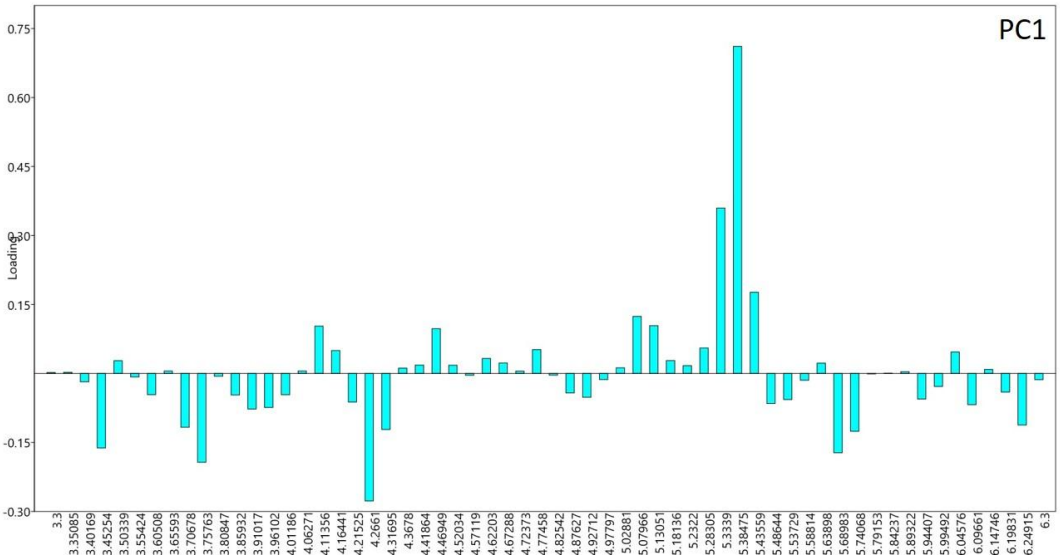
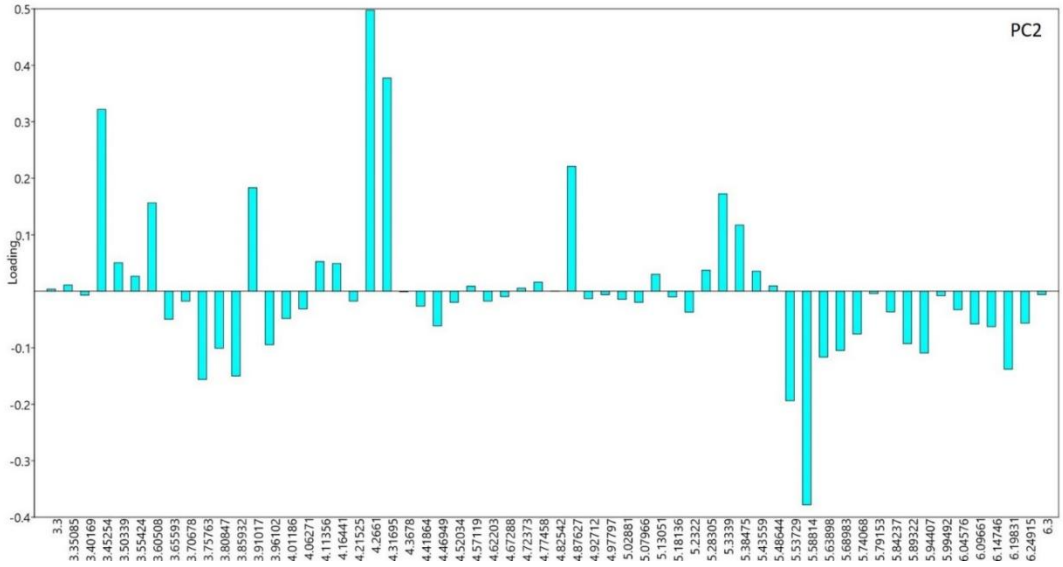


Table J12 : ^{13}C and ^{1}H NMR of 3-(*E*)-laurenyne and β-snyderol ($CDCl_3$, 400 MHz)

3-(*E*)-laurenyne			β-snyderol		
^{13}C	^{1}H	chemical shifts of the multiplets	^{13}C	^{1}H	chemical shifts of the multiplets
142.09	6.19 td	6.23, 6.21, 6.19, 6.17, 6.15	145.56		
131.81	5.54 ddq$^{\emptyset}$	5.55, 5.54, 5.54, 5.52, 5.51, 5.51, 5.49	145.03	5.91 dd	5.95, 5.92, 5.91, 5.88
131.20	5.90 dt	5.93, 5.91, 5.91, 5.89, 5.89, 5.87	117.78	5.22 dd	5.24, 5.24, 5.20, 5.19
128.49	5.65 dm*	5.70, 5.69, 5.68, 5.68, 5.67, 5.66, 5.66, 5.65, 5.64		5.07 dd	5.09, 5.08, 5.06, 5.06
126.77	5.69 m*	5.74, 5.72, 5.72, 5.71, 5.70, 5.70, 5.69, 5.68	109.16	4.92 brs	4.92
111.64	5.57 m$^{\emptyset}$	5.59, 5.59, 5.58, 5.58, 5.57, 5.56, 5.56, 5.55		4.65 brs	4.65
82.20			73.38		
81.72	3.75 dd	3.78, 3.76, 3.75, 3.73	67.41	4.13 dd	4.15, 4.14, 4.12, 4.11
79.06	3.84 ddd	3.86, 3.85, 3.85, 3.84, 3.84, 3.83, 3.83, 3.82	53.14	1.71	
76.26	2.80 d		42.09		
65.00	3.95 ddd	3.98, 3.97, 3.97, 3.96, 3.95, 3.94, 3.94, 3.93	41.25	1.73	
38.12	2.55 m			1.29	
	2.24 dddd		37.46	2.33	
34.80	2.47 m			2.01	
	2,15		35.92	2.25	
34.46	2.97 dtd			2.02	
	2.51 m		28.42	1.17 s	
17.78	1.69 ddd		27.8	1.29 s	
			20.6	1.72-1.50 m	
			16.39	0.83 s	

Figure J13 : Scatter plot and loadingplot (PC1 and PC2) of R-phenotype samples





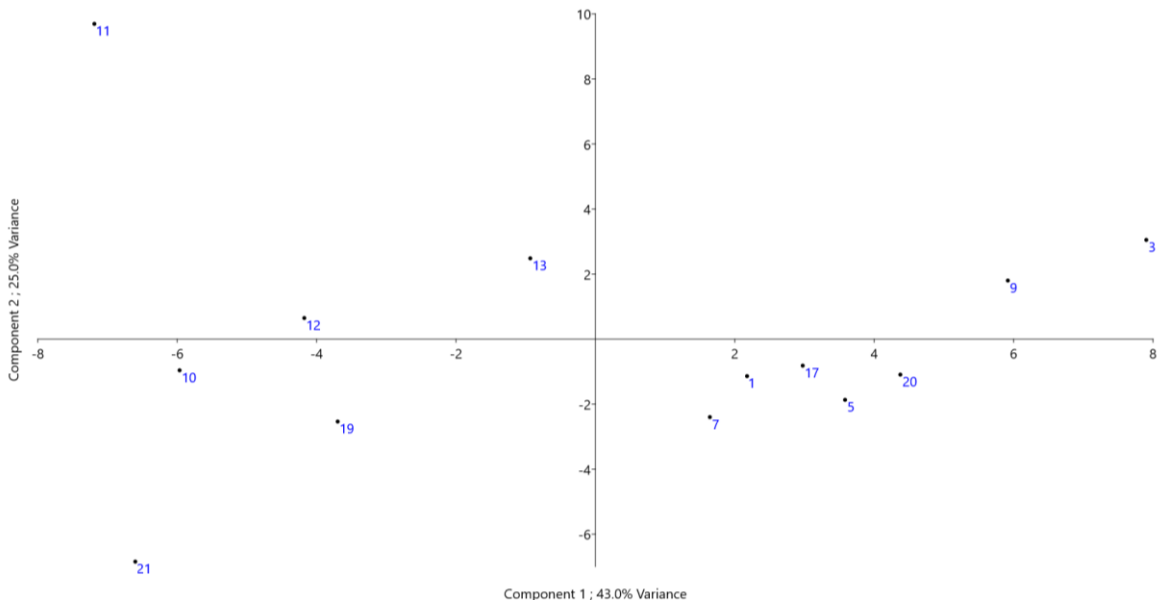
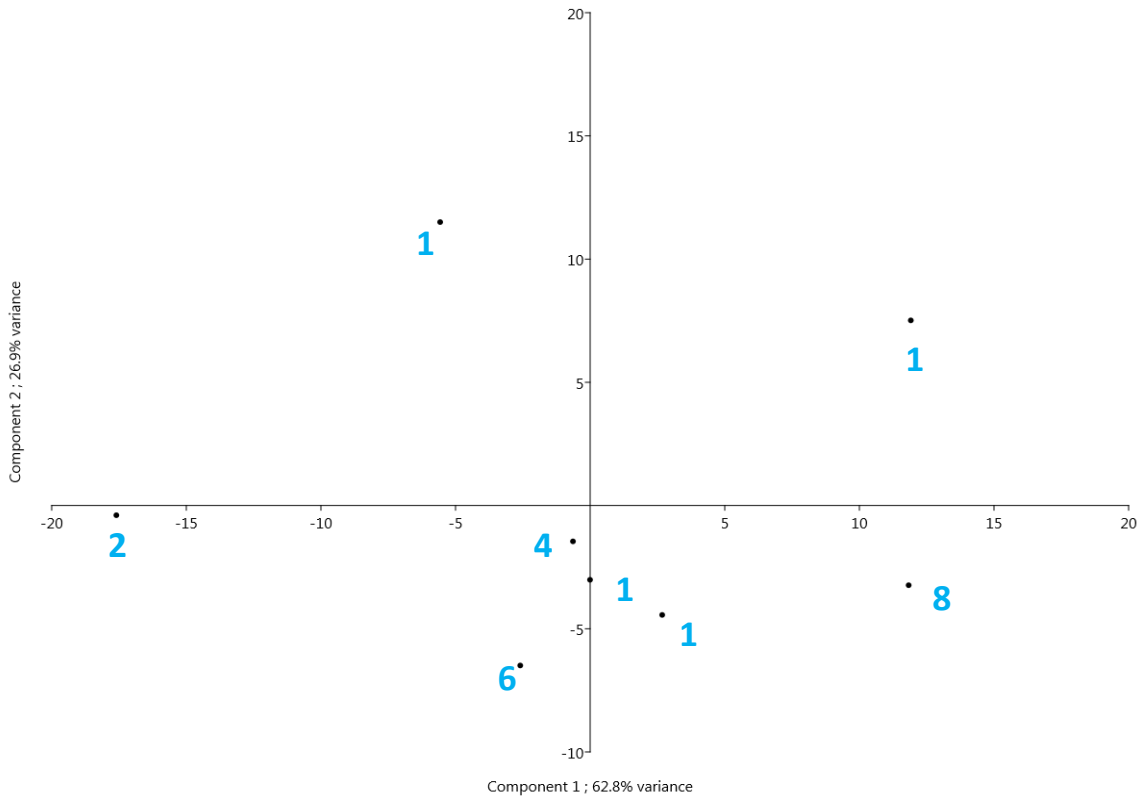


Figure J14 : Scatter plot and loading plot (PC1) of G-phenotype samples



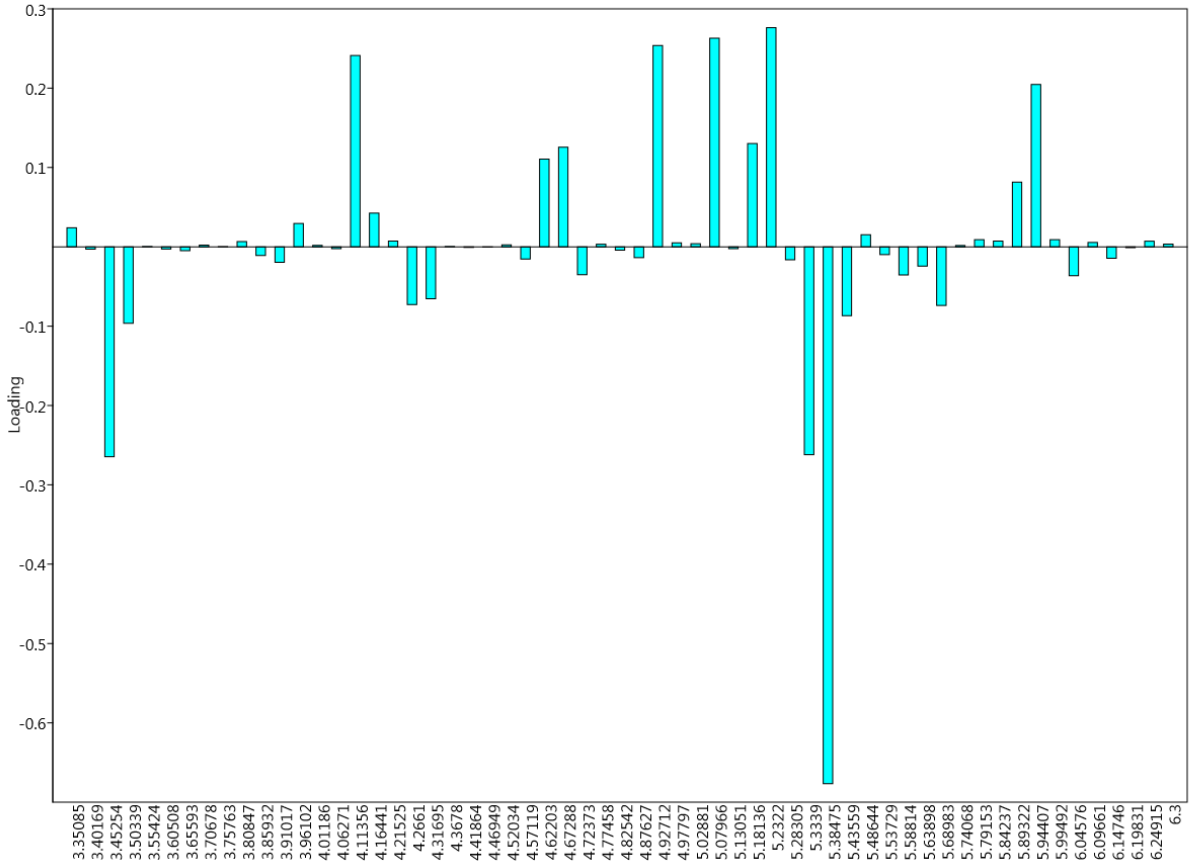
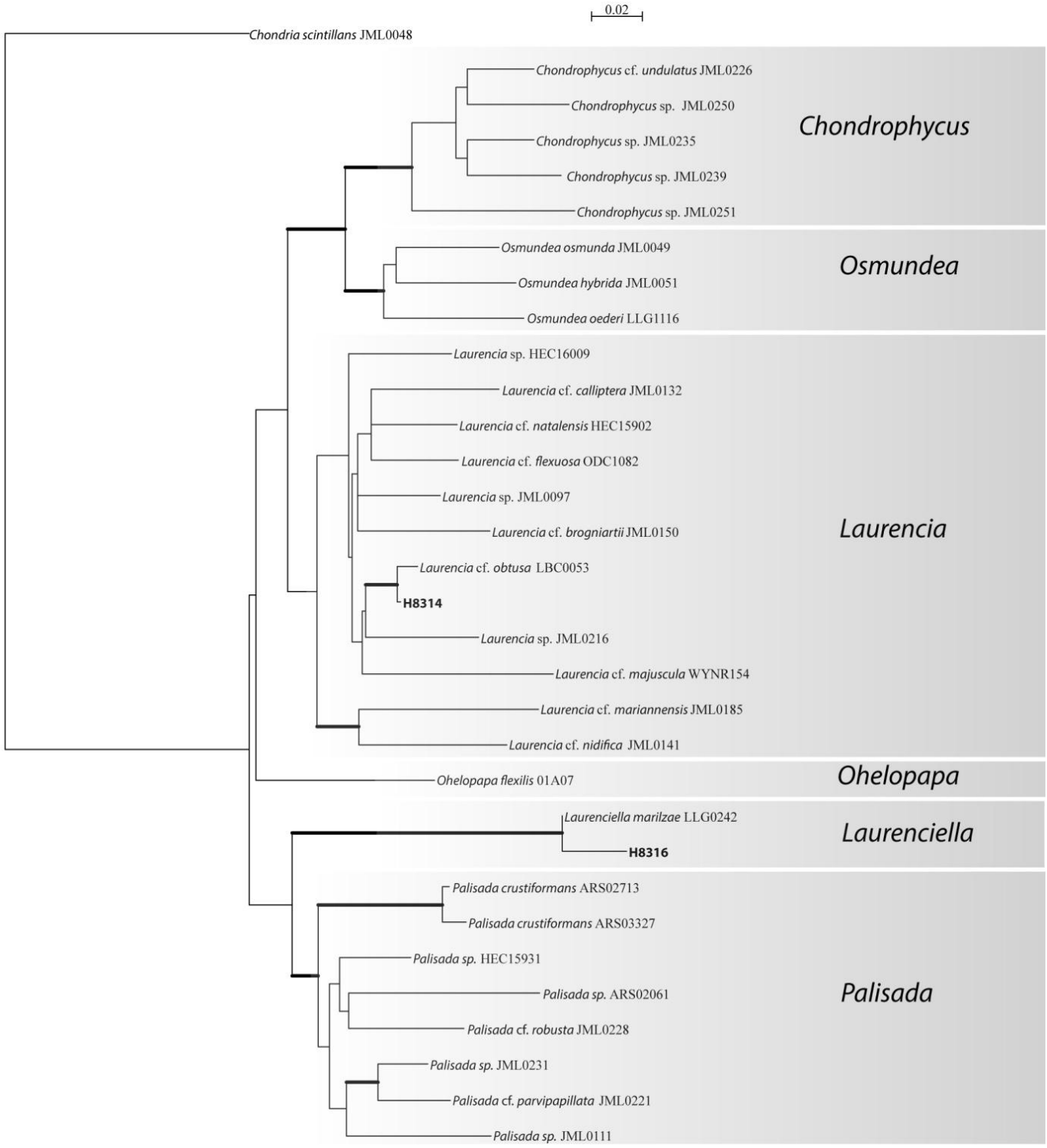
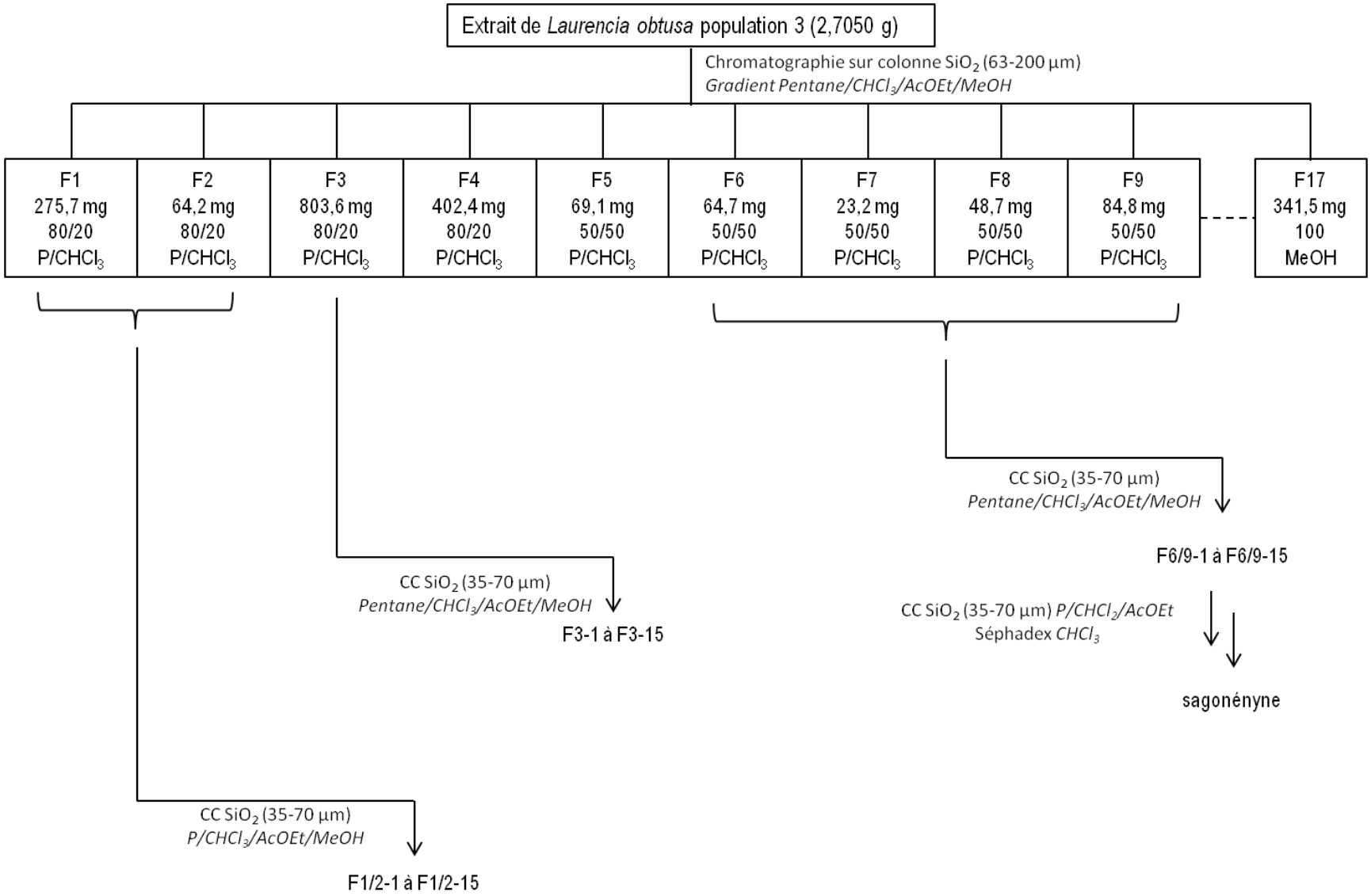

Loading
0.3
0.2
0.1
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
-0.5
-0.6
3.35085
3.40169
3.45254
3.50339
3.55424
3.60508
3.65593
3.70678
3.75763
3.80847
3.85932
3.91017
3.96102
4.01186
4.06271
4.11356
4.16441
4.21525
4.2661
4.31695
4.3678
4.41864
4.46949
4.52034
4.57119
4.62203
4.67288
4.72373
4.77458
4.82542
4.87627
4.92712
4.97797
5.02881
5.07966
5.13051
5.18136
5.2322
5.28305
5.3339
5.38475
5.43559
5.48644
5.53729
5.58814
5.63898
5.68983
5.74068
5.79153
5.84237
5.89322
5.94407
5.99492
6.04576
6.09661
6.14746
6.19831
6.24915
6.3

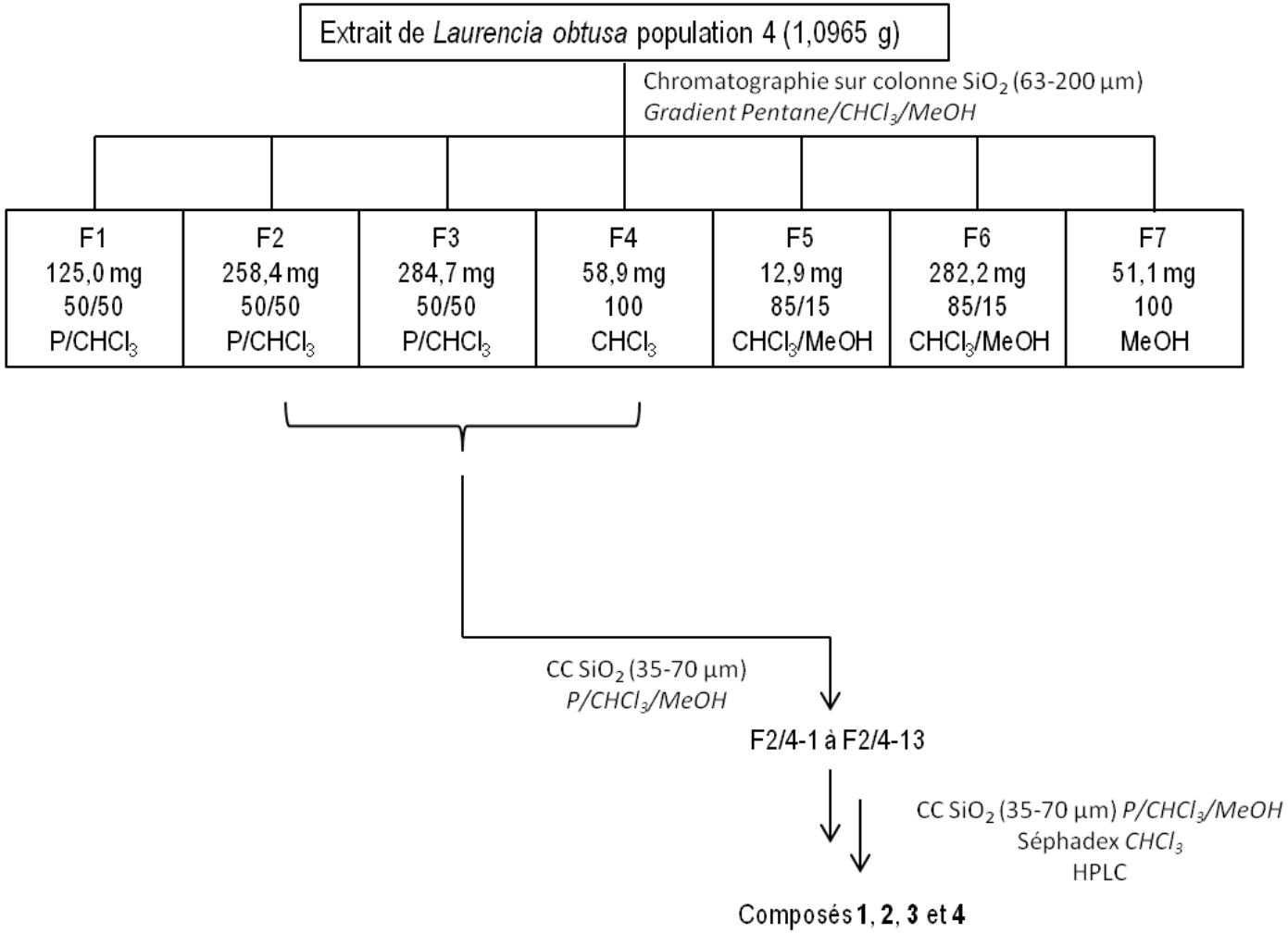
Figure J15 : Phylogenetic tree showing the relationship among members of the *Laurencia* complex. Tree was constructed by raxML. Strongly supported nodes (Bayesian support > 95, ML bootstrap > 80 are indicated in bold).



Annexe K : Fractionnement de l'extrait issu de la population 3



Annexe L : Fractionnement de l'extrait issu de la population 4



RÉSUMÉS

Résumé de l'article 1 « Snyderol derivatives from *Laurencia obtusa* collected in Corsica »

L'étude de la composition chimique d'un extrait de *L. obtusa* récoltée dans le golfe d'Ajaccio a permis d'isoler et de caractériser une nouvelle molécule possédant le squelette du γ-snydérol. Cette molécule a été isolée après une série de fractionnements sur gel de silice et séphadex puis caractérisée par RMN 1D, 2D et spectrométrie de masse.

Six autres composés connus ont été identifiés dans cet extrait grâce à la méthode d'identification de constituants en mélange basée sur la RMN ^{13}C. Celle-ci, élaborée au laboratoire, repose sur l'identification, assistée par ordinateur, des constituants d'un mélange. L'identification est obtenue par comparaison des données spectrales expérimentales avec celles de composés de référence contenues dans des bibliothèques de spectres. Les 6 composés identifiés sont l'α-snydérol et deux de ses dérivés, le β-snydérol, le 8-kéto-10-déhydrobromo-β-snydérol et le 8-hydroxy-β-snydérol.

Le nouveau composé identifié est seulement le deuxième γ-snydérane identifié dans le complexe *Laurencia*. Sa présence, associée à celles d'autres isomères et dérivés des snydérols, est discutée d'un point de vue chimiotaxonomique.

Mots clés : *Laurencia obtusa* ; RMN ; sesquiterpène ; γ-snydérol

Résumé de l'article 2 « Chemical Composition of *Laurencia obtusa* Extract and Isolation of a New C_{15}-Acetogenin »

Une nouvelle acétogénine, nommée sagonényne, a été isolée à partir d'un extrait de *L. obtusa* récoltée sur la côte Ouest de la Corse. Au sein du complexe *Laurencia*, cette acétogénine présente une structure originale puisque c'est l'une des rares à ne posséder qu'un unique cycle tétrahydropyranique. Sa structure a été établie par RMN 1D, 2D, spectrométrie de masse et par comparaison avec les données de la littérature.

L'analyse de l'extrait brut et des fractions de chromatographie a aussi permis d'identifier 23 composés connus supplémentaires par RMN ^{13}C. En plus des sesquiterpènes (snydéranes et brasilanes notamment), qui constituent les composés majoritaires de cet extrait, nous trouvons également des diterpènes, des acétogénines linéaires ou cycliques et des stérols.

L'extrait a été soumis à des tests d'activités biologiques afin de déterminer sa cytotoxicité sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses. Il s'est montré particulièrement actif sur la lignée cellulaire THP-1.

Mots clés : *Laurencia obtusa* ; RMN ^{13}C ; Corse ; activité cytotoxique ; sagonényne

Résumé de l'article 3 « New Metabolites Isolated from a *Laurencia obtusa* Population Collected in Corsica»

L'étude de la composition chimique d'un extrait de *L. obtusa* récoltée à Erbalunga (Cap corse) a permis de mettre en évidence plusieurs molécules qui ne sont pas présentes dans les bibliothèques de données (RMN ^{13}C) constituées au laboratoire. Après fractionnement, nous avons pu isoler et caractériser trois nouvelles molécules : deux acétogénines et un diterpène. L'analyse structurale de ces composés a été réalisée par RMN 1D, 2D et par spectrométrie de masse.

Les deux acétogénines identifiées partagent le même système cyclique à savoir un tétrahydropyrane lié à un tétrahydrofurane par un méthylène. Les deux composés diffèrent uniquement par leur partie terminale : un bromoallène pour le composé majoritaire de l'extrait, et un aldéhyde α-β insaturé pour l'autre. Il s'agit de la seconde acétogénine possédant une fonction aldéhyde décrite dans le complexe *Laurencia*. Le 3ème composé isolé constitue le premier diterpène possédant le squelette 19(4→3)*abeo*-labdane isolé à partir d'une population de *Laurencia*.

Par ailleurs, cinq autres composés ont également été identifiés en utilisant la méthodologie d'analyse développée par l'université de Corse et basée sur la RMN ^{13}C: la sagonényne, le laurène, l'α-bromocuparène, le microcladallène A et le β-snydérol. La structure des deux nouvelles acétogénines identifiées étant très proche de celle de la sagonényne précédemment identifiée dans une population collectée dans l'Ouest de la Corse, nous avons également proposé une voie de biosynthèse commune à ces trois métabolites.

Mots clés : *Laurencia obtusa* ; RMN ; non terpénique ; C_{15}-acétogenine ; *abeo*-labdane

Résumé de l'article 4 « Discrimination and Characterization of Two Mediterranean Species from the *Laurencia* Complex (Rhodomelacea) Using an NMR-Based Metabolomic Approach»

Au sein du complexe *Laurencia,* la détermination du genre et de l'espèce d'une population s'avère difficile. Le barcoding, associé à des observations phénotypiques, sont nécessaires pour différencier des espèces. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à deux populations du complexe *Laurencia*, qui présentent des critères phénotypiques caractéristiques, pour réaliser une étude métabolomique basée sur la RMN ^{1}H.

Ainsi, 21 populations ont été récoltées afin d'évaluer l'influence temporelle et géographique sur leur composition chimique. Les données obtenues à partir des spectres RMN ^{1}H, après traitement statistique, ont démontré une nette séparation des échantillons en deux groupes. Les études moléculaires, effectuées en parallèle, ont confirmé cette séparation et permis d'identifier les deux espèces comme étant *Laurencia obtusa* et *Laurenciella* sp.

De plus, les métabolites secondaires responsables de la séparation en deux groupes ont été identifiés par RMN ^{13}C. L'association de la RMN ^{1}H et ^{13}C lors d'une approche métabolomique s'avère alors particulièrement efficace, en complément du barcoding, pour discriminer deux espèces.

Mots clés : Métabolomique ; fingerprint ; RMN ^{1}H ; *Laurencia obtusa* ; *Laurenciella* sp. ; Corse

Résumé vulgarisé

Les filières PAM et cosmétiques se sont fortement développées en région Corse durant la dernière décennie. La production d'huiles essentielles a en particulier rencontré un grand succès avec des débouchés dans les domaines de la parfumerie, de l'aromathérapie et des cosmétiques. En revanche, les ressources végétales d'origine marine présentes sur le pourtour de l'île sont mal connues et inexploitées malgré la grande biodiversité qui caractérise la mer Méditerranée. Dans ce contexte, notre objectif était double : d'une part il s'agissait de déterminer la composition chimique de plusieurs populations d'algues rouges appartenant au complexe *Laurencia* ; d'autre part, nous souhaitions apporter des éléments de réponse quant à la variabilité chimique observée entre les différentes populations. La nature des composés chimiques synthétisés par l'algue peut en effet apporter des indications complémentaires aux méthodes classiques d'identification de ces espèces.

La première partie concerne donc l'analyse de la composition chimique des extraits obtenus à partir de quatre populations de *Laurencia obtusa* récoltées en Corse. Nous avons ainsi pu identifier 46 composés précédemment cités dans des espèces appartenant au complexe *Laurencia*. Cinq molécules nouvelles ont également été identifiées. Celles-ci possèdent des structures originales pour le complexe *Laurencia* et sont susceptibles d'être considérées comme des marqueurs chimiques des populations récoltées en Corse.

La deuxième partie est consacrée aux études de variabilité chimique au sein du complexe *Laurencia*. En effet, la diversité et l'originalité des molécules identifiées dans chacune des quatre populations nous a conduits à réfléchir sur la synthèse de ces composés. Nous avons donc étudié la variabilité chimique de deux populations du complexe et mis en évidence qu'il était possible de les discriminer sur la base de leur composition chimique.

Riassuntu vulgarizatu

I settori di è piante aromatiche è medicinale (PAM) è di i cusmetici sò stati assai più avvalurati durante l'ultimu decenniu. A produzione d'olii essenziali hà particularmente cunnisciutu un successu maiò, incù sbocchi in i campi di a prufumeria, di l'aromaterapia è di i cusmetici. Eppuru è risorse vegetale d'urighjine marina scuntrate à u circondu di l'isula di Corsica stanu sempre pocu cunnisciute è non sfruttate, malgradu a grande diversità caratteristica du u Mediterraniu. Accussì u nostru scopu era doppiu : prima ci vulia à ditirminà a cumposizione chimica di parechje populazioni d'alghe rosse classificate in u cumplessu *Laurencia*; ma vuliamu ancu arrecà una prima risposta per ciò chì tocca a à variabilità chimica usservata tra e sfarrente populazione. Infatti, a chimiotassunumia costituisce un'antru mediu cumplementariu à quelli più usati (barcoding ADN) quandu è relazioni filogenetiche stanu insufficiente per permette a discriminazione di spezie classificate in u cumplessu.

A prima parte cumpiglia dunque l'analisi di a cumposizione chimica d'estratti ottenuti da quattru populazione di *Laurencia obtusa* racolte in Corsica. Avemu cusì pussutu identificà 46 cumpunenti chi erani digià stati discritti in spezie classificate in u cumplessu *Laurencia*. Cinque molecule nuvelle sò state altresi identificate. E apprisentanu strutture uriginale per u cumplessu *Laurencia*, ciò che c'inciterebbe à pruponele cume marcatori chimichi di è populazioni racolte in Corsica.

A seconda parte cumpiglia i studi di variabilità chimica dintra u cumplessu *Laurencia*. Infatti, a diversità e l'uriginalità di è molecule identificate hanu instigatu una riflessione annantu a sintesi di questi cumpunenti. Avemu dunque studiatu a variabilità chimica di duie populaziane di u cumplessu e avemu fattu a prova ch'ellu era pussibule di discrimininarle appughjendusì annantu a cumposizione chimica.

Abstract

In recent years, natural products obtained from Corsican endemic plants have become increasingly popular in the fields of perfumery, aromatherapy and cosmetics. On the other hand, marine resources of the island are not sufficiently exploited despite the large biodiversity of the Mediterranean Sea. In this context, the aim of our study was twofold. First, it was to study the chemical composition of several red alga populations belonging to the *Laurencia* complex, in adapting the analytical strategy to the complexity of the mixture. Secondly, we wanted to contribute to a better understanding of the chemical variability observed between the different populations. Indeed, chemotaxonomy can be considered as a useful complementary tool to classical methods (DNA barcoding) for the discrimination of *Laurencia* species, which phylogenetic relations are complex.

The first part concerns the chemical composition of 4 *Laurencia obtusa* populations collected in Corsica. Extracts and fractions obtained after silica gel chromatographies were analyzed by ^{13}C NMR. A total of 46 known compounds were directly identified in mixture by comparison with literature spectra data. This study also allowed the identification and characterization of 5 new metabolites by means of 1D and 2D NMR as well as mass spectrometry. Therefore we isolated one γ-snyderane, one diterpene exhibiting the 19(4→3)*abeo*-labdane skeleton, together with 3 C_{15} acetogenins sharing the same tetrahydropyran ring. All of these new metabolites possess an uncommon skeleton for the *Laurencia* complex, giving to Corsican populations some specific feature.

The second part deals with the chemical variability and metabolomic studies of the *Laurencia* complex. Indeed, the diversity and originality of the molecules identified in each population led us to focus on chemotaxonomic studies of *Laurencia* species. Thus, we were able to develop a method of discrimination of 2 *Laurencia* species by combining ^{1}H and ^{13}C NMR and we were also able to highlight metabolites responsible of this discrimination.

Keywords : Extracts ; ^{13}C NMR ; Mediterranean Sea ; *Laurencia obtusa*

Résumé

Les filières PAM et cosmétiques se sont fortement développées en région Corse durant la dernière décennie. La production d'huiles essentielles a en particulier rencontré un grand succès avec des débouchés dans les domaines de la parfumerie, de l'aromathérapie et des cosmétiques. En revanche, les ressources végétales d'origine marine présentes sur le pourtour de l'île sont mal connues et inexploitées malgré la grande biodiversité qui caractérise la mer Méditerranée. Dans ce contexte, notre objectif était double : d'une part il s'agissait de déterminer la composition chimique de plusieurs populations d'algues rouges appartenant au complexe *Laurencia*, en adaptant la stratégie analytique en fonction de la complexité du mélange ; d'autre part, nous souhaitions apporter des éléments de réponse quant à la variabilité chimique observée entre les différentes populations. La chimiotaxonomie peut en effet s'avérer être un outil complémentaire aux méthodes classiques (barcoding ADN) dans la discrimination des espèces du complexe, dont les relations phylogénétiques sont très complexes.

La première partie concerne donc l'analyse de la composition chimique des extraits obtenus à partir de quatre populations de *Laurencia obtusa* récoltées en Corse. Les extraits et fractions obtenues après chromatographie sur colonne ouverte de silice ont été analysés par RMN ^{13}C. Au total, 46 composés connus ont été directement identifiés en mélange par comparaison avec les données spectrales issues de la littérature. Cette étude a également permis d'identifier et de caractériser (RMN 1D, 2D et spectrométrie de masse) 5 molécules nouvelles dans les différentes populations. Il s'agit d'un snydérane, d'un diterpène possédant le squelette 19(4→3)*abeo*-labdane, ainsi que de trois acétogénines partageant le même cycle tétrahydropyranique. Ces nouveaux constituants possèdent des structures peu ou pas décrites dans le complexe *Laurencia* issues probablement de voies de biosynthèses spécifiques et confèrent une originalité aux populations récoltées en Corse.

La deuxième partie du mémoire est consacrée aux études de la variabilité chimique au sein du complexe *Laurencia* avec une approche métabolomique. En effet, la diversité et l'originalité des molécules identifiées dans chacune des quatre populations nous a conduits à examiner les relations chimiotaxonomiques. Ainsi, nous avons, par combinaison de la RMN ^{1}H et du ^{13}C, caractérisé la discrimination de deux espèces du complexe, en mettant en évidence les métabolites responsables de cette différenciation.

Mots clés : Extrait ; RMN ^{13}C ; Méditerranée ; *Laurencia obtusa*