

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention Océanologie Biologique

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Camille Jégou

Préparée au Laboratoire d'Écophysiologie et de
Biotechnologie des Halophytes et des Algues Marines
(EA 3877) et au Laboratoire des Sciences de
l'Environnement Marin (UMR 6539)

Étude du genre *Cystoseira* des côtes bretonnes : taxinomie, écologie et caractérisation de substances naturelles

Thèse soutenue le 14 novembre 2011

devant le jury composé de :

Mme Florence Rousseau, Maître de conférences
Université Pierre et Marie Curie / MNHN - Rapporteur

M. Alan Critchley, Professeur
Vice Président Recherche Acadian Seaplants Ltd - Rapporteur

M. Gérard Culioli, Maître de conférences
Université du Sud Toulon-Var - Examineur

M. Dominique Davoult, Professeur des universités
Université Pierre et Marie Curie / SBR - Examineur

M. Eric Deslandes, Professeur des universités
Université de Bretagne Occidentale - Examineur

Mme Valérie Stiger-Pouvreau, Maître de conférences
Université de Bretagne Occidentale - Directrice de thèse

SOMMAIRE

Sommaire	1
Avant-propos	7
1 Contexte scientifique.....	8
2 Collaborations	8
3 Autres activités pendant la thèse	9
4 Diffusion scientifique.....	10
5 Organisation du manuscrit	10
Introduction générale.....	11
1 La biodiversité, nouvel enjeu politique	13
2 La régression des Fucales de l'estran breton.....	14
3 La régression des Fucales des côtes méditerranéennes	15
4 Le genre <i>Cystoseira</i> en Bretagne	17
5 La taxinomie et la classification, axes de recherches majeurs	20
6 La recherche de substances naturelles marines	21
6.1 Développement et objectifs	21
6.2 Métabolites secondaires des macroalgues	23
7 Contexte scientifique de l'étude	25
8 Objectifs du manuscrit	26
Chapitre I.....	28
Cadre environnemental et biologique	28
1 Environnement marin et sites d'étude	29
1.1 Subdivisions du domaine océanique.....	29
1.2 Lumière et peuplements de macroalgues.....	30
1.3 Les marées, phénomène structurant l'étage médiolittoral	33
1.4 Spécificités géomorphologiques et climatiques de la Bretagne	35
1.5 Caractérisation de l'étage médiolittoral.....	37
1.6 Sélection des sites d'études	41
1.6.1 La pointe de Penmarc'h.....	42
1.6.2 La plage du Trez-Hir à Plougonvelin	46
1.6.3 L'anse de Porsmeur à Porspoder	47

1.6.4	La station de Portsall à Ploudalmézeau	48
2	Modèle biologique.....	49
2.1	Les origines multiples des algues	49
2.2	Présentation du genre <i>Cystoseira</i>	51
2.2.1	Origines	51
2.2.2	Systématique	51
2.2.3	Diversité	52
2.2.4	Répartition mondiale et éléments de biologie	52
2.2.5	Morphologie	53
2.2.6	Reproduction	54
2.2.7	Critères d'identification.....	55
2.3	Présentation des espèces étudiées.....	56
2.3.1	<i>Cystoseira baccata</i> (S.G. Gmelin) P.C. Silva	56
2.3.2	<i>Cystoseira fœniculacea</i> (Linnaeus) Greville	59
2.3.3	<i>Cystoseira humilis</i> Schousbœ ex Kützing.....	60
2.3.4	<i>Cystoseira nodicaulis</i> (Withering) M. Roberts	61
2.3.5	<i>Cystoseira tamariscifolia</i> (Hudson) Papenfuss	62
2.4	Complément d'information pour la discrimination des 5 espèces	64
	Chapitre II	66
	Taxinomie et systématique des espèces du genre <i>Cystoseira</i> en Bretagne	66
1	Introduction	67
1.1	Historique taxinomique et systématique au sein du genre <i>Cystoseira</i>	67
1.1.1	Observations morphologiques et cytologiques	67
1.1.2	La classification chimiotaxinomique	72
1.1.3	L'apport de la phylogénie moléculaire.....	74
1.2	Objectifs de l'étude taxinomique au sein du genre <i>Cystoseira</i>	76
2	Matériels et méthodes.....	78
2.1	Discrimination des espèces par chromatographie sur couche mince	78
2.2	Étude de taxinomie générale du genre <i>Cystoseira</i> en Bretagne	79
2.2.1	Collecte et préparation des échantillons.....	79
2.2.2	Empreintes chimiques par ¹ H RMN HR-MAS	80
2.2.3	Empreintes chimiques par LC-ESI-MS ⁿ	85
2.2.4	Analyses phylogénétiques	89
2.3	Purification et caractérisation de chimiomarqueurs	93
3	Résultats	95

3.1	Discrimination des espèces par chromatographie sur couche mince	95
3.2	Étude de taxinomie générale du genre <i>Cystoseira</i> en Bretagne	96
3.3	Isolement du chimiomarqueur de <i>Cystoseira nodicaulis</i>	111
4	Discussion	120
4.1	Discrimination des espèces.....	120
4.2	Classification chimique des espèces.....	122
4.3	La Classification chimique face à la classification phylogénétique	124
4.4	La nouvelle nomenclature des cystoseires de Bretagne	129
4.5	Pertinence des critères morphologiques	130
4.6	Les terpènes, au-delà de simples marqueurs chimiotaxinomiques.....	130
5	Conclusion.....	132

Chapitre III..... 133

Distribution, biologie des populations et adaptations pigmentaires des espèces de *Cystoseira* 133

1	Introduction	134
1.1	Distribution des cystoseires sur l'estran	134
1.2	Évolution spatio-temporelle des populations	136
1.3	Adaptation pigmentaire et distribution sur l'estran	137
1.3.1	Variabilité de la quantité de lumière reçue sur l'estran.....	137
1.3.2	Appareil pigmentaire des macroalgues brunes.....	140
1.4	Objectifs de l'étude écologique du genre <i>Cystoseira</i>	145
2	Matériels et méthodes.....	146
2.1	Étude de la distribution.....	146
2.2	Suivi écologique des populations	147
2.3	Quantification des principaux pigments	149
2.3.1	Prélèvements et conditionnement des échantillons.....	149
2.3.2	Extraction des pigments et préparation avant dosage	150
2.3.3	Séparation et dosage par Chromatographie Liquide Haute Performance	151
2.4	Analyse statistique des données	153
3	Résultats	154
3.1	Distribution et évolution spatio-temporelle des populations.....	154
3.1.1	Étude principale.....	154
3.1.2	Éléments complémentaires : variabilité saisonnière de la distribution	184
3.2	Variabilité inter- et intraspecificque des principaux pigments.....	187
4	Discussion	202
4.1	La distribution des cystoseires, une constante à travers les saisons	202

4.2	Différentes répartitions, différentes stratégies.....	206
4.3	La saisonnalité, un caractère spécifique	209
4.4	Analyse quantitative des pigments en lien avec la distribution.....	210
5	Conclusion.....	212

Chapitre IV 213

Phlorotannins du genre *Cystoseira*..... 213

1	Introduction	214
1.1	Présentation générale des phlorotannins.....	214
1.2	Méthodes d'analyse	216
1.3	Rôles écologiques	217
1.4	Sources de variabilité des teneurs en phlorotannins	218
1.5	Perspectives de valorisation.....	218
1.6	Objectifs de l'étude des phlorotannins du genre <i>Cystoseira</i>	219
2	Matériels et méthodes.....	221
2.1	Variabilité des teneurs en phlorotannins	221
2.1.1	Stratégie d'échantillonnage et conditionnement	221
2.1.2	Extraction des phlorotannins.....	222
2.1.3	Choix de la méthode de quantification des composés phénoliques	222
2.1.4	Purification partielle des extraits bruts.....	223
2.1.5	Dosage des composés phénoliques par la méthode de Folin-Ciocalteu.....	225
2.1.6	Analyse statistique des données	226
2.2	Caractérisation structurale des phlorotannins du genre <i>Cystoseira</i>	226
2.2.1	Échantillonnage	226
2.2.2	Extraction des phlorotannins.....	227
2.2.3	Purification et fractionnement de l'extrait	227
2.2.4	Analyses par résonance magnétique nucléaire	231
2.2.5	Détermination de l'activité antiradicalaire des fractions purifiées.....	231
2.3	Étude du pool de phlorotannins chez <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	233
2.3.1	Identification du phloroglucinol.....	233
2.3.2		234
2.3.3	Variabilité intra-individuelle	235
2.3.4	Variabilité saisonnière.....	237
3	Résultats	238
3.1	Détermination des teneurs en phlorotannins	238
3.1.1	Choix du protocole d'extraction-purification.....	238

3.1.2	Variabilité des teneurs en composés phénoliques	246
3.2	Caractérisation structurale des phlorotannins.....	249
3.2.1	Efficacité du protocole de purification.....	249
3.2.2	Caractérisation des fractions purifiées par RMN 2D ^1H - ^{13}C (HMBC).....	254
3.2.3	Détermination de l'activité antiradicalaire des fractions purifiées.....	259
3.3	Étude du phloroglucinol chez <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	261
4	Discussion	271
4.1	Détermination des teneurs en phlorotannins	271
4.1.1	Optimisation du protocole de purification des extraits bruts	271
4.1.2	Teneurs spécifiques	273
4.1.3	Variabilité saisonnière.....	274
4.2	Caractérisation structurale des phlorotannins.....	277
4.2.1	Efficacité du protocole de purification.....	277
4.2.2	Familles de phlorotannins caractérisées par rmn 2D	278
4.2.3	Activité antiradicalaire des phlorotannins.....	279
4.3	Étude du phloroglucinol chez <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	280
5	Conclusion.....	281
Conclusion générale		283
1	Résultats majeurs.....	284
2	Perspectives	287
Bibliographie.....		289
Résumé vulgarisé.....		305

AVANT-PROPOS

1 CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été menés au Laboratoire d'Écophysiologie et de Biotechnologies des Halophytes et des Algues Marines (LÉBHAM, EA 3877), et se sont conclus au sein du Laboratoire de l'Environnement Marin (LEMAR, UMR 6539). Ces deux unités, rattachées à l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), s'inscrivent dans la thématique marine développée à l'Université de Bretagne Occidentale (UBO).

Cette thèse de doctorat de l'École Doctorale des Sciences de la Mer (EDSM, ED n°156) a été dirigée par Valérie Stiger-Pouvreau, et a été rendue possible grâce à l'attribution, d'octobre 2008 à septembre 2011, d'une allocation de recherches du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Les programmes de recherches BIOTECMAR et Phlorotann-ING en ont assuré le financement technique, permettant notamment investissements et maintenance en matériel, ainsi que l'achat de consommables.

2 COLLABORATIONS

L'étude chimiotaxinomique du Chapitre II a été soutenue financièrement par les programmes BIOTECMAR et Phlorotann-ING. Les résultats ont été obtenus en collaboration avec Gérard Culioli (laboratoire MAPIEM, Université du Sud Toulon-Var), pour l'analyse des extraits lipophiles par LC-MS et pour la purification du terpène de *Cystoseira nodicaulis* (sous la forme d'un séjour de recherche au laboratoire MAPIEM en 2011), et avec Nelly Kervarec et Gaëlle Simon (service de RMN-RPE de l'Université de Bretagne Occidentale) pour les analyses HRMAS.

L'étude d'écologie présentée au Chapitre III a été également soutenue financièrement par le programme BIOTECMAR. Les travaux d'analyse de la composition pigmentaire des cystoseires ont été rendus possibles grâce à Solène Connan, alors A.T.E.R. à l'Université de Bretagne Occidentale, qui m'a formé sur l'utilisation du système de Chromatographie Liquide Haute Performance dans une optique de quantification des pigments, et sur le protocole expérimental exposé dans ce chapitre (depuis l'extraction jusqu'au dosage).

Les résultats présentés dans le Chapitre IV ont été obtenus grâce au soutien financier du programme Phlorotann-ING et à de nombreuses collaborations. Le protocole de purification des phlorotannins s'est inspiré du travail de post-doctorat de Stéphane Cérantola (dirigé alors par Erwan Ar Gall, enseignant-chercheur au Lémarr) et qui dirige dorénavant le Service de RMN-RPE de l'Université de Bretagne Occidentale. Stéphane Cérantola s'est également chargé des acquisitions des spectres de RMN-2D. Le protocole avancé de purification a été optimisé en collaboration avec Florian Lelchat (actuellement doctorant à Ifremer). Les analyses en RMN-1D d'extraits et de fragments de *Cystoseira tamariscifolia* ont été réalisées par Nelly Kervarec et Gaëlle Simon. Le protocole modifié du DPPH a été élaboré en collaboration avec Mélanie Hupel (alors doctorante au Lébham).

3 AUTRES ACTIVITÉS PENDANT LA THÈSE

Durant cette thèse, j'ai pu suivre plusieurs formations, notamment un séminaire concernant l'analyse de spectres RMN à deux dimensions qui était dispensée par le GDR Biochimar à Nantes (2010). Cette formation m'a permis de m'initier à la caractérisation structurale de substances naturelles.

En outre, parallèlement à mes activités de recherche, j'ai effectué un monitorat d'initiation à l'enseignement supérieur au sein de l'U.F.R. Sciences et Techniques de l'UBO, et à l'IUEM, où j'ai assuré des séances de travaux pratiques en phycologie, phylogénie, et botanique. A l'issue de ce monitorat, il m'a été demandé de produire une synthèse de mes travaux de recherches à destination du grand public. Considérant l'exercice intéressant et au vu de la variété des champs disciplinaires abordés dans cette thèse, je la présente à la fin de ce manuscrit. Elle restitue fidèlement, à mon sens, la philosophie de mes travaux.

4 DIFFUSION SCIENTIFIQUE

Les résultats de l'étude chimiotaxinomique générale ont été présentés oralement au cours de l'édition 2009 de la *European Society for Marine Biotechnology*. Les résultats ont également fait l'objet d'une publication dans la revue internationale *Talanta* (volume 83, année 2010), sous le titre « LC/ESI-MSⁿ and ¹H HR-MAS NMR analytical methods as useful taxonomical tools within the genus *Cystoseira* C. Agardh (Fucales, Phaeophyceae) ». D'autres manuscrits ont été préparés pendant cette thèse, et ils seront présentés dans les chapitres concernés (références bibliographiques comprises).

5 ORGANISATION DU MANUSCRIT

Ce manuscrit de thèse comprend une introduction générale qui présente les enjeux de ce travail de thèse, un chapitre de présentation générale, trois chapitres détaillant et discutant les résultats obtenus. La plus grande partie de ces résultats se présente sous forme de manuscrits publiés ou à soumettre. Après une conclusion générale, ce manuscrit de thèse présente les références bibliographiques citées dans le texte, et se conclut par un résumé vulgarisé des travaux.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La Bretagne est une terre marquée par la rigueur des éléments, si malmenée que souvent la végétation qui s'y installe n'a d'autre choix que de courber l'échine face à la puissance des vents d'Ouest. Son littoral dévoile à perte de vue des rochers aux arêtes saillantes, taillées par l'Océan Atlantique et qui inspirent ce sentiment de méfiance et de respect que partagent les gens de mer en contemplant l'océan.

Cette terre immédiatement austère, froide et sauvage, offre à qui sait la découvrir une mosaïque infinie de teintes. Depuis l'ocre des lichens ponctuant le gris moucheté du granit jusqu'au pourpre des étoiles de mer échouées sur le sable blanc, c'est la vie, à travers toutes ses formes, qui donne à la Bretagne ses couleurs chaudes.

Dans les chaos rocheux que la mer vient lécher deux fois chaque jour se cache une végétation luxuriante. Ce lieu entre terre et mer, que l'on appelle estran, est le point d'ancrage d'un écosystème d'une grande richesse. Les espèces majeures que l'on peut y observer sont des algues brunes, apparentées aux fucus et aux laminaires. A marée haute, elles forment d'immenses forêts sous-marines et dès que la mer se retire, elles reposent en un tapis, masquant presque en totalité leur substrat.

A l'opposé, les cystoseires sont d'autres algues brunes dont les populations sont abondantes dans les niveaux profonds, et qui restent bien souvent cantonnées sur l'estran à des anfractuosités rocheuses. Leur rôle au sein de cet écosystème n'en demeure pas moins crucial. En considérant l'attention limitée prêtée à ces algues en Bretagne, qui contraste de façon saisissante avec l'intérêt qui leur est porté sur le pourtour méditerranéen, et devant l'étendue du potentiel de recherches associé à ces algues, mon travail de thèse s'est intéressé à l'étude du genre *Cystoseira* en Bretagne.

Dans les paragraphes à suivre, nous décrivons d'abord les étapes majeures de l'intégration de la dimension « biodiversité » dans la politique de l'État français et, dans un deuxième temps, nous proposons un état des lieux des connaissances sur la dynamique de quelques peuplements de macroalgues, d'abord sur le littoral breton, au travers de la régression constatée des grandes ceintures d'algues brunes, puis sur les côtes méditerranéennes françaises, avec le recul des espèces de cystoseires. Enfin, les espèces de *Cystoseira* établies en Bretagne sont brièvement présentées, et le contexte scientifique ainsi que les thématiques abordées dans ce travail de thèse sont explicités.

1 LA BIODIVERSITÉ, NOUVEL ENJEU POLITIQUE

En ratifiant la Convention sur la Diversité Biologique en 1994, l'État français s'est engagé à mettre en œuvre des mesures de protection, de gestion et de restauration de ses habitats remarquables. Cette décision s'inscrit dans une stratégie internationale en faveur de la biodiversité, initiée par le Sommet de la Terre de Rio de Janeiro de 1992 et qui s'est déclinée à l'échelle européenne via l'établissement de la Stratégie Paneuropéenne pour la Protection de la Diversité Biologique et Paysagère.

Même si la volonté affichée de freiner l'érosion de la biodiversité à l'échéance 2010 ne s'est traduite que par une amélioration partielle des indicateurs écologiques, cette démarche témoigne d'un intérêt nouveau de la société pour les enjeux environnementaux. Aujourd'hui, l'Union Européenne apparaît comme un moteur essentiel et coordonne de nombreuses actions, au travers de :

- La Directive Habitats (92/43/CEE), qui fournit le cadre juridique à la constitution du réseau Natura 2000, établissant ainsi des Zones de Protection Spéciales pour diverses espèces d'oiseaux et des Zones Spéciales de Conservation sélectionnées sur la valeur écologique des habitats et des espèces animales et végétales.
- La Directive-Cadre sur l'Eau (DCE, 2000/60/CE), qui vise à atteindre un « bon état » des masses d'eau (y compris d'un point de vue écologique) et qui confie aux États-membres la mise en œuvre des programmes de surveillance des secteurs concernés.
- La Directive-Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM, 2008/56/CE), qui se situe dans le prolongement de la Directive-Cadre pour l'Eau. Elle a pour but de déterminer l'état actuel des zones côtières (sur les plans physiques, chimiques et écologiques), de caractériser leur santé écologique et, le cas échéant, d'initier une série de mesures visant à rétablir le bon état écologique.

L'application de ces directives doit s'appuyer sur des inventaires faunistiques et floristiques, des suivis temporels des milieux concernés et la détermination de leur état écologique. En Bretagne, suite au naufrage du pétrolier Erika en 1999, les acteurs scientifiques se sont rassemblés autour d'un projet visant à déterminer un état initial des peuplements benthiques, afin de mieux en cerner les évolutions en cas de pollution accidentelle. De cette démarche est né le Réseau Benthique (Rebent), coordonné par l'Institut

Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer), dont les actions permettent également de répondre aux exigences de la DCE et de la DCSMM.

Le Rebent est opérationnel depuis 2003 et ses premiers résultats ont été rendus publics en 2006. Il oriente une grande partie de ses efforts vers l'étude de l'estran, et les premiers éléments publiés ont montré un recul net des populations de macroalgues brunes sur certains secteurs de Bretagne, en moins de dix ans.

2 LA RÉGRESSION DES FUCALES DE L'ESTRAN BRETON

Depuis 2004, le Rebent déploie une stratégie multiple pour caractériser la dynamique des grands peuplements de macroalgues côtières que sont les populations de *Pelvetia canaliculata*, *Fucus spp.*, *Ascophyllum nodosum* et *Laminaria spp.* (Derrien-Courtet *et al.*, 2010). Un travail de recensement et de numérisation des données bibliographiques a d'abord été mené, afin de rassembler les données préexistantes. Puis, l'état des populations de macroalgues a été déterminé par deux approches :

1. Une méthode sectorielle fondée sur la télédétection par le satellite Spot. Par analyse du spectre de la lumière renvoyée par les zones côtières, il est possible de réaliser une interprétation en termes de couverture algale (Perrot *et al.*, 2006).
2. Une méthode stationnelle qui s'appuie sur un suivi des grandes populations de macroalgues et détermine l'évolution temporelle de la diversité algale et du couvert végétal sur chacun des estrans étudiés (Ar Gall *et al.*, 2010).

Les deux approches décrivent une régression drastique des populations d'algues brunes entre 1987 et 2004 sur de nombreux sites comme Santec, Quiberon, et Pleubian (Figure 1). Cependant, les indicateurs soulignent une recolonisation du substrat depuis 2004 (Derrien-Courtet *et al.*, 2010). Si la régression des Fucales et des Laminariales a été observée ailleurs en Europe, les causes de ce phénomène ne sont pas encore parfaitement cernées. Une dominance alternée entre populations végétales et animales, associée à des oscillations climatiques, est avancée pour expliquer le phénomène (Rossi *et al.*, 2010). Il n'en demeure pas moins problématique de ne pouvoir anticiper les fluctuations des peuplements de macroalgues, ni d'en connaître précisément l'origine.

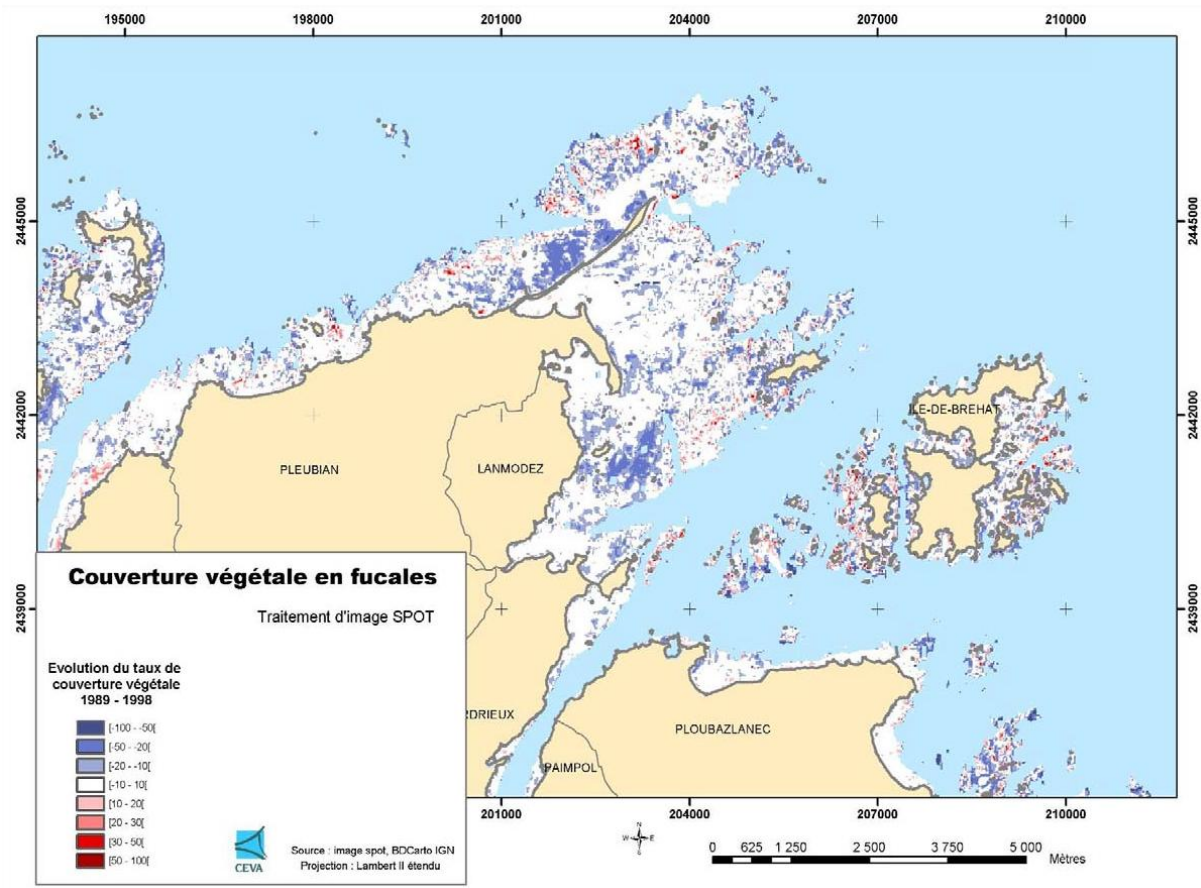


Figure 1 : Évolution du couvert de Fucal à Pleubian (Côtes d'Armor) entre 1989 et 1998, d'après Rossi *et al.* (2010). En bleu : régression des Fucal ; en rouge : progression

Sur les côtes méditerranéennes, un phénomène de régression des macroalgues brunes a également été observé, pour lequel la pression anthropique est directement mise en cause.

3 LA RÉGRESSION DES FUCAL DES CÔTES MÉDITERRANÉENNES

La Méditerranée est une mer presque fermée qui ne reçoit que des apports limités d'eau de mer par le détroit de Gibraltar. Ce relatif isolement a permis le développement de peuplements benthiques originaux, et les populations végétales remarquables que sont les algues de cystoseires et les herbiers de posidonie sont un symbole de la richesse des fonds méditerranéens. En revanche, la forte densité de la population humaine sur tout le pourtour du bassin induit une forte contrainte anthropique qui tend à altérer l'état des biocénoses.

Aussi très rapidement, avec la Convention de Barcelone pour la protection de la Méditerranée contre la pollution signée en 1976, les pays du bassin méditerranéen se sont entendus autour d'une stratégie commune en faveur de la biodiversité et des habitats particuliers. La Convention de Berne pour la protection de la vie sauvage (1978), dont l'action rayonne sur l'ensemble des pays européens, dresse pour la Méditerranée une liste d'espèces d'algues brunes strictement protégées qui inclut cinq espèces de *Cystoseira* (*C. amentacea*, *C. mediterranea*, *C. sedoides*, *C. spinosa* et *C. zosteroides*).

Le recul des forêts sous-marines de cystoseires est un phénomène bien documenté en Méditerranée, et les causes avérées sont multiples : eutrophisation, pollution, augmentation de la turbidité de l'eau, prédation/compétition (liste non exhaustive ; d'après Sales *et al.*, 2011 ; Díez *et al.*, 2011 ; Falace *et al.*, 2010 ; Arévalo *et al.*, 2007 ; Pinedo *et al.*, 2007 ; Thibaut *et al.*, 2005 ; UNEP, 1996 ; Munda, 2000). Ces algues brunes sont alors très souvent remplacées par des algues rouges (genre *Corallina*) ou des algues vertes (genre *Ulva*) qui adoptent un comportement opportuniste. Thibaut *et al.* (2005) ont étudié ce phénomène de recul de cystoseires sur la côte des Albères, dans les Pyrénées Orientales (Tableau 1).

Tableau 1 : Évolution des populations de cystoseires sur la côte des Albères entre 1912 et 2005, d'après Thibaut *et al.* (2005). État de chaque taxon, depuis "Très abondant" jusqu'à "Non observé"

Espèces	1912	1937	1978	2005
<i>Cystoseira barbata</i>	Fréquent	Fréquent	Rare	Non observé
<i>C. caespitosa</i>	Fréquent	Fréquent	Rare	Rare
<i>C. compressa f. compressa</i>	Très abondant	Très abondant	Très abondant	Très abondant
<i>C. crinita</i>	Fréquent	Fréquent	Rare	Non observé
<i>C. elegans</i>	Fréquent	Fréquent	Rare	Très rare
<i>C. foeniculacea f. latiramosa</i>	Rare	Non observé	Non observé	Non observé
<i>C. foeniculacea f. tenuiramosa</i>	Fréquent	Fréquent	Rare	Non observé
<i>C. funkii</i>	Rare	Rare	Non observé	Non observé
<i>C. mediterranea</i>	Très abondant	Très abondant	Abondant	Abondant
<i>C. sauvageauana</i>	Rare	Très rare	Non observé	Non observé
<i>C. spinosa var. compressa</i>	Abondant	Abondant	Très rare	Non observé
<i>C. spinosa var. spinosa</i>	Rare	Non renseigné	Très rare	Non observé
<i>C. zosteroides</i>	Fréquent	Fréquent	Fréquent	Rare

Par comparaison avec les inventaires réalisés par Sauvageau (1912), Feldman (1937) et Gros (1978), les auteurs ont mis en évidence une tendance à la diminution de l'abondance pour toutes les espèces de *Cystoseira* depuis le début du XX^{ème} siècle, qui a conduit à la disparition de plusieurs taxons.

4 LE GENRE *CYSTOSEIRA* EN BRETAGNE

Les espèces de *Cystoseira* sont particulièrement étudiées en Méditerranée, zone géographique où le genre est le plus diversifié et où les espèces sont les plus abondantes (Cabioch *et al.*, 2006). Sur les côtes de l'Atlantique Nord-Est, le genre est représenté par quelques espèces, certaines étant caractéristiques de cet océan, comme *C. baccata*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia* (Sauvageau, 1912), d'autres s'établissant aussi bien en Méditerranée que dans l'Atlantique, comme *C. fœniculacea* et *C. humilis*.

Ces cinq espèces sont les seules établies en Bretagne. Elles y constituent un élément fondamental dans la structuration des habitats marins. L'Hardy-Halos *et al.* (1973) ont réalisé une classification phytosociologique des algues, afin de caractériser la stratification verticale des algues dans les fonds marins, et de mettre en évidence le rôle-clé de certaines espèces dans les écosystèmes benthiques (Figure 2).

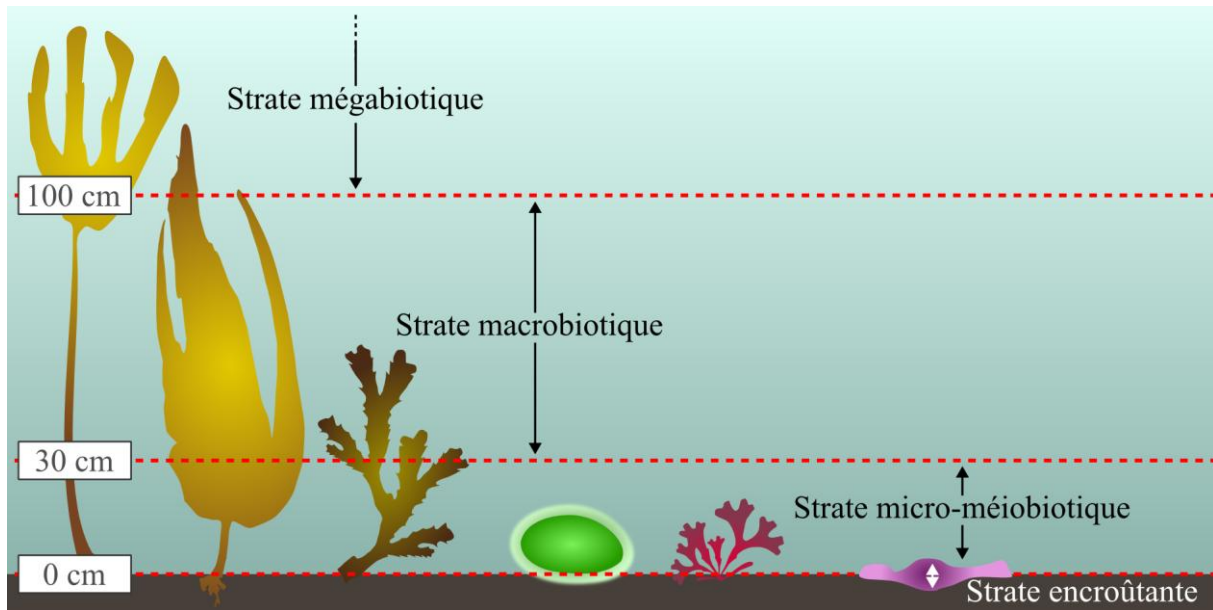


Figure 2 : Stratification du benthos adaptée d'après l'Hardy-Halos *et al.* (1973). De gauche à droite : *Laminaria hyperborea* et *L. digitata* (strate mégabiotique) ; *Fucus serratus* (strate macrobiotique) ; *Codium bursa* et *Chondrus crispus* (strate micro-méiobiotique) ; *Lithophyllum incrustans* (strate encroûtante).

Les cinq espèces étudiées se situent généralement dans la strate macrobiotique (avec des individus adultes entre 40 et 80 cm). Certains thalles de *Cystoseira baccata* et *C. tamariscifolia* dépassent le mètre, entrant ainsi dans la strate mégabiotique. Ils forment alors une canopée qui constitue un habitat luxuriant pour de nombreuses espèces animales et végétales.

Comme cela a été décrit en Méditerranée, les populations de cystoseires de la façade Atlantique sont également soumises à de multiples menaces. La plus importante est sans doute l'espèce invasive *Sargassum muticum*, qui s'établit progressivement en Europe depuis les années 1970. Les conséquences de la colonisation de cette algue japonaise sur les peuplements autochtones ont fait l'objet de nombreuses publications. Arenas *et al.* (1995) relie la capacité d'invasion de *Sargassum muticum* à une production de zygotes bien supérieure aux algues natives, telles que *Cystoseira nodicaulis* en Espagne. Viejo (1997) rapporte des changements importants dans les cuvettes de l'estran de la côte du Nord de l'Espagne, notamment une diminution de la couverture de Fucales suite à l'apparition de *Sargassum muticum*. L'auteur suppose qu'un phénomène d'ombrage limiterait le développement des autres algues, comme cela a été montré pour *Bifurcaria bifurcata*

(Fucales, Sargassaceae) qui semble particulièrement affectée par la canopée de *S. muticum* (Figure 3). Wernberg *et al.* (2001) évoquent l'importance du cycle pseudo-pérenne de l'algue invasive, par rapport aux espèces natives de *Sargassaceae*. Le thalle de *Sargassum muticum* est extrêmement réduit en hiver, et toute l'énergie est consacrée, jusqu'à la période estivale, à l'élongation et la mise en place des organes de la reproduction, puis à la reproduction en été. Par opposition, *Halidrys siliquosa* (Fucales, *Sargassaceae*), espèce pérenne, dépense une partie non négligeable de son énergie au maintien de l'intégrité de son thalle durant la mauvaise saison, ce qui nuirait à son potentiel de croissance et de reproduction au printemps. Les travaux de Le Lann (2009) corroborent toutes ces données et signalent une plus grande plasticité de *Sargassum muticum* vis-à-vis des conditions environnementales, en comparaison aux espèces natives, *Cystoseira baccata* et *Bifurcaria bifurcata*.

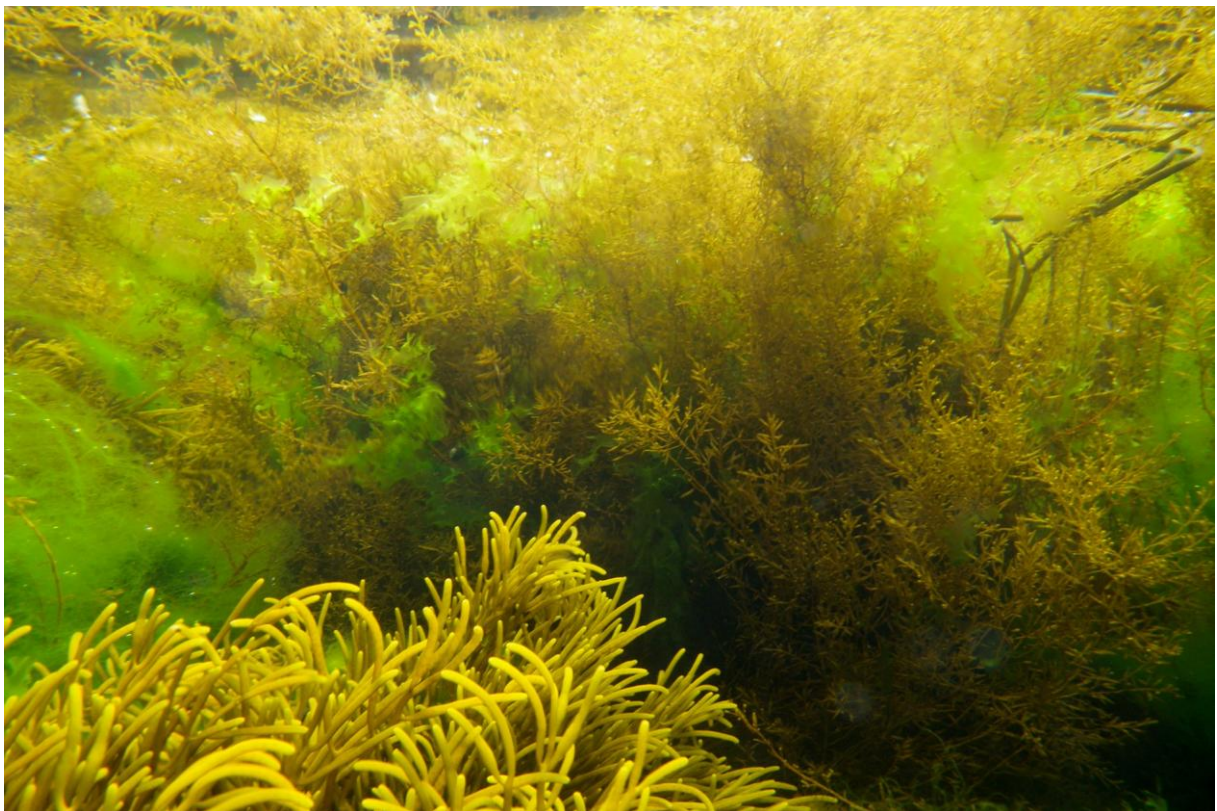


Figure 3 : Les populations de *Sargassum muticum* forment une large canopée en été ; ici au-dessus de *Bifurcaria bifurcata* dans une cuvette de l'estran à Penmarc'h (Finistère, France)

Tout comme les espèces méditerranéennes, les cystoseires de l'Atlantique sont particulièrement sensibles aux phénomènes de pollution. Díez *et al.* (2003, 1999) ont montré la régression de *Cystoseira baccata* et *C. tamariscifolia* sur la côte basque espagnole, à proximité d'effluents contaminés par des eaux usées d'origine domestique et industrielle. Par ailleurs, Lodeiro *et al.* (2006) ont montré la capacité des tissus de *C. baccata* à fixer (par adsorption) le Plomb (Pb^{2+}) et le Cadmium (Cd^{2+}). Toujours pour cette même espèce, Herrero *et al.* (2005) ont prouvé sa capacité à retenir le Mercure (Hg^{2+}). Le genre *Cystoseira* est ainsi représenté, dans l'Atlantique comme en Méditerranée, par des espèces dont la sensibilité aux perturbations anthropiques est avérée. De ce fait, Juanes *et al.* (2008) incluent *C. baccata* et *C. tamariscifolia* dans une liste réduite d'espèces naturellement présentes dans les étages infralittoral et médiolittoral de Cantabrie (Espagne), liste qui est prise en compte dans le calcul d'un indice de qualité des fonds rocheux. De la même façon, Díez *et al.* (2011) mettent la présence d'espèces de *Cystoseira* au cœur de la détermination de la qualité des estrans rocheux. Les cystoseires sont donc des indicateurs de bon état écologique.

5 LA TAXINOMIE ET LA CLASSIFICATION, AXES DE RECHERCHES MAJEURS

Le rôle déterminant des cystoseires dans les écosystèmes benthiques et leur déclin sous la contrainte de facteurs anthropiques sont aujourd'hui les principales raisons de l'attention qui est leur portée. Historiquement, ces espèces ont été étudiées pour des raisons bien différentes. Depuis le XIX^{ème} siècle, de nombreux phycologues de toute l'Europe se sont attachés à caractériser et classer les différentes espèces et à en fournir des clés de détermination. La tâche s'est avérée compliquée, nécessitant des approches d'alpha-taxinomie (collecte et description d'échantillons) et de beta-taxinomie (hiérarchisation entre espèces). Des méthodes morphologiques et cytologiques ont d'abord été employées. Elles ont connu leur apogée dans le courant du XX^{ème} siècle, sous l'impulsion de quelques phycologues, tels Sauvageau, Feldmann, Ercegović et Giaccone notamment (Pellegrini *et al.*, 1997). Elles ont été complétées dès les années 1970 par des études chimiques qui ont permis d'établir une correspondance entre la production de molécules originales et la systématique (Amico, 1995 et Valls & Piovetti, 1995 pour revue). Enfin, depuis les années 1990 et suite à l'essor de la biologie moléculaire, des analyses phylogénétiques ont levé le voile sur certaines questions de classification à l'échelle de l'ordre des Fucales (Cho *et al.*, 2006 ; Rousseau *et al.*, 1999 ;

1997), sans résoudre la polyphylie du genre. Au commencement de ce travail de thèse, aucune étude ne détaillait les relations phylogénétiques entre les cinq espèces du littoral breton.

Les études chimiques au sein du genre *Cystoseira* n'ont pas uniquement cherché à établir des classifications. Elles s'inscrivent plus généralement dans le cadre d'une recherche de nouvelles substances naturelles d'origine marine qui s'est particulièrement développée au cours du XX^{ème} siècle.

6 LA RECHERCHE DE SUBSTANCES NATURELLES MARINES

6.1 DÉVELOPPEMENT ET OBJECTIFS

Au siècle dernier, sous l'impulsion d'avancées techniques, les ressources profondes, jusque-là hors de portée, sont devenues accessibles. Grâce à l'amélioration des méthodes analytiques, de nouvelles molécules ont pu être identifiées, dévoilant progressivement la complexité et la diversité chimique du milieu marin. Le nombre de nouvelles molécules découvertes chez des organismes marins continue sa progression depuis les années 1950 (Figure 4).

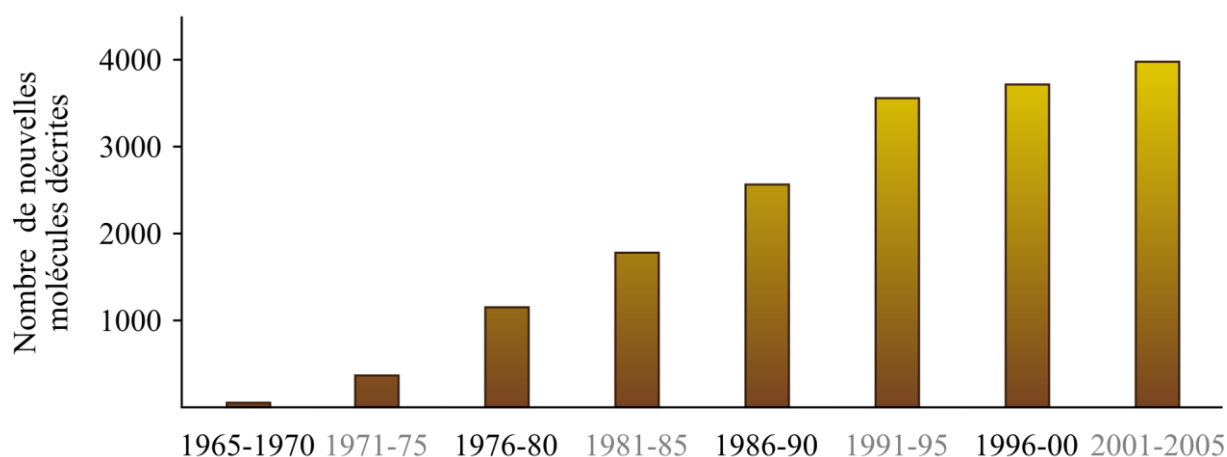


Figure 4 : Nombre de nouvelles molécules d'origine marine décrites depuis 1965, groupées par période de 5 ans (adapté d'après Blunt *et al.*, 2007)

Le plus souvent, deux démarches motivent la recherche de substances naturelles marines. La première a pour objectif la compréhension de phénomènes biologiques. En effet, dans l'océan comme sur les terres émergées, il a été démontré que de multiples familles de molécules sont impliquées en tant que moyens privilégiés de communication entre organismes (voir [Potin *et al.*, 2002](#) pour le cas des macroalgues). Ces molécules sont souvent des métabolites secondaires : elles ne sont pas synthétisées pour répondre aux besoins essentiels de l'organisme, ce rôle étant assuré par les acides nucléiques, les acides aminés et de nombreux oses et lipides ([Amsler, 2008](#)). La connaissance structurale de ces métabolites secondaires est une condition *sine qua non* à la compréhension du dialogue chimique qui s'établit entre espèces au sein des écosystèmes.

Les substances naturelles marines sont également associées à une grande palette d'activités biologiques. L'océan se révèle être une source potentielle de nouveaux médicaments ([Bhakuni & Rawat, 2005](#)). Aussi, la publication de la structure chimique d'une nouvelle molécule s'accompagne assez fréquemment d'une perspective de valorisation, via des résultats de tests d'activité. Les principales investigations concernent le secteur médical, et des propriétés anticancéreuses, antibiotiques et anti-inflammatoires de nombreuses molécules marines ont été mises en évidence (voir [Blunt *et al.* \(2007\)](#) pour une liste des activités). D'autres applications dans le domaine des biotechnologies sont également à l'essai, notamment l'activité antifouling. Le fouling traduit l'accumulation progressive d'organismes sur les coques de navires. Il entraîne une surconsommation de carburant, une diminution de la vitesse du navire et une détérioration accélérée de sa coque. Le TBT est un biocide puissant, largement incorporé dans les peintures des navires pour lutter contre le fouling, mais dont les effets sur les écosystèmes marins sont dévastateurs, même à faible dose. Depuis l'interdiction partielle du Tributylétain (TBT) votée par l'Organisation Maritime Internationale en 2001, l'activité antifouling de nouvelles molécules marines est évaluée, afin de trouver une alternative à ce composé toxique.

6.2 MÉTABOLITES SECONDAIRES DES MACROALGUES

Les substances naturelles de macroalgues marines présentent une grande variété d'activités biologiques (Bourgougnon & Stiger-Pouvreau, 2011). Les investigations actuelles sont essentiellement portées sur leurs propriétés cytotoxiques et antibiotiques (Figure 5). Cependant, ces nouvelles molécules actives sont issues d'un nombre assez restreint d'espèces qui attirent l'attention des chercheurs, comme les espèces des genres *Dictyota* et *Sargassum* (algues brunes) ainsi que *Laurencia* (algues rouges).

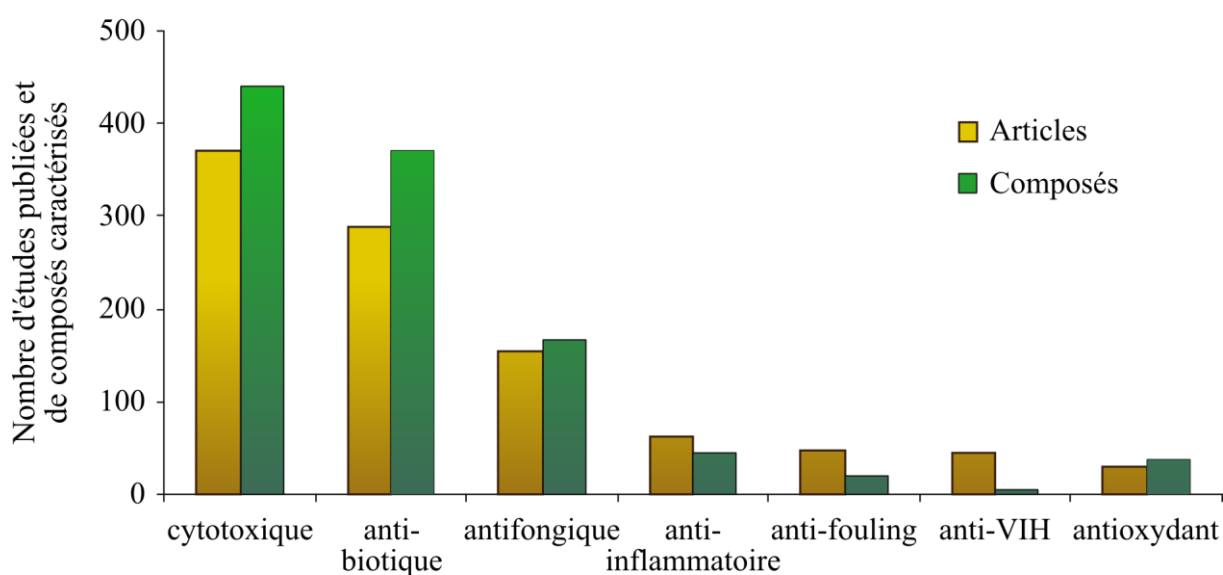


Figure 5 : Activités biologiques des métabolites de macroalgues ; nombre d'études publiées et de composés actifs (d'après Ioannou & Roussis, 2009)

En effet, la variété des substances naturelles est inégalement répartie entre les trois grandes classes de macroalgues marines (Maschek & Baker, 2008). Les algues rouges (classe des *Rhodophyceae*) représentent la plus grande richesse chimique, et près de la moitié des nouvelles molécules décrites sont issues du genre *Laurencia*. La plupart des découvertes actuelles concernent des dérivés terpéniques bromés ou chlorés, de type diterpènes et sesquiterpènes (Stengel *et al.*, 2011). Au contraire, on ne reporte chez les algues vertes (classe des *Chlorophyceae*) que très peu de molécules originales, principalement des terpènes, similaires à ceux rencontrés chez les algues rouges, à ceci près qu'ils ne sont pas halogénés.

Chez les algues brunes (classe des *Phaeophyceae*), les terpènes et les phlorotannins sont les deux principales familles de molécules étudiées (Blunt *et al.*, 2007). Ces deux types de biomolécules sont impliqués dans la défense chimique des macroalgues (Potin *et al.*, 2002). Ils peuvent ainsi être synthétisés en réponse à une agression extérieure, comme celle d'un herbivore par exemple (Stiger *et al.*, 2004 ; Brock *et al.*, 2001 ; Cronin & Hay, 1996).

Les terpènes sont particulièrement étudiés au sein des ordres des Fucales et des Dictyotales. Parmi les représentants de ces deux ordres, la classification actuelle au sein des genres *Cystoseira* et *Dictyota* n'est pas des plus évidentes (Tronholm *et al.*, 2010 ; Amico, 1995). C'est la raison pour laquelle les terpènes ont été utilisés en tant que chimiomarqueurs, afin de préciser les relations entre espèces à l'intérieur de ces deux genres (De-Paula *et al.*, 2008 ; Pelegri *et al.*, 1997 ; Kelecom & Laneuville-Teixeira, 1986). Parallèlement, l'activité anti-fouling de nombreux terpénoïdes a été démontrée (Bhadury & Wright, 2004). Ainsi, des terpènes isolés chez *Bifurcaria bifurcata*, *Halidrys siliquosa* et *Cystoseira baccata* ont montré une activité anti-fouling significative (Hellio *et al.*, 2001 ; Mokrini *et al.*, 2008 ; Culioli *et al.*, 2008).

Contrairement aux terpènes, qui ne sont pas synthétisés par toutes les algues brunes, les phlorotannins sont des composés ubiquistes dans la classe des *Phaeophyceae* (Ragan & Glombitza, 1986). Ces molécules sont des biopolymères de taille très variable, et qui ont de multiples rôles cellulaires (de la constitution de la paroi aux voies de signalisation cellulaire) et plus encore de rôles écologiques (activité anti-herbivore, filtre naturel aux UV, etc.), d'après Amsler & Fairhead (2006). De nombreuses activités biologiques leur sont associées, tout particulièrement dans le secteur biomédical pour les phlorotannins d'*Ecklonia cava* : activité anti-VIH (Artan *et al.*, 2008) ; protection contre les rayons ionisants (Park *et al.*, 2008a, 2008b) ; amélioration de la mémoire lors de troubles dégénératifs du cerveau (Myung *et al.*, 2005) ; protection des cellules du foie (Kim *et al.*, 2005), etc.

Au sein du genre *Cystoseira* présent sur les côtes bretonnes, les données disponibles dans la littérature pour ces deux types de biomolécules sont disparates :

- Au commencement de ce travail de thèse, *C. fœniculacea*, espèce-type du genre, n'avait pas encore été le sujet d'études chimiques, et ses principaux métabolites secondaires (phlorotannins et éventuels terpènes) restent indéterminés.

- *C. humilis* a fait l'objet d'une recherche (infructueuse, certes), de terpènes (Amico, 1995) ; cependant ses phlorotannins n'ont pas été étudiés.
- Les phlorotannins de *C. nodicaulis* ont été en partie caractérisés (Glombitza *et al.*, 1985), mais pas d'éventuels dérivés terpéniques.
- Les phlorotannins (Glombitza *et al.*, 1981, 1975 ; Le Lann, 2009) comme les terpènes (Mokrini *et al.*, 2008 ; Amico, 1995) de *C. baccata* et *C. tamariscifolia* ont déjà été étudiés.

7 CONTEXTE SCIENTIFIQUE DE L'ÉTUDE

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de deux programmes de recherche : les projets BIOTECMAR et Phlorotann-ING.

Le premier est un programme cofinancé par le Fonds Européen de Développement Régional, et s'intègre dans l'axe prioritaire n°2 du programme Espace Atlantique : « Environnement Maritime et Énergies Renouvelables ». Il met en relation de nombreuses structures de recherche en Espagne, en France, en Irlande et au Portugal. L'objectif du projet est de faciliter le développement de filières de production d'ingrédients à valeur ajoutée utilisant les produits marins sous-exploités. Cela implique un état des lieux des ressources actuelles, une aide au développement technologique, un rapprochement des acteurs de la filière (du laboratoire à l'industrie), et l'initiation d'actions-pilotes. Le projet Biotecmar a financé une part importante des analyses chimiques et du suivi écologique de populations réalisés au cours de cette thèse, ainsi que la participation à l'édition 2009 du congrès de l'European Society for Marine Biotechnology.

Phlorotann-ING est un projet intégrateur du Groupement d'Intérêt Scientifique Europôle Mer, qui réunit l'Université de Bretagne Occidentale et la Station Biologique de Roscoff autour de molécules d'intérêt à valoriser. Son but est de comprendre les voies de synthèse des phlorotannins des algues brunes, en combinant des approches de chimie, de biochimie et d'écologie à une démarche de génomique fonctionnelle. Au démarrage, le projet s'appuyait sur trois espèces-modèles : *Ectocarpus siliculosus*, *Ascophyllum nodosum* et *Sargassum muticum*. Au fur et à mesure de l'avancée du projet, d'autres modèles ont été ajoutés comme les genres *Cystoseira* et *Fucus* par exemple. Phlorotann-ING a notamment financé la mise au point du protocole de purification des phlorotannins et les analyses

associées (identification structurale, activités biologiques), ainsi qu'un séjour à l'Université de Toulon-Var afin de collaborer avec Dr Gérard Culioli sur la partie chimiotaxinomie.

8 OBJECTIFS DU MANUSCRIT

Le présent travail explore (1) la taxinomie et la systématique, (2) l'écologie et (3) l'isolement de molécules d'intérêt au travers des phlorotannins et de dérivés terpéniques, de *Cystoseira baccata*, *C. faeniculacea*, *C. humilis*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia*, seuls représentants du genre *Cystoseira* en Bretagne. L'étude est intrinsèquement pluridisciplinaire, aussi les méthodes et techniques employées seront souvent communes aux différentes thématiques abordées. Le principe général de ces différentes techniques est décrit au Chapitre II, où les premiers résultats sont présentés.

Le Chapitre I présente l'environnement colonisé par les macroalgues marines, et plus particulièrement les cystoseires, en précisant quelques caractéristiques écologiques des peuplements benthiques, avant de détailler les sites d'échantillonnage retenus pour cette étude. Dans un deuxième temps, le genre *Cystoseira* y est décrit d'un point de vue taxinomique et écologique, et chaque espèce est définie, par sa morphologie et son habitat.

Le Chapitre II cherche à approfondir la taxinomie et la classification des cystoseires de Bretagne. Il présente une démarche originale qui combine deux méthodes de chimie analytique (la Résonance Magnétique Nucléaire et la Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse) à une approche moléculaire plus classique, dans le but de discriminer les différentes espèces, et d'établir une notion de « proximité entre espèces » qui s'appuie sur des critères chimiques et phylogénétiques. Suite à ce travail, une démarche de purification et de caractérisation d'un marqueur chimique de *Cystoseira nodicaulis* est menée, afin de proposer une chimio-taxinomie complète des cinq espèces fondée sur les marqueurs de type « terpène ».

Le Chapitre III est une étude écologique des cystoseires de l'étage médiolittoral. Il constitue, à notre connaissance, le premier travail sur des populations inféodées à des cuvettes en Bretagne, et permet d'appréhender l'état initial des populations sur les sites étudiés. Une analyse de la distribution des espèces sur l'estran est présentée, afin de prouver l'existence d'une zonation analogue aux ceintures de Fucales de l'estran. Grâce à un suivi écologique, la

variabilité spatio-temporelle de chaque population est mise en évidence, et il devient possible d'associer dynamique et répartition sur l'estran. Enfin, une quantification des principaux pigments est proposée afin d'illustrer un mécanisme biochimique d'adaptation des populations à la position qu'elles occupent sur l'estran.

Le Chapitre IV présente une étude des phlorotannins au sein du genre *Cystoseira*. En premier lieu, un protocole miniaturisé d'extraction et de semi-purification de ces composés est développé afin de déterminer les teneurs spécifiques et leur variabilité saisonnière. Par la suite, un protocole détaillé de purification de ces composés est mis au point. En s'appuyant sur les différences de polarité des molécules extraites, il permet de caractériser qualitativement le mélange de composés pour chaque espèce. Suite aux résultats obtenus, une espèce est sélectionnée, et une nouvelle méthode de quantification par Résonance Magnétique Nucléaire est utilisée afin de déterminer les variations saisonnières des teneurs.

Enfin, une synthèse des résultats obtenus dans chacun des trois volets de l'étude clôt ce manuscrit et met en lumière les perspectives qu'offre ce travail.

CHAPITRE I

CADRE ENVIRONNEMENTAL ET BIOLOGIQUE

1 ENVIRONNEMENT MARIN ET SITES D'ÉTUDE

1.1 SUBDIVISIONS DU DOMAINE OCÉANIQUE

La diversité du milieu marin a rapidement conduit les océanographes à dissocier plusieurs zones dans les océans, afin d'en décrire la richesse avec davantage de précision. Dans ce manuscrit ne sera détaillée qu'une portion très restreinte de ces océans, aussi convient-il d'introduire quelques notions générales avant de caractériser les sites retenus pour cette étude.

La vie marine se répartit entre deux domaines : le benthos, qui regroupe les organismes inféodés aux fonds des océans, et le pélagos, réunissant les êtres vivant en liberté dans la colonne d'eau. Les algues du genre *Cystoseira* étudiées étant strictement benthiques, les spécificités de la vie pélagique ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

Le fond des océans est usuellement découpé en une succession d'étages qui témoignent de diverses profondeurs, depuis le bord de mer jusqu'aux fosses océaniques (Figure 6). Dans la partie côtière de la lithosphère continentale, autrement appelée zone néritique, se distinguent quatre étages :

- L'étage supralittoral est une première transition vers la mer. Il est continuellement soumis aux embruns, et colonisé par des lichens et des végétaux terrestres, et son niveau inférieur correspond à celui des hautes mers de vives-eaux.
- L'étage médiolittoral, plus connu sous le nom d'estran, correspond à la portion de côte alternativement émergée et immergée, au gré des cycles de marée.
- L'étage infralittoral lui succède, caractérisé par des peuplements de macroalgues photophiles immergées en permanence, que l'on retrouve donc sous le niveau des basses mers de vives-eaux.
- Le fond du plateau continental, jusqu'à 300 mètres de profondeur, est appelé étage circalittoral. Il est notamment peuplé d'algues sciaphiles, qui parviennent à s'adapter à la faible intensité lumineuse.

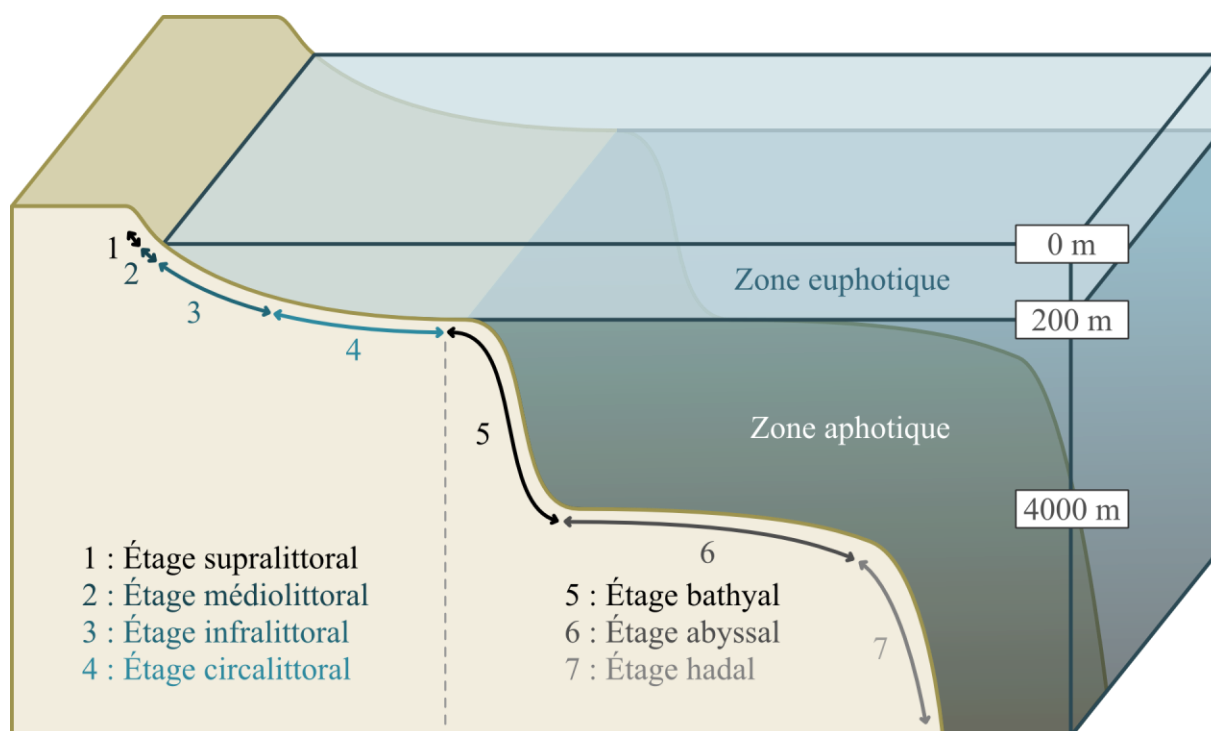


Figure 6 : Subdivisions des fonds marins (profondeurs à titre indicatif)

Au-delà du plateau, trois étages supplémentaires sont décrits, et aucune algue ne s'y développe :

- L'étage bathyal correspond au talus continental.
- Il précède l'étage abyssal, autour de 4000 mètres de profondeur, qui est le plancher océanique.
- L'étage hadal est celui des grands fonds, souvent associé aux fosses de subduction.

1.2 LUMIÈRE ET PEUPELEMENTS DE MACROALGUES

Les algues sont dépendantes de la lumière qu'elles utilisent en tant que source d'énergie. A mesure que la profondeur augmente, l'intensité lumineuse décroît par filtration au travers de la colonne d'eau. On caractérise ainsi une zone euphotique (Figure 6), où la photosynthèse est possible, et qui court depuis la surface jusqu'à 200 mètres de profondeur, par opposition à la zone aphotique sous-jacente, au sein de laquelle la lumière ne pénètre pas, et où le développement d'organismes photosynthétiques est impossible (Figure 6). La

profondeur-limite entre ces deux zones est fonction du lieu et de la saison considérés, et dépend directement de facteurs tels que la turbidité, l'hydrodynamisme et les courants, qui modulent l'opacité de l'eau dès les premiers mètres sous la surface.

Le développement des macroalgues est déterminé par l'existence d'un substrat favorable à leur installation et par la présence de lumière propice (qualitativement et quantitativement) à leur développement. En effet, les radiations lumineuses qui atteignent la surface de l'eau de mer sont filtrées de façon différentielle au travers de la colonne d'eau, suivant la longueur d'onde considérée (Figure 7).

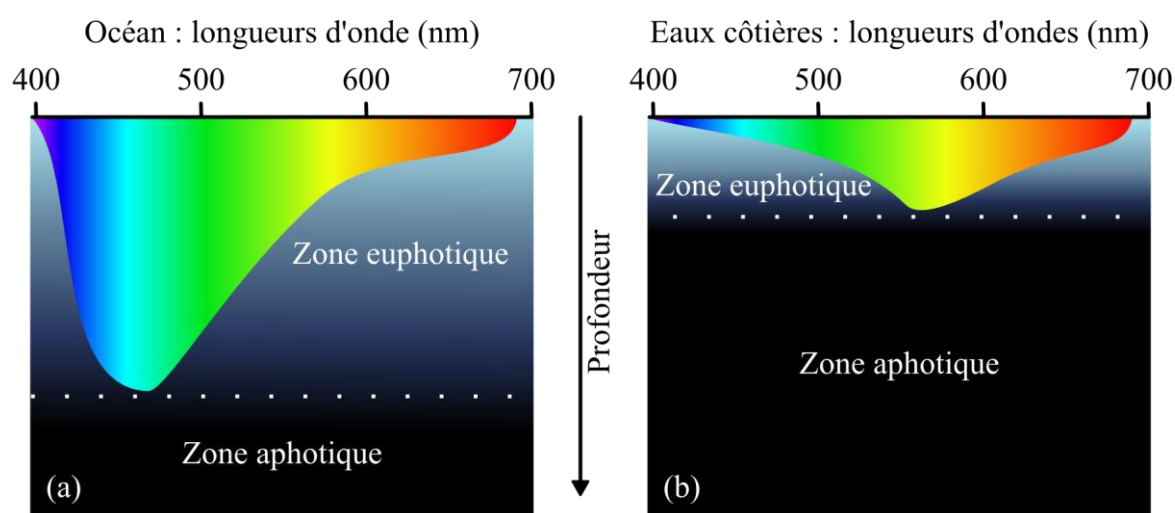


Figure 7 : Atténuation du spectre lumineux en fonction de la profondeur, (a) dans les océans et (b) dans les eaux proches du trait de côte (d'après Kyle Carothers, données NOAA-OE). Sur les graphiques, la gamme de couleurs à une hauteur donnée signifie l'étendue du spectre de lumière disponible à la profondeur correspondante.

La théorie de l'adaptation chromatique complémentaire a été proposée pour expliquer la succession algale des eaux tempérées, observée à l'échelle des peuplements. Le constat de départ est le suivant : les algues vertes sont souvent restreintes aux niveaux superficiels, les algues brunes s'établissent jusqu'à des profondeurs moyennes, et seules les algues rouges s'installent à la limite de la zone euphotique. Les pigments photosynthétiques seraient à l'origine de cette zonation :

— Chlorophylles a et b absorbant les radiations rouges, pour les algues vertes.

- Chlorophylles a et c (absorbant dans le rouge), et fucoxanthine qui absorbe le vert, pour les algues brunes.
- Chlorophylle a, et surtout phycoérythrine qui absorbe dans le vert-cyan, pour les algues rouges.

Au travers de la Figure 7a, on comprend que les radiations rouges étant filtrées à faible profondeur, peuvent limiter les algues vertes aux niveaux superficiels, et que les algues rouges succèdent aux algues brunes, puisque les radiations vertes sont plus abondantes en fond de zone euphotique. Même si cette théorie souligne l'importance de la composition pigmentaire dans la structuration des peuplements de macroalgues, elle ne tient pas lieu de vérité absolue. Comme en atteste la Figure 7, l'atténuation du spectre lumineux est variable qualitativement et quantitativement au sein des océans, ce qui laisse supposer qu'un autre phénomène doit être envisagé. De plus, quelques algues vertes sont capables de croître autour de 80 mètres de profondeur (Ballantine *et al.*, 2003), et le maximum observé est à 268 m pour une algue rouge. Ainsi, la synthèse de pigments complémentaires (permettant d'absorber les longueurs d'onde en zone profonde), ainsi que le point d'équilibre entre photosynthèse et respiration (qui dépend à la fois de la qualité et de la quantité de lumière disponible), expliqueraient plus directement l'existence d'une profondeur-limite théorique propre à chaque espèce (Cabioc'h *et al.*, 2006).

Comme le plateau continental se situe dans la zone euphotique, les macroalgues marines sont particulièrement représentées en fond de zone côtière. Depuis l'étage médiolittoral, qui constitue un environnement particulièrement changeant, jusqu'à l'étage circalittoral, aux conditions de vie bien plus constantes, les populations d'algues sont souvent impliquées dans la structuration des écosystèmes (Bulleri *et al.*, 2002, et références incluses ; Jones *et al.*, 1994). Les forêts de *Sargassaceae*, incluant les cystoseires, jouent notamment un rôle écologique important pour un grand nombre d'organismes, en fournissant (1) un substrat pour les espèces épiphytes et endobiontiques (Leite & Turra, 2003 ; Belegreatis *et al.*, 1999), (2) de la nourriture pour les herbivores (Potin *et al.*, 2002) et (3) une protection contre les prédateurs (Gotceitas *et al.*, 1995).

Le genre *Cystoseira*, objet de cette étude, est observé dans l'étage infralittoral, où les populations forment des forêts sous-marines, ainsi que dans les cuvettes de l'étage médiolittoral, qui constituent un refuge naturel lorsque la mer se retire.

1.3 LES MARÉES, PHÉNOMÈNE STRUCTURANT L'ÉTAGE MÉDIOLITTORAL

Le phénomène de marée traduit l'oscillation sur une échelle verticale des masses d'eau selon des cycles observables à échelles journalières et annuelles. Il est le résultat d'interactions gravitationnelles établies entre la Terre et la Lune, satellite de faible masse mais très proche de la planète, et dans une moindre mesure, entre la Terre et le Soleil, bien plus distant mais d'une masse considérable. Du fait d'un déséquilibre de cette attraction à différents points de la surface de la planète se crée un mouvement dans les océans que l'on appelle onde de marée.

L'étage médiolittoral a été défini comme étant la zone de balancement des marées, entre les niveaux des hautes mers de vives-eaux et celui des basses mers de mortes-eaux. Les organismes y subissent des cycles d'exondation et d'inondation, en lien avec la propagation de l'onde de marée. L'intensité de ce phénomène est variable à la surface du globe (Figure 8). En certaines zones des océans, appelées points amphidromiques, l'amplitude de marée est presque nulle ; on en retrouve par exemple près de Tahiti (Polynésie française, Pacifique Sud) et dans la Mer des Caraïbes (Atlantique Nord). Par opposition, on observe parfois aux abords des continents un marnage important, c'est notamment le cas en baie de Fundy (Nouvelle-Écosse, Canada) où le marnage avoisine 15 mètres (Garrisson, 2011), et pour prendre un exemple plus proche, en Bretagne, où le marnage atteint 11 mètres à Brest. Ces écarts de marnage à l'échelle planétaire peuvent être illustrés par les différences de la composante lunaire semi-diurne, principal forçage du phénomène de marée (Figure 8).

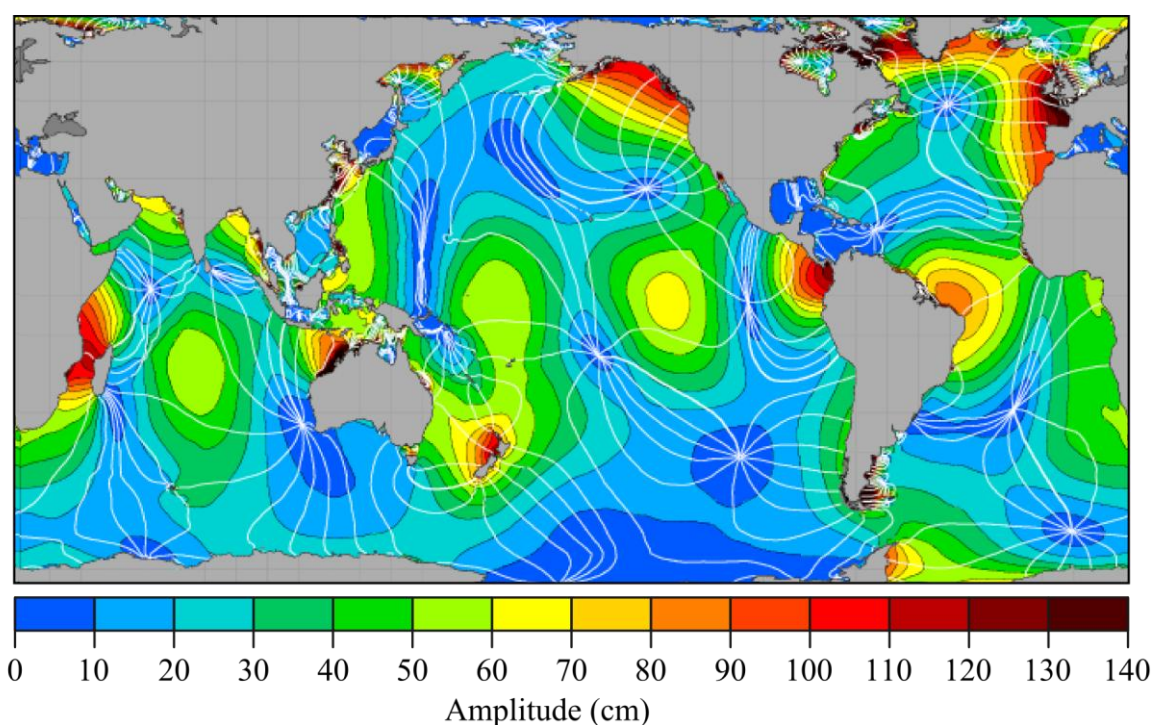


Figure 8 : Variations de l'amplitude de la composante lunaire semi-diurne à la surface de la planète (d'après Richard Ray, NASA/GSFC-JPL)

Ainsi les côtes bretonnes, du fait d'une amplitude de marée très importante, s'illustrent par un large étage médiolittoral, favorable au développement de grandes populations de macroalgues, plus particulièrement des algues brunes de l'ordre des Fucales. Au cours de cette étude, nous avons choisi de concentrer l'effort d'échantillonnage sur l'étage médiolittoral, fréquemment colonisé en Bretagne par des populations de *Cystoseira* (Dizerbo & Herpe, 2007 ; Cabioc'h *et al.*, 2006). Le choix de cet étage s'est fondé sur deux critères : (1) son accessibilité, qui permet un échantillonnage régulier, et facilite le suivi de populations, et (2) le gradient de conditions environnementales qui y règnent, qui laisse imaginer des mécanismes adaptatifs variables selon les populations.

1.4 SPÉCIFICITÉS GÉOMORPHOLOGIQUES ET CLIMATIQUES DE LA BRETAGNE

Telle qu'elle apparaît aujourd'hui, la Bretagne est le résultat d'une histoire riche en événements géologiques : formation de chaînes montagneuses, subduction d'un océan, multiples épisodes sédimentaires (Thomas, 2005). Les systèmes de cisaillement Nord et Sud-armoricains, qui découpent la région d'Est en Ouest, témoignent de la persistance de l'activité géologique (Figure 9).

Le littoral breton est façonné par cette histoire, et ménage de grands estrans rocheux, constitués pour la plupart de roches plutoniques (de type granite) et métamorphiques (gneiss et schistes), entrecoupées de baies sableuses, là où le temps a érodé les terrains les plus friables. La dominance des estrans rocheux en fait une région privilégiée pour l'étude des macroalgues en France. En effet, en dehors du Massif Armoricaire, les côtes atlantiques sont les prolongements des bassins sédimentaires parisien et aquitain (Figure 9), et l'étagé médiolittoral se situe alors en marge de cordons dunaires, peu propices à l'établissement de macroalgues. Le vaste plateau continental breton, qui s'étend à plus de 100 km au large du trait de côte, dévoile une grande diversité de fonds. Les nombreux récifs immergés, les fonds sableux omniprésents et les vasières sont autant d'habitats qui présagent de la richesse des peuplements benthiques. Les fonds marins sont d'ailleurs exploités, notamment les bancs de maërl (algues rouges calcaires, par exemple du genre *Lithothamnium*) et forêts de laminaires (algues brunes du genre *Laminaria*), en ce qui concerne le phytobenthos.

Sur les 2700 km de côtes bretonnes, pas moins de 700 espèces de macroalgues sont recensées (Dizerbo & Herpe, 2007), ce qui fait de la région un point chaud de diversité algale. Les raisons sont multiples, et l'explication commence par des précisions de courantologie et de climatologie. En effet, la zone est considérée comme une transition entre des eaux méridionales, chaudes, et les eaux plus froides de l'Atlantique Nord (Figure 9). De plus, la proximité de la dérive Nord-Atlantique, dans la continuité du « Gulf Stream », limite les différences saisonnières de température par des apports réguliers d'eau chaude. L'alternance régulière de systèmes dépressionnaires, en provenance d'Islande ou d'Irlande, et d'anticyclones, joue également en ce sens.

Ainsi, la relative stabilité des masses d'eau permet la coexistence d'espèces méridionales (ex : *Laminaria ochroleuca*) et septentrionales (ex : *Alaria esculenta*), qui se trouvent en Bretagne à la limite de leur aire de répartition (Guiry & Guiry, 2011).

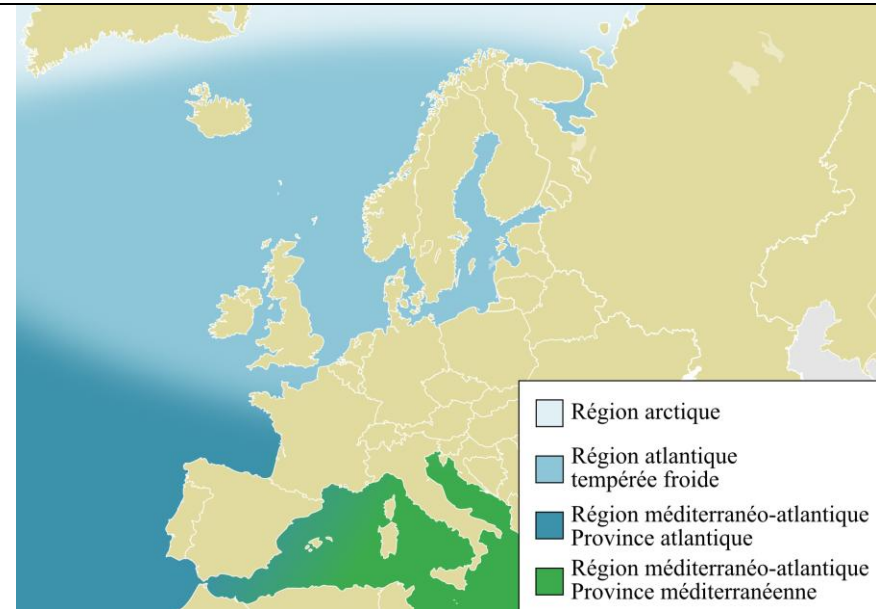
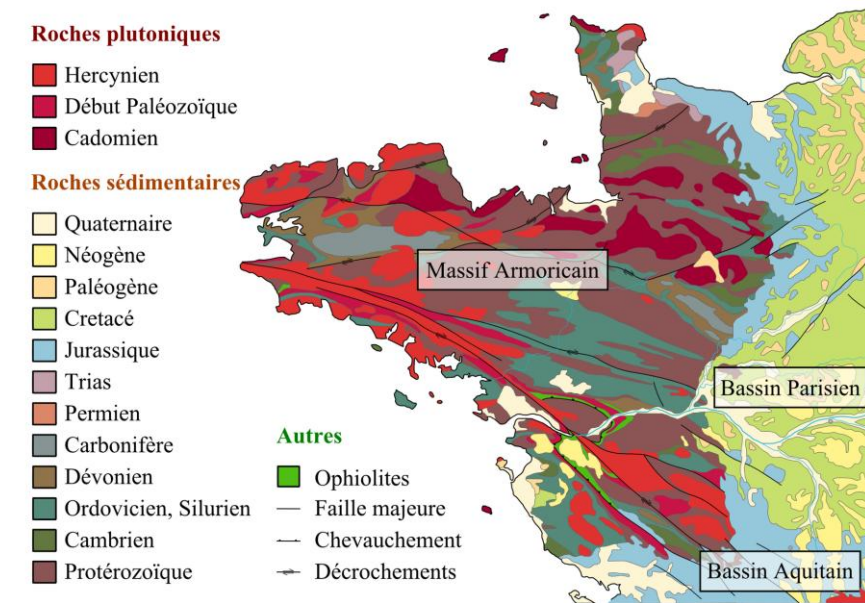


Figure 9 : Caractéristiques géologiques et biogéographiques de la Bretagne.

1. En haut à gauche : carte géologique (nature et âge des roches) adaptée d'après Woudloper (CC BY-SA 3.0, Wikimedia Commons) ;
2. En bas à gauche : distribution des estrans rocheux (en brun) sur le littoral breton ;
3. En haut à droite : Régions phytogéographiques de l'Europe de l'Ouest, adapté d'après Van den Hoek (1975).

1.5 CARACTÉRISATION DE L'ÉTAGE MÉDIOLITTORAL

Dès les premières études de la végétation sous-marine, notamment au travers de la première esquisse dessinée par d'Orbigny (1820), et plus récemment, avec la distribution décrite par Floc'h (1964) sur le littoral breton, les phycologues se sont attachés à détailler l'organisation spatiale singulière des peuplements de macroalgues. Sur l'étage infralittoral, et de façon plus nette encore sur l'étage médiolittoral, les populations algales s'établissent selon un schéma précis et cohérent.

La première spécificité est la dominance, en chaque endroit de l'estran, d'une à deux espèces de macroalgues brunes, Fucales ou Laminariales, constituant parfois une véritable canopée. On peut alors découvrir sous ce couvert diverses algues de petite taille, et qui seront ainsi protégées à marée basse. L'autre singularité est l'installation de chaque espèce à un niveau caractéristique. On parle alors de ceintures algales pour définir chaque portion de l'estran. Une ceinture permet de définir la position du secteur considéré sur l'estran, plus ou moins proche du niveau de marée basse, la/les espèce(s) dominante(s), et les espèces minoritaires associées. Par exemple, la ceinture à *Himanthalia elongata* caractérise la limite estran/étage infralittoral, où l'algue vit en association avec *Bifurcaria bifurcata*, au-dessus d'un « parterre » d'algues rouges et vertes (Figure 10).



Figure 10 : A marée basse par faible coefficient de marée, *Himanthalia elongata* forme une canopée recouvrant de nombreuses espèces animales et végétales.

Ainsi, il existe une composition spécifique en lien avec un gradient de conditions environnementales. Certaines algues s'implantent uniquement au niveau que la mer n'atteint que par marée haute. *Pelvetia canaliculata* fait partie de ces algues qui passent la majorité de leur temps hors de l'eau (et parfois plusieurs jours de suite). D'autres espèces s'implantent au niveau de mi-marée, comme *Ascophyllum nodosum* et *Fucus vesiculosus*. Dans une même journée, elles sont aussi longtemps émergées que submergées. Des algues comme *Fucus serratus* ne sont émergées que lorsque la mer est basse, soit environ 8 heures par jour. Plus en profondeur, les espèces du genre *Laminaria* restent immergées de façon permanente ; seules les parties terminales du thalle sont parfois émergées. La progression le long de ce gradient, du haut vers le bas de l'estran, s'accompagne de changements morphologiques, en termes de tailles et de formes, visibles pour certaines espèces en (Figure 11).

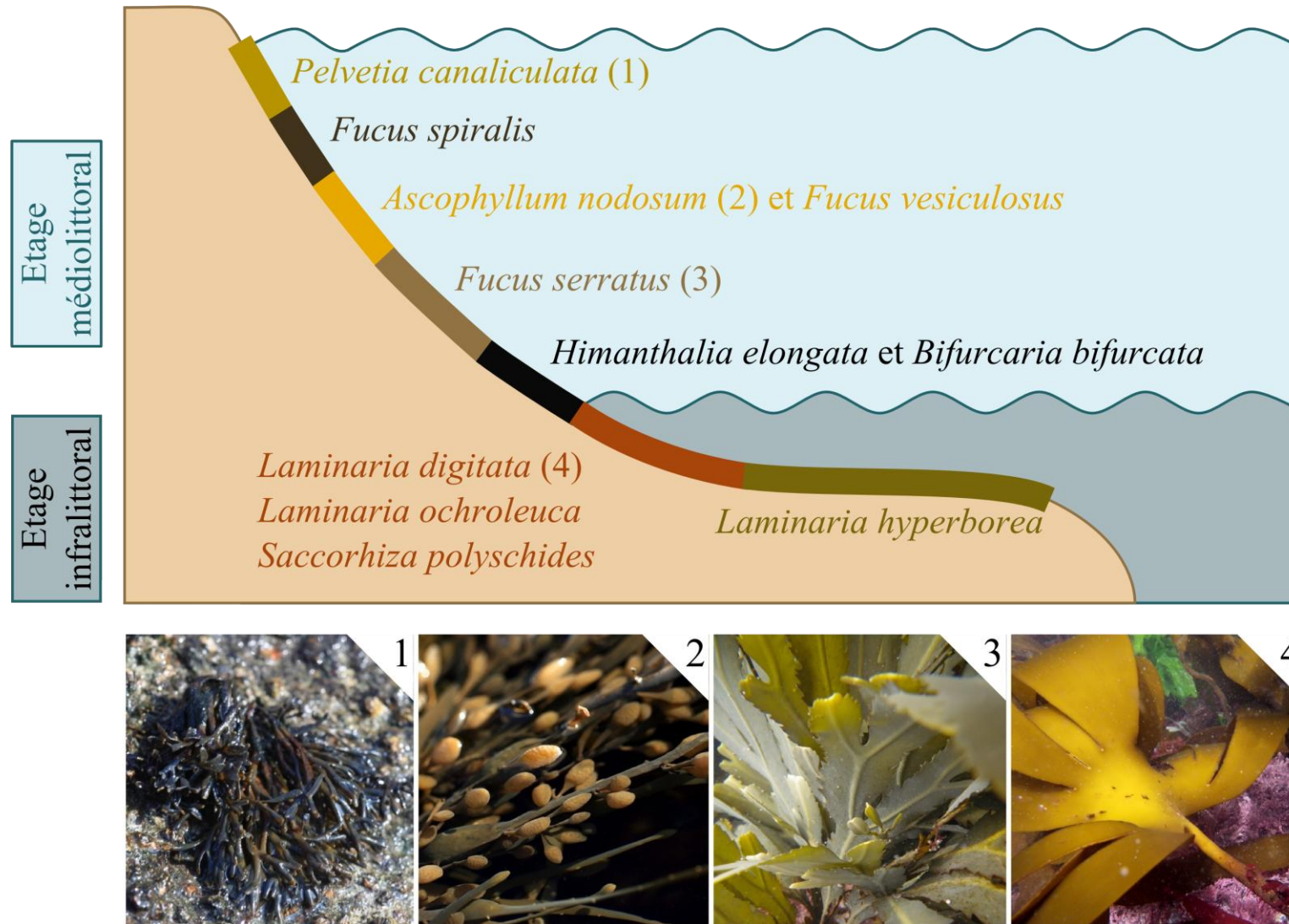


Figure 11 : Répartition (en mode abrité) et diversité morphologique de quelques algues brunes (Fuciales et Laminariales) sur un estran rocheux en Bretagne

Depuis les années 1980, de nombreuses démarches expérimentales ont été mises en œuvre afin de déterminer l'origine de cette organisation en ceintures. Il apparaît, de façon simplifiée, que la position des espèces de macroalgues est un compromis entre deux facteurs principaux. Le premier est la résistance à l'émersion et aux contraintes sous-jacentes. Plus cette résistance est forte, plus l'algue a la capacité de se développer en position haute sur l'estran. Ainsi cette résistance est souvent à l'origine de la limite supérieure d'une population sur l'estran (Lubchenco, 1980 ; Schonbeck & Norton, 1978). Le deuxième facteur est la compétition qui s'établit entre espèces. Les bas niveaux de l'estran sont les plus favorables au développement des algues, et la compétition (notamment pour le substrat) y est grande. C'est une explication possible à la limite inférieure de certaines populations (Foster, 1982 ; Lubchenco, 1980).

L'hydrodynamisme est un facteur supplémentaire, qui par son action mécanique, peut abraser les thalles, les décrocher, ou tout simplement limiter l'installation des jeunes plantules. Certaines espèces persistent malgré l'action des vagues, auquel cas des modifications morphologiques peuvent se produire, comme la perte des aérocystes ou la réduction de la taille du thalle (Prathec et al., 2009 ; Blanchette & Gaines, 2000). Par opposition, d'autres algues ne se développent pas en milieu battu, ce qui modifie considérablement l'équilibre des compétitions interspécifiques, et la balance devient souvent favorable à la faune benthique, au travers de la dominance de patelles, moules, balanes, etc. (Dion, 2009 ; Cabioc'h et al., 2006).

Concernant les cystoseires, et les membres de la famille des *Sargassaceae* en général, ces mêmes auteurs précisent que lorsqu'elles sont installées sur l'étage médiolittoral, elles tapissent le fond des cuvettes, qui sont des bassins naturels de rétention d'eau disséminés sur toute la longueur de l'estran.

La notion d'étagement semble difficilement adaptable aux cuvettes. A propos du littoral breton, on suppose en effet que s'il y a des différences de composition végétale dans les cuvettes en fonction de leur niveau sur l'estran, il n'existe pas de Fuciales ou de Laminariales dominante au sein de chacune d'entre elle. Ainsi, il n'y aurait pas de comparaison directe possible avec les ceintures des rochers émergés à marée basse. Les cuvettes sont plus simplement considérées comme des lieux sur l'estran où les espèces de l'étage infralittoral remontent. La présence constante d'eau dans la cuvette modère les

perturbations inhérentes à la période d'émersion, qui rendent normalement impossible le développement d'espèces comme les laminaires dans l'étage médiolittoral.

De plus, un phénomène de micro-zonation existe dans les cuvettes les plus profondes, généralement retrouvées vers les bas niveaux. On peut alors noter une succession des ceintures de Fucales et de Laminariales « comprimées » sur une hauteur correspondant à la profondeur de la cuvette, au lieu des mètres de différence couramment observés sur toute la hauteur de l'estran.

1.6 SÉLECTION DES SITES D'ÉTUDES

Le choix de sites d'études a été réalisé sous la contrainte d'un facteur majeur : la présence de cystoseires. En effet, en Bretagne, ces algues sont inféodées aux cuvettes de l'estran ou à l'étage infralittoral, et vivent presque exclusivement en mode abrité – avec de rares exceptions pour *Cystoseira baccata* et *C. humilis*. Le nombre de sites d'intérêt correspondant à ces critères est plutôt limité. Au début de ce travail, un premier site d'échantillonnage a été découvert à Penmarc'h, localité qui dévoile de grands platiers rocheux. Un autre site d'échantillonnage a été recherché pour étudier la variabilité spatiale des populations. Après investigations sur le terrain, nous avons sélectionné trois stations dans le Nord Finistère : au Trez-Hir (commune de Plougonvelin) pour *C. humilis*, à Porsmeur (commune de Porspoder) pour *C. baccata* et *C. tamariscifolia* et à Portsall (commune de Ploudalmézeau) pour *C. fæniculacea* et *C. nodicaulis* (Figure 12). Le choix de trois stations est lié à la configuration du littoral sur la côte Ouest du Finistère Nord, qui n'a pas permis l'observation conjointe des cinq espèces en un même lieu.

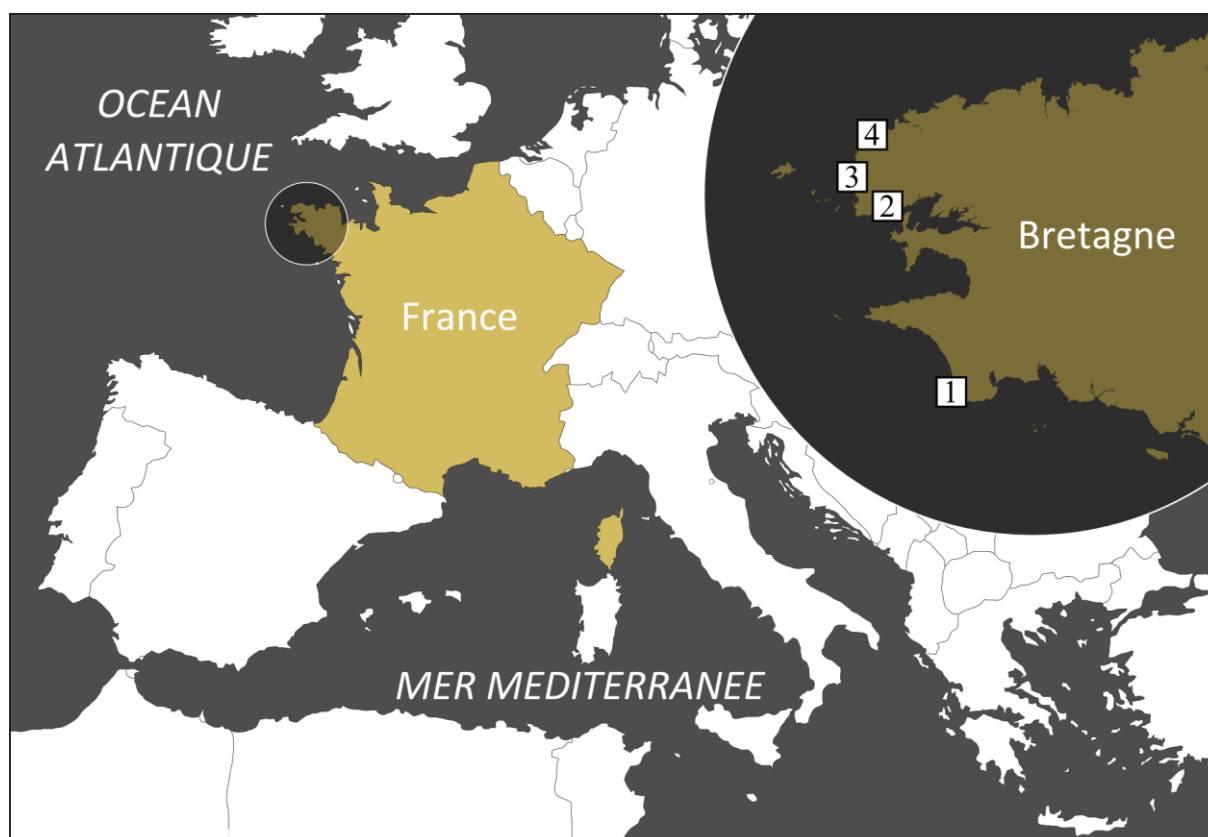


Figure 12 : Localisation des stations d'échantillonnage sur la pointe bretonne (dans le cercle). (1) : Saint-Guérolé et Saint-Pierre (commune de Penmarc'h) ; (2) : Trez-Hir (commune de Plougonvelin) ; (3) : Porsmeur (commune de Porspoder) ; (4) : Portsall (commune de Ploudalmézeau)

1.6.1 LA POINTE DE PENMARC'H

La pointe de Penmarc'h est un tournant entre la façade Ouest et la façade Sud du département du Finistère, à l'interface entre l'Atlantique et le Golfe de Gascogne. Le site est caractérisé par une multitude de conditions environnementales, propices au développement de communautés algales variées. La géomorphologie, la climatologie et la courantologie du site ont été caractérisées en détail par le Centre National pour l'Exploitation des Océans (CNEXO, 1976). La portion Sud de la côte penmarchaise, partiellement cartographiée par Braud & Pérez (1974), indiquait déjà la présence d'algueraies à cystoseires et laminaires.

Au Nord de la commune, le quartier de Saint-Guérolé constitue le secteur le plus exposé à la houle (Figure 13). Le littoral y est rocheux, et le site, fortement battu par houles de Sud-Ouest comme de Nord-Ouest, est un terrain favorable pour deux espèces caractéristiques

du mode battu : l'algue rouge *Porphyra umbilicalis* et l'algue brune *Fucus vesiculosus* var. *vesiculosus*, ainsi que pour le développement de communautés animales caractéristiques : pouces-pieds, balanes, moules, etc. Le couvert algal de l'estran est particulièrement limité, à la faveur de vastes populations animales, et l'on ne peut parler de ceintures qu'à partir des niveaux bas de l'estran (ceinture à *Fucus serratus*).

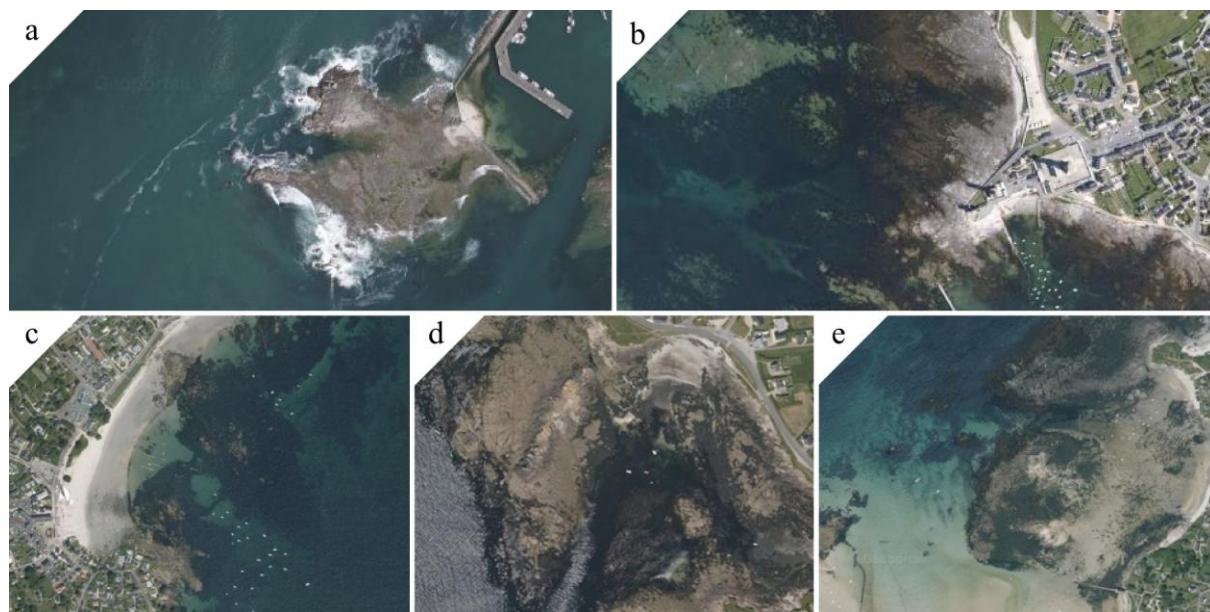


Figure 13 : Images satellites des stations retenues dans cette étude (Finistère, France) : (a) : Saint-Guénolé (mode battu) ; (b) Saint-Pierre (abrité) ; (c) : Trez-Hir (semi-abrité) ; (d) : Porsmeur (abrité) ; (e) : Portsall (abrité). Photographies IGN-Géoportail, 2011

De ce fait, seules des espèces ayant une affinité (ou tout du moins une tolérance) vis-à-vis d'un fort hydrodynamisme s'installent dans des anfractuosités rocheuses. Les cuvettes les moins profondes, et qui sont directement soumises à l'impact des vagues, sont bien souvent vierges de toute population végétale, ou tapissées par une couverture rase d'algues rouges des genres *Corallina* et *Lithophyllum*. Par contre, on observe dans les cuvettes les plus encaissées des populations conséquentes de *Bifurcaria bifurcata* disposées en couronne, des thalles réduits d'*Himanthalia elongata*, de *Sargassum muticum*, et dans une moindre mesure, de *Cystoseira baccata* (Figure 14). Cette zone n'a été échantillonnée que dans le cadre de prélèvements mineurs, afin de ne pas perturber la population de cystoseires pour le moins restreinte dans cette partie de l'estran.



Figure 14 : Cuvette exposée du bas de l'étage médiolittoral, à Saint-Guérolé (commune de Penmarc'h)

A partir de la façade Sud-Ouest et jusqu'au Sud, autour du quartier de Saint-Pierre, les nombreux écueils au large forment un brise-lames naturel et, à la côte, l'hydrodynamisme est quasi-nul (Figure 13). L'estran plat et en pente douce, creusé de nombreux chenaux et cuvettes (Figure 15), est une niche privilégiée pour les peuplements d'algues brunes, et notamment de Fuciales. Ainsi l'on peut observer une succession complète de ceintures algales depuis les hauts niveaux à *Pelvetia canaliculata*, jusqu'aux ceintures de Laminariales (cf. paragraphe 1.5).

Dans ce secteur plus particulièrement, l'estran se singularise par sa longueur qui, en y ajoutant le haut de l'étage infralittoral accessible par grandes marées, dépasse aisément 500 m, perpendiculairement au trait de côte.



Figure 15 : Plateau rocheux abrité de Saint-Pierre (commune de Penmarc'h), vu du phare d'Eckmühl

La superficie considérable de cet estran est un atout majeur pour échantillonner des thalles de *Cystoseira*, et rares sont les autres sites où les populations sont aussi bien représentées. De ce fait, les cuvettes abritées rencontrées sur la côte de Saint-Pierre ont été le lieu privilégié pour toutes les études sur le genre *Cystoseira*. La quasi-totalité des échantillons prélevés en vue de procéder à l'extraction de biomolécules provient de cette station. De plus, la topologie du terrain est compatible avec un suivi de populations et une étude de distribution, que nous présentons au Chapitre III de ce manuscrit.

Les cuvettes hautes de l'estran abritent principalement des espèces d'algues vertes des genres *Ulva* et *Chætomorpha*, ainsi que des thalles de *Scytosiphon lomentaria* selon la période de l'année. Au niveau moyen de l'estran, à proximité des ceintures à *Ascophyllum nodosum* et à *Fucus vesiculosus*, on observe dans les mares des populations de *Sargassum muticum*, de cystoseires, ainsi qu'une variété d'algues rouges au fond des mares. *Sargassum muticum* cohabite dans les cuvettes plus basses avec *Halidrys siliquosa*, *Fucus serratus*, *Dictyota dichotoma* (algues brunes) ainsi que *Palmaria palmata* et *Chondrus crispus* (algues rouges).

1.6.2 LA PLAGE DU TREZ-HIR À PLOUGONVELIN

Le Trez-Hir est une anse semi-battue, ouverte vers le Sud-Est, en sortie de rade de Brest (Figure 13). Sur le haut de plage se dresse un promontoire rocheux qui descend jusqu'à l'étage infralittoral (Figure 16). Ce plateau présente plusieurs cuvettes où se sont installées des algues vertes des genres *Ulva* et *Chaetomorpha*, et quelques algues brunes de la famille des Sargassaceae : *Sargassum muticum*, *Bifurcaria bifurcata* et *Cystoseira humilis*. La végétation du bas de l'étage médiolittoral est bien plus luxuriante, et se compose de la succession classique des ceintures de Fucales. Par marée basse de vive-eau, l'étage infralittoral dévoile des populations d'*Himanthalia elongata* et de *Laminaria sp.*

Dans les cuvettes du haut de l'estran, isolées dès la mi-marée (Figure 16), *Cystoseira humilis* est particulièrement discrète. Son habitat se limite à deux cuvettes, sur une surface totale ne dépassant guère 2 m². La population ne comptant que très peu d'individus, le site peut se révéler d'un grand intérêt pour étudier une éventuelle dynamique de colonisation du substrat.



Figure 16 : Estran au Trez-Hir (commune de Plougonvelin), en mode semi-abrité

1.6.3 L'ANSE DE PORSMEUR À PORSPODER

Cette station a été retenue en raison d'études précédentes, attestant de la présence de populations de *Cystoseira baccata* et *C. tamariscifolia* (Le Lann, 2009 ; Dizerbo & Herpe, 2007). Le site est enclavé entre deux avancées rocheuses, et laisse apparaître une large cuvette ouverte sur la mer, mi-sableuse et mi-rocheuse (Figure 17). Cette cuvette ne se vide jamais complètement à marée basse, et reçoit l'eau résiduelle des niveaux supérieurs au fur et à mesure que la mer se retire. La cuvette retenue pour cette étude, observable au premier plan en Figure 17, est à la limite entre les étages médiolittoral et infralittoral. Aux populations de *Cystoseira baccata*, *Cystoseira tamariscifolia* et *Sargassum muticum* s'y ajoutent des individus isolés des espèces *Bifurcaria bifurcata*, *Laminaria saccharina* et *Himanthalia elongata*, ainsi qu'un tapis d'algues rouges telles que *Chondrus crispus*. En dépit de son exposition plein Ouest, le site demeure abrité du fait de la présence de pointes rocheuses arrêtant les houles dominantes (Figure 13) et d'îles au large (telles Ouessant et Molène, par exemples). Les quantités importantes d'algues présentes sous forme de laisse de mer attestent de la richesse des champs d'algues sous-marins, qui sont exploités par une flottille de goémoniers basés à Lanildut, premier port goémonier d'Europe.



Figure 17 : Littoral de Porsmeur (commune de Porspoder), en mode abrité

1.6.4 LA STATION DE PORTSALL À PLOUDALMÉZEAU

A Portsall, le littoral se positionne dans la continuité de celui observé à Porsmeur : majoritairement rocheux, l'estran peut se concevoir comme un chaos granitique baignant dans une mer de sable grossier (Figure 13). La portion d'estran sélectionnée à Portsall est un ensemble de mares abritées entre deux îlots granitiques (Figure 18). Sa position au niveau de la ceinture à *Ascophyllum nodosum* la situe en plein milieu de l'étage médiolittoral. Dizerbo & Herpe (2007) indiquent qu'entre Roscoff et Brest, Portsall est l'unique site où des populations de *C. nodicaulis* ont été recensées. De plus, c'est l'un des trois secteurs, avec le Trez-Hir et le site du Minou à Plouzané, où a été observée *C. fœniculacea*. Après vérification, ces deux derniers secteurs étaient exempts de populations de cystoseires. Nous avons donc retenu la station de Portsall où les deux espèces sont facilement observables.



Figure 18 : Estran à Portsall (commune de Ploudalmézeau) en mode abrité

Les cuvettes à Portsall sont colonisées par *Sargassum muticum*, *Bifurcaria bifurcata*, et également par de très rares individus de *Cystoseira baccata* et un unique spécimen de *C. tamariscifolia*. On retrouve également, de façon saisonnière, un large couvert d'algues épiphytes, tout particulièrement *Scytosiphon lomentaria* et *Ectocarpus* sp. (algues brunes), ainsi que *Chaetomorpha* sp. (algues vertes).

2 MODÈLE BIOLOGIQUE

2.1 LES ORIGINES MULTIPLES DES ALGUES

Les algues peuvent se concevoir comme le regroupement empirique des organismes thallophytes photosynthétiques inféodés aux systèmes aquatiques ou humides. Aussi pratique soit-elle, cette définition n'indique en rien une histoire évolutive commune.

Si l'utilisation du mot « algue » n'a pas de sens d'un point de vue phylogénétique, elle sous-entend néanmoins une diversité biologique considérable, au travers dix groupes monophylétiques impliqués et d'origines éloignées : depuis les bactéries - avec l'exemple des cyanobactéries - jusqu'aux eucaryotes, au travers des algues vertes, rouges ou brunes et autres groupes de microalgues (Figure 19).

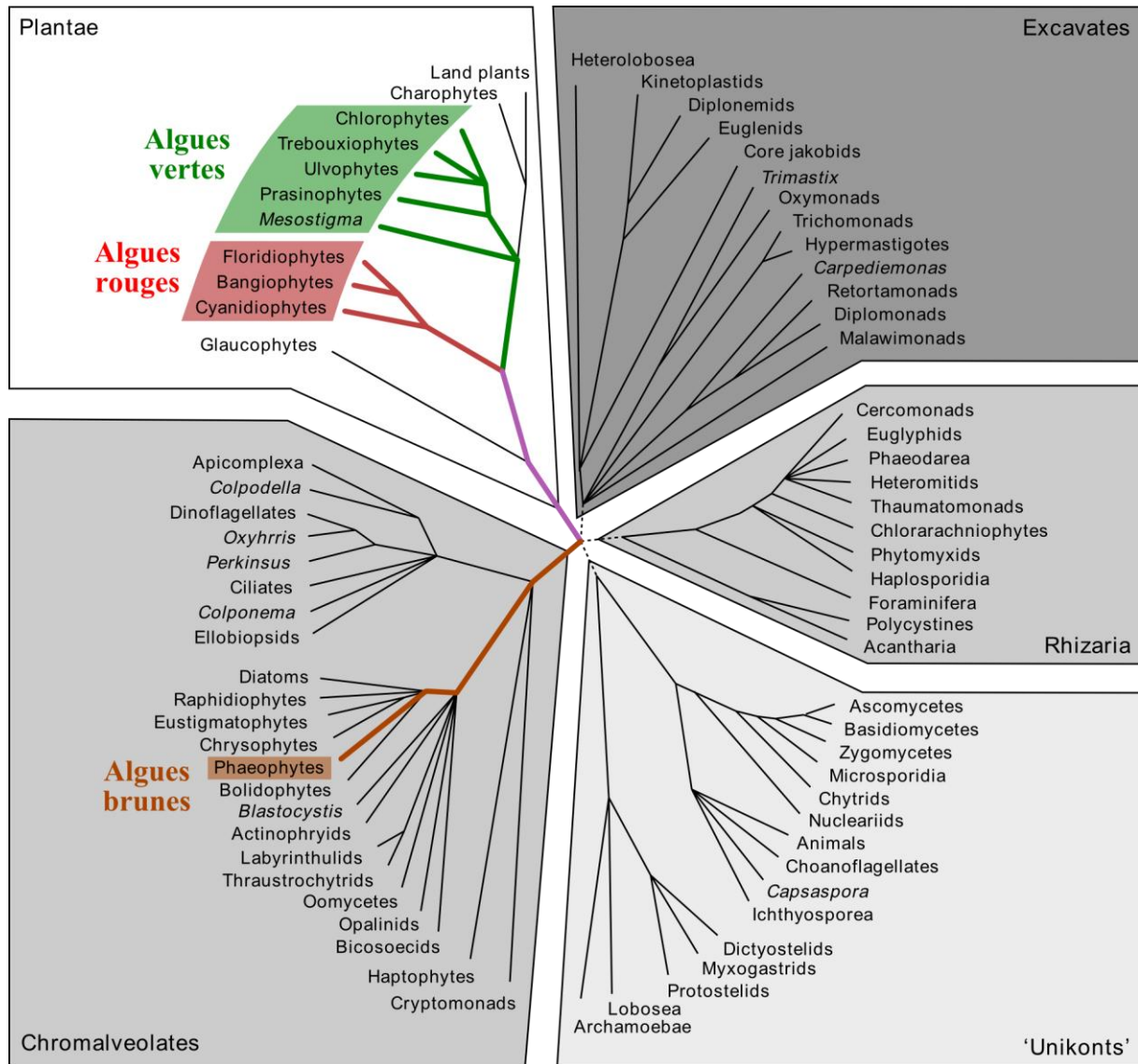


Figure 19 : Classification des eucaryotes d'après Keeling *et al.* (2005), avec position des principales classes de macroalgues

De plus, les algues colonisent une multitude d'environnements : depuis le simple mur ombragé, recouvert de *Trentepohlia aurea*, en passant par un lac salé coloré par *Dunaliella salina*, et jusqu'aux fonds marins recouverts de *Laminaria digitata*. Cette extraordinaire richesse taxinomique qui rayonne sur des habitats hétéroclites laisse entrapercevoir l'étendue de la diversité de ces organismes, aux échelles génétique, chimique, cytologique, et morphologique.

Le présent travail décrit quelques espèces de *Cystoseira*, qui est un des genres majeurs au sein des algues brunes, au même titre que les genres *Fucus*, *Sargassum* et *Laminaria*.

2.2 PRÉSENTATION DU GENRE *CYTOSEIRA*

2.2.1 ORIGINES

Le genre *Cystoseira* a été défini en 1820 par Agardh dans son ouvrage intitulé *Species algarum*. Le nom provient d'un caractère morphologique, la présence de flotteurs (*cysto-*) disposés en chaînes (*-seira*) sur le thalle de ces algues. Néanmoins, la description d'Agardh s'appuyait uniquement sur des éléments de reproduction, et ne détaillait que les caractères majeurs des réceptacles. Le lectotype *Fucus concatenatus* L., connu aujourd'hui sous le nom de *Cystoseira fœniculacea* (Linnaeus) Greville, a été proposé en 1829 par Bachelot de la Pylaie.

2.2.2 SYSTÉMATIQUE

La position en systématique du genre *Cystoseira* n'a guère été stable au cours des deux derniers siècles. Au départ inclus dans un groupe très large, les « Fucoïdés » (Greville, 1830), puis dans la famille des *Sargassaceae* (Feldman, 1937 ; Dawson, 1941). A la suite d'allers-retours taxinomiques (Nizamuddin, 1962, pour revue), le genre en a par été retiré pour intégrer une nouvelle famille à laquelle il a donné son nom : les *Cystoseiraceae*. De récents travaux de biologie moléculaire (Rousseau *et al.*, 1997 ; Horiguchi & Yoshida, 1998 ; Rousseau & De Reviers, 1999) l'ont à nouveau réintégré dans la famille des *Sargassaceae*. Ces résultats ont été confortés par les travaux plus récents de Rousseau *et al.* (2001), Cho *et al.* (2006), Phillips *et al.* (2008). De fait, la famille des *Cystoseiraceae* n'a plus d'existence en systématique.

La place actuelle du genre *Cystoseira* dans la hiérarchie du vivant est la suivante :

- Empire : *Eukaryota*
- Règne : *Chromista*
- Sous-règne : *Chromobiota*
- Infra-règne : *Heterokonta*
- Embranchement : *Heterokontophyta*
- Ordre : *Fucales*
- Famille : *Sargassaceae*

2.2.3 DIVERSITÉ

Au commencement de ce travail, pas moins de 47 espèces de *Cystoseira* étaient reconnues (Guiry & Guiry, 2008), sur un total de 297 taxons recensés, incluant des synonymes, sous-espèces, variétés et formes. Le doute subsistant sur la validité de nombreux taxons est étroitement lié à la multiplication d'erreurs d'identification. En effet, les cystoseires se caractérisent par une forte diversité morphologique sur les plans interspécifique et intraspécifique. Ainsi, si les différentes espèces offrent une vaste gamme de formes et d'aspects, la variabilité morphologique observée (1) entre individus d'une même espèce, et (2) au sein d'un même individu au cours des saisons, complique la tâche de reconnaissance sur le terrain. De plus, les premiers critères d'identification des espèces ayant été définis à partir d'échantillons provenant d'une seule localité, ils se révèlent souvent inadaptés dans un milieu fondamentalement différent (Roberts, 1967a).

2.2.4 RÉPARTITION MONDIALE ET ÉLÉMENTS DE BIOLOGIE

La Mer Méditerranée peut être considérée comme le bastion des cystoseires ; Pellegrini *et al.* (1997) évoquent même le terme de « Cystoseiranée ». Ses eaux sont colonisées par une trentaine de taxons, dont une vingtaine est endémique (Guiry & Guiry, 2011 ; Amico, 1995). Ainsi la richesse spécifique méditerranéenne serait le fruit d'un mécanisme de radiation adaptative majeur combiné à des processus de spéciation importants (Cabioc'h *et al.*, 2007 ; Amico, 1995 ; Roberts, 1978). Cependant, l'aire de répartition du genre s'étend bien au-delà, dans les Océans Atlantique, Pacifique, et Indien (Oliveras Plá & Gómez Garreta, 1989).

Le biotope colonisé est fonction de critères spécifiques et géographiques. En Méditerranée où le marnage est faible, les cystoseires colonisent l'étage infralittoral ; en Atlantique, on les retrouve très souvent dans les cuvettes de l'étage médiolittoral, et jusqu'à l'étage infralittoral, comme précisé précédemment (page 40).

2.2.5 MORPHOLOGIE

Les principaux traits du genre *Cystoseira* ont d'abord été décrits par Sauvageau (1912), qui a détaillé les espèces atlantiques et méditerranéennes des côtes françaises, puis par Ercegović (1952) pour des échantillons provenant de l'Adriatique. De façon générale, le thalle d'une cystoseire se présente sous forme d'un système d'axes d'ordres multiples (primaire, secondaire, etc. ; voir Figure 20) à croissance non limitée, pouvant porter des appendices à croissance limitée, assimilables à des pleuridies. Le/les axe(s) primaire(s) prend (prennent) naissance sur un disque basal conique, qui est le point d'ancrage du thalle à son substrat. La présence d'aérocystes (flotteurs) en position interne dans les axes est typique du genre. Néanmoins, selon la phénologie et les conditions de milieu, ils peuvent être absents chez certains individus.

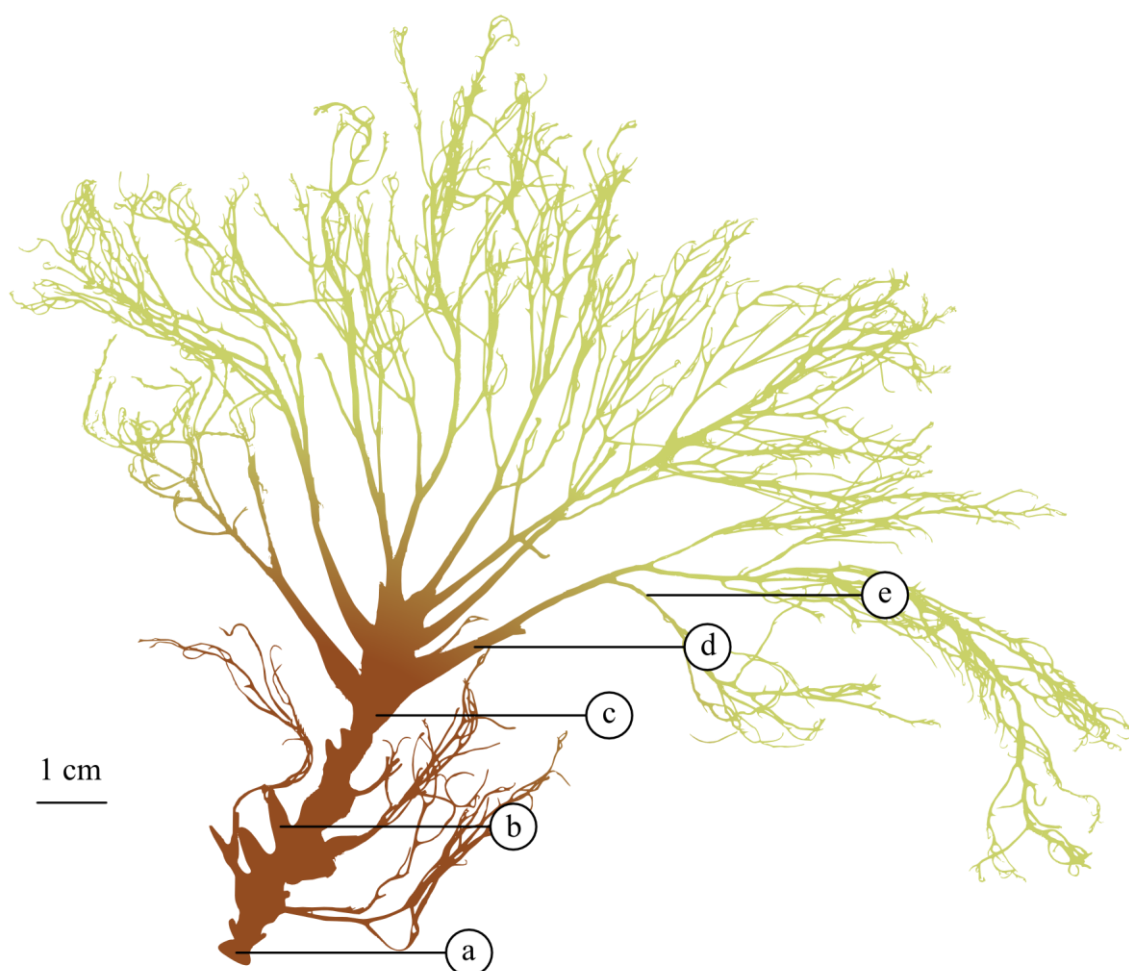


Figure 20 : Organisation d'un thalle de cystoseire : exemple de l'espèce tophuleuse *Cystoseira nodicaulis*. (a) : Disque basal réduit ; (b) : tophule ; (c) : axe primaire épais ; (d) : axe secondaire ; (e) : axe tertiaire (iridescent)

Les cystoseires sont des espèces pérennes, en ce sens qu'elles sont présentes dans leur milieu toute l'année durant. En revanche, elles perdent et régénèrent leurs axes secondaires d'après un rythme saisonnier. Ce phénomène sera illustré au travers de l'étude d'écologie réalisée sur les populations de cystoseires bretonnes (Chapitre III de ce manuscrit).

2.2.6 REPRODUCTION

Les réceptacles, lieu de production des gamètes, sont généralement en position apicale sur les axes de dernier ordre, pour les cinq espèces établies en Bretagne, ils contiennent des conceptacles hermaphrodites (Figure 21). Ainsi, les espèces du genre *Cystoseira* sont le plus souvent monoïques, c'est-à-dire qu'un seul type d'individu caractérise la population, en produisant les deux types de gamètes (voir la description de *Cystoseira tamariscifolia* en page 62 pour un cas particulier). Le cycle de développement est typique d'une fucale : il est monogénétique diplontique, avec pour unique génération macroscopique un méiosporophyte diploïde produisant *in fine* des gamètes.

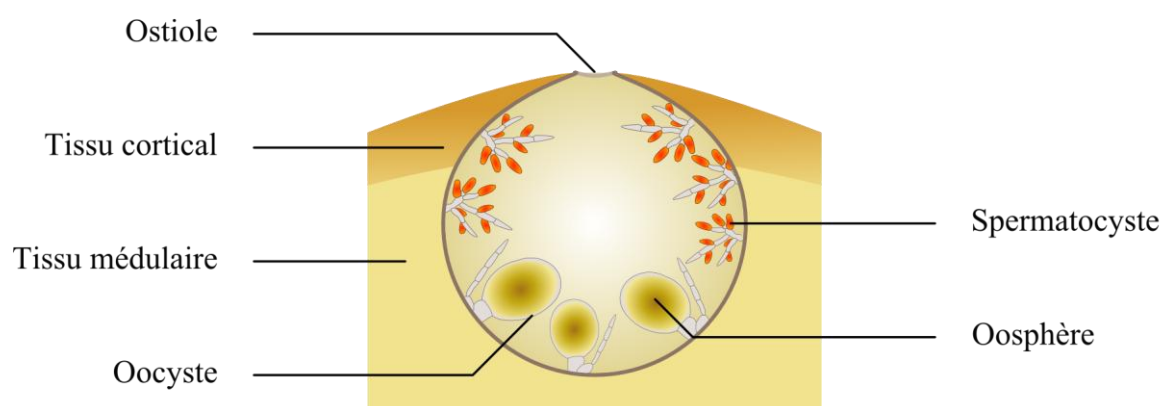


Figure 21 : Organisation des gamétocystes dans le conceptacle des *Sargassaceae* (visibles au grossissement $\times 100$)

Les spermatozoïdes ou anthérozoïdes (gamètes mâles) sont issus d'une cellule-mère ayant subi une méiose suivie de 4 mitoses. La production d'une seule oosphère (gamète femelle) par oocyste est une caractéristique de la famille des *Sargassaceae*, avec une cellule-mère qui subit une méiose, générant 8 noyaux, dont 7 dégèrent et le huitième se différencie en une oosphère viable (Figure 22).

La disposition des gamètes dans le conceptacle est constante chez les *Sargassaceae*. Les oocystes occupent le fond du conceptacle, tandis que les spermatocystes sont situés plus près de l'ostiole, formant un anneau au-dessus des oocystes (Figure 21). Après fécondation, quatre à huit rhizoïdes primaires se développent rapidement chez l'embryon des cystoseires (Alongi *et al.*, 1999 ; Roberts, 1967a ; Guern, 1962).

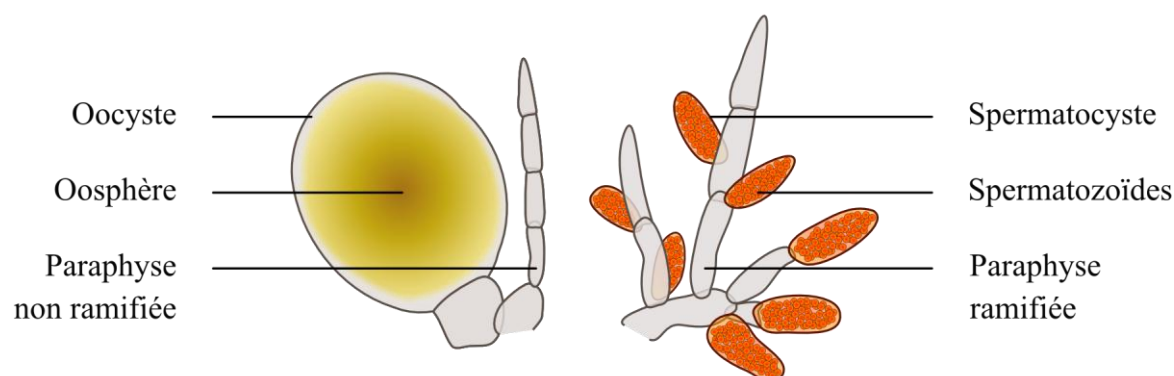


Figure 22 : Détail des éléments de reproduction (femelles et mâles) et des cellules associés (visibles au grossissement $\times 400$)

2.2.7 CRITÈRES D'IDENTIFICATION

Du fait de la multiplicité de formes des espèces du genre *Cystoseira*, le choix des critères de détermination revêt une importance majeure. Aujourd'hui, d'après Cabioc'h *et al.*, (2006) et Roberts (1967a), les principaux éléments utilisés en taxinomie sont :

- La présence d'un seul ou de plusieurs axes primaires sur le disque basal,
- L'aspect de l'apex des axes principaux,
- La présence de renflements sur les axes principaux, appelés tophules,
- La présence d'appendices (exemples : « feuilles », « épines »),
- L'aspect des réceptacles.

2.3 PRÉSENTATION DES ESPÈCES ÉTUDIÉES

Sur les côtes bretonnes, *Cystoseira baccata*, *C. fœniculacea*, *C. humilis*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia*, qui sont décrites ci-après, sont les seuls représentants du genre *Cystoseira*. On peut également les considérer comme des espèces natives, ou tout du moins installées de longue date, puisque Sauvageau (1912) attestait déjà de leur présence sur les côtes atlantiques de France. Pour faciliter la relecture de la bibliographie, l'Encadré 1 recense les différents synonymes et anciennes appellations de chacun des taxons. L'origine taxinomique de leur nom est présentée, et une brève description morphologique est donnée, illustrée par une photographie. Leur aire de répartition est indiquée, ainsi que leur localisation sur les estrans bretons, qui sera d'ailleurs étudiée dans le Chapitre III. Enfin, un aperçu de différentes études qui s'y consacrent est proposé.

2.3.1 *CYSTOSEIRA BACCATA* (S.G. GMELIN) P.C. SILVA

Cette espèce a été pour la première fois décrite par Gmelin (1768) sous le nom de *Fucus baccatus* ; le nom actuel a été proposé par Silva (1952). L'espèce est particulièrement bien installée sur les côtes atlantiques de l'Europe. Elle s'étend au Nord jusqu'à la Mer Baltique, et au Sud jusqu'en Mauritanie. Elle est absente de la Mer Méditerranée (Guiry & Guiry, 2011).

Les individus sont caractérisés par la présence d'un axe primaire généralement unique, aplati, et qui se ramifie de façon alterne et distique (Figure 23). Seul cet axe subsiste à certains moments de l'année. La base des rameaux secondaires est souvent pourvue de frondes, appendices morphologiquement similaires à des feuilles. On peut noter en fin de période de croissance la présence d'aérocystes volumineux et de forme ovale, disposés en chaînes le long des axes secondaires. Ces flotteurs ont inspiré le nom d'espèce, *baccata* signifiant « orné de perles ». Les réceptacles, apicaux et similaires à des tubercules, portent souvent des appendices plus ou moins épineux.



Figure 23 : Thalle de *Cystoseira baccata*, cliché centré sur l'axe primaire et les aërocystes

Cystoseira baccata se retrouve sur l'estran préférentiellement dans le bas de l'étage infralittoral, et plus anecdotiquement jusqu'au haut du médiolittoral, dans des cuvettes, depuis les zones battues jusqu'aux secteurs abrités. Cette relative ubiquité sur l'estran semble témoigner d'une grande valence écologique face aux variations journalières de température caractérisant ces milieux.

Depuis la description complète que Roberts (1967b) en a donné, cette espèce a été le sujet de plusieurs travaux. Elle a été étudiée d'un point de vue écologique (Le Lann, 2009), d'un point de vue chimique (Glombitza *et al.*, 1981 ; Le Lann & Stiger-Pouvreau, 2009 : étude des phlorotannins ; Mokrini *et al.*, 2008 : étude des dérivés terpéniques). Sa capacité de bioabsorption de métaux lourds a également été démontrée (Lodeiro *et al.*, 2006 ; Herrero *et al.*, 2005).

Encadré 1 : Noms binomiaux employés dans la littérature et synonymie. Sources : Guiry & Guiry, 2008 ; Dizerbo & Herpe, 2007 ; Cabioc'h *et al.*, 2006 ; Sauvageau, 1912

CYTOSEIRA BACCATA (S.G. GMELIN) P.C. SILVA

- *Fucus baccatus* S.G. Gmelin 1768
- *Fucus abrotanoides* S.G. Gmelin 1768
- *Fucus fibrosus* Hudson 1778
- *Cystoseira fibrosa* (Hudson) C. Agardh 1820
- *Cystoseira thesiophylla* Duby 1830
- *Phyllacantha fibrosa* (S.G. Gmelin) Kützinger 1843
- *Phyllacantha thesiophylla* (Duby) Kützinger 1860

CYTOSEIRA FENICULACEA (LINNAEUS) GREVILLE

- *Phyllacantha concatenata* (Linnaeus) Kützinger
- *Fucus foeniculaceus* Linnaeus 1753
- *Fucus concatenatus* Linnaeus 1753
- *Fucus abrotanifolius* Linnaeus 1753
- *Fucus discors* Linnaeus 1767
- *Cystoseira concatenata* (Linnaeus) C. Agardh 1820
- *Cystoseira abrotanifolia* (Linnaeus) C. Agardh 1820
- *Cystoseira discors* (Linnaeus) C. Agardh 1828
- *Cystoseira ercegovicii* Giaccone 1973

CYTOSEIRA HUMILIS SCHOUSBOE EX KÜTZING

- *Cystoseira barbata* var. *pumila* Montagne 1841
- *Cystoseira pumila* Kützinger 1860
- *Cystoseira canariensis* Sauvageau 1912
- *Cystoseira compressa* var. *pustulata* Ercegovic
- *Cystoseira abrotanifolia* subsp. *pustulata* Ercegovic 1952
- *Cystoseira barbata* (Goodenough & Woodward) C. Agardh
- *Cystoseira myriophylloides* Sauvageau

CYTOSEIRA NODICAULIS (WITHERING) M. ROBERTS

- *Fucus mucronatus* Turner
- *Fucus nodicaulis* Withering 1796
- *Cystoseira granulata* C. Agardh

CYTOSEIRA TAMARISCIFOLIA (HUDSON) PAPENFUSS

- *Fucus selaginoides* Linnaeus 1759
- *Fucus tamariscifolius* Hudson 1762
- *Fucus ericoides* Linnaeus 1763
- *Cystoseira ericoides* (Linnaeus) C. Agardh 1820
- *Cystoseira ericoides* var. *laevis* P.J.L. Dangeard 1949
- *Cystoseira ericoides* var. *divaricata* P.J.L. Dangeard 1949
- *Cystoseira selaginoides* (Linnaeus) Zanardini

2.3.2 *CYTOSEIRA FÆNICULACEA* (LINNAEUS) GREVILLE

C. fœniculacea (Greville, 1830) est l'espèce-type du genre *Cystoseira*, initialement décrite par Linnée (1753) sous le nom de *Fucus concatenatus*. L'espèce est bien installée sur les côtes Est-Atlantiques, depuis les îles Britanniques jusqu'au Sénégal. Elle colonise également la Mer Méditerranée jusqu'en Turquie, et s'est installée en Mer Rouge (Guiry & Guiry, 2011).

Cystoseira fœniculacea est une espèce cespiteuse (plusieurs axes principaux se développent directement à partir du disque basal), qui est caractérisée par la ramification alterne et distique de ses axes, qui se fait dans un plan (Figure 24), et par la présence de rameaux aplatis rappelant des feuilles, comme les frondes que l'on peut observer chez les spécimens du genre *Sargassum*. Les réceptacles sont terminaux, fusiformes et lisses. Les populations sont la plupart du temps observées dans les cuvettes profondes de l'étage médiolittoral, en mode abrité.



Figure 24 : Thalle de *Cystoseira fœniculacea*, détail des axes secondaires, aérocystes et réceptacles

Ce taxon a fait l'objet d'un nombre restreint d'études. A notre connaissance, seules des études taxinomiques descriptives ont été consacrées à cette espèce (Roberts, 1968 ; Dawson, 1941). Une position hypothétique de *Cystoseira fæniculacea* dans l'arbre phylogénétique du genre a été proposée par Giaccone (Amico, 1995). A notre connaissance, aucune étude chimique n'a été menée sur ce taxon.

2.3.3 *CYSTOSEIRA HUMILIS* SCHOUSBÆ EX KÜTZING

Ce taxon a été pour la première fois présenté par Schousbæ à partir de l'herbier Sonder de Tanger, mais la description valide a été publiée par Kützing (1860). L'espèce colonise l'Est-Atlantique, depuis les îles Britanniques jusqu'en Mauritanie, et est observée globalement dans toute la Mer Méditerranée (Guiry & Guiry, 2011).

Les individus sont cespiteux et généralement de petite taille, ce caractère étant à l'origine du nom d'espèce. Dans l'absolu, c'est le mode de ramification des axes secondaires qui permet une distinction nette entre *Cystoseira humilis* et *C. fæniculacea*. En effet chez *C. humilis*, les rameaux se développent en tous sens, de sorte qu'ils n'ont aucunement l'aspect d'une feuille plane (Figure 25). Les réceptacles sont apicaux, fusiformes et lisses. En Bretagne, l'espèce est observée en mode abrité à semi-battu, dans les cuvettes hautes de l'étage médiolittoral. (Cabioc'h et al., 2006).

Cystoseira humilis a été le sujet d'études en écologie (Engelen et al., 2008 ; Pardi et al., 2000). Amico (1995) indique qu'elle a fait l'objet d'investigations concernant ses métabolites secondaires lipophiles.



Figure 25 : Rameaux secondaires (avec aérocystes) du thalle de *Cystoseira humilis*

2.3.4 *CYSTOSEIRA NODICAULIS* (WITHERING) M. ROBERTS

D'abord décrite par [Withering \(1796\)](#) sous le nom de *Fucus nodicaulis*, l'espèce a fait l'objet d'une révision taxinomique ([Roberts, 1976](#)) qui lui a donné son nom actuel. Son aire de répartition s'étend de l'Écosse à la Mauritanie, et elle pénètre en Méditerranée jusqu'en Tunisie ([Guiry & Guiry, 2011](#)). En 1912, Sauvageau évoque une installation en cours de cette espèce dans le Sud-Ouest de la France, sans doute en provenance de régions plus septentrionales. Ceci amène à considérer, de façon générale, le Nord-Est de l'Atlantique comme un foyer potentiel de l'espèce *Cystoseira nodicaulis*.

Les thalles de cette espèce possèdent un axe primaire unique, pourvu de renflements caractéristiques (tophules, Figure 20) qui sont les départs d'axes secondaires. Les rameaux sont épineux, et les plus jeunes sont iridescents, généralement verts (Figure 26). Les réceptacles sont de forme variable, plus ou moins tuberculeux, et portent des épines. Les populations sont particulièrement bien installées dans les cuvettes abritées du bas de l'étage

médiolittoral ; ainsi *C. fæniculacea* et *C. nodicaulis* sont souvent observées l'une à côté de l'autre.

Les investigations publiées sur *Cystoseira nodicaulis* ont eu principalement trait à l'écologie (Viejo, 1999 ; Arenas *et al.*, 1995). Une étude physiologique sur l'assimilation du carbone et son transport a été menée par Dumay (1981). Elle a également fait l'objet d'une étude chimique (Glombitza *et al.*, 1985).



Figure 26 : Rameaux de *Cystoseira nodicaulis*, avant la formation de réceptacles

2.3.5 *CYSTOSEIRA TAMARISCIFOLIA* (HUDSON) PAPENFUSS

D'abord observée par Linnée en 1753 et nommée à l'époque *Fucus selaginoides*, le nom actuel a été donné par Papenfuss (1950). L'espèce est principalement installée sur les côtes Atlantiques, des îles Britanniques à la Mauritanie. Des populations ont également été signalées en Méditerranée occidentale (en Italie et en Tunisie), voire orientale (Turquie). Cependant, d'après Roberts (1970), *Cystoseira tamariscifolia* ne se développe pas en

Méditerranée orientale. Une explication possible pour sa présence en Turquie serait une introduction récente de l'espèce, ou une extension très rapide de l'aire de distribution de ce taxon vers l'Est de la Méditerranée.

Les individus possèdent un seul axe primaire qui peut se ramifier à proximité du disque basal. Les axes secondaires se ramifient sans organisation particulière et ils présentent, selon les saisons et les sites, des aérocytes volumineux. Les rameaux sont couverts d'épines, et sont dans l'ensemble fortement iridescents. Leur teinte va du vert au violet, en passant par le bleu (Figure 27). Les réceptacles sont terminaux, tuberculeux et épineux.



Figure 27 : Rameaux terminaux de *Cystoseira tamariscifolia*, avec aérocytes

Sauvageau (1912) a décrit chez *Cystoseira tamariscifolia* un phénomène rare chez les algues : la présence d'individus exclusivement femelles dans une population, en mélange avec des individus hermaphrodites. Néanmoins il ne précise pas l'origine géographique des échantillons observés. Cependant, un échantillon prélevé en 1836 à Cherbourg (disponible

dans l'herbier Thuret), et annoté « Conceptacles femelles ; pas d'anthéridies », confirme ces observations. Toutefois, aucun individu uniquement mâle n'a jamais été rapporté chez cette espèce, ni chez aucune cystoseire d'ailleurs (Roberts, 1967a).

Cette espèce se niche dans les cuvettes du bas du médiolittoral et jusque dans l'étage infralittoral, en mode abrité (Cabioch *et al.*, 2006). Elle a fait l'objet de nombreuses études, et notamment une détermination des interactions entre la lumière et les composés phénoliques sur le terrain (Abdala-Diaz *et al.*, 2006), la caractérisation de ses composés phénoliques (Glombitza *et al.*, 1975), l'isolement de métabolites de type terpénoïdes (Bennamara *et al.*, 1999 ; Amico & Piatelli, 1989), et l'évaluation d'activités biologiques d'extraits (Souhaili *et al.*, 2004 ; Abourriche *et al.*, 1999).

2.4 COMPLÉMENT D'INFORMATION POUR LA DISCRIMINATION DES 5 ESPÈCES

Afin de faciliter la reconnaissance d'échantillons à partir de spécimens conservés dans des alguiers, des dessins de thalles sont présentés en Figure 28. Les éléments caractéristiques observables sur des échantillons d'alguiers sont ainsi :

- la présence de gros aérocystes, et d'appendices aplatis sur les rameaux de *Cystoseira baccata* ;
- l'alternance et l'agencement dans un plan des rameaux de *C. fœniculacea* ;
- la profusion de rameaux de dernier ordre chez *C. humilis*, sans organisation particulière ;
- la présence de rameaux fins aux épines discrètes chez *C. nodicaulis* ;
- des axes épais aux épines saillantes chez *C. tamariscifolia*.

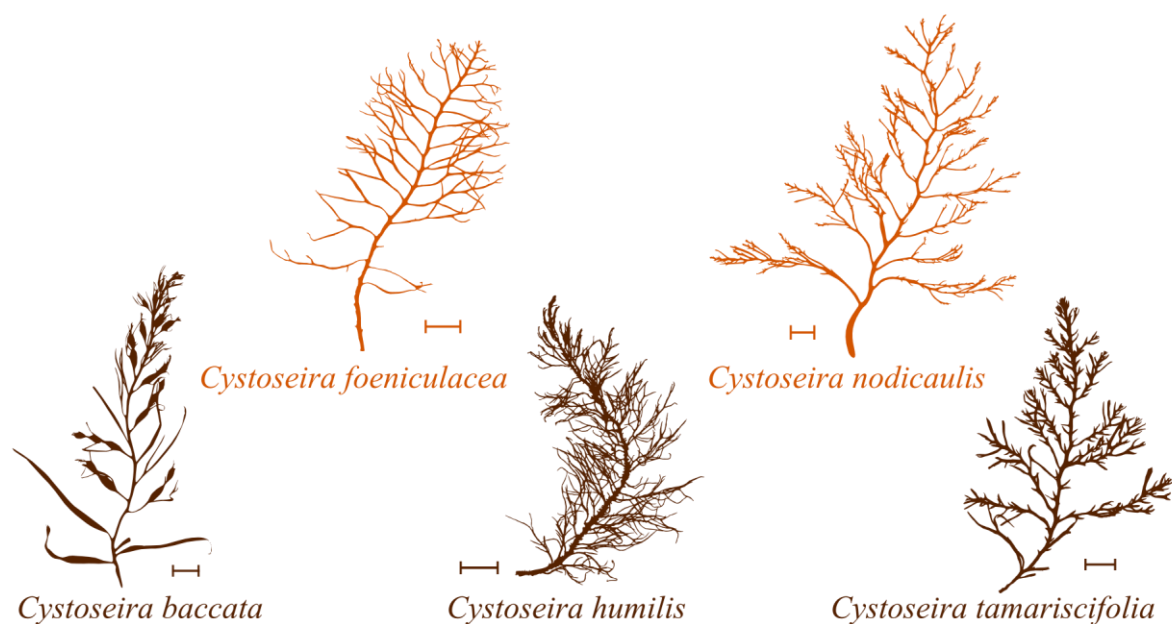


Figure 28 : Profils de jeunes rameaux apicaux de cystoseires d'après des spécimens d'alguier (collection personnelle) ; barre d'échelle : 1 cm

Avant d'envisager d'étudier un organisme vivant, il est primordial de s'assurer de l'identification des spécimens utilisés. En effet, il n'est pas rare, lorsque plusieurs études chimiques se succèdent sur un même taxon, que des erreurs de détermination des spécimens soient mises en évidence (Tringali, 1997). Aussi nous avons choisi de consacrer le premier volet de notre étude (Chapitre II de ce manuscrit) à une caractérisation taxinomique avancée des cinq espèces de *Cystoseira*, par une approche originale combinant des méthodes de chimie analytique et une phylogénie moléculaire plus classique, afin d'associer une « carte d'identité chimique » à chaque taxon.

CHAPITRE II

TAXINOMIE ET SYSTÉMATIQUE DES ESPÈCES DU GENRE *CYSTOSEIRA* EN BRETAGNE

1 INTRODUCTION

1.1 HISTORIQUE TAXINOMIQUE ET SYSTÉMATIQUE AU SEIN DU GENRE *CYSTOSEIRA*

1.1.1 OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES ET CYTOLOGIQUES

C'est à Linné (1753) que l'on doit la première description d'une cystoseire. Le genre a été proposé plus tard par C.A. Agardh (1820), qui le caractérise par une courte sélection de caractères essentiels : « réceptacles tuberculeux présentant de nombreuses loges perforées, qui renferment des fils articulés entremêlés ».

L'auteur n'ayant pas précisé de type pour ce genre, le *Fucus concatenatus* de Linné (1753) a été proposé comme lectotype par Bachelot de la Pylaie (1829). Le spécimen le plus ancien de *Fucus concatenatus* est celui de Van Royen (1740), déposé au Rijksherbarium de Leiden, Pays-Bas (référence : Herb. Lugdb. 910, 153-1332), et présenté en Figure 29. Roberts (1967a) le reconnaît comme un spécimen de *Cystoseira fæniculacea*, qui représente depuis lors l'espèce-type du genre.



Figure 29 : Spécimen de *Fucus concatenatus* de Van Royen, d'après Roberts (1967)

La désignation d'un type au genre *Cystoseira* est ainsi survenue plus de 200 ans après la première description de *C. fæniculacea*, et plus de 130 ans après la création du genre par C. A. Agardh. Cet intervalle de temps considérable témoigne d'une taxinomie et d'une systématique qui n'ont pas été établies sans difficultés par plusieurs générations de phycologues.

Les travaux de **Roberts (1967a)** constituent un excellent moyen de s'initier à la taxinomie, la classification et plus largement la biologie du genre *Cystoseira*, tout particulièrement pour les cinq espèces décrites dans ce manuscrit. L'auteur reprend les descriptions du genre d'**Ercegović (1952)**, réalisées d'après des échantillons de l'Adriatique et celles de **Sauvageau (1912)**, qui s'est appuyé sur des algues des côtes atlantiques et méditerranéennes de France.

C'est cependant à **Valiante (1883)** que l'on doit une des premières études de cystoseires, et son travail est bien plus qu'un simple inventaire d'espèces. Il décrit dans son manuscrit le développement embryonnaire, celui de l'appareil végétatif, de l'appareil reproducteur, et fournit une description pour 11 espèces du golfe de Naples. Il présente également plusieurs planches illustratives, qui détaillent l'aspect du thalle pour les différentes espèces, ainsi que quelques caractéristiques cytologiques communes au sein du genre : aspects des zygotes, différenciations des tissus, présence de cryptes pilifères (Figure 30).

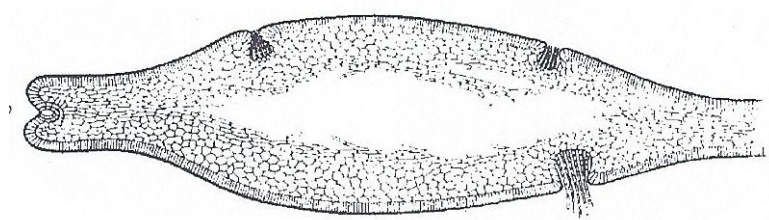


Figure 30 : Coupe transversale d'une cystoseire au niveau d'un aérocyte avec cryptes pilifères, d'après Valiante (1883)

L'étude de **Sauvageau (1912)** qui dresse le premier bilan taxinomique du genre *Cystoseira* à l'échelle européenne, s'appuie notamment sur la monographie de Valiante. Ses propos relatent la difficulté des phycologues du XIX^{ème} siècle à définir les espèces et à s'entendre sur la classification. Ainsi, il affirme :

Page 135 : « Les diagnoses des anciens auteurs sont tellement brèves et si peu précises qu'elles laissent presque toujours le lecteur dans l'indécision. D'ailleurs, C. AGARDH, BERTOLONI, NACCARI, ZANARDINI, BORY, etc., sont loin de s'entendre sur les espèces de LINNÉ, GMELIN, WULFEN, ESPER, DELLE CHIAJE, HUDSON, STACKHOUSE, GOODENOUGH et WOODWARD, POIRET, etc. [...] ».

Son ouvrage est, aujourd'hui encore, la plus grande synthèse réalisée sur le genre *Cystoseira*. Sauvageau y décrit notamment la morphologie générale de l'appareil végétatif et de l'appareil reproducteur. Pour chaque espèce reconnue, il confronte les descriptions des anciens auteurs ainsi que leurs échantillons conservés en alguiers, pour « fusionner » des taxons et limiter les problèmes de synonymie. Il en précise également les traits morphologiques et la période de reproduction d'après ses observations personnelles à Banyuls et à Guéthary, ainsi que l'aire de distribution.

Face à la diversité du genre *Cystoseira* est apparue la nécessité d'établir une arborescence dans sa classification et d'établir des associations d'espèces proches. C'est également à Sauvageau (1911) que l'on doit la première esquisse en ce sens. D'après ses observations sur la biologie de la reproduction de nombreux échantillons atlantiques et méditerranéens, il établit un groupe : les « *Cystoseira* à anthérozoïdes sans point rouge » qui, exclusion faite de plusieurs synonymes, réunit *C. faeniculacea*, *C. humilis* et *C. compressa*. Plus tard, Roberts (1967a, 1968a) expliquera que les gamètes mâles de ces trois espèces sont en fait dépourvus de stigma, une vésicule rouge riche en caroténoïdes, très courante chez les représentants de l'Ordre des Fucales. Guern (1962), en observant le développement des rhizoïdes de l'embryon chez 12 espèces de l'Océan Atlantique ou de la Mer Méditerranée, confirme que ces trois espèces se distinguent nettement des autres par le développement de 8 rhizoïdes primaires, contre 4 pour *C. baccata*, *C. brachycarpa*, *C. crinita*, *C. elegans*, *C. mediterranea*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia* (Figure 31).

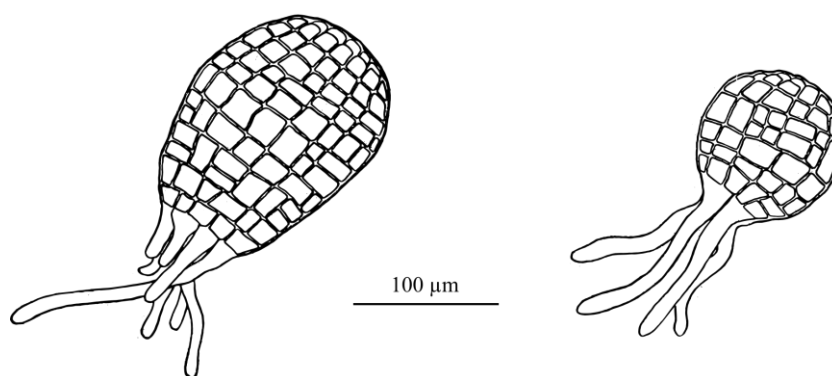


Figure 31 : Zygote âgé de trois jours de *Cystoseira compressa* (à gauche) et de *C. mediterranea* (à droite), d'après Guern (1959)

Roberts (1977, 1970, 1968a, 1968b, 1968c, 1967a, 1967b, 1966) a consacré de nombreux travaux à l'étude du genre *Cystoseira*, en orientant son propos vers les spécimens de cystoseires des Îles Britanniques (*Cystoseira baccata*, *C. fœniculacea*, *C. humilis*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia*). Elle souligne l'apport de plusieurs caractères qui renforcent la validité du groupe des « cystoseires à anthérozoïdes sans point rouge ». Les critères suivants sont évoqués pour illustrer la singularité de *C. fœniculacea* et de *C. humilis* face aux autres espèces : la cytologie (observations sur les noyaux des cellules) ; la morphologie (aspect caractéristique des apex des axes principaux, organisation singulière des cryptes pilifères) ; la reproduction (développement et organisation particuliers du réceptacle, spermatocystes presque sessiles dans le conceptacle, absence de stigma dans les spermatozoïdes).

En outre, parmi le genre *Cystoseira*, la fécondation a lieu dans la colonne d'eau, sauf précisément chez les trois espèces (*C. fœniculacea*, *C. humilis* et *C. compressa*) listées par Guern (1962), pour lesquelles les oosphères restent à proximité du réceptacle, comme ce qui est décrit chez les genres *Sargassum* et *Turbinaria* (Stiger, 1997).

Par la suite, la classification du genre a été grandement complétée par Giaccone (Amico, 1995), qui a également étudié de nombreux taxons méditerranéens. L'auteur y décrit une phylogénie hypothétique du genre *Cystoseira*, présentée à la Figure 32. Selon Giaccone, les cinq espèces des côtes bretonnes appartiendraient à des lignées différentes au sein du genre *Cystoseira*. Il confirme également la distinction entre *C. fœniculacea* – *C. humilis* d'une part et *C. baccata*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia* d'autre part.

Malgré ces avancées, la classification au moyen d'analyses morphologiques ou cytologiques demeure une tâche longue et fastidieuse, et ce pour de nombreuses raisons. Incohérences entre herbiers, descriptions laconiques des échantillons (Sauvageau, 1912), grande variabilité morphologique sous la dépendance des conditions environnementales (Roberts, 1967), sont autant d'obstacles à l'établissement d'une taxinomie indiscutable. De plus, les critères morphologiques ne sont pas forcément le reflet d'une vérité phylogénétique. Ainsi, Horiguchi & Yoshida (1998) ont démontré que le mode de ramification des thalles, critère précédemment utilisé pour distinguer les *Sargassaceae* des *Cystoseiraceae*, n'avait pas de sens en cladistique. Cette étude est d'ailleurs le point de départ d'analyses phylogénétiques ayant permis la réintégration des *Cystoseiraceae* dans la famille des *Sargassaceae*.

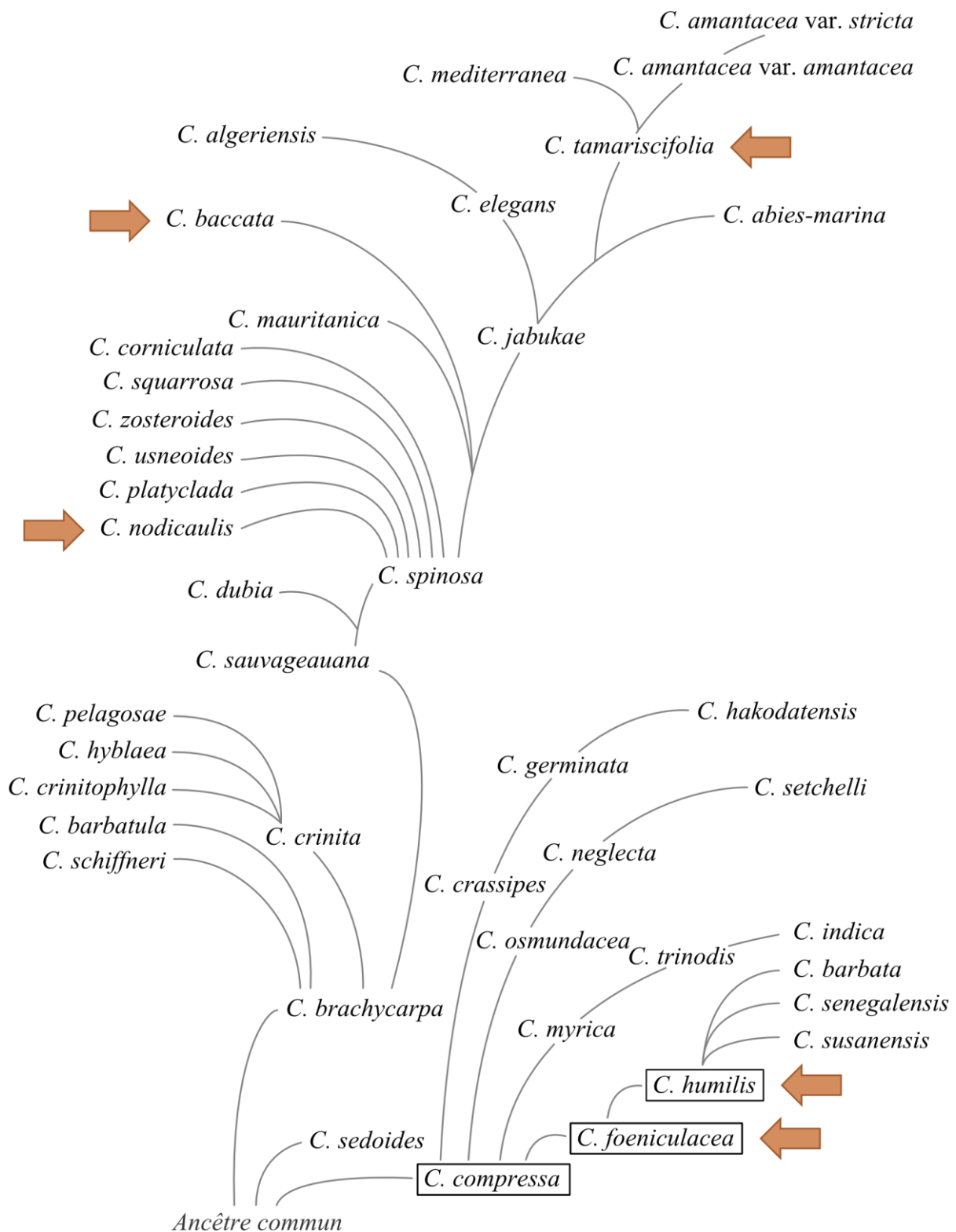


Figure 32 : Arbre hypothétique des relations phylogénétiques existant entre les espèces du genre *Cystoseira* d'après Giaccone (Amico, 1995). Les encadrés regroupent les espèces « à anthérozoïdes sans point rouge ». Les noms des cinq espèces étudiées dans ce manuscrit sont désignés par les flèches

1.1.2 LA CLASSIFICATION CHIMIOTAXINOMIQUE

La deuxième moitié du XX^{ème} siècle, sous l'impulsion de progrès en techniques analytiques, a permis à la classification de prendre un tournant inédit. La caractérisation des substances naturelles synthétisées par certaines espèces du genre *Cystoseira* et la chimiotaxinomie qui s'appuie sur la présence de métabolites pour élaborer des classifications ont fourni de nouveaux arguments aux phycologues.

Plusieurs espèces de *Cystoseira* produisent diverses molécules de la famille des terpènes. Ces composés sont similaires en ce sens que tous sont constitués d'un nombre précis d'unités d'isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène). Au sein de la famille des Fucales, seuls des diterpènes sont observés, c'est-à-dire des molécules constituées de 4 unités d'isoprène (Amico, 1995 ; Valls & Piovetti, 1995). Les sesquiterpènes, molécules à 3 unités d'isoprène, sont quant à elles caractéristiques des *Dictyotales* (Kornprobst, 2010).

Certaines cystoseires produisent ainsi des diterpènes, et en fonction de l'espèce, on observe une palette de molécules variable (Figure 33).

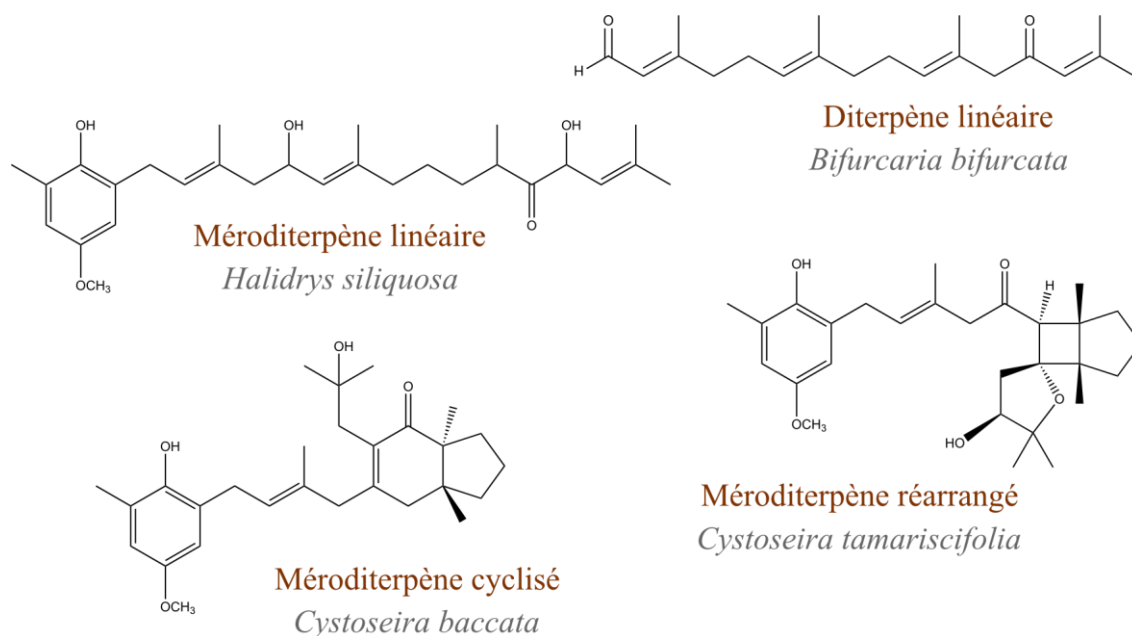


Figure 33 : Exemples de diterpènes identifiés dans la famille des *Sargassaceae*, d'après Mokrini *et al.* (2008) et Amico (1995)

D'après Valls & Piovetti (1995), on peut observer :

- Des **diterpènes linéaires**, constitués d'un enchaînement de 4 unités isopréniques. Ce sont les seuls composés identifiés chez *Bifurcaria bifurcata*, et on en trouve aussi chez *Cystoseira tamariscifolia* ;
- Des **méroditerpènes linéaires**, constitués de 4 unités isopréniques associées à un cycle aromatique. A ce jour, seul ce type de composés a été isolé chez *Halidrys siliquosa* (Culioli *et al.*, 2008), et des composés similaires ont été identifiés chez *C. tamariscifolia* ;
- Des **méroditerpènes cyclisés**, qui sont le produit d'une ou de plusieurs cyclisation(s) internes d'un méroditerpène linéaire. Ce sont les seuls terpènes que *Cystoseira baccata* produise (Mokrini *et al.*, 2008 ; Amico, 1995), et on en trouve également chez *C. tamariscifolia* ;
- Des **méroditerpènes réarrangés**, qui sont des méroditerpènes cyclisés dont certaines fonctions ont subi une migration intramoléculaire. Parmi les espèces de Bretagne, seule *C. tamariscifolia* en produit.

Les méroditerpènes sont issus d'une voie biosynthétique mixte, qui comprend la voie du géranylgeraniol (voie des diterpènes linéaires) et celle de l'acide shikimique, à l'origine de la partie aromatique de la molécule (Valls & Piovetti, 1995).

Ces molécules font l'objet de nombreuses investigations, notamment en raison de leur large palette d'activité biologique : antimicrobienne, antifouling, anti-tumorale, cytotoxique (Bourgougnon & Stiger-Pouvreau, 2011 pour revue). Toutefois, de très nombreuses études décrivant de nouveaux terpènes chez des espèces du genre *Cystoseira* les exploitent pour établir des classifications entre espèces. Ainsi Pellegrini *et al.* (1997), Amico (1995) et Valls & Piovetti (1995) présentent un bilan taxinomique des cystoseires qui s'appuie sur la composition en métabolites secondaires lipophiles.

D'après la dernière étude, plusieurs groupes ont été réalisés parmi les espèces :

- Groupe 1 : Pas de synthèse de métabolites secondaires de type terpènes. Synthèse privilégiée de stérols. C'est le cas notamment de *Cystoseira humilis* et de *C. compressa* ;

- Groupe 2 : Synthèse de diterpènes linéaires Exemple : *C. brachycarpa*, *C. balearica* ;
- Groupe 3 : Synthèse de méroditerpènes. Exemples : *C. baccata*, *C. tamariscifolia*.

D'après Amico (1995) et Valls & Piovetti (1995), *C. fœniculacea* et *C. nodicaulis* n'ont pas encore fait l'objet d'études relatives à leur métabolites secondaires lipophiles.

Néanmoins, l'ensemble des travaux publiés de taxinomie, qui recourent la morphologie, la cytologie, la reproduction et la chimie des espèces, semblent confirmer la cohérence du groupe « *C. fœniculacea*, *C. humilis* et *C. compressa* ».

1.1.3 L'APPORT DE LA PHYLOGÉNIE MOLÉCULAIRE

La fin du XX^{ème} siècle coïncide avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire. Le séquençage de certaines portions de génome a permis de trancher sur des questions que les analyses morphologiques et chimiques laissaient sans réponse. En outre, la phylogénie moléculaire constitue une méthode objective et robuste pour décrire des relations de parenté, aboutissant ainsi à des classifications plus solides. De grands changements taxinomiques en ont découlé. Actuellement, au sein du genre *Cystoseira*, 293 noms d'espèces et de variété sont répertoriés dans la banque de données Algaebase. Seulement 43 espèces sont taxinomiquement reconnues (Encadré 2).

De multiples études s'appuyant sur des échantillons provenant des Océans Atlantique et Pacifique et de la Mer Méditerranée ont mis en lumière la polyphylie du genre *Cystoseira*, et ont remis en question la validité de la famille des *Cystoseiraceae*, ses représentants rejoignant alors la famille des *Sargassaceae* (voir références au Chapitre I).

Cependant, au commencement de nos travaux, il n'existait à notre connaissance aucune étude qui se proposait de résoudre les relations phylogénétiques parmi les cinq espèces colonisant les côtes bretonnes. Les résultats de Rousseau & de Reviers, (1999) et de Rousseau *et al.*, (1997) permettent néanmoins de reconstituer les relations évolutives existant entre quelques espèces et d'autres membres de la famille des *Sargassaceae* (Tableau 1).

Encadré 2 : Espèces de *Cystoseira* taxinomiquement reconnues, d'après Guiry & Guiry (2011) avec l'espèce type mise en gras

Cystoseira abies-marina (S.G.Gmelin) C.Agardh

Cystoseira algeriensis Feldmann

Cystoseira amentacea var. *stricta* Montagne

Cystoseira amentacea (C.Agardh) Bory de Saint-Vincent

Cystoseira baccata (S.G.Gmelin) P.C.Silva

Cystoseira barbata (Stackhouse) C.Agardh

Cystoseira barbatula Kützing

Cystoseira brachycarpa J.Agardh

Cystoseira compressa (Esper) Gerloff & Nizamuddin

Cystoseira concatenata f. *repens* Zinova & Kalugina

Cystoseira corniculata (Turner) Zanardini

Cystoseira crinita Duby

Cystoseira crinitophylla Ercegovic

Cystoseira dubia Valiante

Cystoseira elegans Sauvageau

***Cystoseira foeniculacea* (Linnaeus) Greville**

Cystoseira funkii Schiffner ex Gerloff & Nizamuddin

Cystoseira helvetica Heer

Cystoseira humilis Schousboe ex Kützing

Cystoseira hyblaea G.Giaccone

Cystoseira jabukae Ercegovic

Cystoseira mauritanica Sauvageau

Cystoseira mediterranea Sauvageau

Cystoseira montagnei J.Agardh

Cystoseira myrica var. *occidentalis* J.Agardh

Cystoseira nodicaulis (Withering) M.Roberts

Cystoseira occidentalis Gardner

Cystoseira pelagosae Ercegovic

Cystoseira planiramea Schiffner

Cystoseira platyclada Sauvageau

Cystoseira rayssiae E.Ramon

Cystoseira sauvageauana Hamel

Cystoseira schiffneri Hamel

Cystoseira sedoides (Desfontaines) C.Agardh

Cystoseira senegalensis P.A.Dangeard

Cystoseira sonderi (Kützing) Piccone

Cystoseira spinosa Sauvageau

Cystoseira squarrosa De Notaris

Cystoseira susanensis Nizamuddin

Cystoseira tamariscifolia (Hudson) Papenfuss

Cystoseira usneoides (Linnaeus) M.Roberts

Cystoseira wildpretii Nizamuddin

Cystoseira zosteroides C.Agardh

Tableau 2 : Bilan des travaux de chercheurs montrant les avancées moléculaires sur les relations phylogénétiques au sein du genre *Cystoseira* : Rousseau et collaborateurs (marqueur : LSU, ADN_r)

Études	Résultats
Rousseau et al. (1997)	<i>Cystoseira tamariscifolia</i> et <i>Bifurcaria bifurcata</i> sont 2 espèces-sœurs. <i>Cystoseira nodicaulis</i> est proche de ces deux espèces. <i>Cystoseira humilis</i> est proche de <i>Sargassum muticum</i> , plus que des autres cystoseires.
Rousseau & de Reviers (1999)	Mêmes conclusions que l'étude précédente. <i>Cystoseira baccata</i> et <i>Cystoseira nodicaulis</i> sont 2 espèces-sœurs.

1.2 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE TAXINOMIQUE AU SEIN DU GENRE *CYTOSEIRA*

Notre démarche a pour vocation de présenter un bilan taxinomique et une classification actualisés des cinq espèces de *Cystoseira* peuplant le littoral breton : *Cystoseira baccata*, *C. fœniculacea*, *C. humilis*, *C. nodicaulis*, et *C. tamariscifolia*. En effet, en 2008, date de commencement de ces travaux, la classification n'avait été que partiellement explorée, et aucune phylogénie intégrant ces cinq espèces n'avait été publiée. Nos travaux sont intrinsèquement pluridisciplinaires, en intégrant :

- Une approche « chimique », où certaines molécules sont utilisées en tant que marqueurs spécifiques ;
- Une phylogénie moléculaire, qui permet d'établir une classification d'après des séquences d'ADN, tenant compte de l'histoire évolutive des espèces.

Notre étude taxinomique se donne deux objectifs : (1) établir les relations phylogénétiques existant entre les cinq espèces, par l'utilisation de techniques analytiques innovantes et validées par une démarche classique de taxinomie moléculaire et (2) isoler des chimiomarqueurs soupçonnés par l'utilisation des deux techniques précédentes.

En introduction à notre travail de chimiotauxinomie, nous présentons des analyses en chromatographie sur couche mince (CCM) d'extraits lipophiles. Nous avons tenté d'utiliser

cette démarche qui s'est avérée pertinente à l'échelle intraspécifique chez *Bifurcaria bifurcata* (Le Lann, 2009 et références incluses), l'auteur ayant caractérisé différents écotypes grâce à l'analyse en CCM d'extraits d'algue. L'objectif de cette analyse préliminaire est de déterminer si cette méthode peut être discriminante à l'échelle interspécifique au sein du genre *Cystoseira*.

Ensuite, nous présentons des travaux qui s'appuient sur des résultats de biologie moléculaire (arbres phylogénétiques issus du marqueur nucléaire ITS2) et sur deux méthodes de chimie analytique : la Résonance Magnétique Nucléaire sur échantillons solides (^1H RMN HR-MAS), qui nous permet d'analyser la composition chimique des algues sans extraction, et la Chromatographie en Phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en Ionisation par Électronébulisation (LC-ESI-MSⁿ), que nous utilisons pour détecter les métabolites dans des extraits lipophiles. L'objectif de cette étude est de montrer la pertinence de ces deux méthodes analytiques pour résoudre des questions taxinomiques au sein du genre *Cystoseira*, et de façon plus générale, de vérifier la cohérence entre les données chimiques et moléculaires.

Enfin, nous avons souhaité caractériser certaines molécules, dont nous avançons l'intérêt chimiotaxinomique, détectées *in vivo* et dans les extraits. Parmi les cinq espèces de *Cystoseira*, nous avons plus particulièrement cherché des marqueurs de type terpène chez *C. fæniculacea* et *C. nodicaulis*, les autres espèces ayant déjà fait l'objet d'isolement de chimiomarqueurs. Dans ce Chapitre II sont ainsi détaillées l'extraction, la purification et la caractérisation structurale du dérivé terpénique synthétisé par *C. nodicaulis*.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 DISCRIMINATION DES ESPÈCES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Pour nos analyses, nous avons repris le protocole détaillé par [Le Lann \(2009\)](#). Il se déroule en trois temps : une extraction, une séparation des composés par chromatographie sur couche mince (CCM) et une révélation. La CCM est une technique chromatographique simple d'accès, qui permet de séparer les composés en mélange dans un échantillon. Les différents échantillons sont déposés sur une plaque (qui constitue la phase stationnaire), elle-même placée à la verticale dans une enceinte close contenant un peu de solvant de migration (phase mobile). Le solvant remonte la plaque par capillarité, entraînant plus ou moins les molécules avec lui. De cette façon, en fin de migration, on observe différentes tâches qui illustrent la séparation des composés caractérisés par différents rapports frontaux (distances de migration des molécules rapportées à celle du solvant). Certaines molécules sont difficilement visibles à l'œil nu, ou se confondent avec d'autres familles de composés, c'est pourquoi on utilise des révélateurs afin de les observer plus facilement.

En mai 2009, nous avons échantillonné les cinq espèces de *Cystoseira* à Penmarc'h, ainsi que les trois autres membres de la famille des *Sargassaceae* : *Sargassum muticum*, *Halidrys siliquosa* et *Bifurcaria bifurcata*. Cette dernière espèce a d'ailleurs déjà fait l'objet d'une analyse en CCM par [Le Lann \(2009\)](#).

Les composés lipophiles ont été extraits avec 100 mL de mélange méthanol/dichlorométhane 1:1 (V/V), à partir d'1 g de poudre d'algue, pendant 3 heures, à température ambiante et à l'obscurité. L'ensemble a ensuite été filtré sur coton de verre et centrifugé (5000 tours/min pendant 10 minutes à température ambiante). Puis, la phase supérieure liquide a été récupérée et le volume de solvant réduit à 10 mL de méthanol par évaporation rotative, pour constituer l'extrait brut.

Les échantillons (extraits bruts) ont été déposés sur plaque CCM (TLC Silicagel 60 F₂₅₄, 20x20, MERCK), et le solvant de migration utilisé était un mélange hexane:éther diéthylique:acide acétique glacial (80:20:2, v:v:v). En fin de migration, les composés lipidiques ont été révélés par un mélange de sulfate de cuivre à 3 % et d'acide orthophosphorique à 8 %, en accord avec [Le Lann \(2009\)](#).

2.2 ÉTUDE DE TAXINOMIE GÉNÉRALE DU GENRE *CYTOSEIRA* EN BRETAGNE

L'étude de taxinomie générale que nous présentons ici a pour but d'approfondir les investigations chimiques initiées avec l'étude par CCM, en utilisant des techniques innovantes ayant deux objectifs (1) analyser plus en profondeur les extraits lipophiles et (2) obtenir un aperçu des métabolites *in vivo*. L'originalité de notre démarche est de confronter ces résultats à une approche de phylogénie moléculaire, afin de dessiner une classification qui s'appuie sur des critères moléculaires et chimiques.

2.2.1 COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

L'étude générale de chimiotaxinomie a nécessité un double échantillonnage. Afin d'évaluer la pertinence taxinomique des techniques chimiques et d'en déterminer la robustesse, un premier échantillonnage a été réalisé à Penmarc'h, en septembre 2008. La date a été retenue car étant située en dehors des périodes de « dormance » des espèces saisonnières (cet état de fait sera détaillé au Chapitre III).

Pour chaque espèce de cystoseire (*Cystoseira baccata*, *C. faeniculacea*, *C. humilis*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia*), trois individus ont été prélevés au hasard à différents endroits sur l'estran. Ainsi, 15 échantillons (3 par espèce) prélevés à Penmarc'h ont été retenus pour analyses chimiques.

Nous avons complété cet échantillonnage en décembre 2008, dans le but d'obtenir des tissus de « bonne qualité » pour analyses moléculaires. En effet, dans le cas particulier des algues brunes, de nombreux métabolites sont connus pour diminuer la qualité du matériel génétique, ou pour inhiber le fonctionnement de l'ADN polymérase, limitant alors l'amplification du fragment d'ADN ciblé (Snirc *et al.*, 2010 ; Phillips *et al.*, 2001). Pour pallier ces problèmes, il est possible d'extraire les acides nucléiques à partir de tissus ne contenant que peu de ces molécules gênantes. Les réceptacles, contenant de très nombreux gamètes, renferment de multiples copies de l'information génétique, et sont donc la partie du thalle la plus adéquate (Horiguchi & Yoshida, 1998). Les zones de croissance végétative (bourgeons) sont une alternative, en ce sens que là où se multiplient les cellules, le métabolisme secondaire n'est pas privilégié.

Ainsi la période choisie pour ce second échantillonnage (en plein hiver), correspond à un compromis pour optimiser la qualité des tissus retenus. Aussi avons-nous pu isoler des réceptacles chez *C. baccata*, *C. fæniculacea*, *C. humilis* et *C. nodicaulis* en cette saison, et retenir des bourgeons pour *C. tamariscifolia*. Les échantillons ont été prélevés à Porspoder, Portsall ou Plougonvelin, dans la région brestoise. Un seul individu a été récolté par espèce, et après récupération de réceptacles ou de bourgeons, le reste du thalle a été soumis à analyses chimiques.

Voici donc le bilan de nos échantillons pour chaque espèce :

- 3 thalles collectés à Penmarc’h + 1 thalle prélevé en région brestoise sont destinés à subir les deux analyses chimiques (^1H RMN HR-MAS et LC-ESI-MSⁿ) ;
- Le thalle prélevé en région brestoise est également soumis à des analyses phylogénétiques (amplification et séquençage du marqueur nucléaire ITS2).

2.2.2 EMPREINTES CHIMIQUES PAR ^1H RMN HR-MAS

Pour déterminer une signature chimique globale à nos échantillons, nous nous sommes appuyés sur la technique de Résonance Magnétique Nucléaire ^1H HR-MAS employée avec succès par [Le Lann et al. \(2008\)](#) pour discriminer des espèces proches au sein du genre *Turbinaria* (Fucales, *Phaeophyceae*). La technique de RMN, ainsi que son utilisation dans le cadre de nos travaux, sont présentées dans l’Encadré 3.

Nous avons utilisé comme échantillons des fragments d’apex (rameaux de dernier ordre) issus des 20 thalles collectés (15+5). Nous avons préféré ces parties du thalle car ce sont les moins épiphytées. Ainsi on s’assure d’analyser seulement la composition chimique de l’algue. Les thalles ont été lyophilisés avant de procéder à l’analyse. Les analyses ont été menées au Service de RMN-RPE de l’UBO. Les spectres RMN HR-MAS ont été acquis sur un spectromètre Bruker DRX 500, équipé d’une sonde HR-MAS $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ à 25°C. Chaque spectre se compose de 64 scans réalisés avec une présaturation du signal de l’eau. Pour obtenir un spectre, environ 5 mg de fragment d’algue ont été placés dans un rotor en oxyde de zirconium, auxquels on a ajouté 30 μL de D_2O . Le rotor est mis en rotation à 5 kHz, ce qui augmente la résolution sur le spectre. On s’approche ainsi de la qualité d’une analyse sur échantillon liquide.

Encadré 3 : Principe des méthodes de Résonance Magnétique Nucléaire utilisées

Principe

La spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire est une technique analytique développée en 1946 par Felix Bloch et Edward Mills Purcell, et qui s'est imposée depuis en chimie organique et chimie des substances naturelles. Néanmoins, son application la plus célèbre est sans doute l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), utilisé dans le domaine médical, et qui permet d'obtenir de façon non invasive des clichés de l'intérieur du corps humain.

La spectroscopie de RMN impulsionnelle consiste à enregistrer et mesurer le phénomène de résonance de noyau soumis à deux champs magnétiques. A chaque noyau atomique correspond un moment cinétique de spin, dont la valeur dépend directement de sa composition en neutrons et en protons. L'existence de ce moment cinétique induit un moment magnétique, qui est à l'origine du phénomène de résonance. Ainsi, l'enregistrement du signal RMN n'est possible que dans le cas d'atomes dont le moment cinétique de spin est non nul. Les noyaux de spin nul, comme le ^{12}C et le ^{16}O , ne résonnent pas et sont donc « invisibles » par RMN.

Dans le cas du ^1H (isotope le plus courant de l'hydrogène), le nombre de spin vaut $\frac{1}{2}$. En l'absence de champ magnétique à proximité, ces noyaux ne présentent pas d'orientation particulière. Cependant, lors de l'application d'un champ B_0 , les moments magnétiques s'orientent dans sa direction (dans le même sens ou en sens opposé), tout en tournant autour de l'axe de B_0 à une fréquence caractéristique du noyau considéré, appelée fréquence de Larmor (Figure 34). On observe ainsi deux populations de noyaux (sens ou anti-sens), qui correspondent à deux états d'énergie différents. Il y a plus de moments magnétiques orientés dans le sens de B_0 que dans le sens contraire, on observe ainsi une aimantation macroscopique M_0 , colinéaire à B_0 .

L'application d'un champ magnétique B_1 , perpendiculaire à B_0 , en rotation dans le plan (xOy) à la fréquence de Larmor du noyau considéré, permet le phénomène de résonance. Celui-ci se traduit par un basculement de l'aimantation macroscopique M_0 depuis (Oz) vers (Oy). L'interruption du champ B_1 se traduit par un retour progressif de l'aimantation macroscopique vers l'axe (Oz). Cette relaxation des noyaux génère un signal magnétique (une sinusoïdale amortie) détecté par une bobine placée sur l'axe (Oy) que l'on appelle FID (*Free Induction Decay*).

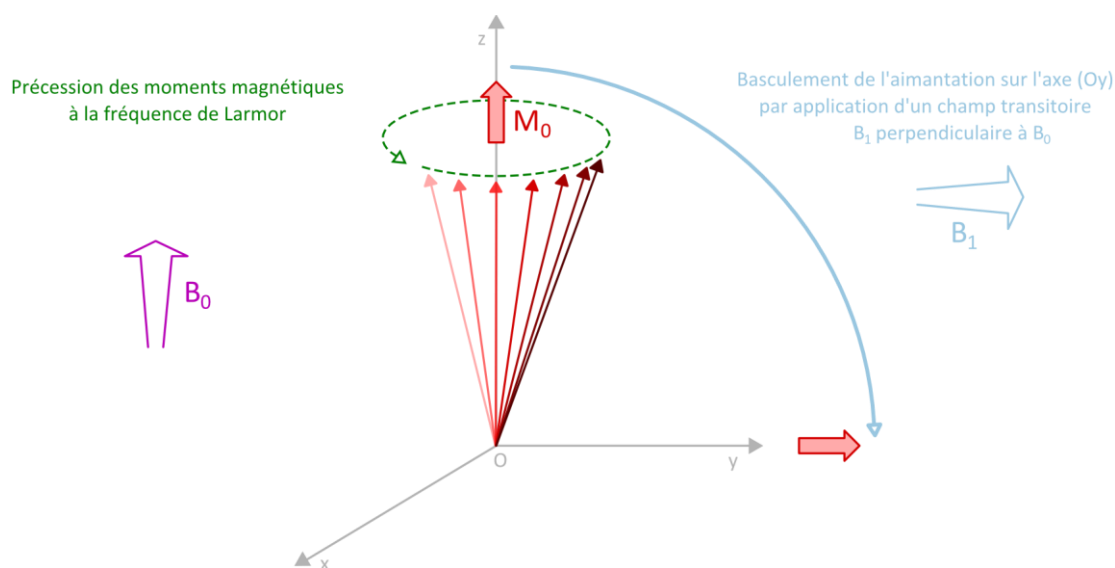


Figure 34 : Champs magnétiques et basculement d'aimantation des noyaux lors d'une expérience RMN à séquence impulsionnelle

Le signal enregistré par la bobine est bien plus qu'une simple courbe sinusoïdale amortie. En effet, si la fréquence de résonance dépend surtout de l'intensité du champ magnétique B_0 et de la nature du noyau considéré, elle est également légèrement influencée par l'environnement chimique du noyau au sein d'une molécule. Ainsi le signal FID d'un échantillon RMN est une somme de plusieurs courbes sinusoïdales amorties, de fréquences légèrement différentes par rapport à la fréquence de Larmor.

L'application d'une transformée de Fourier sur les variations de champ magnétique détectées par la bobine (interférogramme) permet de déconvoluer les différents signaux et de présenter un spectre RMN. Sur ce spectre on observe plusieurs signaux (ou « pics »), chacun d'entre eux étant caractérisé par :

- Son déplacement chimique (δ , en ppm), qui illustre l'environnement chimique du noyau considéré au sein d'une molécule, et qui donne une idée du type de fonction chimique impliqué ;
- Sa multiplicité (singulet, double, triplet, etc.), qui témoigne du nombre de noyaux chimiquement différents dans son voisinage.
- Son intensité, qui lorsqu'on utilise des temps de relaxation suffisant, permet d'établir une correspondance exacte sur le spectre entre intensité des signaux et quantités de protons impliqués.

RMN des échantillons en solutions

L'utilisation la plus courante de la spectroscopie de RMN est l'analyse d'échantillons en solution. Pour l'étude de substances naturelles, deux noyaux sont très couramment étudiés : le proton (^1H), isotope le plus représentatif (>99.9%) de l'hydrogène, et le ^{13}C , isotope rare du carbone (<1.1%). A cause de ces différences de fréquence isotopique, les expériences en RMN ^1H sont plus faciles que celles du ^{13}C , pour lesquelles des échantillons très concentrés sont nécessaires afin d'obtenir des résultats probants.

Les expériences RMN peuvent se concevoir sur 1 ou 2 dimensions. Dans le cas d'expériences à 1 dimension, le spectre montre les déplacements chimiques pour un seul isotope. C'est le cas pour la RMN du ^1H , et la RMN du ^{13}C . Les expériences à 2 dimensions montrent les relations entre différents noyaux au sein d'une même molécule. On distingue par exemple les séquences :

- COSY (COrelation SpectroscopY) : séquence homonucléaire ^1H - ^1H qui relie des protons vicinaux (portés par deux carbones adjacents)
- HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) : ici séquence hétéronucléaire ^1H - ^{13}C , elle met en relation les protons et les carbones auxquels ils sont liés ($^1J_{\text{H-C}}$).

- HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy) : similaire à la précédente, elle permet de relier des protons aux carbones proches ($^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$).
- NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) : contrairement aux précédentes séquences, elle indique le couplage dipolaire entre 1H . Ainsi, ce n'est pas à travers des liaisons chimiques que la corrélation s'établit, mais dans l'espace. Cette méthode est principalement employée pour déterminer la stéréochimie de molécules complexes.

RMN des échantillons solides

La RMN du solide, ou RMN HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning), et que l'on appellera également RMN *in vivo* dans ce manuscrit, a été initiée en 1959 par Raymond Andrew et ses collaborateurs. Cette technique a ouvert de nouveaux horizons à la spectroscopie de RMN en étendant le champ d'application aux solides. Le problème des faibles résolutions observées au cours des analyses classiques de RMN peut être compensé par la mise en rotation à haute fréquence (quelques kHz) des échantillons dans un rotor placé à l'angle magique (54.7°) par rapport à la direction du champ magnétique B_0 (Figure 35).

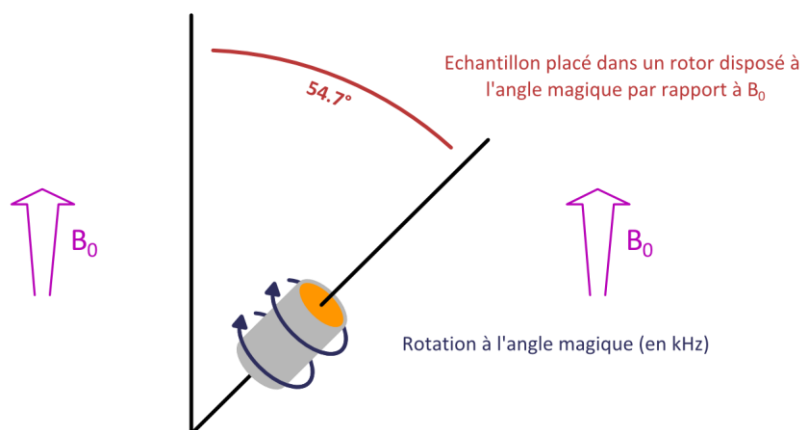


Figure 35 : Rotation de l'échantillon à l'angle magique lors des expériences de RMN HR-MAS

Nous avons utilisé une démarche statistique pour confronter les données spectrales. En premier lieu, nous avons réalisé une matrice d'absence et de présence pour chaque signal observé ; au final, cela se traduit par un tableau à 20 lignes (20 échantillons) et à plusieurs dizaines de colonnes (qui recensent les signaux). Les signaux ont été distingués les uns des autres sur toute la plage de déplacements chimiques (généralement entre 1 et 8 ppm). De cette façon, nous avons pu mettre en évidence des signaux originaux, et d'autres qui au contraire, étaient récurrents dans les échantillons.

Pour résumer les résultats de ce tableau de données, nous avons procédé à une Analyse des Correspondances Multiples en utilisant le module FactoMineR (Lê *et al.*, 2008) du logiciel R (R Development Core Team, 2011). Cette méthode permet de condenser l'information issue d'un jeu de données qualitatives, et de réduire à deux dimensions (sous forme d'un graphe) la variabilité d'un nuage de points à n dimensions (n variables), en gardant maximale l'inertie du nuage au maximum.

2.2.3 EMPREINTES CHIMIQUES PAR LC-ESI-MS^N

L'obtention d'empreintes chimiques utilise, entre autres, une technique chromatographique et une analyse par spectrométrie de masse. Le principe et les objectifs de ces deux méthodes sont exposés dans l'Encadré 4.

Les 20 échantillons lyophilisés ont été broyés finement et extraits à plusieurs reprises en utilisant comme solvants des mélanges de dichlorométhane et de méthanol (2:1, V/V), puis (1:1), (1:2) et enfin (1:1). Chaque extraction a été réalisée à l'obscurité et sous agitation pendant 4 heures à température ambiante, en débutant cette étape par 30 minutes de sonication. Pour chaque échantillon, les extraits ont été rassemblés, et le solvant a été évaporé. L'extrait brut obtenu a ensuite été nettoyé par extraction en phase solide (SPE) sur colonne C18e (Strata, Phenomenex). Le principe est à la fois d'éliminer les composés les plus polaires et d'éliminer les molécules les plus grasses en les « fixant » sur la colonne.

Encadré 4 : Principe des méthodes de Chromatographie et de détection utilisées

Principe de la Chromatographie Liquide Haute Performance

La Chromatographie Liquide Haute Performance est une technique analytique utilisée pour séparer des composés présents dans un échantillon, dans le but de les identifier ou de les quantifier, dans le cas de systèmes dits « analytiques », ou de les purifier (systèmes préparatifs). Le principe est le suivant :

1. On injecte l'échantillon à analyser/purifier dans une phase stationnaire :
 - Soit une phase normale (polaire), classiquement un gel de silice,
 - Soit une phase inverse (apolaire), constituée de silice greffée de diverses fonctions chimiques, comme des chaînes aliphatiques de 18 carbones (C₁₈).
2. On fait passer à travers cette phase stationnaire un solvant (ou un mélange de solvant) adapté aux molécules que l'on souhaite séparer et qui représente la phase mobile.

Les interactions qui s'établissent entre les molécules de l'échantillon, le solvant et la colonne sont variables ; en conséquence, certains composés seront plus facilement élués que d'autres. Ainsi, ils sortiront du système chromatographique à différents moments (appelés temps de rétention), et un détecteur en bout de chaîne permet de repérer ces composés.

Le principe est d'injecter l'échantillon à analyser/purifier dans une phase stationnaire appelée colonne chromatographique, et de faire passer dans cette colonne un solvant précis qui représente la phase mobile. Les interactions qui s'établissent entre les molécules de l'échantillon, le solvant et la colonne sont variables ; en conséquence, certains composés seront plus facilement élués que d'autres. Ainsi, ils sortiront du système chromatographie à différents moments (appelés temps de rétention), et un détecteur en bout de chaîne permet de repérer ces composés.

Principe de la spectrométrie de masse

Les spectromètres de masse sont fréquemment utilisés en couplage avec divers systèmes chromatographiques. L'avantage de cette méthode est sa très grande sensibilité. De plus, dans le cas de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), il est possible de fragmenter une molécule et d'en caractériser les « morceaux » ; cette technique est particulièrement adéquate pour l'étude des biopolymères. Un spectromètre de masse fonctionne de la façon suivante :

1. Il ionise les molécules qu'il reçoit en provenance du système. Dans notre étude, cela se fait par électronébulisation (formation d'un aérosol constitué de gouttelettes chargées).
2. Il analyse les ions chargés en les séparant en fonction du rapport m/z (masse de l'ion rapportée à sa charge).
3. Il détecte les ions et les compte.

Autres systèmes de détection

Nous avons également utilisé un détecteur à diffusion de lumière, qui détecte les perturbations d'un faisceau lumineux sous l'effet de l'échantillon. En pratique, les molécules sortant du système de chromatographie entrent dans le détecteur face à un faisceau laser, et ce faisant, elles le dévient. C'est cette déviation qui est quantifiée et qui permet la détection des composés analysés. Ce détecteur est universel, puisque toutes les molécules dévient la lumière. Son inconvénient est sans doute sa sensibilité plus faible que celle d'un spectromètre de masse.

Nous avons également utilisé un détecteur à barrette de diode, qui détecte l'absorption de certaines longueurs d'onde (UV/visible) par les molécules. La différence d'intensité entre lumière émise par le détecteur et lumière reçue après filtration par l'échantillon est le paramètre qui est à l'origine de la détection des molécules. Ce détecteur est très performant lorsque l'on connaît la longueur d'onde maximale d'absorbance des analytes que l'on souhaite identifier ou doser. En revanche, si les composés n'absorbent pas spécifiquement certaines longueurs d'onde, son utilité peut s'en trouver réduite.

Une colonne SPE est conditionnée par le passage de 10 mL de dichlorométhane-méthanol (1:1) puis 10 mL d'eau ultrapure (Figure 36a,b). Dans un ballon, environ 10 mg d'extrait brut sont mélangés avec de la silice C18 grâce à un peu de solvant qui est ensuite éliminé par évaporation rotative, et l'ensemble « silice + extrait » est récupéré et déposé sur la colonne conditionnée (Figure 36c). Une première élution (10 mL d'eau ultrapure) permet d'éliminer les composés les plus polaires (Figure 36d), et finalement, l'extrait « nettoyé » est récupéré par le passage de 10 mL de dichlorométhane-méthanol (1:1) (Figure 36e).

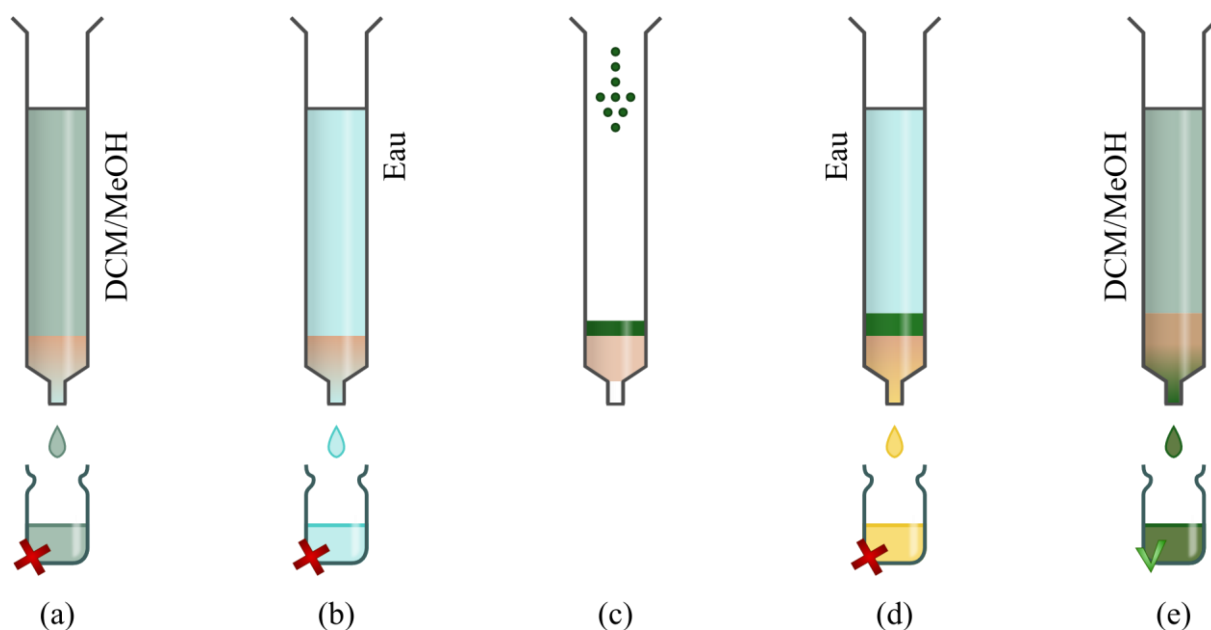


Figure 36 : Nettoyage des extraits par Extraction en Phase solide ; (a-b) : conditionnement de la colonne ; (c) : dépôt solide de l'échantillon ; (d) : élution des composés polaires ; (e) : élution des composés apolaires ; DCM : dichlorométhane, MeOH : méthanol

Chaque échantillon a ensuite été analysé sur un système de Chromatographie Liquide Haute Performance (chaîne LaChrom Elite HPLC) couplé à un détecteur à barrette de diodes (Hitachi L2455), à un détecteur à diffusion de lumière, et à un spectromètre de masse (Esquire 6000, Bruker Daltonic) de type trappe à ions équipé d'une interface d'électronébulisation (ESI, ElectroSpray Ionization). La séparation a été réalisée sur une colonne de type C6 (Phenomenex Gemini C6-Phenyl, 250 mm × 3 mm, 5µm), en utilisant un gradient d'eau et d'acétonitrile à 1 % d'acide formique (Tableau 3), avec un débit de 0.5 mL/min.

Au cours de cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés aux résultats de spectrométrie de masse, ainsi qu'à ceux du détecteur à diffusion de lumière, détecteur moins puissant mais universel. Nous avons concentré nos recherches sur les temps de rétentions entre 10 et 40 minutes, gamme la plus propice pour la détection de terpènes, en considérant la polarité du gradient de solvant. Avant 10 minutes, on n'observe que le pic d'injection et quelques composés très polaires ; au-delà de 40 minutes, on n'observe quasiment plus de molécule.

Tableau 3 : Gradient de solvant utilisé pour l'analyse HPLC des composés lipophiles. Les deux solvants contiennent 1 % (V/V) d'acide formique

Temps (min)	Eau ultrapure	Acétonitrile
0	80 %	20 %
20	35 %	65 %
35	35 %	65 %
40	0 %	100 %
55	0 %	100 %
60	80 %	20 %

2.2.4 ANALYSES PHYLOGÉNÉTIQUES

L'ADN a été extrait à partir d'échantillons conservés dans du Silica gel en utilisant le kit d'extraction DNEasy Plant MiniKit (Qiagen). Le principe du protocole est illustré en Figure 37. La première étape est le broyage des tissus à l'azote liquide, puis l'ajout de différents tampons au broyat afin de casser les membranes cellulaires et de solubiliser l'ADN. Ensuite, l'extrait d'ADN est récupéré puis filtré par centrifugation sur colonne QIAshredder. Après récupération du filtrat, un tampon éthanolique est ajouté, et l'ensemble est centrifugé sur colonne de silice (DNEasy MiniSpin) qui fixe alors l'ADN, que l'on nettoie alors par plusieurs passages de tampon sur la colonne qui vont éliminer de nombreux contaminants. Enfin, l'ADN est récupéré grâce à un solvant particulier qui le décroche de la colonne DNEasy Mini Spin.

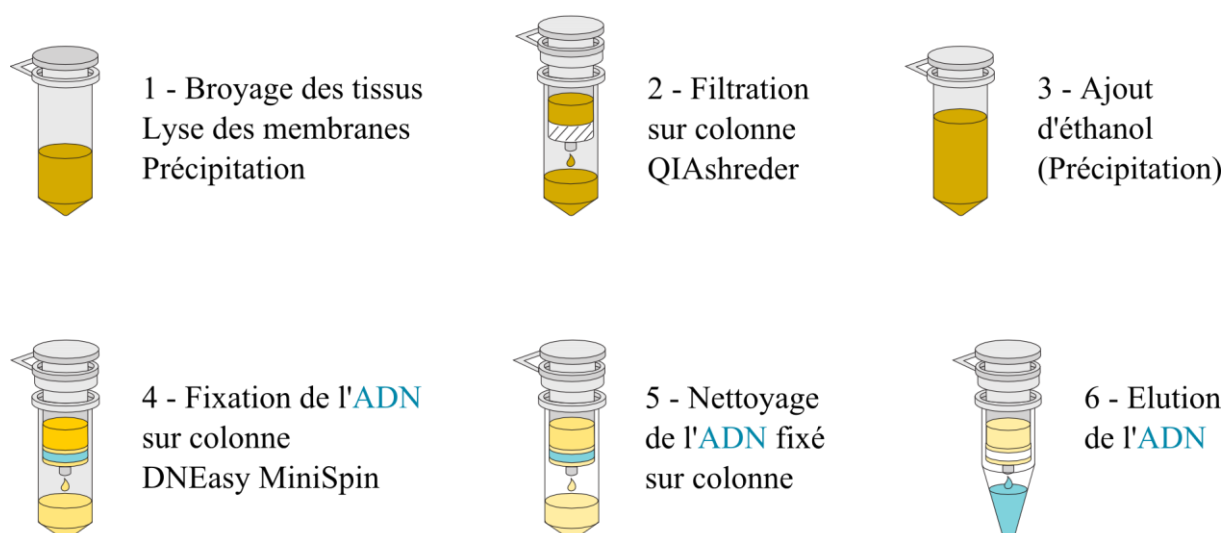


Figure 37 : Protocole général d'utilisation du DNEasy Plant Mini Kit, modifié d'après Qiagen

Les solutions d'ADN ont ensuite été purifiées grâce au kit GeneClean (MP Biomedicals). Le protocole, légèrement modifié d'après les instructions du fournisseur, est détaillé en Figure 38. Le principe général est similaire aux étapes 4, 5 et 6 du protocole d'extraction (Figure 37) : l'ADN est fixé à de la silice, mais cette fois-ci en solution aqueuse, et ensuite les différents contaminants sont éliminés grâce à un solvant éthanolique.

Nous avons choisi d'amplifier le marqueur ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2, ADN ribosomal), qui est couramment utilisé pour établir les relations phylogénétiques au sein des algues brunes (Mattioli *et al.*, 2008 ; Rohfritsch *et al.*, 2007 ; Stiger *et al.*, 2003, 2000 ; Leclerc *et al.*, 1998). Nous avons utilisé les amorces 5.8S BF (sens) et 25BR2 (antisens) utilisées par Yoshida *et al.* (2000). L'amplification a été réalisée par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en accord avec Stiger *et al.* (2000). La préparation du mélange pour réaliser la PCR est indiquée au Tableau 4. La PCR consiste en une première étape de dénaturation (1 min à 95°C), suivie de 35 cycles « dénaturation (95°C, 30 s) – hybridation (55°C, 30 s) – élongation (72°C, 45 s) », et se termine par une dernière élongation (72°C, 7 min). Les échantillons sont ensuite conservés à 4°C par le thermocycleur.

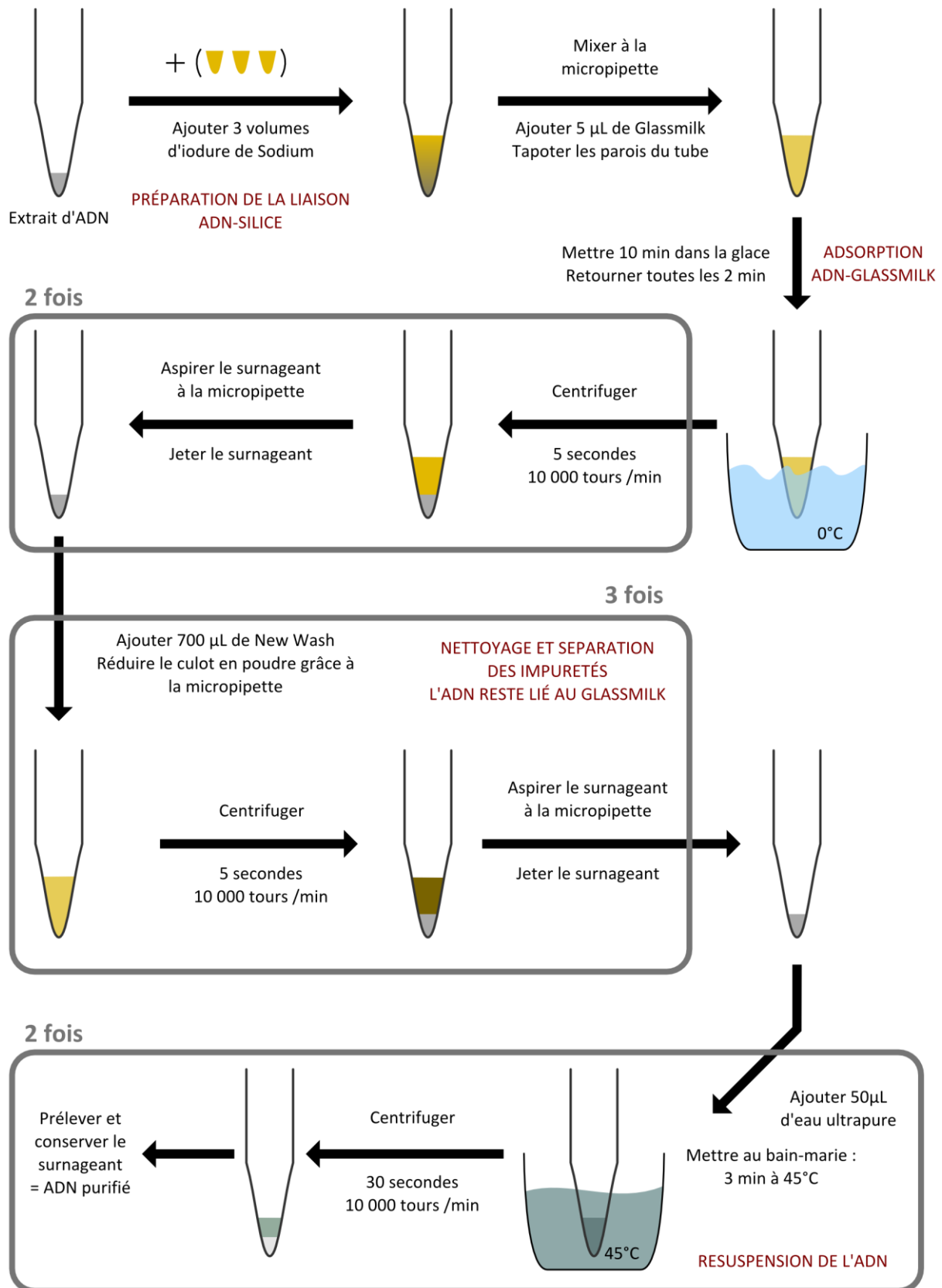


Figure 38 : Synoptique du protocole d'utilisation du GeneClean Kit

Tableau 4 : Volumes (μL) de réactifs utilisés pour la préparation d'un mélange PCR. 1 μL de solution d'ADN est ajouté juste avant la mise en route du thermocycleur

Eau mQ	Tampon PCR	dNTP	MgCl ₂
37.75	5	1	1.5
Amorce 5.8S BF	Amorce 25 BR2	DMSO	Taq Polymérase
0.5	0.5	2.5	0.25

La qualité des produits PCR a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8%, conditionné dans du tampon Tris-Acetate-EDTA à 0.5X. 5 μL de produit PCR (1 par échantillon) et 2 μL de marqueur de taille sont déposés dans les puits ; la migration dure 25 min à 100 V. Le gel est ensuite déposé dans un bain de marqueur fluorescent de l'ADN (GelRed) pendant 20 minutes, et la révélation se fait sur une table à UV.

Les produits PCR ont été séquencés par Macrogen Europe, en suivant la méthode du Big Dye Terminator, et les résultats ont été vérifiés par confrontation des brins sens et anti-sens.

D'autres séquences ont été téléchargées depuis la GenBank. Elles sont disponibles à l'adresse suivante : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Toutes les séquences ont été alignées manuellement en prenant en compte la structure secondaire des ITS2 (A. W. Coleman, données non publiées), grâce au logiciel BioEdit (Hall, 1999). L'analyse phylogénétique selon la méthode du plus proche voisin (Saitou & Nei, 1987) a été réalisée à l'aide du logiciel MEGA 4 (Kumar *et al.*, 2008).

2.3 PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE CHIMIOMARQUEURS

Après avoir caractérisé les différences chimiques entre les extraits lipophiles des cinq cystoseires de Bretagne, nous avons approfondi notre étude en cherchant à caractériser de nouveaux dérivés terpéniques. De nombreux méroditerpènes ayant déjà été identifiés chez *Cystoseira baccata* et *C. tamariscifolia* (Mokrini *et al.*, 2008 ; Amico, 1995), et comme *C. fœniculacea* et *C. humilis* n'en produisent pas (voir paragraphe 3.1), nous avons concentré nos efforts sur l'étude des extraits lipophiles de *C. nodicaulis*. Le dérivé terpénique issu de *Cystoseira nodicaulis* a fait l'objet de plusieurs tentatives de purification, qui ne se sont pas toutes avérées fructueuses. Nous présentons la méthode qui nous a permis d'isoler le composé et de le caractériser à la Figure 39.

Nous avons utilisé différentes techniques chromatographiques pour isoler ce composé (chromatographie sur colonne de silice, chromatographie liquide sur système semi-préparatif), en sélectionnant à chaque fois une fraction grâce à une analyse en LC-MS.

Sélection des fractions injection en LC-MS

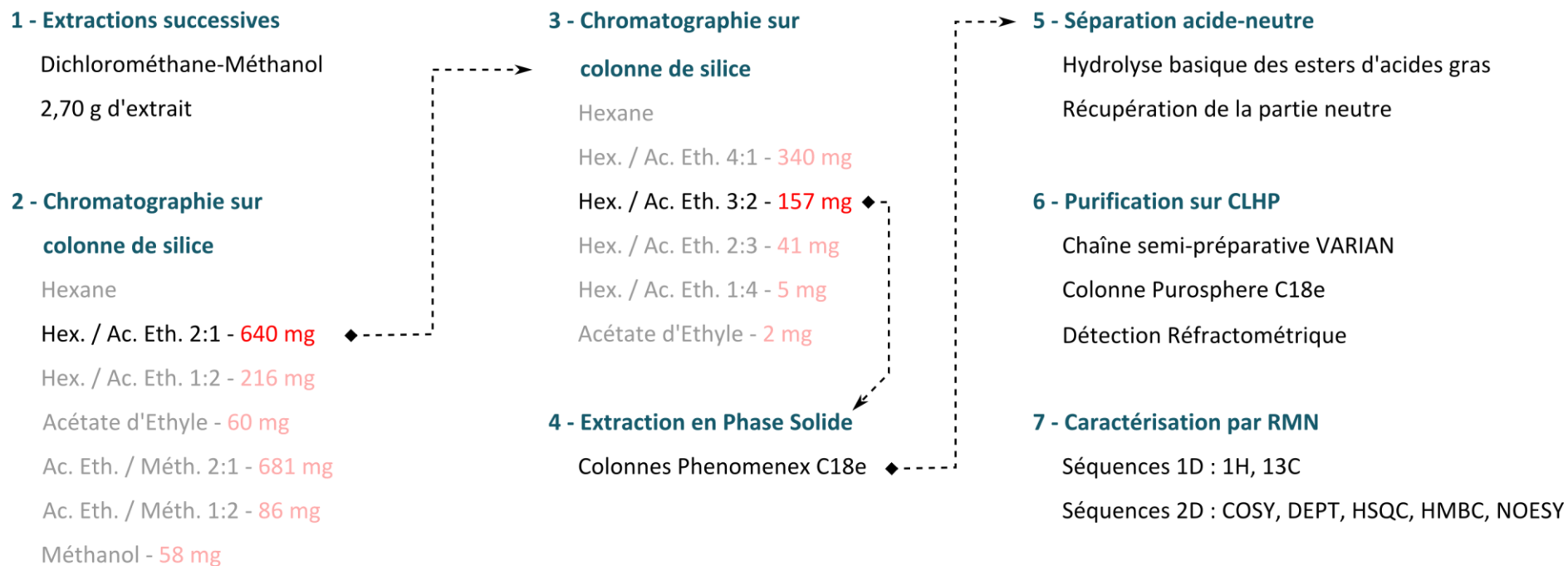


Figure 39: Synoptique du protocole utilisé pour isoler et caractériser le composé majoritaire des extraits lipophiles de *Cystoseira nodicaulis* (à partir de 50 g de poudre d'algues) ; les fractions non retenues après chromatographie sur colonne de silice apparaissent en filigrane.

3 RÉSULTATS

3.1 DISCRIMINATION DES ESPÈCES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

La Figure 40 présente le résultat de la séparation des constituants des extraits lipophiles des espèces de *Cystoseira* et des autres sargassacées colonisant les côtes bretonnes.

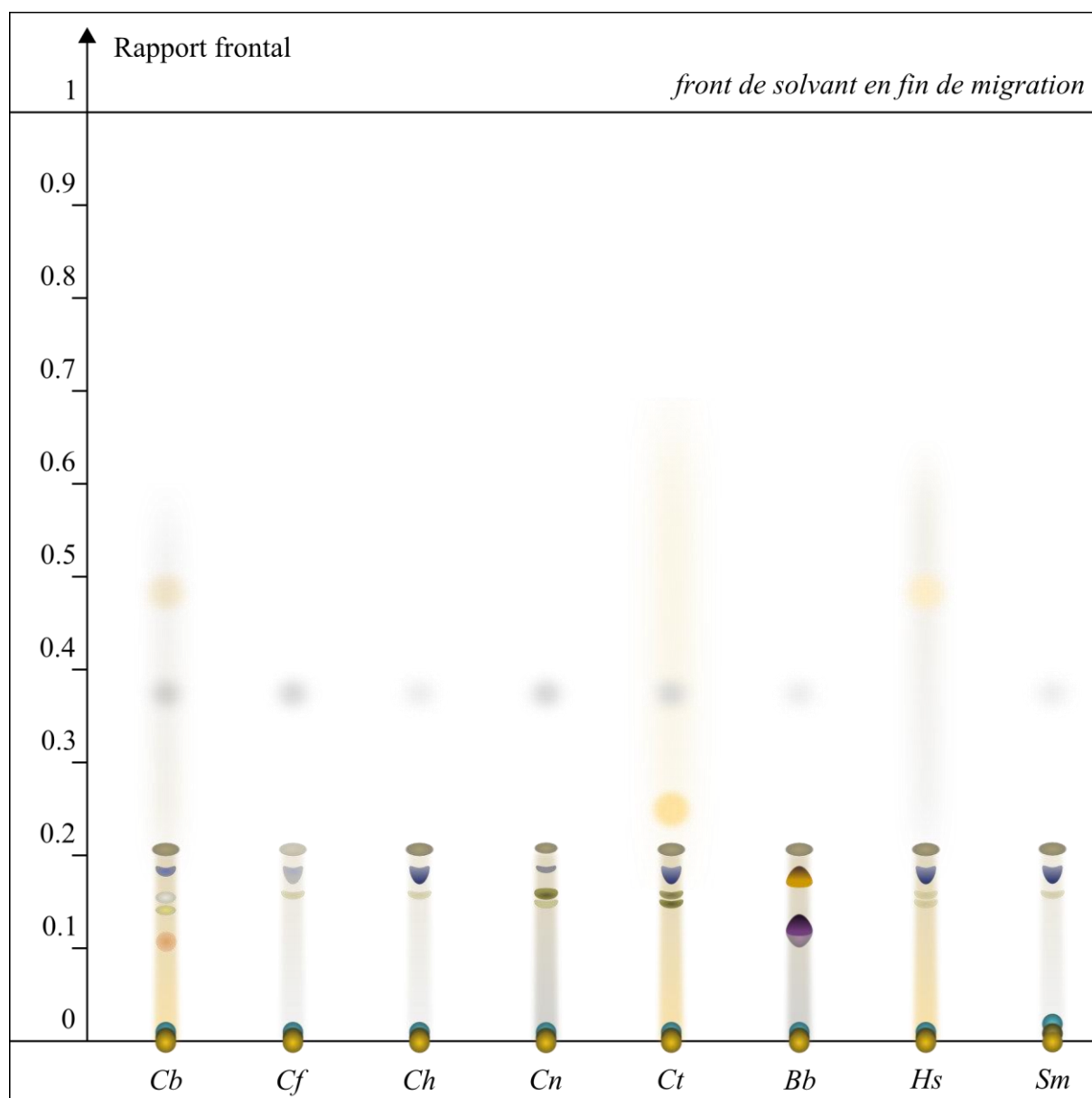


Figure 40 : Résultats d'analyses par CCM des extraits lipophiles des *Sargassaceae* bretonnes, après révélation (migration de bas en haut). Cb : *Cystoseira baccata* ; Cf : *C. fœniculacea* ; Ch : *C. humilis* ; Cn : *C. nodicaulis* ; Ct : *C. tamariscifolia* ; Bb : *Bifurcaria bifurcata* ; Hs : *Halidrys siliquosa* ; Sm : *Sargassum muticum*

Les profils chromatographiques montrent une séparation relativement limitée des composés, avec des tâches qui s'étalent sur des rapports frontaux entre 0 et 0.5 (Figure 40). Le nombre de tâches observées est très variable selon les espèces. Il se situe entre 7 tâches (pour *Cystoseira fœniculacea*, *C. humilis* et *Sargassum muticum*) jusqu'à 10 (pour *C. baccata*). Les trois premiers spots, observés près de la ligne de dépôt ($R_f=0$) sont observés sur l'ensemble des échantillons. Cette variabilité n'est en fait liée qu'à un nombre restreint de spots que l'on ne trouve que chez une espèce :

- $R_f=0.11$, un spot orange chez *C. baccata* ;
- $R_f=0.25$, un spot orange chez *C. tamariscifolia* ;
- $R_f=0.12$, deux spots violets chez *Bifurcaria bifurcata* ;

Les profils de *C. fœniculacea*, *C. humilis* et *Sargassum muticum* indiquent que ces trois espèces ont une richesse assez limitée en dérivés lipophiles, mais ils montrent surtout une composition identique. *A priori*, on observe également un profil très similaire chez *C. nodicaulis*.

En revanche, parmi les 4 autres espèces, il est bien difficile d'établir des rapprochements. En effet les spots situés à $R_f=0.2$ et $R_f=0$ sont partagés par l'ensemble des espèces. Hormis ceux-ci, il n'existe pas de spot qui ne soit partagée que par un groupe restreint d'espèces.

3.2 ÉTUDE DE TAXINOMIE GÉNÉRALE DU GENRE *CYTOSEIRA* EN BRETAGNE

Les résultats intégrant les analyses chimiques et phylogénétiques du genre *Cystoseira* en Bretagne ont été publiés dans la revue internationale « Talanta », sous la référence :

Jégou C., Culioli G., Kervarec N., Simon G. and Stiger-Pouvreau V. (2010)

LC/ESI-MSⁿ and ¹H HR-MAS NMR analytical methods as useful taxonomical tools within the genus *Cystoseira* C. Agardh (Fuciales, Phaeophyceae)

Talanta 83: 613-622

Le manuscrit est présenté dans les pages suivantes.

En résumé, nous avons mis en évidence des différences entre espèces à la fois en termes de composition chimique générale, au travers des résultats de HR-MAS, et en termes de composés lipophiles, par LC-MS. Ces deux méthodes permettent la discrimination des espèces de *Cystoseira* de Bretagne, à l'exception de *C. faeniculacea* et *C. humilis* qui se confondent d'un point de vue chimique.

Grâce à l'analyse par LC-MS, nous avons pu montrer que ces deux espèces ne produisent pas de terpènes, ce qui s'est traduit par des chromatogrammes « plats ».

Nos résultats ont été confortés par une très bonne reproductibilité, notamment en ce qui concerne les extraits lipophiles. En effet, pour chacune des cinq espèces, les chromatogrammes des 4 échantillons analysés étaient identiques. Il existe donc une constance dans la production de terpènes (ou la non-production, selon l'espèce considérée), observée entre deux sites (à Penmarc'h et en région brestoise) et sur deux saisons (en été et en hiver).

En ce qui concerne la classification, le marqueur ITS2 indique que le genre *Cystoseira* est polyphylétique, les deux espèces citées plus haut se démarquant des trois autres. Il semblerait ainsi que les regroupements opérés par LC-MS, qui séparent les espèces productrices et non-productrices de terpènes, illustrent correctement la classification du genre. Même si ces techniques n'ont pas permis de distinguer deux espèces sur les cinq étudiées, cela illustre sans doute la proximité qui existe entre elles tant d'un point de vue morphologique que phylogénétique.

Les deux méthodes analytiques permettent d'obtenir des « cartes d'identité chimique » pour chaque taxon, peuvent être utilisées en appui pour des études taxinomiques, fournissent des résultats rapides et peu coûteux et sont également très intéressantes dans le cadre d'études préliminaires de substances naturelles.



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

LC/ESI-MSⁿ and ¹H HR-MAS NMR analytical methods as useful taxonomical tools within the genus *Cystoseira* C. Agardh (Fucales; Phaeophyceae)

Camille Jégou^{a,*}, Gérald Culioli^b, Nelly Kervarec^c, Gaëlle Simon^c, Valérie Stiger-Pouvreau^{a,*}

^a Laboratoire d'Écophysiologie et de Biotechnologies des Halophytes et des Algues Marines EA 3877, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, rue Dumont D'Urville, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

^b Laboratoire Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin (MAPIEM), Équipe « Biofouling & Substances Naturelles Marines », Université du Sud Toulon - Var, avenue de l'université, BP 20132, 83957 La Garde Cedex, France

^c Service de Résonance Magnétique Nucléaire - Résonance Paramagnétique Électronique, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, 6 avenue Victor Le Gorgeu CS93837, 29238 Brest, France

article info

Article history:

Received 7 April 2010

Received in revised form

28 September 2010

Accepted 2 October 2010

Available online 8 October 2010

Keywords:

Chemotaxonomy

Cystoseira

HR-MAS NMR

LC/ESI-MSⁿ fingerprinting

ITS2

Phylogeny

abstract

Species of the genus *Cystoseira* are particularly hard to discriminate, due to the complexity of their morphology, which can be influenced by their phenological state and ecological parameters. Our study emphasized on the relevance of two kinds of analytical tools, (1) LC/ESI-MSⁿ and (2) ¹H HR-MAS NMR, also called in vivo NMR, to identify *Cystoseira* specimens at the specific level and discuss their taxonomy. For these analyses, samples were collected at several locations in Brittany (France), where *Cystoseira* *baccata*, *C. foeniculacea*, *C. humilis*, *C. nodicaulis* and *C. tamariscifolia* were previously reported. To validate our chemical procedure, the sequence of the ITS2 has been obtained for each species to investigate their phylogenetic relationships at a molecular level. Our study highlighted the consistency of the two physico-chemical methods, compared to "classical" molecular approach, in studying taxonomy within the genus *Cystoseira*. Especially, LC/ESI-MSⁿ and phylogenetic analyses converged into the discrimination of two taxonomical groups among the 5 species. The occurrence of some specific signals in the ¹H HR-MAS NMR spectra and/or some characteristic chemical compounds during LC/ESI-MSⁿ analysis could be regarded as discriminating factors. LC/ESI-MSⁿ and ¹H HR-MAS NMR turned out to be two relevant and innovative techniques to discriminate taxonomically this complex genus.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

The genus *Cystoseira* C. Agardh (1820) is composed of forty-seven validated species, among nearly three hundred of taxa listed in the AlgaeBase at present [1]. It belongs to the family Sargassaceae, and in Europe, it shows the biggest species richness within this family. Currently, more than thirty species have been identified in the Mediterranean Sea, while only ten species have been reported along the Atlantic coasts of continental Europe [1–3], among which are the most common *Cystoseira baccata* (S.G. Gmelin) P.C. Silva, *C. foeniculacea* (Linnaeus) Greville, *C. humilis* Schousboe ex Kützinger, *C. nodicaulis* (Withering) M. Roberts and *C. tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss. Most of the chemical studies on *Cystoseira* species have been led on exclusively Mediterranean taxa and/or in

Mediterranean sites [4,5]. Despite the growing number of scientific publications focusing on some specific taxa in the last decades, their classification remains unclear. Concerning the five Atlantic species cited before, many taxonomical changes have occurred since their first description. Between three and nine synonyms are recorded for each taxon [1,2]. Misclassification due to the high morphological variability of these taxa, observed throughout the seasons [6], and linked with multiple environmental conditions as described for the genus *Sargassum* [7], could explain these taxonomic ambiguities.

In order not to be influenced by morphological variability, recent researches in taxonomy frequently include molecular analyses. Molecular tools have proven themselves to be valuable in a taxonomical context, such as samples identification and species phylogenetic relationships establishment. Among the order Fucales (in which is found the genus *Cystoseira*), phylogeny has become more and more investigated during the last decade. The phylogeny of both Fucaceae and Sargassaceae families has been studied using mitochondrial, chloroplastic, and nuclear markers [7–18]. Within the family Sargassaceae, recent works have proven the usefulness of nuclear ribosomal DNA (and more particularly the Internal Transcribed Spacers—ITS) to establish phylogenetic relationships [9,12,13].

Abbreviations: HR-MAS NMR, High Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance; ITS2, Internal Transcribed Spacer 2; LC/ESI-MSⁿ, Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Multistage Mass Spectrometry; MCA, Multiple Correspondence Analysis; ppm, parts per million.

* Corresponding authors. Tel.: +33 2 98 49 86 68.

E-mail addresses: camille.jegou@univ-brest.fr (C. Jégou), valerie.stiger@univ-brest.fr (V. Stiger-Pouvreau).

However, the selection of efficient molecular markers is a crucial step in such studies. A molecular marker can be helpless in studying phylogeny within some taxa, because of a too poor informational variability, resulting in identical sequences or the impossibility of their alignment. Furthermore, some characteristic biomolecules in brown macroalgae (such as polyphenols) are also known to decrease the quality of DNA, making the sequences harder to get than what could be expected [19]. Considering these problematic issues, and the cost of molecular methods, other approaches, such as chemical investigations, could be performed to discuss taxonomy.

Considering the genus *Cystoseira*, few phylogenetic studies of Phaeophyceae have been led [9,14–16], whereas many authors have investigated their chemotaxonomy. Actually only fragmental information has been obtained from phylogenetic studies concerning the genus, and the most exhaustive works have been realized taking account of chemical criteria. Most of them have focused on the characterization of lipophilic content, and notably the identification of several kinds of terpene derivatives that could be regarded as chemotaxonomic markers [20,21]; for a complete review see [4,5,22]. The classification of all taxa has been discussed according to the chemical composition of the algae and assumed biosynthetic pathways of the isolated molecules.

In addition, a novel chemotaxonomic approach has recently proven itself useful to study the genus *Turbinaria* (also included within the family Sargassaceae) from the Pacific Ocean. Thus, Le Lann et al. [23] used NMR to produce *in vivo* chemical signals of pieces of thalli. In this study, without any precise investigation about the chemical composition of the studied algae, a statistical analysis of the spectra obtained using *in vivo* HR-MASNMR permitted the efficient separation of two close species, *Turbinaria conoides* and *T. ornata*, which are hard to discriminate using the only classical taxonomical criteria (involving morphological features).

The aim of the present work was then to evaluate the relevance of two innovative analytical techniques for taxonomical purposes, in the case of 5 species of the genus *Cystoseira*, present along the coasts of Brittany (France). We used Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Multiple-Stage Mass Spectrometry (LC/ESI-MSⁿ) to analyze lipophilic extracts, and *in vivo* ¹H HR-MASNMR to observe the global chemical profile of each taxon. Both techniques were then employed to distinguish and classify five species of the genus *Cystoseira*. The sequences of the ITS2, commonly informative in phylogenetic studies within the Fucales, were obtained for each species and used as a reference step to validate and discuss the results of both analytical methods. The powerfulness of both techniques was evaluated following two major criteria: their ability to distinguish the species, and their capacity to establish relevant taxonomic boundaries, in comparison to the phylogenetic study data.

1. Materials and methods

1.1. Sample collection and preparation

Investigations in chemical and molecular taxonomy within the genus *Cystoseira* was permitted by a dual sampling strategy.

Specimens of the five *Cystoseira* species – *C. baccata*, *C. foeniculacea*, *C. humilis*, *C. nodicaulis* and *C. tamariscifolia* – were firstly sampled on September 2008 in Penmarc'h (47° 48' N, 4° 22' W), in order to get fresh material for chemical investigations. A preliminary work was realized to find out the position of individuals on the intertidal and subtidal zones. We localized about 250 points where some *Cystoseira* species could be observed (unpublished data). Among them, 3 sample collection spots were then randomly chosen for each taxon, so as to get triplicates in chemical

analyses, and to face the maximum variability on the field, considering their morphology and phenology. The choice was made to collect only apical axes, for two reasons: (i) among the five species, two of them (*C. foeniculacea* and *C. humilis*) do not have a real primary axis and (ii) this sampling is much less destructive as *Cystoseira* species are known to seasonally drop and regenerate their ultimate axes [24]. The second series of algal material was sampled on December 2008 on other sites to get optimal quality of tissues for DNA extraction. These particular date and sites were chosen in order to get the more reproductive parts possible from samples in the aim of maximizing the quantity of DNA available for extraction. Consequently *C. baccata* and *C. tamariscifolia* were sampled on the low shore of Porspoder (48° 29' N, 4° 46' W), *C. foeniculacea* and *C. nodicaulis* on the intertidal zone of Portsall (48° 34' N, 4° 42' W), and *C. humilis* in the rocky pools from the upper shore of Plougonvelin (48° 21' N, 4° 42' W). The five resulting samples were submitted to physico-chemical and molecular analyses. In addition, specimens of other Sargassaceae occurring in Brittany: *Bifurcaria bifurcata* R. Ross, *Halidrys siliquosa* (L.) Lyngb. and *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, were collected on early April 2009 at Penmarc'h. These extra-generic specimens permitted to study the position of *Cystoseira* species from Brittany within the phylogenetic tree of the family Sargassaceae. For both sampling series, the algal material was cleaned up from its possible epiphytes. Samples were either freeze-dried or conserved in silica gel, to be used for physico-chemical analyses or molecular analyses, respectively. A small part of the freeze-dried material (top axis) was used for ¹H HR-MAS analyses. The rest was ground to powder for extraction.

1.2. Species morphological discrimination

On the field, the identification of the *Cystoseira* species was carried out according to the key given by Cabioch et al. [24]. We particularly focused on the following criteria: absence/presence of a primary axis, axes organized in a plan or not, and absence/presence of tophules. Drawings of the shape of ultimate axes of the *Cystoseira* species are presented at Fig. 1. Maximal attention was paid to distinguish *C. foeniculacea* from *C. humilis*, for two reasons. First, these two species are highly morphologically related; both are caespitose, and moreover, the first, differing by its kind of ramification (in a plan), is not easy to distinguish from *C. humilis* when its axes are beginning to regenerate (C. Jégou, pers. obs.). Secondly, the key proposed by Cabioch et al. [24] uses deduction to identify *C. humilis*, so that no particular morphological characteristic makes it clearly different.

1.3. Chemical investigations

1.3.1. LC/ESI-MSⁿ fingerprinting

The powder obtained from each collected sample was used for a sequence of extractions using three kinds of mixtures of dichloromethane and methanol as solvent: (2:1, v/v) the first time, and after that the powder was re-used with (1:1) mixture, then (1:2), and finally (1:1) again for 7 times. Every extraction consisted in addition of 500 mL solvent, beginning with 30 min of sonication (Sonicater 88155, Bioblock Scientific, Illkirch, France), and lasted about 4 h with agitation on a universal shaker (SM-30, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Germany). The 10 extracts obtained from each sample were then pooled, and evaporated under vacuum (Laborota 4000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany). The final extract was cleaned using Solid Phase Extraction (Strata C18-E, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). First elution was realized with water, resulting in the loss of salt and polar organic compounds such as sugars or phlorotannins. Finally, non-polar compounds were eluted using a mixture

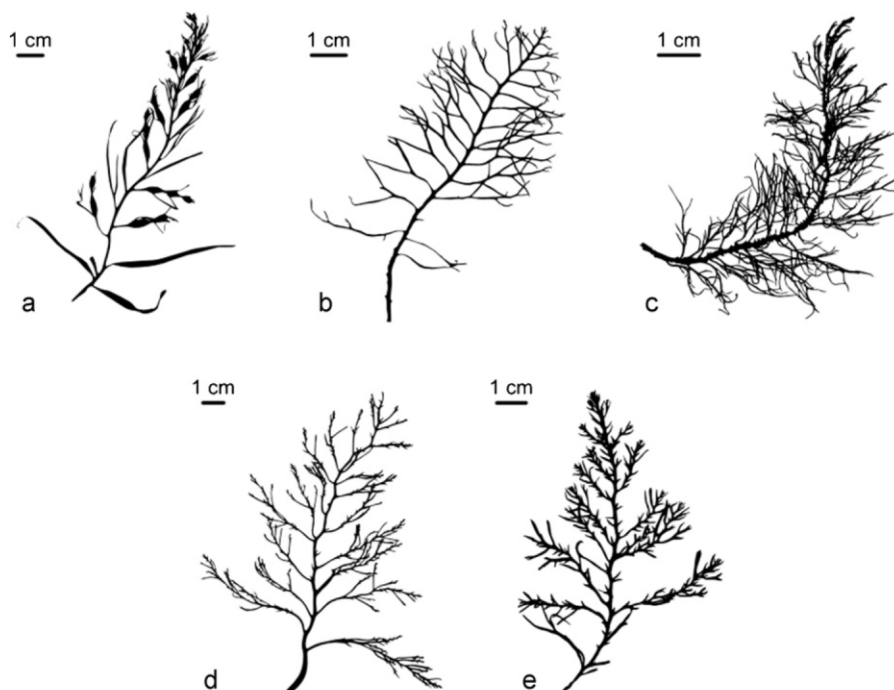


Fig. 1. Drawings of the ultimate axes of the *Cystoseira* species, obtained from samples used in this study: (a) *C. baccata*, (b) *C. foeniculacea*, (c) *C. humilis*, (d) *C. nodicaulis* and (e) *C. tamariscifolia*.

of dichloromethane and methanol (1:1). These “cleaned” samples were analyzed using LC/ESI-MSⁿ coupled also with a Diode Array Detector (DAD) and an Evaporative Light Scattering Detector (ELSD). For this experiment, a LaChrom Elite HPLC (VWR-Hitachi, Fontenay-sous-Bois, France) composed by a L-2130 quaternary pump, a L-2200 autosampler and a L-2300 column oven was used. Detection was performed with a L2455 DAD and an ELSD (Chromachem model, Eurosep, Cergy Pontoise, France) coupled to an ion trap mass spectrometer fitted with an ESI interface (Esquire 6000, Bruker Daltonik, GmbH, Bremen, Germany). Operating conditions for MS analysis were: dry temperature, 350 °C; capillary voltage, 4000 V; nebulizer, 50 psi; dry gas, helium at 12 L/min. Ion trap full-scan analysis was conducted from *m/z* 50 to 1200 with an upper fill time of 200 ms. Approximately 1 mg of each “cleaned” sample was dissolved in 1 mL of a mixture of methanol/dichloromethane (1:1, v/v) and a 10 μ L sample volume was injected in the chromatographic system. Compounds were separated using an analytical reversed-phase column (Gemini C₆-Phenyl, 250 mm $\times$ 3 mm, 5 μ m, Phenomenex) maintained at 30 °C. For this separation, a binary mobile phase was used: eluent A was constituted by 1% (v/v) of formic acid in water and eluent B by 1% (v/v) of formic acid in acetonitrile. After a preliminary step of optimization, the gradient of elution was set as follow: (i) a start with 20% of B and an increasing up to 65% of B in 20 min (linear ramp), (ii) an isocratic step with 65% of B during 15 min, (iii) a linear ramp until 100% of B in 5 min (linear ramp). This composition was finally maintained during 15 min until re-equilibration of the system to the initial conditions (5 min). The flow rate was fixed at 0.5 mL/min. Finally 15+5 chromatograms (3+1 per species) were obtained. Considering the polarity-decreasing gradient used for this study, we paid attention to the retention time interval from 10 up to 40 min. Out of this range, non-discriminating molecules such as sterols and fatty acids could be found. Possible terpene derivatives were the most likely to be detected in the chromatograms from 10 to 40 min. The mass over charge ratio (*m/z*) of the ions detected at a precise retention time in positive and/or negative modes was

eventually used to discriminate compounds with similar retention time.

1.3.2. In vivo NMR spectroscopy

All HR-MAS NMR spectra were acquired on a DRX 500 spectrometer (Bruker BioSpin, Wissembourg, France) equipped with an indirect HR-MAS ¹H/³¹P probehead with gradient Z at 25 °C. A typical proton ¹H HR-MAS NMR spectrum consisted of 64 scans was performed with presaturation of the water peak. Each spectrum was phased and baseline-corrected using a polynomial function. We used around 5 mg of algal axis that was placed in a 4 mm zirconium oxide MAS rotor. Approximately 30 μ L of D₂O was added into the rotor with the algal sample for ²H field locking. The sample was placed in a rotor spinning around an axis, which is oriented at the so-called “magic angle” of 54° 7' with respect to the magnetic field B₀. Best homogenization was obtained at a spinning rate of 5000 Hz. This resulted in a high-resolution NMR spectrum approaching the ones obtained with liquid samples, making spectra analysis possible. A statistical tool was applied to confront the spectra obtained through the NMR analysis. First, a matrix of absence/presence of the observed signals was realized to summarize the in vivo chemical diversity of the samples, from a qualitative point of view. We did not restrict our observations to a certain range of chemical shifts, as many signals varying among samples occurred from 1 up to 8 parts per million (ppm).

Proceeding manually in the construction of the matrix permitted to evaluate the correspondence of NMR signals between the spectra. We used the multiplicity (i.e. the shape of the signal, from singlets to multiplets) in addition to the chemical shift values to characterize a unique signal, as for some molecules chemical shifts are known to slightly depend on pH [25]. Consequently, we were able to find out several chemical signals shared by different species.

To analyze the qualitative data, a Multiple Correspondence Analysis (MCA) was carried out to highlight the differences and resemblances in the spectra. The matrix was used as input for the

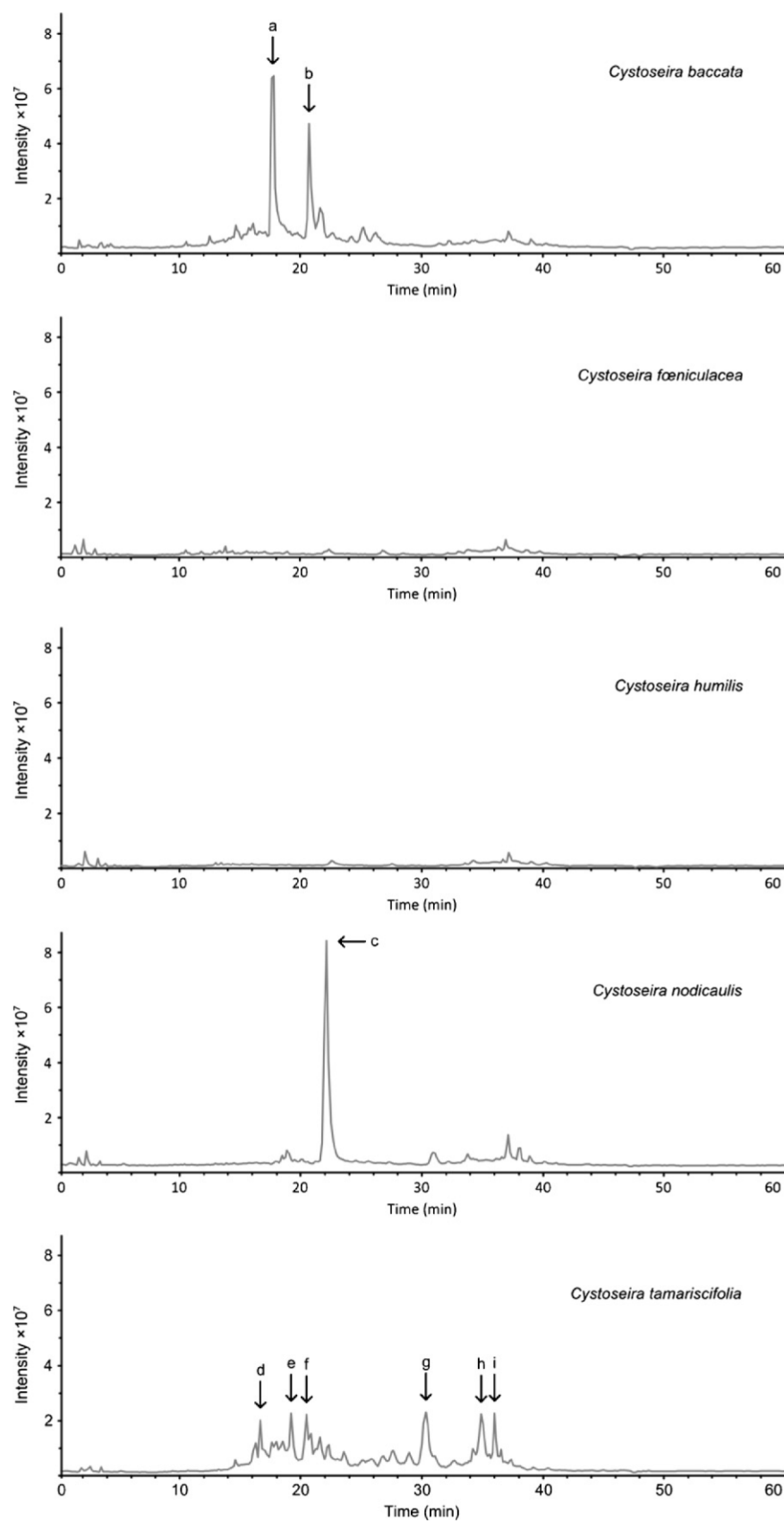


Fig. 2. Chromatograms obtained from the extracts of the *Cystoseira* species (+MS detection). The letters indicate the presence of some molecules, detailed in Table 1.

Table 1

Major compounds detected in the extracts of the *Cystoseira* species, associated m/z ratios and fragmentation profiles. Correspondence to the signals observed in Fig. 2 is indicated. *C. foeniculacea* and *C. humilis* not shown (no signal observed in their chromatograms).

Peak	Retention time (min.)	Molecular weight (g/mol)	+MS	+MS/MS	-MS	-MS/MS
<i>Cystoseira baccata</i>						
a	17.8	458	M ₁ : 481 [M + Na] ⁺ M ₂ : 441 [M - H ₂ O + H] ⁺ M ₃ : 423 [M - 2H ₂ O + H] ⁺	463 [M ₁ - H ₂ O] ⁺ 423 [M ₂ - H ₂ O] ⁺ 405 [M ₃ - H ₂ O] ⁺	M ₁ ⁻ : 457 [M - H] ⁻	442 [M ₁ - CH ₃] ⁻ 439 [M ₁ - H ₂ O] ⁻
b	20.8	440	M ₁ : 463 [M + Na] ⁺ M ₂ : 423 [M - H ₂ O + H] ⁺	n.o. 405 [M ₂ - H ₂ O] ⁺	M ₁ ⁻ : 439 [M - H] ⁻	424 [M ₁ - CH ₃] ⁻
<i>Cystoseira nodicaulis</i>						
c	22.2	472	M ₁ : 495 [M + Na] ⁺ M ₂ : 455 [M - H ₂ O + H] ⁺	480 [M ₁ - CH ₃] ⁺ 477 [M ₁ - H ₂ O] ⁺ 437 [M ₂ - H ₂ O] ⁺	n.o.	n.o.
<i>Cystoseira tamariscifolia</i>						
d	16.7	474	M ₁ : 497 [M + Na] ⁺ M ₂ : 425 [M - H ₂ O - CH ₃ OH + H] ⁺	479 [M ₁ - H ₂ O] ⁺ 465 [M ₁ - CH ₃ OH] ⁺ 407 [M ₂ - H ₂ O] ⁺	473 [M - H] ⁻	n.o.
e	19.3	440	M ₁ : 463 [M + Na] ⁺ M ₂ : 423 [M - H ₂ O + H] ⁺	445 [M ₁ - H ₂ O] ⁺ 405 [M ₂ - H ₂ O] ⁺	M ₁ ⁻ : 439 [M - H] ⁻	421 [M ₁ - H ₂ O] ⁻
f	20.4	472	M ₁ : 495 [M + Na] ⁺ M ₂ : 423 [M - H ₂ O - CH ₃ OH + H] ⁺	477 [M ₁ - H ₂ O] ⁺ 463 [M ₁ - CH ₃ OH] ⁺ 405 [M ₂ - H ₂ O] ⁺	n.o.	n.o.
g	30.2	440	M ₁ : 463 [M + Na] ⁺ M ₂ : 423 [M - H ₂ O + H] ⁺	445 [M ₁ - H ₂ O] ⁺ 405 [M ₂ - H ₂ O] ⁺	439 [M - H] ⁻	n.o.
h	34.9	454	M ₁ : 477 [M + Na] ⁺ M ₂ : 423 [M - H ₂ O + H] ⁺	405 [M ₂ - H ₂ O] ⁺ 445 [M ₁ - CH ₃ OH] ⁺	n.o.	n.o.
i	36.0	454	M ₁ : 477 [M + Na] ⁺ M ₂ : 423 [M - H ₂ O + H] ⁺	405 [M ₂ - H ₂ O] ⁺ 445 [M ₁ - CH ₃ OH] ⁺ 405 [M ₂ - H ₂ O] ⁺	n.o.	n.o.

n.o.: no observed.

MCA realized with the statistical software R [26] and its package FactoMineR [27].

1.4. Phylogenetic validation

DNA was fully extracted from the silica-gel conserved samples using a DNEasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), following the furnished procedure. Extracted DNA was purified using GeneClean II Kit (MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA). As many studies proved the usefulness of the ITS2 sequences to investigate phylogenetic relationships at a low taxonomic level [18], and particularly within the family Sargassaceae [7,8,12,13], we chose 5.8S BF – forward – and 25BR2 – reverse – primers to amplify the ITS2 locus of our samples according to Yoshida et al. [28]. Amplification was realized according to Stiger et al. [13]. PCR products were purified using GeneClean II Kit, and sequenced by Macrogen (Macrogen Corp., Amsterdam, The Netherlands) in forward and reverse directions, using Big Dye Terminator Method. Additional sequences from other Sargassaceae algae were retrieved from the GenBank. The secondary structure of the ITS2 has been taken into account, as an efficient way to align ITS2 sequences using Bioedit software [29]. A phylogenetic tree was built under Mega 4 software [30] based on the Neighbor-Joining (NJ) algorithm. Sequences of some other Sargassaceae taxa (include species of the genera *Sargassum*, *Turbinaria* and *Myagropsis*) were used to enroot the consensus tree (outgroup). The relevance of the position of each node was assessed with bootstraps, obtained with 1000 replicates.

2. Results

2.1. LC/ESI-MSⁿ fingerprinting

Twenty chromatograms were produced from the extracted and analyzed samples. A very good reproducibility within each species was found. The 5 chromatograms presented at Fig. 2 are representative of the chemical profile of each of the 5 species. The first

information is provided by the signal/baseline noise ratio. *C. baccata*, *C. nodicaulis* and *C. tamariscifolia* have high maximal intensities (respectively up to 6.10^7 , 8.10^7 and 2.10^7), while the noise intensity is for the 5 species about 2.10^6 . This results in an optimal signal/noise ratio (up to 40). This highlights the presence of major compounds, illustrated by high peaks on the +MS chromatograms and checked by ELSD detection. There are 2 clear compounds for *C. baccata* (retention times: 17.8 and 20.8 min), 1 for *C. nodicaulis* (22.2 min), and 6 for *C. tamariscifolia* (16.7, 19.3, 20.4, 30.2, 34.9 and 36.0 min). On the contrary, *C. foeniculacea* and *C. humilis* have comparatively smaller intensities signals (under 1.10^7), leading to poor signal/noise ratio (about 4). For both species, there is no clear specific signal in the 10–40 min range that could be investigated any further. The weakly detected molecules are fatty residues that have not been fully eliminated during the Solid Phase Extraction process. This is the reason why no other result is presented, considering *C. foeniculacea* and *C. humilis*.

In a second time, the graphical comparison of chromatograms indicates the existence of only 4 kinds of chemical profiles. Actually, all chromatograms are significantly different to each other, except the ones of *C. foeniculacea* and *C. humilis*, which show similar shapes. The m/z ratios at selected retention times confirm the impossibility to distinguish both species thanks to the only LC/ESI-MSⁿ analyses of their lipophilic extracts. In the case of the three other species, MS fragmentation pattern of the major compounds are detailed in Table 1. This way, LC/ESI-MSⁿ separated two groups: (1) *C. foeniculacea* and *C. humilis*, species showing no intense peaks and (2) *C. baccata*, *C. nodicaulis* and *C. tamariscifolia*, with several specific molecules associated.

2.2. In vivo NMR analyses

Twenty spectra, with little intraspecific chemical diversity, were obtained from the samples. Among them, only 5 spectra are presented and highlighted the interspecific chemical diversity (Fig. 3). Some clear signals, permitting unambiguous identification, can be

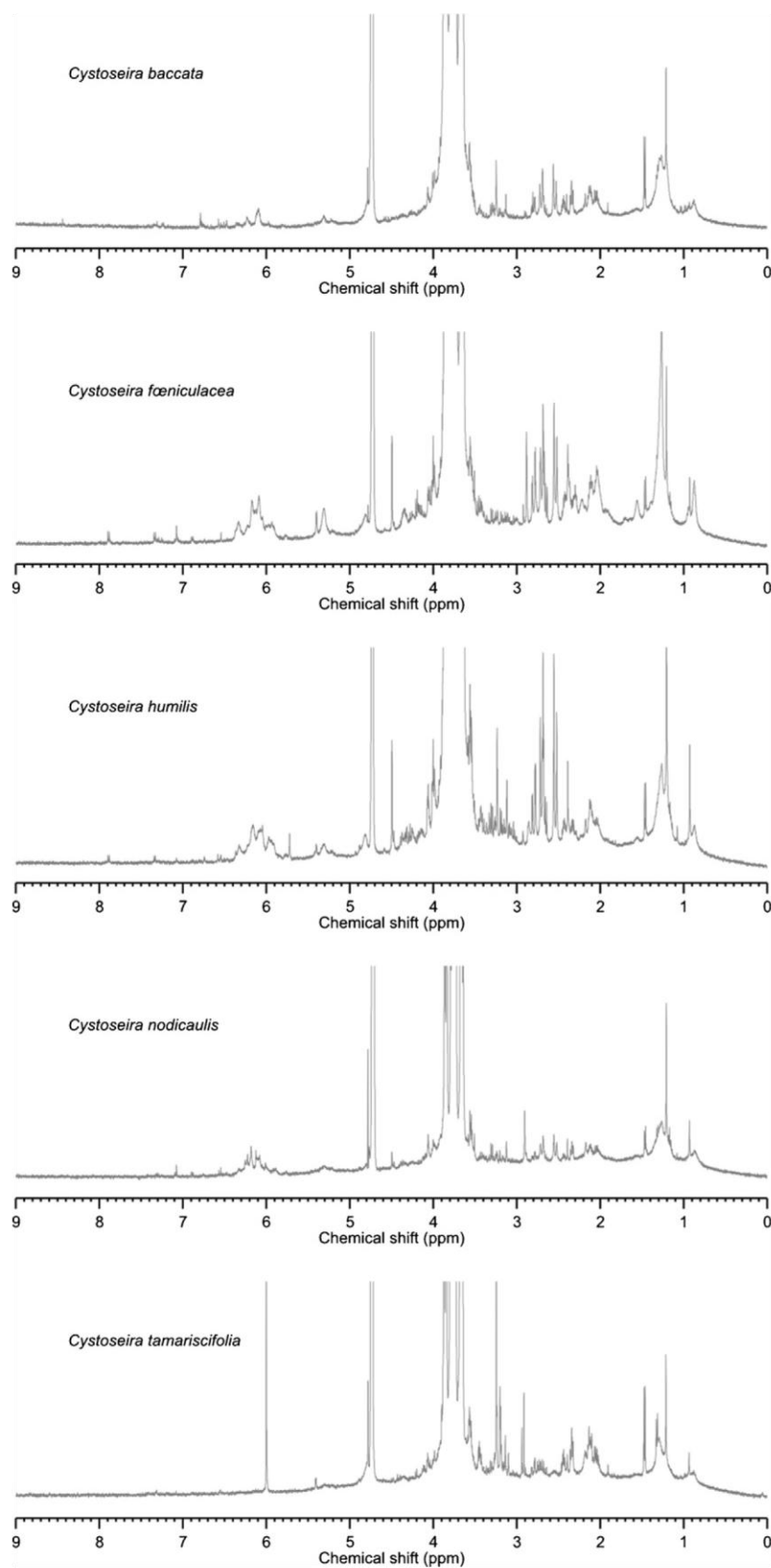


Fig. 3. ^1H HR-MASNMR spectra of *Cystoseira* specimens collected in Brittany.

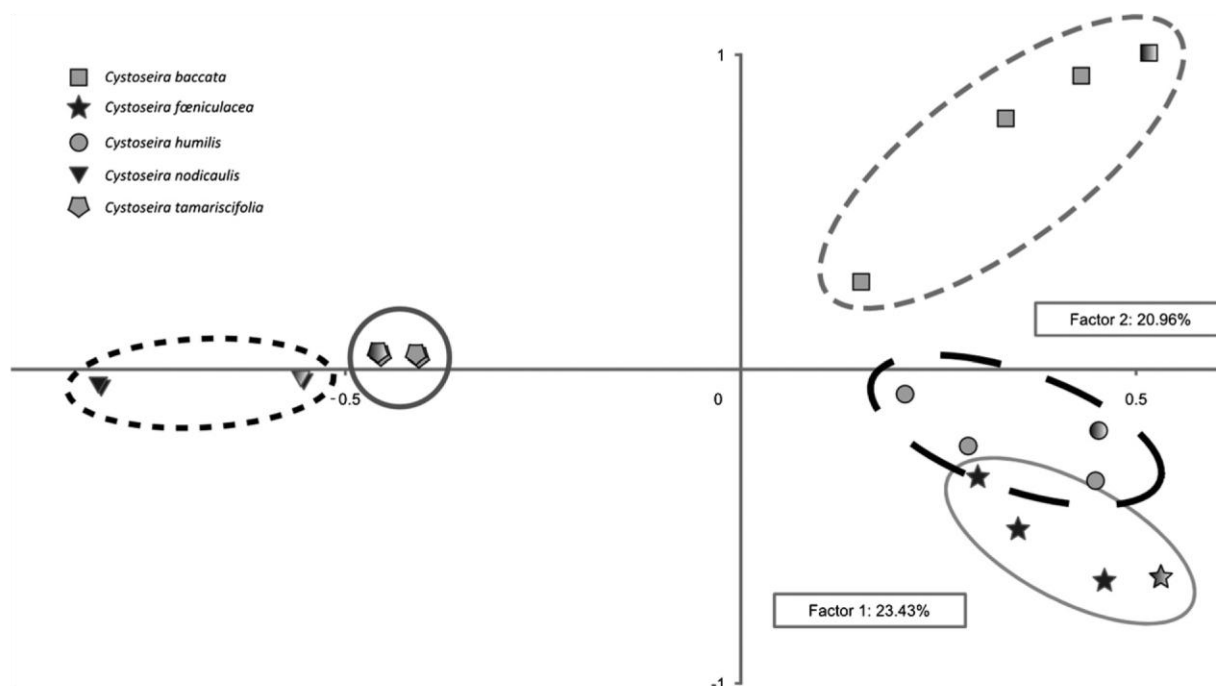


Fig. 4. Multiple Correspondence Analysis: projection of the 20 spectra obtained from the *Cystoseira* samples. Samples collected at Penmarc'h in plain color (15 points), others in shades of grey (5 points).

observed in the spectra of *C. nodicaulis* and *C. tamariscifolia*. As an example, for the first species, it is a singlet at 2.91 ppm. For the latter, one peak at precisely 6.00 ppm was characteristic of the species. *C. foeniculacea* and *C. humilis* are altogether characterized by the occurrence of two doublets of equal intensity at 7.90 and 7.36 ppm, among a wide variety of common signals. *C. baccata* shows the most important chemical diversity, but the presence of many signals permits constant discrimination to the other species. However, the absence of particular signals in the spectra of *C. foeniculacea* and *C. humilis*, associated with a slight intraspecific chemical diversity within both species, makes impossible their absolute discrimination using *in vivo* NMR.

All the information from NMR spectroscopy is compiled in the MCA graph (Fig. 4). In this scatter plot, clusters highlight the chemical domain for each species. The closer two points are on this plot, the closer their chemical composition as observed on their spectra is.

This statistical analysis highlights three issues about the ^1H HR-MASNMR data: (1) *C. foeniculacea* and *C. humilis* are not different considering their global chemical composition; (2) among the five species, only four chemical profiles are observed: *C. nodicaulis*, *C. tamariscifolia*, *C. baccata*, and the couple *C. humilis*/*C. foeniculacea*; (3) *C. nodicaulis* and *C. tamariscifolia* appears as two chemically close species.

2.3. Phylogenetic analysis

Including gaps, the sequences of the five *Cystoseira* species plus 8 other Sargassaceae consist in 649 base pairs. Based on ITS2 sequences, the 5 *Cystoseira* species from Brittany are not monophyletic (Fig. 5); they are separated into two strongly supported clades. *C. foeniculacea* and *C. humilis* are strongly linked to each other (bootstrap of 100). *C. baccata* and *C. nodicaulis* also turn out to be phylogenetically very close species (bootstrap of 100), and form another clade with *C. tamariscifolia* and *Bifurcaria bifurcata* (bootstrap of 85).

So, the phylogenetic analysis revealed (1) a suspected polyphyly within the genus *Cystoseira*, underlined by two distinct clades in

the tree: {*C. foeniculacea* + *C. humilis*} versus {*C. baccata* + *C. nodicaulis* + *C. tamariscifolia*} and (2) the strength of the relationships between *C. baccata* and *C. nodicaulis*.

3. Discussion

Both analytical methods employed in our study led to four chemical profiles among the five species. Moreover, ITS2 sequences from the five *Cystoseira* species turned out to be all different (Fig. 5). This is not contradictory to the existence of five validated species, and concludes about the usefulness of the key identification proposed by Cabioch et al. [24].

3.1. Relevance of analytical methods in species discrimination

LC/ESI-MSⁿ analyses clearly indicated the presence of some major compounds in the chromatograms of *C. baccata*, *C. nodicaulis* and *C. tamariscifolia* (Fig. 2). These were characteristic of each species, as between the taxa, the "peaks" detected by the mass spectrometer differed by their retention time (i.e. polarity) and their m/z ratio (Table 1). Due to their chromatographic and MS data, these compounds could be identified as meroditerpenoids. These metabolites issued from mixed biosynthesis (mevalonate and shikimate pathways) were generally constituted by a diterpenic side-chain linked to a toluquinol moiety. Meroditerpenoids were commonly found as main constituents in the extracts of species belonging to the genus *Cystoseira* [4,5]. Based on their systematic occurrence in lipophilic extracts, considering different sampling sites and different sampling periods, we can suggest their use as chemotaxonomic markers of the *Cystoseira* species in Brittany. Further investigations on the mass spectral data in the chromatograms of *C. baccata* clearly identified the two major compounds detected (peaks a and b) as bicyclic meroditerpenoids, already described from Moroccan samples of this species (referred as compounds 1 and 2 in Mokriani et al. [31]). This identification has been unambiguously confirmed by injection of pure standards and by comparison of their retention time and mass spectrum with those of peaks a and b from this present study (Table 1). In the

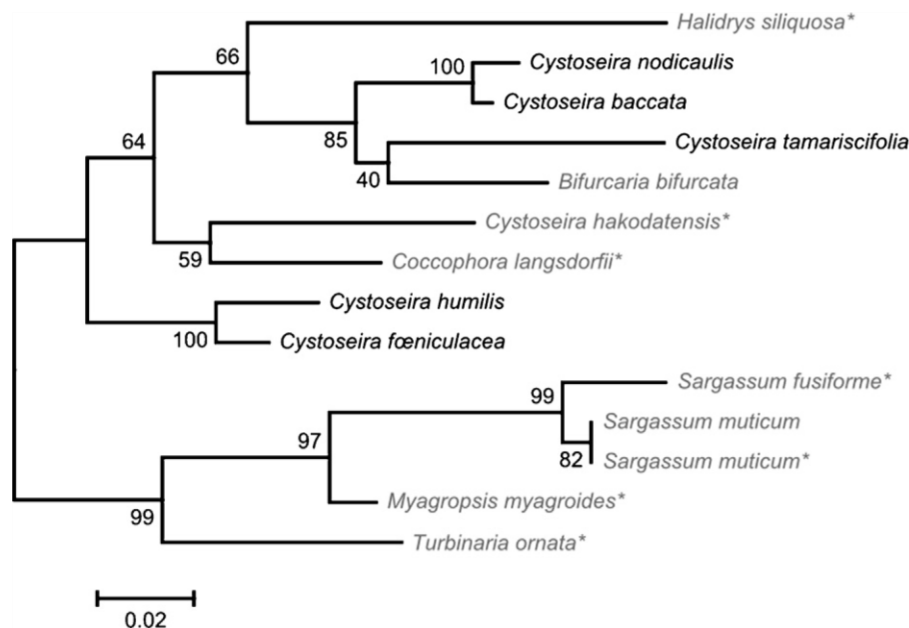


Fig. 5. Phylogenetic tree obtained using the Neighbor-Joining method on the ITS2 sequences. *Cystoseira* species in black, others in grey. * indicates sequences retrieved from the GenBank.

case of *C. nodicaulis*, the chromatogram showed only one major compound (peak c) while for *C. tamariscifolia* six main compounds (peaks d–i) were detected: their spectral data were in agreement with those of meroditerpenoid-related compounds with various levels of oxygenation and/or degrees of unsaturation on the diterpenic part (m/z 474, 472, 454 and 440). For these two last species, further works are in progress to purify and elucidate the chemical structure of the main components of their extracts, and the assessment of their variations in space and time must be done to validate these compounds as chemomarkers. In the case of *C. nodicaulis*, such an analysis is of particular interest, as this species has never been the subject of any chemical study about its lipophilic content.

^1H HR-MAS NMR analyses managed also to give a characteristic chemical profile for these three species, with one homogeneous group per species in the Multiple Correspondence Analysis (Fig. 4). As a matter of fact, two species, *C. nodicaulis* and *C. tamariscifolia* supplied very precise information that could be regarded as discriminating factor on their spectra. For the first, a typical singlet occurred at 2.91 ppm. For *C. tamariscifolia*, an intense singlet at precisely 6.00 ppm indicated the possible occurrence of a simple phlorotannin. Glombitza et al. [32] isolated two simple phenolic compounds from this alga, i.e. bifurhalol and diploretol, but none of their NMR chemical shifts did match with the ones obtained here. Identification of the products at the origin of this 6.00 ppm singlet is in progress, so as to evaluate its relevancy as a chemotaxonomic marker, at least for Breton samples of *C. tamariscifolia*.

However, neither LC/ESI-MSⁿ nor ^1H HR-MAS NMR was helpful to distinguish *C. foeniculacea* and *C. humilis*. This is particularly interesting and means that neither their precise lipophilic composition, nor their global chemistry differs from the one to the other. No really "original" compound is synthesized by these two species. This is in accordance with previous results dealing with chemical classification of *Cystoseira* species [22,4,5], where *C. humilis* was also characterized by the absence of lipophilic secondary metabolites.

3.2. Relevance of methods in species boundaries determination

The analysis of ITS2 sequences highlights a possible polyphyletic status of the genus *Cystoseira* (Fig. 5). The five species of this "genus"

are distributed within two separated clades. The first comprises *C. foeniculacea* and *C. humilis* while the second clade is composed, among other Sargassaceae species, of *C. tamariscifolia*, *C. baccata*/*C. nodicaulis*, and indicates a close relationship between the two latter species, which is in accordance with Rousseau et al. [15] where the same topology was observed using the LSU marker. So, it is necessary to check the taxonomic validity of the genus *Cystoseira*, including taxa from the Mediterranean Sea, Indian and Pacific Oceans. As we particularly focused on terpene derivatives throughout their mass spectral data and retention times using LC/ESI-MSⁿ analyses, at first sight this method can hardly be employed to determine species boundaries within the three species displaying clear information. At this step, the information summarized in Table 1 is only a way to distinguish species. Complementary investigations are required to make comparisons between the structures of the detected metabolites. However, LC/ESI-MSⁿ results can be regarded as absolutely consistent with the possible polyphyletic status of the genus *Cystoseira* highlighted with the molecular approach. The resulted phylogenetic tree clearly separates two strongly supported *Cystoseira* groups: "terpene derivatives producers" (3 species) versus "non lipophilic secondary metabolites producers" (2 species). The taxonomical value of this chemical separation is strengthened by the fact that *Bifurcaria bifurcata* R. Ross and *Halidrys siliquosa* (L.) Lyngb. are also known to be terpene producers [33,34,35], and are located in the tree with the *Cystoseira* species producing terpene derivatives (Fig. 5). Piatelli [22] proposed a classification of the genus based on the production of terpenes. According to him, *C. foeniculacea* can now be added to the "Chemical Group I", that includes all *Cystoseira* taxa which never synthesize lipophilic secondary metabolites.

We consider relevant to go on with chemical investigations for *C. nodicaulis*, in order to complete the chemical classification of the *Cystoseira* species. Regarding the close phylogenetic relationship between both species, it will be particularly interesting to evaluate whether *C. nodicaulis* will join the same group as *C. baccata*: the "Chemical Group V" (defined by Piatelli [22]), characterized by the presence of cyclic meroditerpenoids. The distinction of species using the terpene derivatives production criterion is taxonomically correct for the five Breton species of the genus *Cystoseira*. Investigations could be led to check whether the consistency between

chemical groups and phylogeny could be extended to the whole Sargassaceae family.

Concerning the ^1H HR-MASNMR results, except the previously discussed similarities in *C. foeniculacea* and *C. humilis*, the clearest two others linked species revealed by the close position of the samples of both species in the MCA are *C. nodicaulis* and *C. tamariscifolia* (Fig. 4). This result is due to the presence of several signals shared by both species (used as input for MCA, data not shown). This is then contradictory to the phylogeny assessed by the ITS2 sequences, which revealed a stronger link between *C. baccata* and *C. nodicaulis*. A possible explanation of this phenomenon is that the two species must have in common particular cell structures, called iridescent bodies, which have been described in *C. tamariscifolia* (referred as *C. ericoides* by Pellegrini [36]) and *C. amentacea* (referred as *C. stricta* by Pellegrini [36,37]). These structures are responsible for the Purple-to-Green color of the thalli when immersed, often used as an identification criterion in taxonomy. Looking at *C. nodicaulis*, despite iridescence has also been described [38,39], to our knowledge no study has investigated the cellular origin of this phenomenon. Nevertheless, we can reasonably assume that it is the same as described for the other iridescent *Cystoseira* species. Iridescent bodies have been the subject of some electronic microscopy works. Despite this, the composition of these multi-layered objects has not been elucidated yet. For *Cystoseira amentacea* var. *stricta* Montagne, Pellegrini [36] concluded to a “proteic, polysaccharidic, and lipidic” composition. As these iridescent bodies are present throughout all the cells of the secondary axes, the molecules composing it must have particularly intense NMR signals, actively participating to the overall chemical spectra of the samples. This may be at the origin of the similarity of the chemical composition of both species underlined by the MCA results.

3.3. Interests of the developed methods

The two analytical methods appeared to be useful to discriminate the *Cystoseira* species in Brittany. Chemical composition turned out to be useful for such purpose. Furthermore, both techniques were robust face to spatiotemporal variations (unpubl. data). The inclusion of samples coming from different sites, collected at different periods of the year, did not change the result of the study. It seems that, for the five *Cystoseira* species studied, the chemical composition is constitutive for these organisms. However, among the five species, two of them, *C. foeniculacea* and *C. humilis*, could never be separated, due to a common chemical composition, notably characterized by the absence of “real” major lipophilic secondary metabolites. Nevertheless, consistent information was highlighted to describe both taxa. Considering (1) their high morphological similarities, (2) their very close chemical composition, in a whole, or more precisely concerning their lipophilic molecules, and (3) their tight relationship apart from the other *Cystoseira*, the two species form a highly homogeneous taxonomical duet. If the two chemotaxonomic methods did not detect a difference between both species, at least they revealed the strength of their relationships, confirmed by their phylogeny.

LC/ESI-MSⁿ proved itself to be a valuable technique for investigating the taxonomy of the genus *Cystoseira*. For such a method, results are easy to obtain and provide accurate information about the chemical composition of the extracts. It is a precious preliminary step to investigate secondary metabolites content and taxonomy, in the case of the genus *Cystoseira*.

For taxonomical purposes, the two methods display many advantages, compared to molecular techniques, in terms of manipulation time and cost. They can lead, depending on the species studied, to unambiguous identification of samples, within a few hours concerning ^1H HR-MAS NMR, and one day with LC/ESI-

MSⁿ. This is to be compared to the time necessary for obtaining sequences from samples (more than one week at least, from the extraction of DNA to the obtaining of the phylogenetic trees). Moreover, molecular studies are frequently dependent on many factors that can increase the time gap before getting the sequences. Phylogenetic studies also require high-quality tissues for DNA extraction, e.g. receptacles with male gametes, so as to extract the maximum DNA possible. The use of strictly vegetative tissues can be useless, so the sampling should be done in accordance to the seasonality in the reproduction of the species studied. In addition, some metabolites (polysaccharides, phlorotannins...) can disturb the amplification of DNA during PCR. All these factors shall be taken into consideration before choosing a method or another. Finally, the major advantage for these techniques is the amount of supplementary information obtained, beyond the simple taxonomically oriented work. Indeed, these techniques also bring new data on the chemical composition within the algae, which is crucial when a screening of new molecules is started. As a comparative point of view, ^1H HR-MASNMR, as a non destructive technique, can be valuable in order to get a “ ^1H identity card” of a biological sample, and LC/ESI-MSⁿ is crucial to investigate further on the chemical composition of the extracts. Both techniques appeared relevant in preliminary studies on the search of natural products, so a complementary purification and identification process is being developed to determine the nature of the chemical compounds occurring in the species of the genus *Cystoseira*.

Acknowledgements

This study is part of the Ph.D. thesis work carried out by the first author within the Laboratory of Ecophysiology and Biotechnologies of Halophytes and Marine Algae (LEBHAM EA 3877) set at the IUEM (UBO-UEB). It was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and by the Interreg IVB project Biotecmar. Gratitude is due to Dr. Xavier Dauvergne for statistical advice and to the two anonymous referees for their help in improving the manuscript.

References

- [1] M.D. Guiry, G.M. Guiry, 2010, AlgaeBase, World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, <http://www.algaebase.org>, searched on March 12, 2010.
- [2] A.H. Dizerbo, E. Herpe, Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique, Iles Normandes incluses, Éditions Anaximandre, 2007.
- [3] M. Oliveras Plá, A. Gómez Garreta, *Anal. Bot. Madrid* 46 (1989) 89.
- [4] V. Amico, *Phytochemistry* 39 (1995) 1257.
- [5] R. Valls, L. Piovetti, *Biochem. Syst. Ecol.* 23 (1995) 723.
- [6] M. Roberts, *Eur. J. Phycol.* 3 (1967) 345.
- [7] L. Mattio, C.E. Payri, V. Stiger-Pouvreau, *J. Phycol.* 44 (2008) 1541.
- [8] A. Rohfritsch, C.E. Payri, V. Stiger, F. Bonhomme, *Biochem. Syst. Ecol.* 35 (2007) 91.
- [9] J.B.J. Harvey, L.J. Goff, *J. Phycol.* 42 (2006) 707.
- [10] J.A. Coyer, G. Hoarau, M.P. Oudot-Le Secq, W.T. Stam, J.L. Olsen, *Mol. Phylogenet. Evol.* 39 (2006) 209.
- [11] G.Y. Cho, F. Rousseau, B. de Reviers, S.M. Boo, *Phycologia* 45 (2006) 512.
- [12] V. Stiger, T. Horiguchi, T. Yoshida, A.W. Coleman, M. Masuda, *Phycol. Res.* 51 (2003) 1.
- [13] V. Stiger, T. Horiguchi, T. Yoshida, A.W. Coleman, M. Masuda, *Phycol. Res.* 48 (2000) 251.
- [14] F. Rousseau, R. Burrows, A.F. Peters, R. Kuhlenskamp, B. de Reviers, C.R. Acad. Sci. Paris Life Sci. 324 (2001) 305.
- [15] F. Rousseau, B. de Reviers, *Eur. J. Phycol.* 34 (1999) 53.
- [16] F. Rousseau, M. Leclerc, B. de Reviers, *Phycologia* 36 (1997) 438.
- [17] E.A. Serrão, L.A. Alice, S.H. Brawley, *J. Phycol.* 35 (1999) 382.
- [18] M.C. Leclerc, V. Barriol, G. Lecointre, B. de Reviers, *J. Mol. Evol.* 46 (1998) 115.
- [19] G. Blunden, J. Currie, D.E. Thurston, *J. Appl. Phycol.* 6 (1994) 281.
- [20] A. Ortalo-Magné, A.G. Culioli, R. Valls, B. Pucci, L. Piovetti, *Phytochemistry* 66 (2005) 2316.
- [21] D.W. Laird, I.A. van Altena, *Phytochemistry* 67 (2006) 944.
- [22] M. Piattelli, *New J. Chem.* 14 (1990) 777.
- [23] K. Le Lann, N. Kervarec, C.E. Payri, E. Deslandes, V. Stiger-Pouvreau, *Talanta* 74 (2008) 1079.

- [24] J. Cabioc'h, J.Y. Floc'h, A. Le Toquin, C.F. Boudouresque, A. Meinesz, M. Verlaque, Guide des Algues des Mers d'Europe, Delachaux et Niestlé, 2006.
- [25] M. DeFronzo, R.J. Gillies, J. Biol. Chem. 262 (1987) 11032.
- [26] R Development Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Austria, 2004.
- [27] S. Lê, J. Josse, F. Husson, J. Stat. Soft. 25 (2008) 1.
- [28] T. Yoshida, V. Stiger, T. Horiguchi, Phycol. Res. 48 (2000) 125.
- [29] T.A. Hall, Nucleic Acids Symp. Ser. 41 (1999) 95.
- [30] S. Kumar, M. Nei, J. Dudley, K. Tamura, Brief Bioinform. 9 (2008) 299.
- [31] R. Mokrini, M. Ben Mesaoud, M. Daoudi, C. Hellio, J.P. Maréchal, M. El Hattab, A. Ortalo-Magné, L. Piovetti, G. Culioli, J. Nat. Prod. 71 (2008) 1806.
- [32] K.W. Glombitza, H.U. Rosener, D. Müller, Phytochemistry 14 (1975) 1115.
- [33] G. Culioli, A. Ortalo-Magné, M. Richou, R. Valls, L. Piovetti, Biochem. Syst. Ecol. 30 (2002) 61.
- [34] G. Culioli, A. Ortalo-Magné, M. Daoudi, H. Thomas-Guyon, R. Valls, L. Piovetti, Phytochemistry 65 (2004) 2063.
- [35] G. Culioli, A. Ortalo-Magné, R. Valls, C. Hellio, A.S. Clare, L. Piovetti, J. Nat. Prod. 71 (2008) 1121.
- [36] L. Pellegrini, Thesis, Sciences Naturelles, Université d'Aix-Marseille II, 1978.
- [37] L. Pellegrini, C. R. Acad. Sci. Paris 277 (1973) 277.
- [38] M. Roberts, Eur. J. Phycol. 5 (1970) 201.
- [39] J. Dumay, PhD Thesis, Algologie, Université de Paris VI, 1981.

Matériel supplémentaire

Les séquences ITS2 obtenues au cours de cette étude sont présentées en Figure 41.

Afin de préciser le niveau de certitude qui entoure ces séquences, un chromatogramme issu du séquençage (amorce anti-sens) de l'ITS2 de *Cystoseira nodicaulis*, représentatif de la qualité des données obtenues, est fourni en Figure 42.

	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	10	20	30	40	50	60	70	80	90										
Bifur	CGAAAAATCG	CCCACCGCTT	GGGACTTGCT	TACTCGAGTA	GTAGGTGAGT	CCGAGGCGGT	GGCGCGGACT	CTGAGTGTTC	CGGGGGATTC										
C.bac	CGAAAAATCG	CCCACCGCTT	CGGGCTCGAG	CCCAGAGGC	GGTGGCGCGG	ACTCTGAGTG	TTCCGGGGGA	TGAAGATACA	CTTCGTA	CTT									
C.foe	CGAAAAATCG	CCCACCGCTT	CGGGTTCGGG	ATCTCGAGCT	CGAGTCGGTG	GAGCGGAATC	TGCGTGTTCC	GGGAGGCGAG	GCGGTATGGC										
C.hum	CGAAAACTCG	CCCACCGCTT	CGGGTTCGGA	ATCTCGAGCT	CGAGTCGGTG	GAGCGGAATC	TGCGTGTTCC	GGGAGGCGAG	GCGGTATTTT										
C.nod	CGAGAAATCG	CCCACCGCTT	CGGGCTCGAG	CCCAGGCGG	TGGCGCGGAC	TCTGAGTGTT	CCGGGGGATG	GATGATATAT	TATTTAATAC										
C.tam	CAAAAAATCG	CCCACCGGAT	TGGACTCGCC	CGCTCGAGTA	GCGAGTGAGT	CCGAGGCGGT	GGCGCGGACT	CTGAGTGTTC	CGGGGGATAC										
Sarga	CGAAAACTCG	CCCACAGCTT	CGGGTTCGAT	CTCGACCTCG	AGGCGGTGGA	GCGGAATCTG	AGTGTTCCGG	GGAGCGGTGG	TGCGGTGGGT										

		
	100 110 120 130 140 150 160 170 180	
Bifur	TTGGTCCCCC GAGTTCACCC AAGGCTGGAG AGCAACCAAC CGGCCGGCCA GTTGCGGCGC CGGAGGCGTT CATTTTACGC CCCC CGGACG	
C.bac	CGTCCCCCGA GTTCACCGAA GGCTGGAGGG CAACCAACCG GCCGGCCAGT TGCGTAGCCG GAGGCGTTCA CTTTACGCCC CCCG GACGAT	
C.foe	AATACTAGTA CTCAGCGCCC CGAGTTCACC CAAGGCTAGA GAGTACCAA CCGGCCGGGC AACTCGCCTG CGGCGCTGGA GTCG TTTACT	
C.hum	AATACTAGTA CTCAGCGTCC CGAGTTCACC TAAGACTGGA GGGTACCAA CCGGCCGGGC AACTCGCCTG CGGCGCTGGA GGCG TTTACT	
C.nod	TTCGTCCGTC CTCCGAGTTC ACCGAAGGCT GGAGGGCAAC CAACCGGCCG GCCAGTTGCG GAGCCGAGG CGTTCACTTT ACGC CCCCCG	
C.tam	ATACATACCC TGAGTTCACC CAAGGCTGGA GAGCAATCAA CCGGCCGGCC ACTTGCGGTG CCGGAAGCGT TCATTTGTAC GCCCTCCGGA	
Sarga	ATTTTTGTAC CTA CTGCTCCCCT GAGTTCACCT AAGCCTAGAG AGCTACCGAT CGTCCGGGTT TCTATTCTCT TTGCGGCGCT	

																			
	190	200	210	220	230	240	250	260	270										
Bifur	ACCCGTTGTT	GACGGCGCCC	CTTCTGCGGG	GCGGGGACAC	GACGGGTCGC	TCGGGGTGAG	CGTGGACGAC	CCAAAGCGTC	GCTTGATTGG										
C.bac	CCGTTGTTGA	CGGCGCCCCC	ATCGCGGGGC	GGGGACACGA	CGGGTCGCTC	GGGGTGAGCG	CGGACGACCG	AAAGCGTCGC	TTGACATGGC										
C.foe	TTGCGCCCCC	CGGATGAGTC	GTTGTTGACG	GCGCCCCCTC	TCGCGGGGCG	GGGACACGAC	GGGTCGCTGG	GGGTGAGCGC	GGACGACTTT										
C.hum	TTGCGCCCCC	CGGATGACCC	GTTGTTGACG	GCGCCCCCTC	TCGCGGGGCG	GGGACACGAC	GGGTCGCTGG	GGGTGAGCGC	GGACGACTTT										
C.nod	GACGATCCGT	TGTTGACGGC	GCCCCATCG	CGGGGCGGGG	ACACGACGGG	TCGCTCGGGG	TGAGCGCGGA	CGACCGAAAG	CGTCGCTTGA										
C.tam	CGACCCGTTG	TTGACGGCGC	CCCCTTTGCG	GGGCGGGGAC	ACGACGGGTC	GCTCGGGGTG	AGCGCAACG	ACCGACAGCG	TCGCTTGATG										
Sarga	GATGACAGGT	TAACCCGTGT	CTTCCGAGG	ATCCGTTGTT	GACCCCGCCC	CCTCTCGCGG	GGCGGGGACA	CGACGGGTCG	CCGGGGATGT										

	280	290	300	310	320	330	340	350	360
Bifur	GCGGAAGGGA	GGTAAGGGCT	CGTGAGACGG	ATTTAGGATG	AAATTATACT	ACCCATACCC	CCGATCAAGC	AAGAGG	
C.bac	CGGAAGGGAG	GTAGGCTCGT	GAGAGATGAG	ATGACGACGA	CTATGCCATA	CCCCCGATCA	AGCAAGAGG		
C.foe	ACGGCGTTCG	TTGAGGCCCG	GAAGGGAGGC	AGGCTCGCGA	ATACGATGAG	ATAATGACAT	GCCGTACCCC	CGATCAAGCA	AGAAG
C.hum	ACGGCGTTCG	TTGAGGCCCG	GAAGGGAGGC	AGGCTCGTGA	GTACGATGAG	ATAATGACGA	TGCCGTACCC	CCGATCAAGC	AAGAAGA
C.tam	CATGGCCGGA	AGGGAGGTAG	GCTCGTGAGA	CTAAAGAAGA	GATAGATATA	ACGATGCCAT	ACCCCCGATC	AAGCAAGAGG	

CHAPITRE II – TAXONOMIE ET SYSTÉMATIQUE DU GENRE *CYTOSEIRA* EN BRETAGNE

Cysto	GCCGGAAGGT	AGGTAAGGCT	CGTGAGACGG	GTTTTTTTAGG	ATGTTGGCCA	TACCCCCGAT	CAAGCAAGAG		
Sarga	GTGCGGGTGA	CCCCGAGGCG	TCACTGGAGG	CAGGTTTACC	TGTGTCTTCC	GGAAGATTCC	TTGTTGACGG	CGCCCCCTCT	CGCGGGGCGG
									
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
Bifur									
C.bac									
C.foe									
C.hum									
C.nod									
C.tam									
Sarga	GGACACGACG	GGTCGCCGGA	GATGTGTGCG	GGTGAGTTTG	AAGCGTCGCT	CGAGGCAAGT	TCGCGTTGCG	TCTTTCGGAG	GATCCGTTGT
									
	460	470	480	490	500	510	520	530	540
Bifur									
C.bac									
C.foe									
C.hum									
C.nod									
C.tam									
Sarga	ACGACGGGTC	GCCGGGGATG	TACGCGGGTG	AGTTTGGAGC	GTCGCTGGAG	GCCCGTGGAC	GGTAGGCAGT	CTCGAGAGTG	CCGGTGAGAG
									
	550	560	570	580	590	600	610	620	630
Bifur									
C.bac									
C.foe									
C.hum									
C.nod									
C.tam									
Sarga	GCCGGTGATA	ATGATTATGC	CATACCCCCG	ATCAAGCAAG	AAG.....				

Figure 41 : Séquences ITS2 brutes obtenues au cours de cette étude ; Bifur = *Bifurcaria bifurcata* ; C. bacc = *Cystoseira baccata* ; C.foe = *C. foeniculacea* ; C.hum = *C. humilis* ; C.nod = *C. nodicaulis* ; C.tam = *C. tamariscifolia* ; Sarga = *Sargassum muticum*

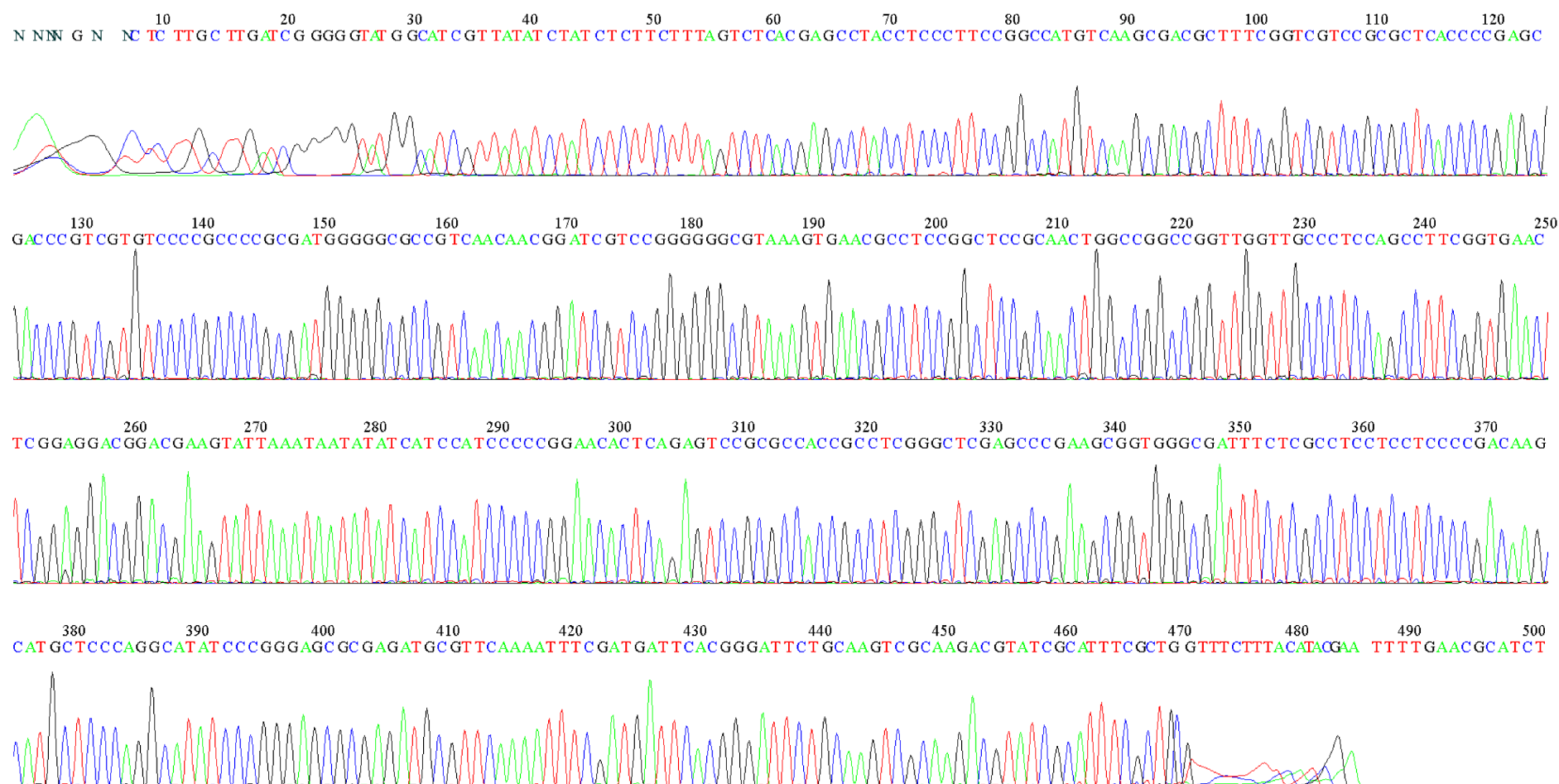


Figure 42 : Chromatogramme résultant du séquençage du brin anti-sens de l'ITS2 de *Cystoseira nodicaulis*

3.3 ISOLEMENT DU CHIMIOMARQUEUR DE *CYTOSEIRA NODICAULIS*

Les résultats ayant abouti à l'identification du mérodiertène issu des extraits de *Cystoseira nodicaulis* sont intégrés à un manuscrit qui sera soumis à la revue internationale « Biochemical Systematics and Ecology », sous la référence :

Jégou C., Culioli G. and Stiger-Pouvreau V.

Meroditerpene from *Cystoseira nodicaulis* and its taxonomic significance

Le manuscrit est détaillé dans les pages suivantes. Il inclut l'ensemble des illustrations nécessaires à la compréhension du propos et se présente sous la structure caractéristique de la revue *Biochemical Systematics and Ecology*.

En résumé, nous avons isolé un composé chez *Cystoseira nodicaulis*, détecté par LC-MS au cours de notre précédente étude taxinomique du genre *Cystoseira* en Bretagne (Jégou *et al.*, 2010). La comparaison avec les données issues de la littérature montre que le mérodiertène isolé chez cette espèce est également synthétisé par l'espèce méditerranéenne *C. elegans*, et que sa structure chimique est proche de mérodiertènes isolés de *C. baccata*. Sa présence récurrente (et exclusive) dans les extraits de *Cystoseira nodicaulis* en Bretagne en fait un marqueur chimiotaxinomique robuste de cette espèce en Bretagne.

Au regard des dernières classifications, la synthèse de terpènes semble être un critère phylogénétiquement pertinent, en ce sens que dans le clade où s'inscrit *Cystoseira nodicaulis*, l'ensemble des espèces qui ont été étudiées d'un point de vue chimique sont connues pour synthétiser des terpènes. Il demeure important d'étendre les investigations sur les terpènes des autres espèces de *Sargassaceae* composant ce clade afin de vérifier l'intérêt des dérivés terpéniques comme critère de classification de ces algues.

Meroditerpene from *Cystoseira nodicaulis* and its taxonomic significance

Camille Jégou¹, Gérald Culioli², Valérie Stiger-Pouvreau¹

¹ Laboratory of Sciences of Marine Environment (LEMAR UMR 6539), European Institute of Marine Studies, University of Western Brittany, rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France

² Laboratoire des Matériaux - Polymères - Interfaces - Environnement Marin (MAPIEM EA 4323), Université du Sud Toulon-Var, avenue de l'université, BP 20132, 83957 La Garde Cedex, France

Corresponding author: camille.jegou@univ-brest.fr

Keywords: *Cystoseira nodicaulis*, Sargassaceae, meroditerpene, chemotaxonomy

Abstract

The lipophilic content of the brown alga *Cystoseira nodicaulis*, collected along the Atlantic coasts of France was investigated for the first time, and led to the isolation of a single monocyclic meroditerpene previously identified in *C. elegans*. This result supplements the chemical data available within the family Sargassaceae and allows us to discuss further on taxonomy by comparison with phylogenetic studies. Cyclized meroditerpenes are characteristic of the clade that includes *C. nodicaulis* and its allied species *C. elegans* and *C. baccata*.

Subject and source

Within brown algae, *Cystoseira* is one of the most species-rich sargassacean genera together with *Sargassum*. It is distributed worldwide in subtropical and tropical waters; however most of the known taxa are settled in the Mediterranean Sea, and to a lesser extent, on the European Atlantic coasts (Guiry and Guiry, 2011). *Cystoseira nodicaulis* (Whiting) M. Roberts is a typical Atlantic species, settled northward from the British Isles and southward to Senegal. Its lipophilic composition has not been characterized yet.

Cystoseira nodicaulis was collected at Penmarc'h (Brittany, France) [47°48'N, 4°22'W] in April 2009. Its identification was ensured following the recommendations provided by Cabioc'h *et al.* (2006) and Roberts (1977). A voucher specimen is deposited (Number: CJ-CN-02) in the Laboratory of Sciences of Marine Environment at the European Institute for Marine Studies (Plouzané, France).

Previous work

The chemistry of the genus *Cystoseira* has been intensively studied, however investigations have especially focused on Mediterranean species (Pellegrini *et al.*, 1997; Amico, 1995; Valls and Piovetti, 1995). To our knowledge, there are no phytochemical reports about lipophilic compounds isolated from *C. nodicaulis*. Nevertheless, *C. baccata*, which can be regarded as the sister species of *C. nodicaulis* (Silberfeld *et al.*, 2010; Jégou *et al.*, 2010; Rousseau and de Reviers, 1999), is well known to produce several bicyclic meroditerpenoids (Mokrini *et al.*, 2008; Valls *et al.*, 1993; Basabe *et al.*, 1992). Other closely-related species have been investigated, notably *C. tamariscifolia*, *Halidrys siliquosa* and *Bifurcaria bifurcata*, the terpenic contents of which have been described (Bennamara *et al.*, 1999; Culioli *et al.*, 2008, 2004; El-Hattab *et al.*, 2008; Ortalo-Magné *et al.*, 2005 and references cited therein). In the course of our chemotaxonomical investigations of the genus *Cystoseira*, we propose to elucidate the nature of a meroditerpenoid previously detected in *C. nodicaulis* extracts (Jégou *et al.*, 2010).

Present work

The algal material was cleaned from epiphytes, rinsed with deionized water, freeze-dried and ground into powder. The powdered alga (50 g) was extracted three times with a mixture of dichloromethane-methanol (1:1, v/v), under agitation and at the obscurity during

three hours. The extracts were pooled, the solvent evaporated to dryness, resulting in 2.70 g of a dark green oil. This extract was fractionated by silica gel column chromatography with increasing proportion of ethyl acetate in *n*-hexane as elution gradient. One fraction was selected by LC-ESI-MSⁿ analyses according to the protocol described by Jégou *et al.* (2010). This fraction was cleaned from fatty acids using solid phase extraction on reversed phase (C18), and purified using repeated semi-preparative reversed-phase HPLC, with a C18e column under an isocratic flow of acetonitrile-water (85:15, v/v). This process led to the obtaining of a pale yellow oil, analyzed through (+)-ESI-MS and NMR experiments. These spectral data were compared to literature values (Amico *et al.*, 1991; 1984a), allowing us to determine the chemical structure of the main terpenoid of *C. nodicaulis* as the one of compound **1** (Figure 1).

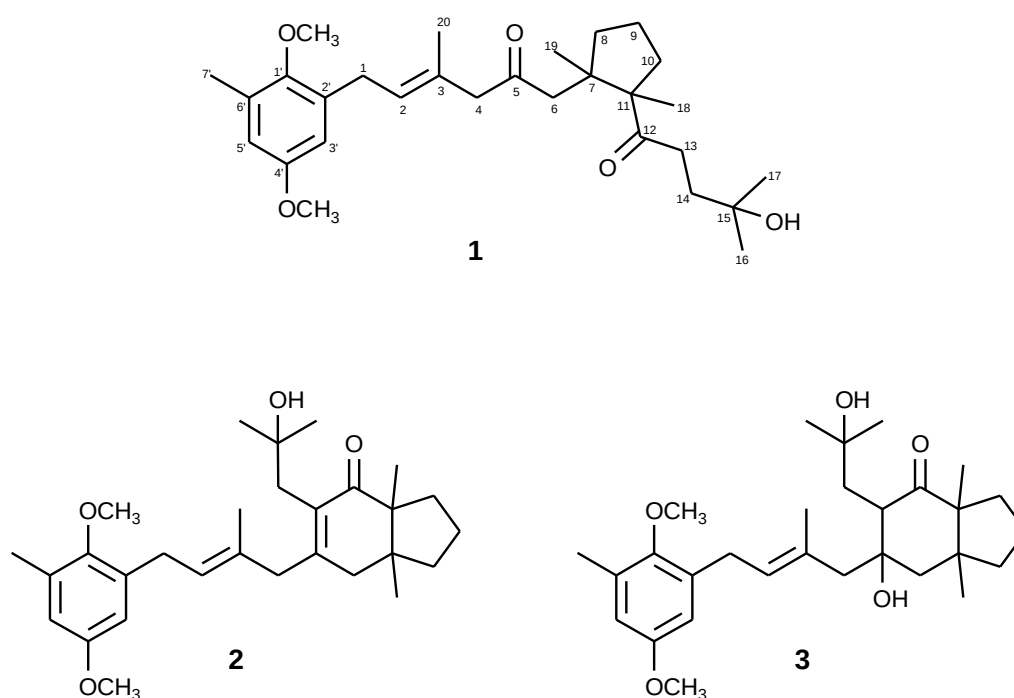


Figure 1: Chemical structures of meroditerpenes **1-3**

Chemotaxonomic significance

The meroditerpene (**1**) isolated from *Cystoseira nodicaulis* (Figure 1) has been described in the hybrid *C. algeriensis* × *C. elegans* (Amico *et al.*, 1984a) and in *C. elegans* (Amico *et al.*, 1988). Furthermore, it is considered as a key metabolite in the biosynthetic pathway conducting to more complex meroditerpenes produced by *Cystoseira* spp. (Amico, 1995). From this compound, an intramolecular aldol condensation between C-5 and C-13 could lead to bicyclic meroditerpenoids (eg. compounds **2** and **3**) bearing a hydriindane moiety

(Amico and Ruberto, 1997). Such metabolites with a bicyclo[4.3.0]nonane ring have been previously described from *C. baccata* (Mokrini *et al.*, 2008; Valls *et al.*, 1993; Basabe *et al.*, 1992), the hybrid *C. algeriensis* × *C. elegans* (Amico *et al.*, 1988; 1984a,b), *C. elegans* (Amico, 1988) and *C. spinosa* (initially named *C. platyramosa*) (Amico *et al.*, 1990a). However, contrary to the latter species, no additional cyclization products could be retrieved in *C. nodicaulis*. The occurrence of similar compounds in *C. baccata*, *C. elegans* and *C. nodicaulis* is consistent with the phylogeny introduced by Draisma *et al.* (2010), in which these three species appear closely related. Based on our previous observations of the lipophilic content within the genus *Cystoseira*, we can notice that these meroditerpenes are robust chemomarkers for *C. baccata*, *C. tamariscifolia* and *C. nodicaulis* in Brittany, since the chemical composition of their lipophilic extracts did not vary through time or sampling sites (Jégou *et al.*, 2010). According to Valls and Piovetti (1995), *C. nodicaulis* joins the chemical group IIIc of the classification of the genus *Cystoseira*, as it produces cyclic meroditerpenoids (Table 1).

Table 1: Chemical and phylogenetic classifications of *Cystoseira* species from Atlantic coasts of France

Species	Chemical classification (Valls and Piovetti, 1995)	Phylogenetic classification (Draisma <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. baccata</i>	Group IIIb (cyclic meroditerpenoid)	<i>Cystoseira</i> -6 in Group 3
<i>C. nodicaulis</i>	Group IIIb (cyclic meroditerpenoid)	<i>Cystoseira</i> -6 in Group 3
<i>C. tamariscifolia</i>	Group IIIc (rearranged meroditerpenoid)	<i>Cystoseira</i> -5 in Group 3
<i>C. humilis</i>	Group I (no terpen production)	<i>Cystoseira</i> -3 in Group 2
<i>C. foeniculacea</i>	Group I (no terpen production)	<i>Cystoseira</i> -3 in Group 2

In the light of the most recent phylogenetic knowledge, the use of diterpenes for chemotaxonomy purposes within the genus *Cystoseira* seems relevant. Draisma *et al.* (2010) indicated how polyphyletic the genus *Cystoseira* was and highlighted different clades and groups. In Table 1, we can see a good correspondence between (1) chemical group III and phylogenetic group 3, and (2) between chemical group I and phylogenetic group 2.

To our knowledge, all the other taxa included in phylogenetic group 3 (e.g. *Bifurcaria bifurcata*, *C. elegans*, *Halidrys siliquosa*, etc.) are known to produce several kinds of terpenes (Culioli *et al.*, 2008; Valls and Piovetti, 1995). Little confusion could be brought by *Cystoseira barbata*, included in phylogenetic group 3 (Draisma *et al.*, 2010) and sometimes ambiguously reported as a non terpene producer in the literature (Amico, 1995; Valls and Piovetti, 1995), whereas it actually produces one meroditerpene (Amico *et al.*, 1990b). However, the last study remains quite evasive about the structural elucidation of this molecule, and a re-investigation of the chemical content of the *Cystoseira barbata* specimen investigated by Draisma *et al.* (2010) appears necessary. As a conclusion, further chemical investigations shall be undertaken within the phylogenetic group 3 to ensure the validity of the diterpene production as a consistent taxonomic criterion.

Acknowledgements

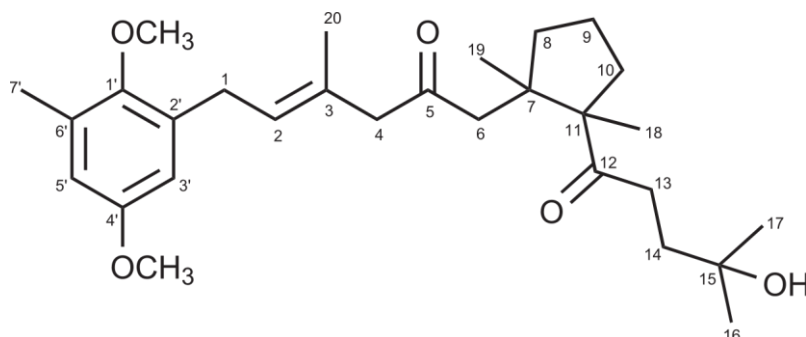
This study is part of the Ph.D. thesis work carried out by the first author within the Laboratory of Sciences of Marine Environment (LEMAR UMR 6539). It was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and by the interreg IVB project Biotecmar.

References

- Amico, V.; Ruberto, G. 1997 Gazz. Chim. Ital. 127, 1
- Amico, V. 1995. Phytochemistry 39, 1257
- Amico, V., Piattelli, M., Neri, P., Recupero, M. 1991. J. Nat. Prod. 54, 877
- Amico, V., Piattelli, M., Neri, P., Ruberto, G. 1990a. J. Nat. Prod. 53, 517
- Amico, V., Piattelli, M., Neri, P., Ruberto, G. 1990b. Gazz. Chim. Ital. 120, 9
- Amico, V., Giaccone, G., Piattelli, M., Ruberto, G. 1988. Phytochemistry 27, 1069
- Amico, V., Cunsolo, F., Piattelli, M., Ruberto, G. 1984a. Phytochemistry 23, 2017
- Amico, V., Oriente, G., Piattelli, M., Ruberto, G. 1984b. Gazz. Chim. Ital. 114, 169
- Basabe, P., Lithgow, A. M., Moro, R. F., Lopez, M. S., Araujo, M. E., Brito Palma, F. M. S. 1992. Stud. Chem. 17, 101
- Bennamara, A., Abourriche, A., Berrada, M., Charrouf, M., Chaib, N., Boudouma, M., Garneau, F.X. 1999. Phytochemistry 52, 37
- Cabioc'h, J., Floc'h, J.-Y., Le Toquin, A., Boudouresque, C.-F., Meinesz, A., Verlaque, M. 2006. Guide des algues des mers d'Europe. Delachaux et Niestlé

- Culioli, G., Ortalo-Magné, A., Valls, R., Hellio, C., Clare, A.S., Piovetti, L. 2008. J. Nat. Prod. 71, 1121
- Culioli, G., Ortalo-Magné, A., Daoudi, M., Thomas-Guyon, H., Valls, R. & Piovetti, L. 2004. Phytochemistry 65, 2063
- Draisma, S., Ballesteros, E., Rousseau, F., Thibaut, T. 2010. J. Phycol. 46, 1329
- El Hattab, M., Ben Mesaoud, M., Daoudi, M., Ortalo-Magné, A., Culioli, G., Valls, R., Piovetti, L. 2008. Biochem. Syst. Ecol. 36, 484
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2011. <http://www.algaebase.org>
- Jégou, C., Culioli, G., Kervarec, N., Simon, G., Stiger-Pouvreau, V. 2010. Talanta 83, 613
- Mokrini, R., Ben Mesaoud, M., Daoudi, M., Hellio, C., Maréchal, J.-P., El Hattab, M., Ortalo-Magné, A., Piovetti, L., Culioli, G. 2008. J. Nat. Prod. 71, 1806
- Ortalo-Magné, A., Culioli, G., Valls, R., Pucci, B., Piovetti, L. 2005. Phytochemistry 66, 2316
- Pellegrini, M., Valls, R., Pellegrini, L. 1997. Lagasalia 19, 145
- Roberts, M. 1977. Eur. J. Phycol. 12, 175
- Rousseau, F. De Reviers, B. 1999. Eur. J. Phycol. 34, 53
- Silberfeld, T., Leigh, J.W., Verbruggen, H., Cruaud, C., De Reviers, B., Rousseau, F. 2010. Mol. Phylogenet. Evol. 56, 659
- Valls, R., Piovetti, L., Banaigs, B., Praud, A. 1993. Phytochemistry 32, 961
- Valls, R., Piovetti, L. 1995. Biochem. Syst. Ecol. 23, 72

Annexe au manuscrit : attribution des signaux RMN (solvant : CDCl₃) et structure chimique du méroditerpène de *Cystoseira nodicaulis* (Gérald Culioli, com. pers.)



N°	¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz)	Corrélation HMBC	DEPT	¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz)	Corrélation HMBC	COSY ¹ H- ¹ H	NOESY ¹ H- ¹ H
1	28.7		CH ₂	3.39 <i>d</i> (7.0 Hz)		H-2	H-2, H ₃ -20
2	128.1		CH	5.40 <i>t</i> (7.0 Hz)		H ₂ -1, H-4, H ₃ -20	H-1, H ₂ -4
3	130.3		C	-	-	-	-
4	55.8		CH ₂	3.09 <i>s</i>		H-2	H-2
5	209.3		C	-	-	-	-
6	48.3	H ₃ -19	CH ₂	3.03 <i>d</i> (16.5 Hz) 2.46 <i>d</i> (16.5 Hz)		H _b -6 H _a -6	H _a -8, H _b -6 H _a -6, H ₃ -18
7	46.1		C	-	-	-	-
8	33.6		CH ₂	2.34 <i>m</i> 1.57 <i>m</i>		H _b -8, H ₂ -9 H _a -8	H _a -6, H _b -8, H ₃ -19 H _a -8
9	19.6		CH ₂	1.70 <i>m</i>			
10	36.4		CH ₂	1.87 <i>m</i> 1.75 <i>m</i>			
11	60.7		C	-	-	-	-
12	216.8	H ₃ -18	C	-	-	-	-
13	36.1		CH ₂	2.58 <i>t</i> (7.0)		H ₂ -14	
14	36.6	H ₃ -16, H ₃ -17	CH ₂	1.73 <i>t</i> (7.0)		H ₂ -13	
15	70.2	H ₃ -16, H ₃ -17	C	-	-	-	-
16	29.6	H ₃ -17	CH ₃	1.21 <i>s</i>	C-17, C-15, C-14		
17	29.6	H ₃ -16	CH ₃	1.21 <i>s</i>	C-16, C-15, C-14		
18	21.5		CH ₃	1.05 <i>s</i>	C-12		
19	21.9		CH ₃	0.93 <i>s</i>	C-6		
20	16.8		CH ₃	1.73 <i>s</i>		H-2	H-1
1'	150.5	H-3', H-5', H ₃ -1'OMe, H ₃ -6'Me	C	-	-	-	-
2'	134.7		C	-	-	-	-

CHAPITRE II – TAXONOMIE ET SYSTÉMATIQUE DU GENRE *CYTOSEIRA* EN BRETAGNE

3'	112.8		CH	6.58 <i>d</i> (3.0 Hz)	C-1'	H-5'	H ₃ -4'OMe
4'	155.7	H ₃ -4'OMe	C	-	-	-	-
5'	114.1	H ₃ -6'Me	CH	6.55 <i>d</i> (3.0 Hz)	C-1'	H-3', H ₃ -6'Me	H ₃ -4'OMe
6'	132.0	H ₃ -6'Me	C	-	-	-	-
6'- OMe	16.5		CH ₃	2.27 <i>s</i>	C-1', C-5', C-6'		H-5', H ₃ -1'OMe
1'- OMe	60.6		CH ₃	3.68 <i>s</i>	C-1'		H ₃ -6'Me
4'- OMe	55.6		CH ₃	3.74 <i>s</i>	C-4'		H-3', H-5'

4 DISCUSSION

Notre étude représente, à notre connaissance, la première démarche de taxinomie et de classification qui combine phylogénie moléculaire et chimie des espèces du genre *Cystoseira*, en ciblant la composition chimique globale et une famille spécifique de chimiomarqueurs (les terpènes).

De plus, nos travaux caractérisent pour la première fois la composition des extraits apolaires de *Cystoseira nodicaulis* et *C. fœniculacea*, qui jusque-là était inconnue (Amico, 1995).

4.1 DISCRIMINATION DES ESPÈCES

Nous présentons ici trois méthodes analytiques, qui permettent d'obtenir un cliché rapide du contenu chimique de ces macroalgues. Seules deux d'entre elles nous paraissent réellement pertinentes dans une optique de discrimination d'espèces.

Notre analyse d'extraits apolaires de *Sargassaceae* par chromatographie sur couche mince (CCM) a mis en évidence des différences de composition chimique entre les espèces. Néanmoins, cette approche ne semble pas suffisamment discriminante pour effectuer des distinctions et des regroupements entre espèces, si ce n'est les espèces productrices ou non de composés lipophiles. Ainsi, à la lumière de notre étude de *Cystoseira nodicaulis*, nous avons pu montrer que cette espèce produit un composé original (Jégou *et al.*, submitted a) qui, de surcroît, est absent des extraits de *C. fœniculacea* et de *C. humilis* (Jégou *et al.*, 2010). Rien ne laissait présager de ce résultat dans les profils chromatographiques (Figure 40). En effet, nous n'avons pas observé de différences majeures lors des analyses par CCM entre ces trois espèces. La capacité limitée de cette approche simple à établir des distinctions et des classifications chimiques au sein du genre *Cystoseira* nous a conduit à sélectionner de nouvelles techniques plus puissantes pour nos analyses chimiques.

La Résonance Magnétique Nucléaire ^1H HR-MAS est la première méthode employée en ce sens. Elle permet de visualiser le contenu d'échantillons directement à partir de tissus biologiques (Desmoulins *et al.*, 2007). Ainsi, la HR-MAS ne nécessite pas de manipulation particulière des échantillons avant leur analyse. On observe sur les spectres RMN une très grande partie des métabolites cellulaires ; seules les molécules immobiles dans les tissus, comme celles qui sont fixées aux parois cellulaires, sont indétectables. En effet, la rotation à

haute fréquence inhérente à la HR-MAS n'a d'effet que sur les métabolites dissous. Par opposition, l'analyse en RMN d'échantillons liquides nécessite une extraction de biomolécules qui est toujours sélective. Le choix du solvant conditionne alors le type de molécules extraites, et selon la polarité choisie, certaines molécules sont presque indétectables dans les extraits. Une extraction laisse de côté une plus grande partie de composés qu'une expérience de RMN *in vivo*.

L'analyse HR-MAS des échantillons de *Cystoseira* a mis en évidence des différences qualitatives dans les spectres, qui témoignent de profils chimiques caractéristiques pour chaque espèce. Dans notre analyse, c'est la zone des composés aromatiques, et plus précisément la gamme de déplacements chimiques entre 6 et 8 ppm, qui apparaît la plus discriminante. Ainsi, ce sont notamment ces signaux qui ont permis la discrimination de 3 espèces (*Cystoseira baccata*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia*) au travers de l'Analyse des Correspondances Multiples (Jégou *et al.*, 2010). Si nous n'avons pas pu discriminer *C. humilis* de *C. faeniculacea*, cela souligne l'étroite relation qui existe entre ces espèces, du point de vue chimique. Notre étude confirme l'intérêt de la technique HR-MAS pour la discrimination d'espèces proches d'algues brunes mise en évidence par Le Lann *et al.* (2008) au sein du genre *Turbinaria* (Fucales, *Sargassaceae*).

La Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS) fournit des résultats très similaires, en ciblant les composés lipophiles extraits des cystoseires. Cette technique nous semble particulièrement pertinente pour plusieurs raisons.

D'une part, la LC-MS fournit des informations sur deux niveaux. Les chromatogrammes obtenus (en cumulant la détection aux ultraviolets-visible, le spectre de masse, ou diffusion de lumière) sont un résultat « graphique » complété par un spectre de masse. Grâce à lui, nous avons pu vérifier la qualité de chaque « pic » (en déterminant le rapport m/z des molécules incriminées), et confronter les résultats au sein d'une même espèce et entre espèces. Les données obtenues sont bien plus utiles qu'un simple chromatogramme pour détecter des différences qualitatives.

D'autre part, nous avons montré que la composition des extraits lipophiles est constante pour chaque espèce, malgré des échantillons de provenance variée dans le temps et dans l'espace. En effet, pour chaque espèce, peu importe la provenance des algues (3 échantillons à Penmarc'h prélevés en septembre 2008, 1 échantillon prélevé en région

brestoise en décembre 2009), les chromatogrammes se sont révélés superposables. De plus, dans nos extraits de *C. baccata*, nous avons pu observer des composés isolés à partir d'échantillons marocains de cette même espèce (Mokrini *et al.*, 2008). A nouveau, nous avons discriminé *C. baccata*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia* grâce à cette technique. *C. fœniculacea* et *C. humilis* sont encore une fois restées indissociables.

Ces deux techniques analytiques sont pertinentes pour la discrimination de certaines espèces du genre *Cystoseira*. La RMN HR-MAS a l'avantage de ne pas requérir de compétence particulière en extraction de biomolécules, et de ne pas se restreindre à l'étude d'une portion du métabolome. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite l'observation de signaux bien résolus, et sans doute une certaine expérience de lecture de spectres RMN. Dans les spectres des cinq cystoseires de Bretagne, la zone de déplacements chimiques comprise entre 0 et 5 ppm renfermait de très nombreux signaux relativement superposés, rendant difficiles les comparaisons entre spectres. C'est la raison pour laquelle la discrimination résultant de notre analyse statistique (ACM) est en grande partie due à l'étude des déplacements chimiques situés au-delà de 6 ppm, où les signaux sont moins nombreux et plus simples à discerner. Plus encore, la LC-MS apparaît pertinente, puisque nous avons ciblé une classe de molécule, les terpènes, qui est classiquement utilisée pour établir la classification du genre *Cystoseira* (Amico, 1995 ; Valls & Piovetti, 1995). Les méroditerpènes synthétisés par *C. baccata*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia* sont directement détectés par LC-MS : ils représentent donc de bons chimiomarqueurs permettant une discrimination aisée de ces espèces proches.

4.2 CLASSIFICATION CHIMIQUE DES ESPÈCES

Le résultat majeur des deux analyses RMN HR-MAS et LC-MS est le regroupement de *Cystoseira fœniculacea* et de *C. humilis*, qui d'un point de vue chimique sont indissociables l'une de l'autre. Les spectres RMN HR-MAS de ces deux espèces se sont parfois révélés superposables, et l'analyse de leurs extraits apolaires n'a révélé la présence d'aucun dérivé terpénique. Nos données confirment ainsi les résultats issus de la littérature chez *Cystoseira humilis*, à savoir l'absence de terpènes chez cette espèce (Amico, 1995 ; Valls & Piovetti, 1995). A l'opposé, nous avons pu caractériser un méroditerpène présent

dans les extraits de *Cystoseira nodicaulis* (Figure 43). Ce composé a déjà été isolé chez *C. elegans* et chez son hybride avec *C. algeriensis* par Amico *et al.* (1988, 1984).

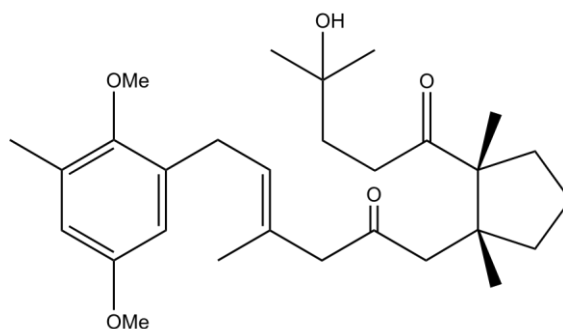


Figure 43 : Méroditerpène cyclique identifié chez *Cystoseira nodicaulis*

Le Tableau 1 présente la classification chimique du genre *Cystoseira* proposée par Valls & Piovetti (1995) complétée avec nos résultats.

Tableau 5 : Classification chimique du genre *Cystoseira*, simplifiée d'après Valls & Piovetti (1995) et complétée par notre étude

Groupe	Description chimique et exemples d'espèces
Groupe I	Absence de diterpènes, synthèse privilégiée de stérols <i>Cystoseira compressa</i> , <i>C. fœniculacea</i> , <i>C. humilis</i>
Groupe II	Synthèse de terpènes linéaires <i>Cystoseira brachycarpa</i> et <i>C. balearica</i>
Groupe III	Synthèse de méroditerpènes linéaires <i>Cystoseira crinita</i> , <i>C. dubia</i> , <i>C. sauvageauana</i>
	Synthèse de méroditerpènes cycliques <i>Cystoseira algeriensis</i> , <i>C. baccata</i> , <i>C. elegans</i> , <i>C. nodicaulis</i>
	Synthèse de méroditerpènes réarrangés <i>Cystoseira mediterranea</i> , <i>C. tamariscifolia</i>

4.3 LA CLASSIFICATION CHIMIQUE FACE À LA CLASSIFICATION PHYLOGÉNÉTIQUE

Notre étude phylogénétique de *Cystoseira* en Bretagne a confirmé la polyphylie du genre, au travers de la séparation nette d'un clade « *Cystoseira fœniculacea* et *C. humilis* ». Nous nous proposons d'incorporer à l'arbre phylogénétique (incluant les sargassacées bretonnes) les données chimiques de notre travail ainsi que celles de la littérature (Culioli *et al.*, 2008 ; Mokrini *et al.*, 2008 ; Ortalo-Magné *et al.*, 2005), afin de mettre en perspective classification chimique et phylogénie (Figure 44).

La confrontation de la classification chimique (Amico, 1995 ; Valls & Piovetti, 1995) et de la phylogénie présentée en Figure 44 aboutit à une contradiction apparente, au travers du cas *Bifurcaria bifurcata* - *Cystoseira tamariscifolia*. En effet, les deux espèces sont quasiment aux antipodes l'une de l'autre, si l'on considère le type de molécules qu'elles peuvent synthétiser. La première ne produit que des diterpènes linéaires, tandis que l'autre synthétise également des molécules plus complexes : des méroditerpènes réarrangés (Tableau 5). A l'opposé, on voit que ces deux espèces sont étroitement liées d'un point de vue phylogénétique, ce qui a déjà été avancé dans la littérature (Rousseau & de Reviers, 1999 ; Rousseau *et al.*, 1997).

La première conclusion est donc que le type de terpène n'a pas de réelle valeur pour décrire les relations phylogénétiques au sein des *Sargassaceae* en Bretagne. Nos résultats sont donc contradictoires par rapport aux conclusions d'Amico (1995) qui, en décrivant la classification chimiotaxinomique des cystoseires, considérait la complexification progressive des terpènes comme une série d'étapes évolutives dans l'histoire du genre *Cystoseira*. Il est possible que l'équipement enzymatique nécessaire à la synthèse de diterpènes élaborés (méroditerpènes et terpènes cyclisés/réarrangés) soit apparu à plusieurs reprises dans l'histoire évolutive des *Sargassaceae*. Il est plus probable encore que chez *Bifurcaria bifurcata*, il y ait eu une simplification de la machinerie enzymatique, qui ait restreint la synthèse de diterpènes à des composés très simples. En effet, ces diterpènes linéaires sont probablement des précurseurs dans la synthèse de méroditerpènes plus complexes. Inhiber ou faire disparaître une seule enzyme pourrait bloquer les réactions de complexification nécessaires à la formation de méroditerpènes élaborés. Si du point de vue morphologique, *Cystoseira tamariscifolia* et *B. bifurcata* ne se ressemblent pas, et si chimiquement, elles sont également bien différentes, elles restent pourtant très proches d'un point de vue phylogénétique, par rapport aux autres Sargassacées.

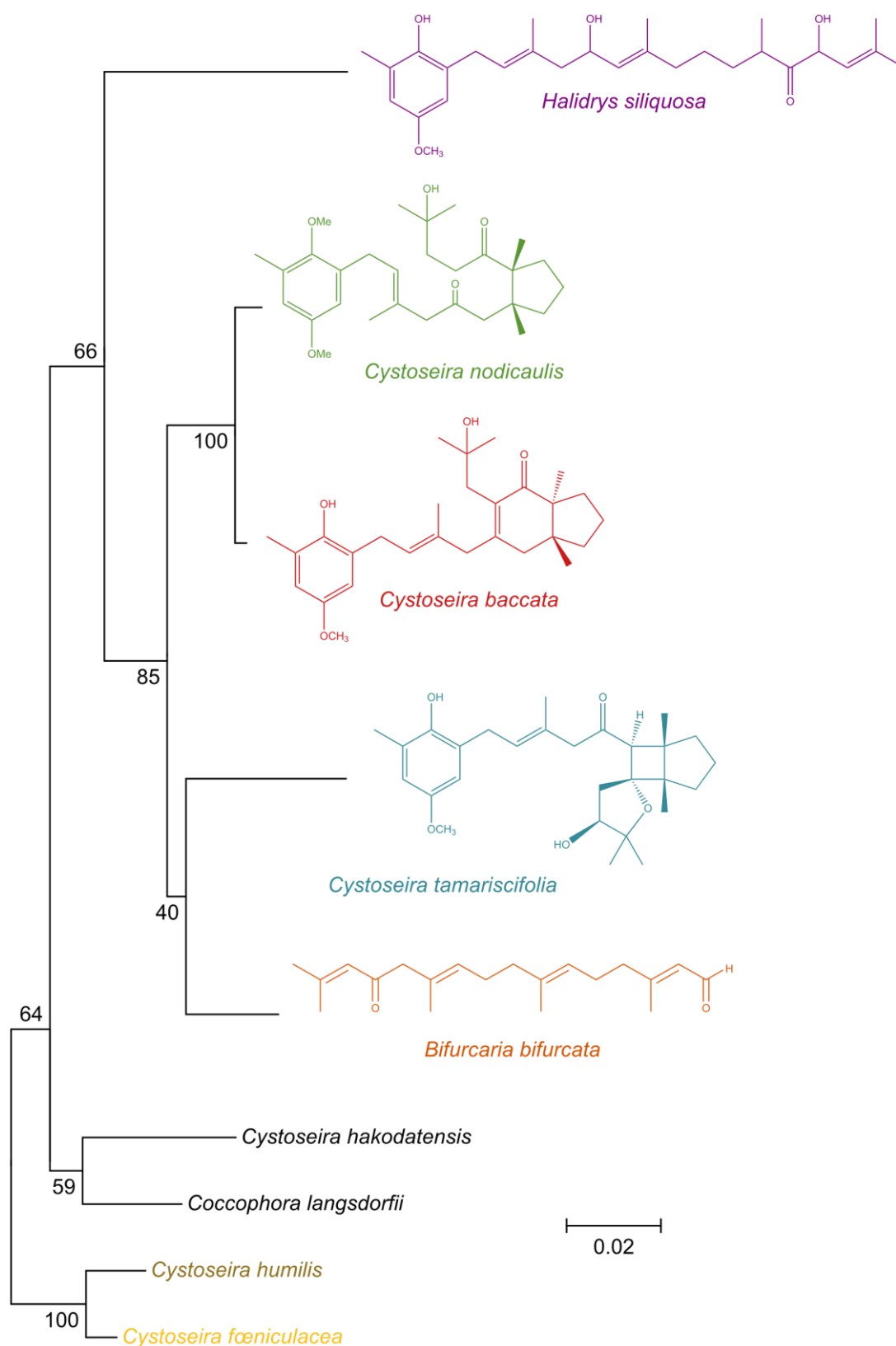


Figure 44 : Classification phylogénétique de quelques sargassacées d'après le marqueur nucléaire ITS2 (méthode du plus proche voisin, bootstraps indiqués) ; chaque espèce est associée à un de ses terpènes, lorsqu'elle en produit.

En revanche, nos résultats semblent indiquer que la synthèse de terpènes est un bon candidat à la description des clades existant dans la famille des *Sargassaceae*. D'après la Figure 44, *Cystoseira humilis* et *C. fæniculacea* forment un clade « basal », non producteur de terpènes, par opposition aux autres cystoseires auxquelles on peut adjoindre *Halidrys siliquosa* et *Bifurcaria bifurcata*. De ce fait, *C. humilis* et *C. fæniculacea* se rapprochent de *Sargassum muticum*, qui ne produit pas non plus de terpènes (Le Lann, com. pers.). Cependant, nos données sont partielles puisque notre effort d'échantillonnage s'est limité à quelques échantillons bretons, qui ne sont pas représentatifs de la diversité du genre *Cystoseira*.

Seul un marqueur moléculaire (ITS2) a été utilisé lors de cette étude, ce qui pourrait être critiqué. Néanmoins, les résultats obtenus durant cette présente étude corroborent ceux obtenus avec d'autres marqueurs moléculaires. En effet, pendant la période de préparation de notre étude du genre *Cystoseira*, deux articles scientifiques ont été publiés pour résoudre des questions de phylogénie au sein des algues brunes. En s'appuyant sur 10 marqueurs issus des trois compartiments cellulaires (plaste, noyau et mitochondrie), Silberfeld *et al.* (2010) ont décrit les mêmes relations phylogénétiques entre *C. baccata*, *C. nodicaulis*, *C. tamariscifolia* et *Bifurcaria bifurcata* que celles que nous avons pu observer grâce au marqueur ITS2.

C'est surtout l'étude de Draisma *et al.* (2010) qui a permis de clarifier la classification grâce à un échantillonnage très complet réalisé au sein du genre *Cystoseira*. Les auteurs ont ainsi caractérisé 6 clades différents au sein de ce genre (Figure 45). A titre d'exemple, voici la composition du groupe monophylétique n° 6 :

Cystoseira abies-marina – *C. baccata* – *C. barbata*/*C. susanensis* – *C. elegans* – *C. jabukae* – *C. nodicaulis* – *C. sauvageauana* – *C. sondeii* – *C. spinosa* – *C. squarrosa* — *C. usneoides*

En observant attentivement cette liste d'espèces, on retrouve à la fois *C. nodicaulis*, dont nous avons pu identifier un méroditerpène cyclisé et *C. barbata*. Amico (1995) signale qu'aucun dérivé terpénique n'a pu être identifié à partir de cette dernière espèce (page 1269). Néanmoins, il se contredit (page 1272) : « the pattern of *C. barbata* secondary metabolites was simpler than that of *C. barbatula* and yielded α -tocopherol and a single tetraprenyltoluquinol », tetraprenyltoluquinol étant l'autre nom des méroditerpènes.

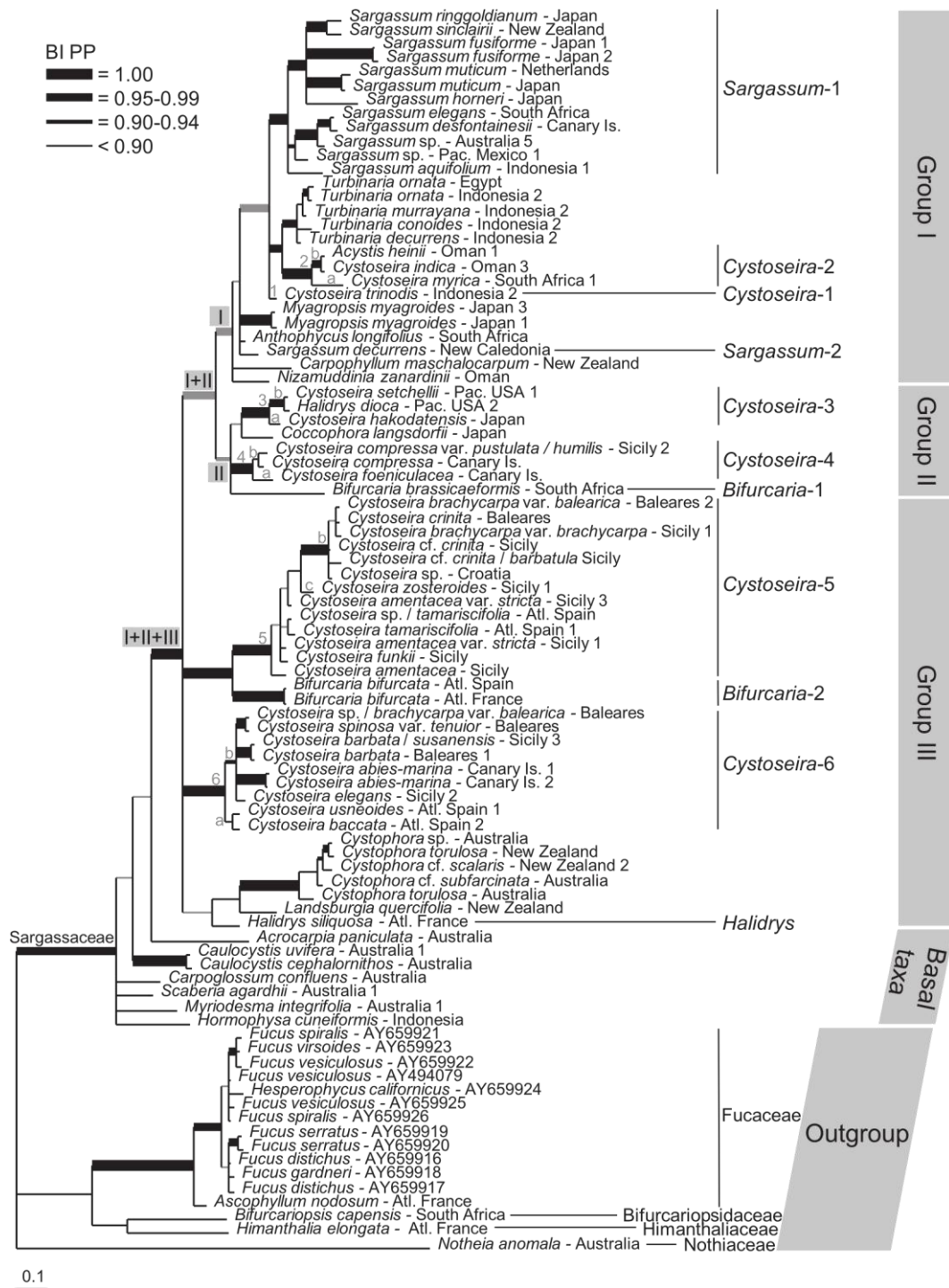


Figure 45 : Arbre phylogénétique montrant les relations existant au sein de la famille des *Sargassaceae* d'après Draisma *et al.* (2010)

De la même façon, Valls & Pioveti (1995) indiquent que *Cystoseira barbata* se situe dans le groupe des espèces non productrices de terpènes (page 739), mais en reprenant (page 738) la classification de Piattelli (1990), ils indiquent qu'elle se situe dans le groupe des cystoseires productrices de méroditerpènes.

La caractérisation du méroditerpène de *C. barbata*, réalisée par Amico *et al.* (1990) est cependant très évasive, les auteurs ne mentionnant pas les données spectroscopiques ayant permis d'aboutir à la structure de la molécule. Il nous apparaît indispensable de réitérer des analyses chimiques sur les extraits lipophiles de *C. barbata* afin de lever le voile sur cette ambiguïté.

En considérant (sous réserve) que *C. barbata* produit effectivement un méroditerpène, alors nous pouvons dresser le bilan suivant : la synthèse de diterpènes apparaît comme un élément pertinent pour illustrer la classification phylogénétique des *Sargassaceae*. En effet, au-delà du clade *Cystoseira*-6, le Groupe III qui inclut également les clades *Cystoseira*-5, *Bifurcaria*-2 et *Halidrys* est composé de 31 taxons répartis en 18 espèces (Figure 45). Parmi elles, on retrouve des espèces connues pour synthétiser des diterpènes, ou des espèces dont la composition en terpènes n'a pas encore été étudiée (Tableau 6).

Tableau 6 : Bilan des connaissances chimiques (d'après Amico, 1995) relatives aux espèces du Groupe III mis en évidence par Draisma *et al.* (2010)

Espèce	Production de terpène
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	Oui
<i>Cystophora cf. scalaris</i>	Indéterminée
<i>Cystophora cf. subfarcinata</i>	Indéterminée
<i>Cystophora torulosa</i>	Indéterminée
<i>Cystoseira abies-marina</i>	Indéterminée
<i>Cystoseira amantacea</i>	Oui
<i>Cystoseira baccata</i>	Oui
<i>Cystoseira barbata</i>	Oui (sous réserve)
<i>Cystoseira brachycarpa</i>	Oui
<i>Cystoseira crinita</i>	Oui
<i>Cystoseira elegans</i>	Oui
<i>Cystoseira funkii</i>	Indéterminée
<i>Cystoseira spinosa</i>	Oui
<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	Oui
<i>Cystoseira usneoides</i>	Oui
<i>Cystoseira zosteroides</i>	Oui
<i>Halidrys siliquosa</i>	Oui
<i>Landsburgia quercifolia</i>	Indéterminée

Toutefois, il convient de considérer ce bilan avec précautions, les erreurs d'identification n'étant pas rares pour les spécimens du « genre » *Cystoseira*. Amico (1995) émet ainsi des réserves sur l'identification d'algues ayant servi de support à des études chimiques publiées dans des revues scientifiques. C'est peut être ce qui explique, dans la revue de Valls & Piovetti (1995), que certaines espèces soient positionnées dans différents groupes chimiques. Par exemple, il semblerait que *C. tamariscifolia* produise des mérodiertènes réarrangés sur le littoral français, mais pas en Sicile ; le même cas de figure est évoqué pour *C. stricta* et *C. mediterranea*. Néanmoins, des variations qualitatives de la composition en terpènes à l'échelle spatiale restent envisageables. Une telle situation a déjà été observée chez la sargassacée *Bifurcaria bifurcata*, pour laquelle deux types chimiques ont été observés en Bretagne (Le Lann, 2009b) et au Maroc (El Hattab *et al.*, 2008 et références incluses).

En conclusion, il nous semble nécessaire de poursuivre les analyses chimiques au sein de la famille *Sargassaceae* afin de résoudre ces problèmes de nomenclature qui peuvent biaiser les résultats de chimiotaxinomie. Le travail conjoint de chercheurs phycologues et chimistes est une condition *sine qua non* pour étudier ces algues brunes.

En l'état, les dérivés terpéniques apparaissent comme de bons indicateurs de la phylogénie. Ils présentent un grand intérêt d'un point taxinomique et permettent très souvent de discriminer des espèces proches. Nous avons pu montrer, pour trois espèces en Bretagne, que leur composition en terpènes était particulièrement stable à travers le temps, et sur différents sites d'échantillonnage, ce qui fait de ces molécules des chimiomarqueurs particulièrement robustes.

4.4 LA NOUVELLE NOMENCLATURE DES CYTOSEIRES DE BRETAGNE

D'après Draisma *et al.* (2010), les espèces *Cystoseira humilis* et *C. fœniculacea* gardent leur nom de genre, puisque *C. fœniculacea* en est le type. Pour *C. nodicaulis* et *C. baccata*, les auteurs proposent les noms de genre *Baccifer* (dont « *Cystoseira* » *baccata* deviendrait le type) et *Gongolaria* (type : *C. abies-marina*). Pour *C. tamariscifolia*, les noms de genre *Carpodesmia* (type : *C. zosteroides*) et *Ericaria* (type : *C. tamariscifolia*) sont évoqués. Néanmoins, la nomenclature actuelle reste inchangée, et les séquences de marqueurs moléculaires de nouveaux taxons doivent être obtenues. C'est la raison pour laquelle nous

utiliserons encore dans ce manuscrit le nom de genre *Cystoseira*, en sachant bien qu'il ne reflète pas correctement les connaissances phylogénétiques actuelles.

4.5 PERTINENCE DES CRITÈRES MORPHOLOGIQUES

Draisma et al. (2010) ont cherché à déterminer quels critères morphologiques étaient informatifs d'un point de vue phylogénétique pour décrire la phylogénie des *Sargassaceae*. Au cours de notre étude des 5 espèces bretonnes, nous pouvions distinguer les deux clades « *Cystoseira fæniculacea* - *C. humilis* » et « *C. baccata* - *C. nodicaulis* - *C. tamariscifolia* » d'après les critères suivants : thalle cespiteux (ou non), nombre de rhizoïdes primaires (8 ou 4), absence de stigma dans les anthérozoïdes (ou présence), etc. Cependant, en élargissant les observations à la famille des *Sargassaceae*, ces critères ne sont pas pertinents. D'après **Draisma et al. (2010)**, seul un critère lié à la reproduction est particulièrement robuste pour décrire les différents sous-groupes au sein de la famille : chez certaines espèces de « *Cystoseira* » plutôt cousines du genre *Sargassum*, les embryons restent liés au réceptacle pendant quelques jours, alors qu'ils sont expulsés chez les autres espèces. Les auteurs évoquent également la présence d'un filament dans les premières étapes de développement du conceptacle comme candidat possible pour illustrer les relations phylogénétiques chez les Sargassacées. A l'heure actuelle, des investigations complémentaires doivent être menées pour trouver d'autres caractéristiques morphologiques.

4.6 LES TERPÈNES, AU-DELÀ DE SIMPLES MARQUEURS CHIMIOTAXINOMIQUES

Notre étude a permis de caractériser le méroditerpène cyclisé présent dans les extraits de *Cystoseira nodicaulis*. A la lumière des derniers résultats de phylogénie moléculaire, l'apport de ces molécules dans la classification des *Sargassaceae* est réel, car elles permettent de distinguer des clades de *Sargassaceae*. Leur rôle en tant que chimiomarqueur spécifique apparaît également intéressant.

Parmi les algues brunes, les phlorotannins et les terpènes sont les deux classes de molécules les plus étudiées (**Blunt et al., 2007**). Jusqu'ici, les raisons d'étudier ces molécules étaient bien différentes. Si de multiples rôles écologiques ont été avancés chez les

phlorotannins (voir Chapitre IV), bien souvent les terpènes n'ont été étudiés qu'à des fins de taxinomie.

Pourtant, Kelecom & Laneuville Teixeira (1986) ont souligné l'implication possible de terpènes dans la défense chimique des espèces de la famille des *Dictyotaceae* (Dictyotales, Phaeophyceae). Depuis lors, Ribeiro Soares *et al.* (2003) ont montré que la production de diterpènes chez *Stypopodium zonale* (Dictyotales, Phaeophyceae) était dépendante de l'état de maturité du thalle, et que ces composés étaient une réponse chimique anti-herbivore. De plus, l'activité biologique de nombreux terpènes a été démontrée dans la famille des *Sargassaceae* (Tableau 7, liste non exhaustive).

Tableau 7 : Exemples d'activités biologiques de terpènes isolés chez des espèces de *Sargassaceae*

Espèce	Activité	Source
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	<i>Antifouling</i>	Hellio <i>et al.</i> , 2001
	<i>Anticancéreuse</i>	Moreau <i>et al.</i> , 2006
	<i>Antiradicalaire</i>	Le Lann, 2009
<i>Cytoseira baccata</i>	<i>Antifouling</i>	Mokrini <i>et al.</i> , 2008
<i>Cytoseira crinita</i>	<i>Antioxydante</i>	Fisch <i>et al.</i> , 2003
<i>Cytoseira tamariscifolia</i>	<i>Antifongique/Antibactérienne</i>	Bennamara <i>et al.</i> , 1999 Abourriche <i>et al.</i> , 1999
<i>Halidrys siliquosa</i>	<i>Antifouling</i>	Culioli <i>et al.</i> , 2008

Ainsi, les terpènes des algues brunes constituent aujourd'hui un potentiel de recherche exceptionnel pour des études d'écologie chimique, et une source importante de composés naturels à activité(s) biologique(s). Après avoir passé plusieurs décennies à caractériser qualitativement les terpènes présents chez les algues brunes, le monde scientifique va sans nul doute s'attarder plus longuement sur les rôles de ces molécules, en quantifiant leur variabilité par le biais d'expériences complexes, comme celles qui ont déjà été menées sur les phlorotannins.

5 CONCLUSION

Cette étude de taxinomie fournit pour la première fois une phylogénie des cinq cystoseires des côtes bretonnes, en les confrontant avec les données chimiques traditionnellement utilisées pour établir la classification du genre *Cystoseira*.

Pour caractériser la chimiodiversité des macroalgues, nous proposons deux méthodes analytiques qui fournissent un accès rapide à la composition chimique des échantillons : la ^1H RMN HR-MAS, utilisée pour caractériser des échantillons intacts, et le LC-ESI-MSⁿ, que nous avons utilisée pour analyser les composés lipophiles, mais qui est utilisable pour n'importe quel type d'extrait. Ces techniques d'analyse rapides, qui ne requièrent que des quantités infimes de matériel biologique, permettent d'obtenir des cartes d'identité chimique de chaque taxon. D'ailleurs, notre protocole d'étude par LC-ESI-MSⁿ est adapté du protocole standardisé du programme ECIMAR, dont l'un des objectifs était de dresser un inventaire de la diversité chimique des peuplements benthiques de la Mer Méditerranée. En considérant les résultats de notre étude, nous suggérons l'utilisation de la RMN *in vivo* pour compléter les signatures chimiques.

La classification des espèces du genre *Cystoseira* reste, d'après nos résultats et les études plus récentes, une affaire complexe. Nous avons pu souligner l'intérêt de l'utilisation des terpènes pour établir des liens entre espèces au sein du genre. Ces molécules sont également de très bons marqueurs pour discriminer les différentes espèces.

Il nous semble important de poursuivre le travail de recherche chimique sur les terpènes, afin d'établir une chimiotaxinomie plus exhaustive des *Sargassaceae*, et pour mieux comprendre la défense chimique des algues brunes. L'intérêt limité qui est actuellement porté à l'étude des terpènes en écologie chimique illustre le grand potentiel de recherche dans ce domaine. Les nombreuses activités biologiques associées aux terpènes sont autant de perspectives prometteuses de valorisation de ces molécules.

Au cours de ce Chapitre II, nous avons actualisé la classification des cystoseires de Bretagne, et précisé les relations phylogénétiques et chimiques qui existent entre elles. Après avoir délimité un cadre chimique et taxinomique pour chaque espèce, nous nous intéresserons dans le chapitre suivant aux populations présentes sur les côtes bretonnes, au travers d'une approche de biologie des populations et d'écologie chimique.

CHAPITRE III

DISTRIBUTION, BIOLOGIE DES POPULATIONS ET
ADAPTATIONS PIGMENTAIRES DES ESPÈCES DE
CYTOSEIRA

1 INTRODUCTION

Notre étude écologique des populations de *Cystoseira* en Bretagne a été motivée par un constat simple : celui du manque de données disponibles dans la littérature. Nous développons dans ce chapitre trois axes de recherche qui, de notre point de vue, méritent quelques approfondissements et dont l'objectif est de répondre à des questions relatives à (1) la distribution des cystoseires sur l'estran, (2) la variabilité spatio-temporelle de leurs populations et (3) une adaptation de leur appareil pigmentaire en fonction de leur répartition sur l'estran.

1.1 DISTRIBUTION DES CYSTOSEIRES SUR L'ESTRAN

En Bretagne, les travaux de [Cabioc'h et al. \(2006\)](#) fournissent quelques indications sur la distribution des espèces de *Cystoseira*. Cependant, si les auteurs précisent que *C. humilis* est inféodée aux cuvettes de l'estran, ils indiquent également que *C. fœniculacea* et *C. baccata* ne se développent qu'au sein de l'étage infralittoral (sous les niveaux de basse mer). De plus, sur l'étage médiolittoral, ils ne précisent pas si *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia* se développent en ceintures classiques, subissant ainsi des cycles d'inondations et d'exondations, comme on peut le voir pour les espèces de *Fucaceae* sur substrat rocheux (Chapitre I), ou si elles restent immergées dans des cuvettes.

En prélude à mon travail de doctorat, j'ai établi une cartographie générale des cystoseires sur un estran de Penmarc'h, en août 2008 (Figure 46). La vocation de cette étude n'était pas de fournir un recensement parfaitement exhaustif, mais plutôt d'esquisser ce que peut être la distribution des cystoseires sur le site. Grâce à un système GPS, 359 occurrences ont pu être géolocalisées sur le terrain : 97 points pour *Cystoseira baccata* ; 72 pour *C. fœniculacea* ; 51 pour *C. humilis* ; 90 pour *C. nodicaulis* ; 49 pour *C. tamariscifolia*.

D'après la Figure 46, il apparaît que *Cystoseira humilis* est l'espèce qui se développe le plus haut sur l'estran, ce qui se voit sur la carte par sa proximité avec le trait de côte. A l'opposé, *C. tamariscifolia* apparaît plus loin, vers les niveaux de marée basse. *C. baccata* semble cohabiter avec cette dernière, mais sa répartition semble s'étendre à des niveaux supérieurs, où elle trouve parfois sa place parmi les populations de *C. fœniculacea* et *C. nodicaulis* qui dominent cette portion de l'estran.

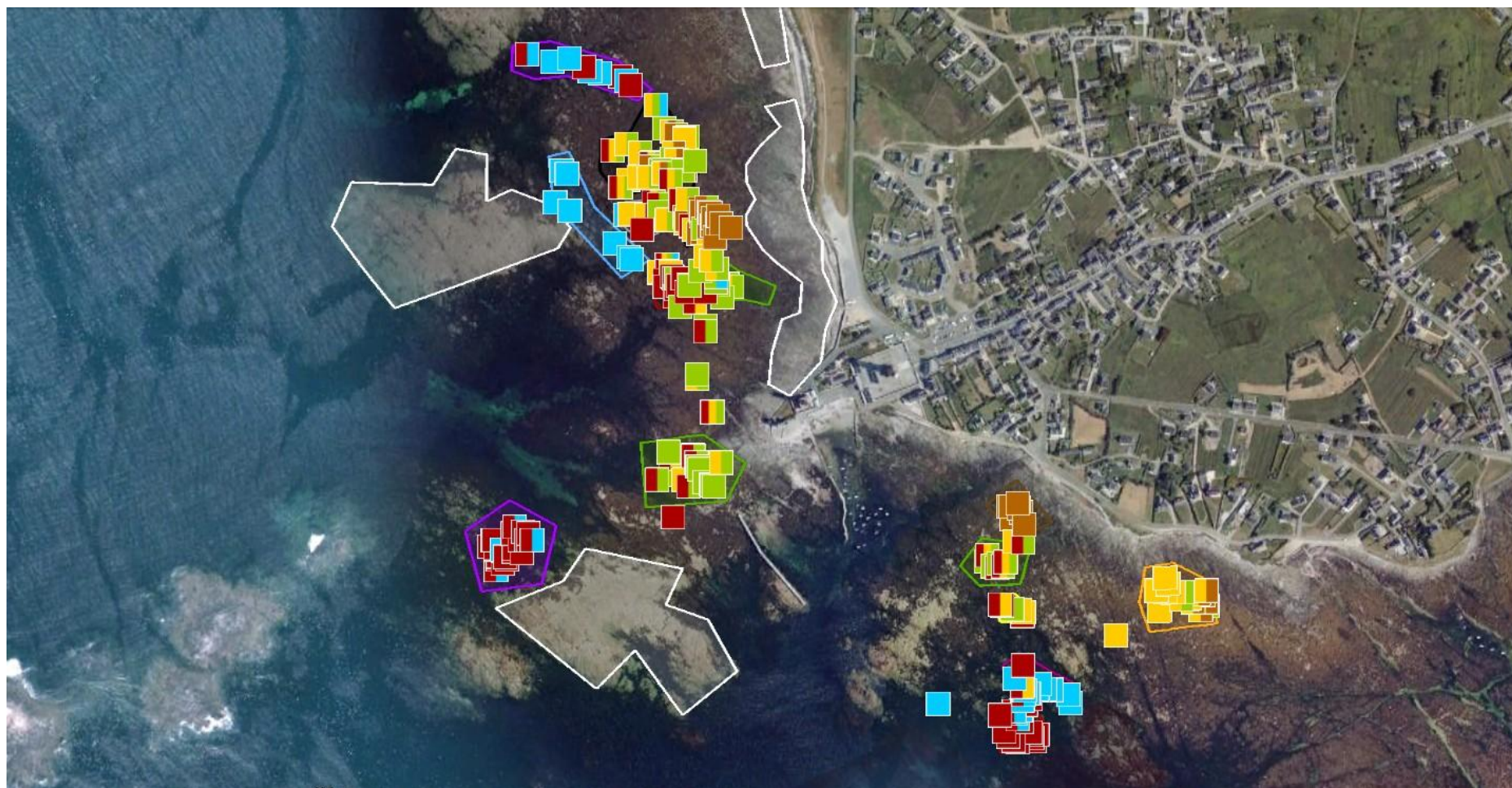


Figure 46 : Observations de cystoseires sur les estrans de Saint-Pierre (commune de Penmarc'h), en août 2008. Présence de *Cystoseira baccata* (en rouge) ; *C. fœniculacea* (en jaune) ; *C. humilis* (en marron) ; *C. nodicaulis* (en vert) et *C. tamariscifolia* (en bleu). Les zones blanches sur l'estran correspondent à des rochers surélevés. Fond de carte Google Earth, photo satellite prise à marée basse.

De plus, sur le site de Penmarc'h, jamais un spécimen n'a été observé hors d'une cuvette sur l'étage médiolittoral. S'il apparaît que *Cystoseira baccata* et *C. tamariscifolia* colonisent très probablement l'étage infralittoral à Penmarc'h, cela n'est pas forcément le cas de *C. fœniculacea*, *C. humilis* et *C. nodicaulis*, qui n'ont pas été observées en deçà de la ceinture à *Fucus serratus*. Ainsi, il ressort de cette étude préliminaire que les cinq cystoseires paraissent inféodées aux cuvettes sur l'étage médiolittoral.

1.2 ÉVOLUTION SPATIO-TEMPORELLE DES POPULATIONS

A notre connaissance, seule une minorité d'espèces de Sargassacées ont fait l'objet de suivis écologiques en Bretagne : *Sargassum muticum*, pour expliquer sa prolifération (Plouguerné *et al.*, 2006 ; Le Lann, 2009) et son installation sur les côtes bretonnes (Le Lann & Stiger-Pouvreau, 2009) ; *Bifurcaria bifurcata* et *Cystoseira baccata* (Le Lann & Stiger-Pouvreau, 2009), dans le cadre d'une comparaison de stratégies entre espèces natives et l'espèce introduite *Sargassum muticum*.

Les travaux de Sauvageau (1912) et ceux de Roberts (entre 1967 et 1977) illustrent cependant quelques caractéristiques des populations implantées sur les côtes françaises et britanniques, notamment la saisonnalité de leur développement, avec jusqu'à deux périodes de croissance et de maturité par année pour *C. nodicaulis* (en France et dans les Îles Britanniques) et pour *C. tamariscifolia* (sur la côte basque française uniquement).

Plus récemment, quelques populations installées dans d'autres pays ont été étudiées. Arenas *et al.* (1995) indiquent que les populations espagnoles (asturiennes) de *C. nodicaulis* présentent également deux périodes de croissance par an, en hiver et en été, et entrent en dormance en fin d'été. Pardi *et al.* (2000) ont montré un renouvellement permanent des populations de *C. humilis* en Italie. A l'opposé, Le Lann (2009) a observé une certaine stabilité des populations de *C. baccata* à travers les saisons en Bretagne, et indique une période de croissance active qui s'étale du printemps à l'automne, selon les sites.

D'autres travaux ont décrit des populations de cystoseires, mais dans des optiques différentes. Ainsi Engelen *et al.* (2008) ont étudié la rythmicité de l'expulsion de gamètes et de l'installation de zygotes chez des populations portugaises de *Cystoseira humilis*. En Méditerranée, Benedetti-Cecchi et collaborateurs ont mis en évidence l'importance des

cystoseires dans la structuration des écosystèmes benthiques : influence des canopées de cystoseires sur la répartition des autres algues (Bulleri *et al.*, 2002) ; facteurs qui affectent l'organisation de la canopée dans les cuvettes de l'étage médiolittoral (Benedetti-Cecchi & Cinelli 1992a) ; conséquences d'une destruction volontaire de cette canopée (Benedetti-Cecchi & Cinelli 1992b).

Ce bilan, certes assez sommaire, reprend l'ensemble des informations publiées qui pourraient aider à décrire les populations de Bretagne. Il met en évidence le manque de données relatives à *C. fœniculacea*, et le caractère partiel de notre connaissance des cycles saisonniers de *C. humilis*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia*.

1.3 ADAPTATION PIGMENTAIRE ET DISTRIBUTION SUR L'ESTRAN

1.3.1 VARIABILITÉ DE LA QUANTITÉ DE LUMIÈRE REÇUE SUR L'ESTRAN

Si chaque espèce du genre *Cystoseira* s'établit sur l'estran dans un secteur bien délimité (Figure 46), alors on peut envisager que chacune d'entre elles subit des contraintes particulières, permettant d'expliquer leur répartition respective, comme on peut le faire chez les Fucales (Lüning, 1990). Il existe un gradient de facteurs biotiques et abiotiques qui s'établit le long de l'estran, entre les niveaux de marée haute et les niveaux de marée basse (Benedetti-Cecchi *et al.*, 2000 ; Lobban & Harrison, 1996). Cela se traduit notamment par une augmentation de la richesse spécifique vers les niveaux les plus bas, qui s'accompagne dans les cuvettes par une augmentation du couvert algal (Barnes & Hughes, 1999).

Les cycles d'émersion-immersion sont également à l'origine de l'intensité inégale des contraintes abiotiques le long de l'estran. Les phénomènes de dessiccation que subissent les algues sont ainsi plus intenses en haut de l'estran, car les algues qui s'y implantent, comme *Pelvetia canaliculata*, peuvent parfois passer des journées entières au sec (Pfetzing *et al.*, 2000). De la même façon, à l'échelle d'une journée, la quantité de lumière incidente y est bien plus importante que celle à laquelle s'exposent des algues implantées en position plus basse. En effet, l'océan recouvre plus longtemps les niveaux bas, et la colonne d'eau constitue un filtre naturel pour les radiations lumineuses, et notamment les ultraviolets. L'exposition à la lumière solaire est ainsi un facteur qui influe sur l'abondance et la distribution des espèces de l'estran (Häder & Figueroa, 1997).

Les cuvettes de l'étage médiolittoral sont aussi soumises à ce cycle de marée. La variabilité des conditions environnementales au sein d'une cuvette est dépendante de la position de celle-ci sur l'estran (Huggett & Griffiths, 1986). Dans les cuvettes les plus hautes, on observe souvent des espèces dites eurytolérantes (Cabioc'h *et al.*, 2006). En effet, la profondeur y dépasse rarement les 20 cm ; de ce fait, pendant l'émersion, l'eau peut s'évaporer, générant une augmentation de la salinité par exemple. De plus, les algues sont soumises plus longtemps à de fortes radiations lumineuses. Seules des espèces capables de résister à ces paramètres très changeants y subsistent, c'est notamment le cas d'algues vertes des genres *Ulva/Enteromorpha* et *Cladophora* (Figure 47). Les cuvettes les plus basses sont moins exposées à ces variations, permettant ainsi le développement d'autres espèces, notamment des algues brunes (*Laminaria digitata*, *Himanthalia elongata*, etc.) et des algues rouges (*Palmaria palmata*, *Chondrus crispus*), que l'on retrouve plus généralement dans l'étage infralittoral (Figure 47).

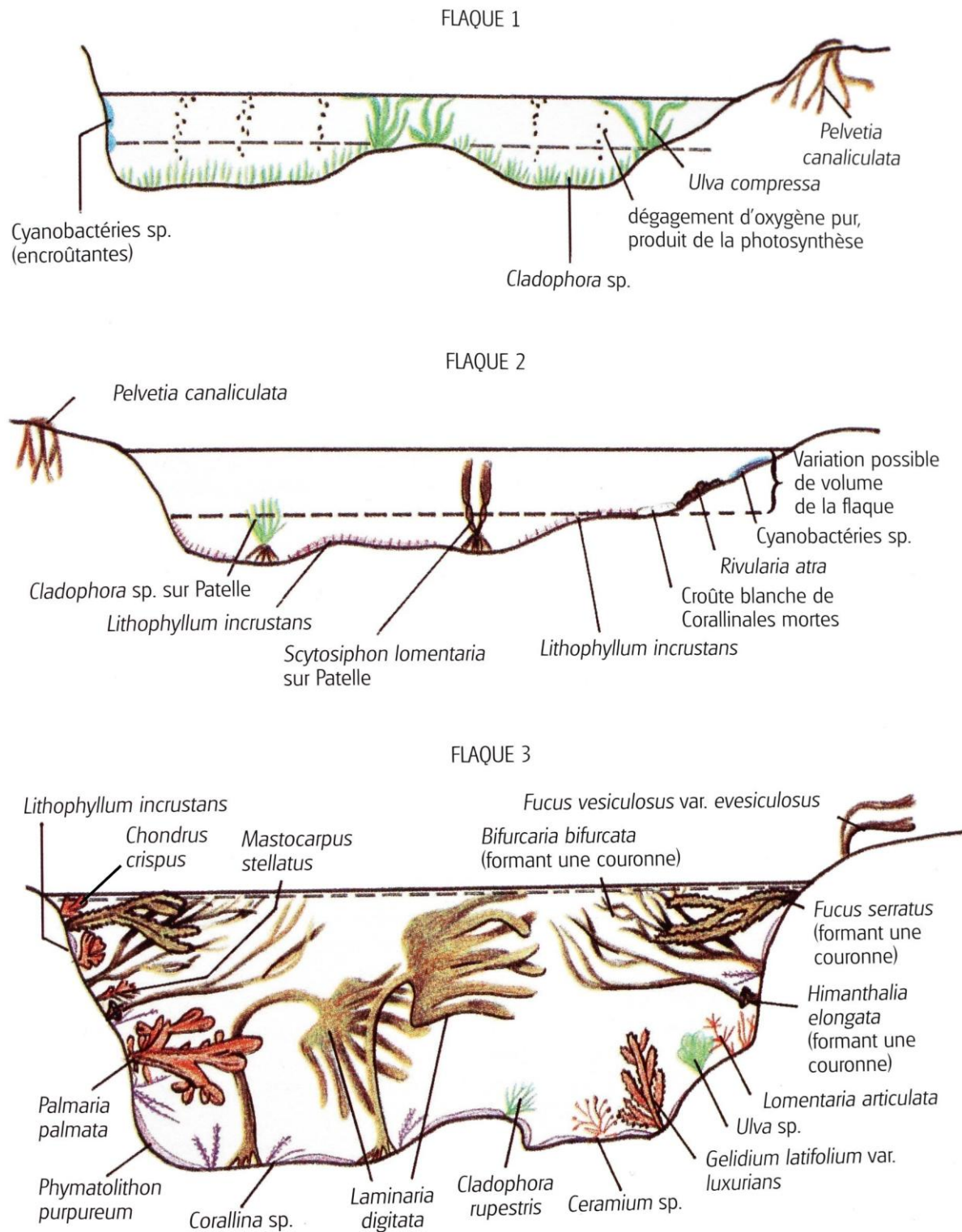


Figure 47 : Schéma des différentes cuvettes de l'estran d'après Cabioc'h *et al.* (2006).
Flaques 1 à 3 : Organisation des niveaux les plus hauts jusqu'au plus bas.

Nous nous sommes ainsi posé les questions suivantes : existe-t-il une adaptation des cystoseires face à ces intensités lumineuses variables sur l'estran ? La réponse des algues à cette contrainte est-elle variable ; dépend-elle de l'espèce considérée, ou au contraire, la stratégie mise en place est-elle plutôt influencée par le niveau d'installation sur l'estran ? Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons envisagé l'étude de composés impliqués dans la photoprotection des algues brunes. Karsten (2008) recense chez les algues quatre grandes familles de composés potentiellement sollicités dans des mécanismes photoprotecteurs :

- Les acides aminés de type mycosporine. Particulièrement représentés chez les algues rouges, ils seraient absents (ou synthétisés en quantité négligeable) chez les algues brunes (Hoyer *et al.*, 2001).
- Les scytonémines, pigments de cyanobactéries.
- Les caroténoïdes, pigments accessoires de l'antenne collectrice des photosystèmes (dans les chloroplastes).
- Les phlorotannins, polymères du phloroglucinol chez les algues brunes.

Au cours de ce chapitre, nous nous intéresserons aux pigments des cystoseires (caroténoïdes et chlorophylles). Dans le Chapitre IV, nous présenterons des résultats concernant les phlorotannins qui compléteront cette étude.

1.3.2 APPAREIL PIGMENTAIRE DES MACROALGUES BRUNES

Deux types de pigments ont pu être isolés à partir des chloroplastes des algues brunes : les chlorophylles et les caroténoïdes. Les chlorophylles a et c sont des pigments verts mobilisés dans l'absorption de l'énergie lumineuse. Une chlorophylle se compose au minimum d'un noyau tétrapyrrolique qui fixe un atome de magnésium en son centre. La chlorophylle c se limite à cette structure simple ; dans le cas de la chlorophylle a, le noyau est lié à une chaîne aliphatique polyinsaturée (Figure 48). Ces pigments sont localisés dans les thylakoïdes, membranes situées dans les chloroplastes où sont implantés les photosystèmes, qui sont le cœur du processus photosynthétique. Chaque photosystème est constitué d'une antenne collectrice composée de différents pigments qui vont absorber l'énergie et la transférer vers le centre réactionnel, où une paire spéciale de chlorophylles va initier un transfert d'électrons caractéristique de la photosynthèse.

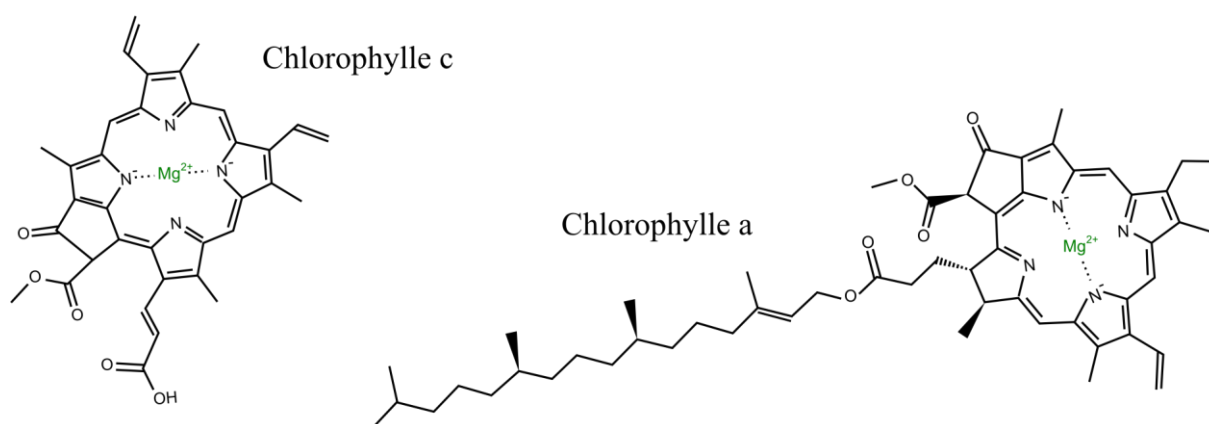


Figure 48 : Structures chimiques de la chlorophylle a et de la chlorophylle c

Chez les algues brunes, la couleur verte des chlorophylles est le plus souvent masquée par la couleur orange des caroténoïdes, qui donne aux *Phaeophyceae* leur teinte brune. Ces caroténoïdes sont des molécules lipophiles polyinsaturées qui sont elles aussi intégrées dans les chloroplastes, notamment au niveau des antennes collectrices de lumière. Ces pigments qui absorbent les radiations bleues (400-600 nm) étendent le spectre de lumière exploitable par les algues, leur permettant ainsi de coloniser des milieux relativement profonds. La structure des principaux caroténoïdes des *Phaeophyceae* est présentée en Figure 49.

Parmi ces caroténoïdes, on distingue deux grandes familles selon la présence ou l'absence d'atomes d'oxygène dans la molécule : les xanthophylles sont substituées par un ou plusieurs atome(s) d'oxygène, comme la fucoxanthine, la violaxanthine, l'anthéroxanthine et la zéaxanthine, tandis que les carotènes, dont le plus connu est le β -carotène, ne le sont pas.

La chlorophylle a, la chlorophylle c et la fucoxanthine sont les trois pigments impliqués dans les antennes collectrices des photosystèmes chez les algues brunes, permettant ainsi la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. La fucoxanthine et la chlorophylle c assurent notamment un transfert d'énergie vers la chlorophylle a qui se situe dans le centre réactionnel des photosystèmes (Alberte *et al.*, 1981). L'analyse quantitative des différents pigments entrant dans la composition des antennes photocollectrices de *Laminaria saccharina* a révélé que la chlorophylle a et la fucoxanthine étaient les deux pigments majoritaires, suivis de la chlorophylle c. De faibles quantités de violaxanthine et de β -carotène ont également été observées (De Martino *et al.*, 2000).

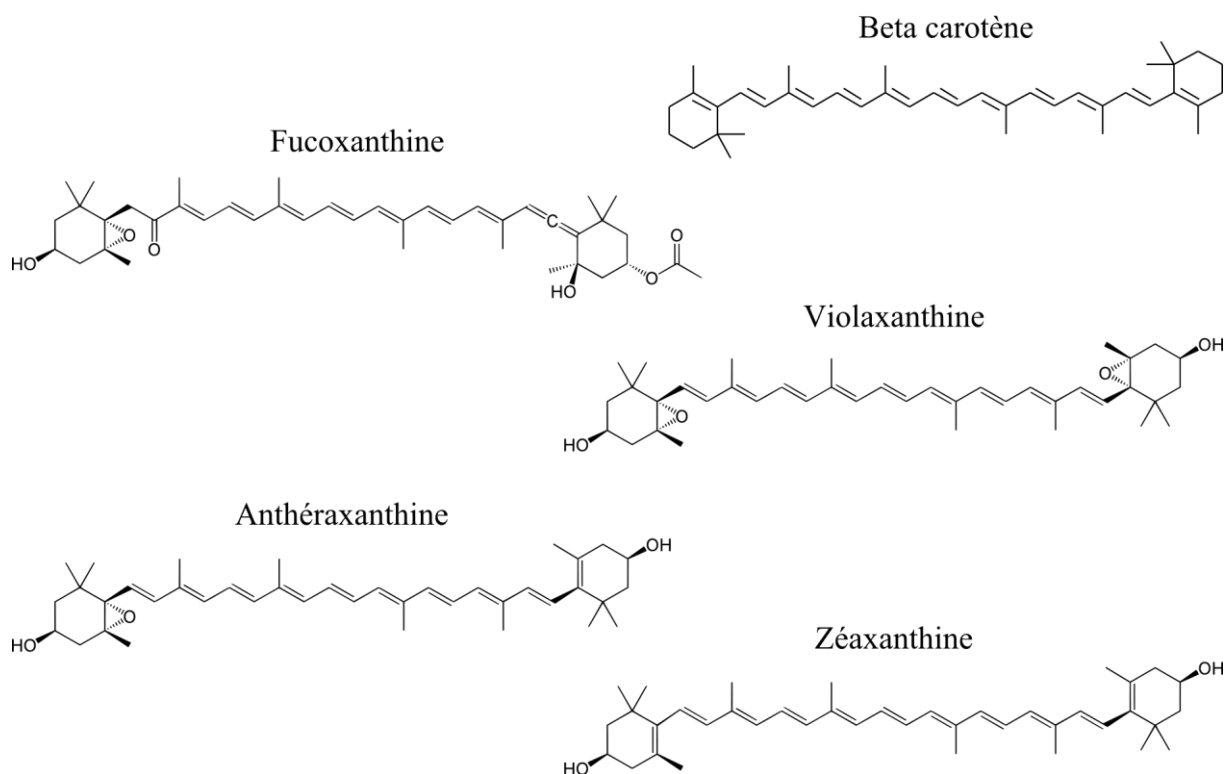


Figure 49 : Structures chimiques des principaux caroténoïdes des macroalgues brunes

Chez *Pelvetia canaliculata*, les mêmes pigments ont été observés, et deux sous-ensembles ont pu être isolés (d'après [De Martino et al., 1997](#)) :

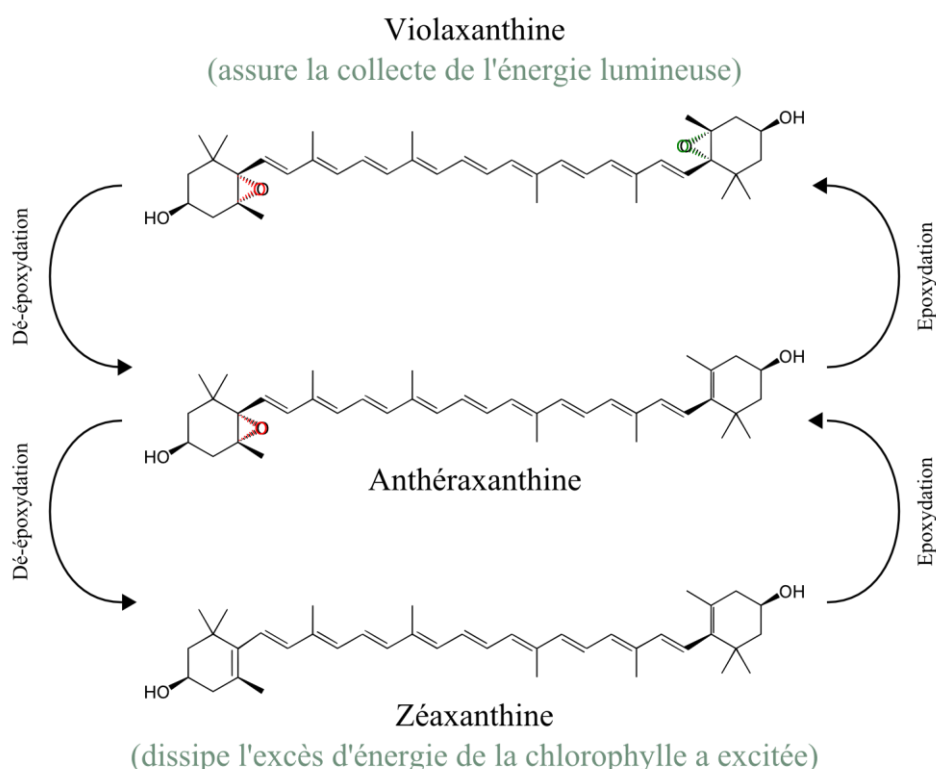
- Un complexe composé de Chl a, de Chl c, et de fucoxanthine, qui n'intervient que pour la collecte de l'énergie lumineuse et le transfert d'énergie.
- Un autre complexe composé de Chl a, de Chl c, de fucoxanthine, et surtout de violaxanthine, d'anthéroxanthine et de zéaxanthine, il assure la collecte de l'énergie lumineuse, le transfert d'énergie et un rôle photoprotecteur.

En effet, les xanthophylles et les carotènes peuvent intervenir dans les mécanismes de photoprotection des algues grâce à leur activité antioxydante. [Le Lann et al. \(2011\)](#), [Heo & Jeon \(2009\)](#) ainsi que [Sachindra et al. \(2007\)](#) ont mis en évidence l'activité antiradicalaire de la fucoxanthine, ce qui laisse présager de son implication dans les mécanismes de détoxification des espèces réactives de l'oxygène, produites lors de la photosynthèse.

Mais c'est sans doute le cycle des xanthophylles qui est un des mécanismes photoprotecteurs les plus importants, dont la violaxanthine, l'anthéroxanthine et la zéaxanthine sont les molécules-clés (Demmig-Adams & Adams, 1996).

Ce processus fait intervenir deux types de conversions : entre violaxanthine et anthéroxanthine, et entre anthéroxanthine et zéaxanthine. Ces étapes permettent de dissiper le surplus d'énergie lorsque la photosynthèse est particulièrement active, et de limiter la production d'espèces réactives de l'oxygène (oxygène singulet, etc.). Le cycle est présenté en Figure 50.

Conditions lumineuses modérées



Conditions lumineuses intenses

Figure 50 : Cycle des xanthophylles, modifié d'après Caron *et al.* (2001)

En cas de très forte intensité lumineuse, la photosynthèse est particulièrement efficace et peut générer des radicaux libres. Le premier signe d'une forte activité photosynthétique est une chute brutale du pH dans la lumière des thylakoïdes. Cette acidité du milieu favorise l'activité de l'enzyme « violaxanthine dé-époxydase », qui transforme la violaxanthine en antheraxanthine dans un premier temps, puis l'antheraxanthine en zéaxanthine. Cette dernière molécule est apte à capter le surplus d'énergie d'une chlorophylle singulet excitée, et de la dissiper sous forme de chaleur, évitant ainsi la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Lorsque l'activité photosynthétique revient à des valeurs plus modérées, le pH augmente, favorisant alors l'activité d'une autre enzyme, la « zéaxanthine époxydase » qui convertit progressivement la zéaxanthine en antheraxanthine puis en violaxanthine (Goss & Jakob, 2010).

L'exemple le plus explicite de l'importance du cycle des xanthophylles chez les macroalgues a été présenté par Gévaert *et al.* (2003, 2002). Chez *Laminaria saccharina*, une espèce du bas de l'étage médiolittoral et de l'infralittoral, la violaxanthine est progressivement convertie en zéaxanthine au cours de la marée descendante, et la conversion s'inverse lors de la marée montante (Gévaert *et al.*, 2003). Les quantités plus importantes de zéaxanthine à marée basse permettent de dissiper l'excès d'énergie lié à la forte intensité lumineuse. Parallèlement à ces changements d'abondance des pigments du cycle des xanthophylles, les autres pigments que sont la Chl a, la Chl c, la fucoxanthine et le β -carotène ne sont pas affectés par ces phénomènes de marée (Gévaert *et al.*, 2002, Tableau 8). De plus, cette dernière étude a révélé qu'entre les individus issus de l'étage infralittoral et ceux issus du bas de l'étage médiolittoral, aucune différence n'existe en termes ni de composition pigmentaire, ni d'« activité » du cycle des xanthophylles.

L'importance du cycle des xanthophylles a également été mise en évidence dans la réponse de l'algue brune *Pelvetia canaliculata* à de fortes radiations lumineuses (Harker *et al.*, 1999), ainsi que pour les algues composant le microphytobenthos (Chevalier *et al.*, 2010).

Tableau 8 : Évolution des teneurs en pigments chez *Laminaria saccharina* au cours d'une marée basse. Les teneurs sont indiquées en rapport pour 100 moles de pigments totaux, Données $\pm$ intervalle de confiance à 95 %, d'après Gévaert *et al.* (2002). Les teneurs en pigments variables sont mentionnées en rouge dans le tableau

	État initial (obscurité)	Marée basse simulée	Retour à l'obscurité
Chlorophylle a	55.99 $\pm$ 1.85	55.64 $\pm$ 2.8	52.96 $\pm$ 1.97
Chlorophylle c	5.91 $\pm$ 1.29	5.38 $\pm$ 1.45	5.74 $\pm$ 1.22
Fucoxanthine	31.41 $\pm$ 1.65	31.97 $\pm$ 2.51	32.55 $\pm$ 2.39
Violaxanthine	4.18 $\pm$ 0.94	2.64 $\pm$ 0.72	4.93 $\pm$ 1.48
Anthéroxanthine	0.15 $\pm$ 0.08	0.79 $\pm$ 0.26	0.68 $\pm$ 0.13
Zéaxanthine	0.07 $\pm$ 0.05	1.58 $\pm$ 0.52	0.59 $\pm$ 0.27
β -carotène	2.29 $\pm$ 0.98	2.00 $\pm$ 0.98	2.55 $\pm$ 1.29

Ainsi, les macroalgues brunes peuvent convertir leur violaxanthine en zéaxanthine lors de conditions lumineuses intenses. Cette zéaxanthine permet de dissiper les surplus d'énergie dans le cas de radiations lumineuses trop intenses. Le cycle des xanthophylles apparaît ainsi comme un mécanisme photoprotecteur majeur chez les algues brunes.

1.4 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE ÉCOLOGIQUE DU GENRE *CYTOSEIRA*

Notre étude tend à répondre aux trois questions précédemment posées à propos de la distribution des espèces de *Cystoseira*, de l'évolution spatio-temporelle de leurs populations, et d'une éventuelle adaptation de leur appareil pigmentaire. Son objectif est d'améliorer notre connaissance de l'écologie de ces espèces jusqu'à présent peu étudiées en raison de leur faible abondance sur les estrans bretons.

Le premier point abordé est la distribution des espèces. Pour cela, nous avons recensé les cystoseires le long d'un transect géolocalisé à Penmarc'h. Cette démarche met en évidence la répartition de chaque espèce sur l'estran et nous amène à dessiner un modèle de zonation s'appuyant sur des observations réalisées sur plusieurs saisons.

La deuxième étape est un suivi des populations, qui nous permet de caractériser l'évolution spatio-temporelle de la densité des individus, leur taille et leur indice de maturité, grâce à des observations réalisées pendant 18 mois et sur deux sites pour chaque espèce. Cette

démarche nous permet de caractériser la phénologie des cystoseires et de mettre en perspective ces données avec leur localisation sur l'estran.

Enfin, nous avons quantifié les pigments de cystoseires prélevées à différentes hauteurs sur l'estran par Chromatographie Liquide Haute Performance. L'objectif de cette analyse est de déterminer, chez les *Cystoseira* de Bretagne, s'il existe des variations quantitatives des principaux pigments en lien avec les espèces et leur distribution, pour déterminer si la variabilité de l'intensité lumineuse sur l'estran implique des mécanismes adaptatifs du point de vue pigmentaire.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION

Nous avons choisi d'étudier la distribution des populations de cystoseires établies à Saint-Pierre (commune de Penmarc'h). En effet, l'estran qui s'y découvre à marée basse est particulièrement grand et en pente douce, ménageant de nombreuses cuvettes qui constituent un biotope favorable aux cystoseires. Le choix de ce site s'appuie sur nos premières observations réalisées sur place en août 2008 (Figure 46). La répartition des individus nous a conduits à suspecter l'existence d'un schéma particulier de zonation des espèces entre les différentes hauteurs sur l'estran.

Nous avons étudié la répartition des cystoseires au printemps, pendant l'été et à l'automne 2010, ainsi qu'en hiver et au printemps 2011. Nos observations couvrent ainsi 5 saisons successives, afin de déterminer s'il existe des variations saisonnières dans cette répartition, en suivant les recommandations d'[Underwood \(2000\)](#).

Pour étudier la distribution des populations, nous avons relevé la présence des 5 espèces le long d'un transect. Dans notre cas, ce transect est une ligne tracée à travers l'estran, depuis le niveau de marée basse (à proximité de la ceinture à *Bifurcaria bifurcata*) jusqu'au niveau de marée haute (ceinture à *Pelvetia canaliculata*). Si la distribution des cystoseires n'est pas aléatoire, on peut s'attendre à observer une succession d'espèces entre le début et la fin du transect.

Nous avons implanté notre transect entre deux points géolocalisés : depuis [47.80019°N; 4.37927°W] jusqu'à [47.79991°N; 4.37533°W]. Cet itinéraire correspond à une remontée progressive, sur 300 mètres de longueur d'estran, depuis les niveaux les plus bas jusqu'aux niveaux les plus hauts. Sur le terrain, la ligne du transect a été matérialisée grâce à un décimètre (capacité : 60 mètres). Aussi nous avons dû découper le transect en 6 tronçons de 50 mètres chacun pour obtenir des résultats fiables de localisation, et nous avons calculé/déterminé les points GPS intermédiaires adéquats.

Dans la pratique, nous avons utilisé un quadrat de 0.5 m × 0.5 m (aire minimale obtenue pour le suivi des populations, cf. paragraphe 2.2) pour réaliser un inventaire des cystoseires. Après avoir implanté une ligne de 50 mètres grâce au décimètre, nous sommes partis du point de départ (le plus bas), et avons progressé en avançant lentement. Tous les 50 cm, nous avons posé le quadrat à côté du ruban du décimètre, et noté la présence (ou l'absence) de cystoseires. Nous avons ainsi pu localiser précisément nos observations sur l'estran. Une fois le transect parcouru en entier et les observations terminées, les données des 6 tronçons ont été réunies. Nous avons ensuite déterminé les coordonnées GPS de chaque observation, et nous en avons déduit la position (basse ou haute) de chaque espèce observée.

Nous avons également cherché à caractériser les cuvettes de l'estran le long du transect. Nous présenterons les résultats d'une étude des variations de température, de salinité et de richesse spécifique algale au sein de 3 types de cuvettes : haute, médiane, et basse, réalisée au cours d'un demi-cycle de marée, au cours d'une journée ensoleillée (hiver 2011).

2.2 SUIVI ÉCOLOGIQUE DES POPULATIONS

Chaque population de cystoseires a été suivie sur deux sites différents, entre février 2009 et juillet 2010. Nous avons choisi un estran sur la commune de Penmarc'h (Finistère Sud), puisque toutes les espèces y étaient observables. Le deuxième site a été plus difficile à trouver. En cherchant dans la région de Brest (Finistère Nord), nous n'avons pas pu observer conjointement les 5 espèces. Nous avons choisi d'étudier *Cystoseira humilis* du Trez-Hir (commune de Plougonvelin), *C. fœniculacea* et *C. nodicaulis* à Portsall (commune de Ploudalmézeau), *C. baccata* et *C. tamariscifolia* de l'anse de Porsmeur (commune de Porspoder). La description de ces sites est présentée au Chapitre I.

En pratique, le suivi est assuré par un échantillonnage aléatoire raisonné au sein des différentes populations, en utilisant des quadrats. Nous employons le terme de « population » pour désigner l'ensemble des individus d'une même espèce présents en un même site.

La taille idéale du quadrat (aire minimale) et le nombre de réplicats d'échantillonnage nécessaires (surface d'échantillonnage) ont été déterminées au commencement de notre étude pour chaque espèce et pour chaque site. Le nombre de réplicats de quadrats Q pour chaque population a été calculé en accord avec [Frontier \(1983\)](#) par la formule d'Elliott, en fixant une précision $p = 15 \%$, en utilisant les résultats de moyenne et de variance de la densité (pour $n=10$ mesures) :

$$Q = \text{Variance} / [\text{moyenne}^2 \times p^2]$$

Le nombre et la taille des quadrats utilisés au cours du suivi écologique sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Aire minimale et surface à échantillonner (nombre de quadrats) utilisées pour suivre chaque population de *Cystoseira* en Bretagne

Site	Espèce	Nombre de quadrats	Taille des quadrats
Penmarc'h	<i>Cystoseira baccata</i>	3	0.5 m × 0.5 m
	<i>Cystoseira fœniculacea</i>	3	0.5 m × 0.5 m
	<i>Cystoseira humilis</i>	3	0.5 m × 0.5 m
	<i>Cystoseira nodicaulis</i>	3	0.5 m × 0.5 m
	<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	3	0.5 m × 0.5 m
Porsmeur	<i>Cystoseira baccata</i>	3	0.5 m × 0.5 m
	<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	3	0.5 m × 0.5 m
Portsall	<i>Cystoseira fœniculacea</i>	3	0.5 m × 0.5 m
	<i>Cystoseira nodicaulis</i>	3	0.5 m × 0.5 m
Trez-Hir	<i>Cystoseira humilis</i>	4	0.5 m × 0.5 m

Chaque mois, nous avons disposé au hasard les quadrats dans les populations, et mesuré trois variables majeures :

- La densité, au travers du nombre d'individus dénombrés par quadrat. Cette variable d'état permet notamment d'appréhender des événements de mortalité et de recrutement dans chaque population.
- La taille des individus, mesurée de la base jusqu'à l'apex du rameau le plus long. Elle renseigne sur les phases de croissance et les phases de sénescence dans la phénologie de l'algue, sur la présence d'individus plus ou moins jeunes, etc.
- L'indice de maturité des individus observés dans les quadrats. Il indique la proportion d'individus portant des réceptacles. L'évolution temporelle de cet indice permet de détecter différentes stratégies de reproduction : diffuse tout au long de l'année, ou au contraire concentrée sur une saison.

2.3 QUANTIFICATION DES PRINCIPAUX PIGMENTS

2.3.1 PRÉLÈVEMENTS ET CONDITIONNEMENT DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons de cystoseires ont été collectés sur un estran de Penmarc'h à marée basse, au cours d'une journée ensoleillée de mai 2011. Suite à nos premières observations sur la distribution des cystoseires (voir Figure 46), nous avons décidé de collecter les échantillons à différents niveaux sur l'estran (haut, moyen, et bas) en fonction de la distribution des populations. Ainsi, nous avons prélevé trois individus pour chaque niveau et chaque espèce. Le plan d'échantillonnage suivant a été respecté, pour un total de 24 échantillons :

- *Cystoseira humilis* a été prélevée dans les cuvettes hautes ;
- *C. fœniculacea* et *C. nodicaulis* dans les cuvettes hautes et médianes ;
- *C. baccata* dans les cuvettes médianes et basses ;
- *C. tamariscifolia* dans les cuvettes basses.

Un bilan visuel de ce plan d'expérience est présenté en Figure 51.

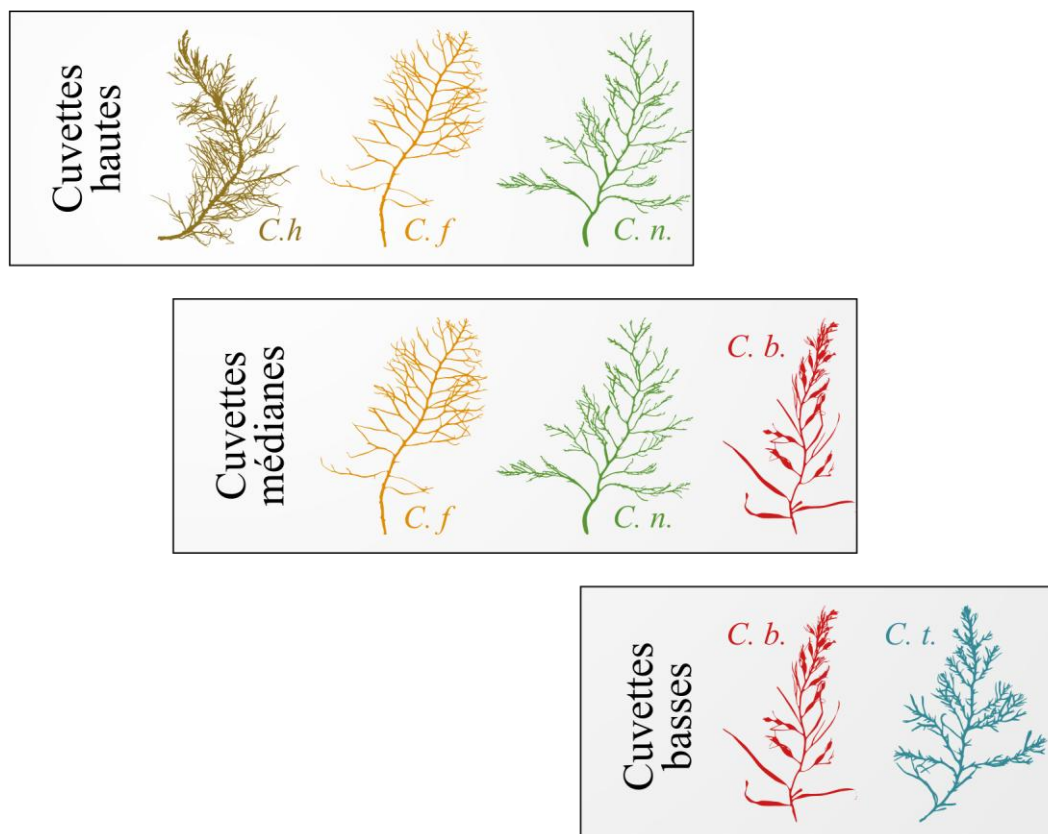


Figure 51 : Schéma des niveaux de collecte des cystoseires sur l'estran de Penmarc'h

Par précaution, nous avons choisi de collecter des thalles dans des cuvettes de profondeur similaire : environ 20 cm de fond. Nous avons également pris soin de ne sélectionner que des thalles non épiphytées. Au laboratoire, les échantillons ont été rincés à l'eau déminéralisée, puis lyophilisés et conservés à -20°C et à l'obscurité.

2.3.2 EXTRACTION DES PIGMENTS ET PRÉPARATION AVANT DOSAGE

Les échantillons ont d'abord été broyés avec de l'azote liquide dans un mortier. Le broyat a ensuite été soumis à deux extractions successives sous agitation, à 4°C et à l'obscurité.

Pour la première extraction, 50 mg de broyat ont été extraits dans un microtube avec 1 mL de solvant (Acétone à 90 % en solution aqueuse) durant 30 minutes. L'utilisation de moins de 10 % d'eau permet de limiter le phénomène de dégradation de pigments pendant

l'extraction (Latasa *et al.*, 2001). Le mélange extrait/poudre a ensuite été centrifugé à 15 000 tours/minute, pendant 5 minutes. L'extrait ainsi récupéré a été conservé séparément dans un nouveau tube, et ceci à 4°C.

La poudre résiduelle a ensuite subi une deuxième extraction : 1 mL d'acétone 90 % a été rajouté, et l'extraction a duré 12 heures. A nouveau, le tube a été centrifugé, et le deuxième extrait a été récupéré.

Les deux extraits ont finalement été rassemblés pour former l'extrait brut. Avant injection sur système de Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP), l'extrait brut est nettoyé par filtration (filtre nylon, Ø = 0.45 µm).

Ensuite, 50 µL de tampon acétate d'ammonium (0.5 mol/L, pH 7.2 ajusté avec une solution d'hydroxyde de sodium) sont mélangés à 150 µL d'extrait brut filtré. Les 200 µL résultants sont ensuite déposés dans un vial, lui-même placé dans le carrousel de l'injecteur automatique du système de CLHP.

2.3.3 SÉPARATION ET DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

La séparation des pigments et de dosage par CLHP s'appuie sur l'adaptation de Bidigare *et al.* (2005) de la méthode mise au point par Wright *et al.* (1991). Au cours des analyses, nous ciblons les pigments suivants :

- Chlorophylles : Chl a et Chl c (forme c2);
- Xanthophylles : fucoxanthine, violaxanthine et zéaxanthine ;
- Carotène : β-carotène.

La méthode que nous avons sélectionnée s'appuie sur la polarité différente de toutes ces molécules. Du fait de diverses interactions entre la colonne de chromatographie et le solvant d'élution, les pigments seront plus ou moins retenus dans le système. On pourra ainsi observer plusieurs « pics » sur les chromatogrammes qui correspondent à un de ces pigments. Classiquement, la détection est réalisée grâce à l'absorption de ces pigments dans le domaine de la lumière visible. La Figure 52 présente un chromatogramme typique montrant la séparation des pigments.

L'attribution des signaux est réalisée grâce à l'injection de standards de pigments (DHI, Danemark). Nous avons comparé les temps de rétention et les spectres d'absorption et vérifié la cohérence de nos résultats par rapport aux données issues de la littérature. La quantification a été réalisée par injection d'une gamme de différentes concentrations de standards afin d'établir la correspondance entre « aire du pic » et « quantité de produit ».

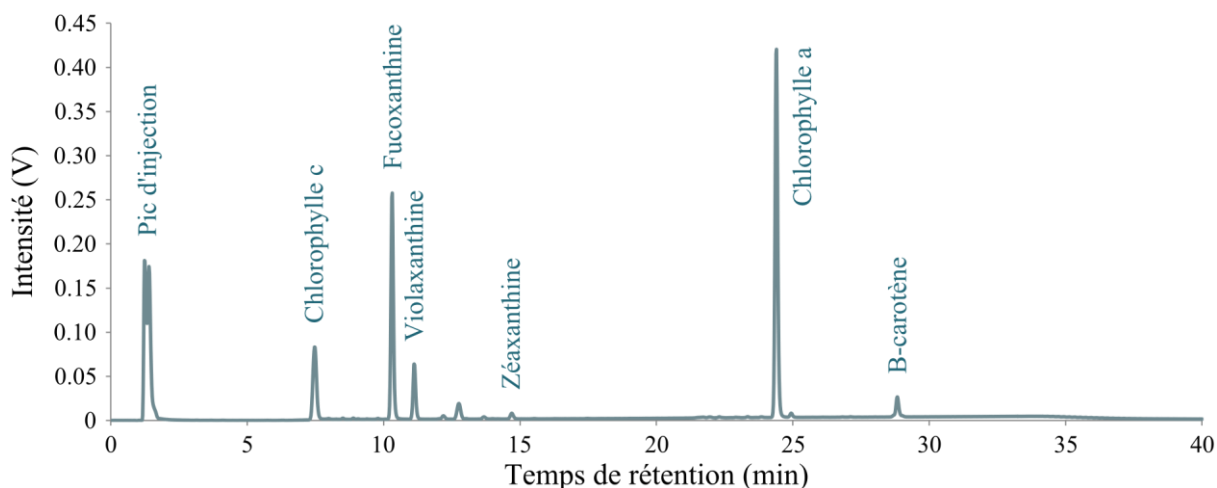


Figure 52 : Chromatogramme montrant la séparation des pigments présents dans un extrait brut de *Cystoseira baccata* ; détection à $\lambda = 435$ nm.

Le matériel utilisé est un système de chromatographie Waters, équipé d'un injecteur automatique (Waters 717 plus Autosampler), d'une pompe (Waters 600 Controller), d'un détecteur à barrette de diodes (PhotoDiode Array detector, Waters). La colonne chromatographique utilisée est en phase inverse : Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 4.6×150 mm; 5 μ m (Agilent Technologies) montée avec une pré-colonne C₁₈ (SecurityGuard, Phenomenex).

Nous avons utilisé un mélange de trois solvants (qualité CLHP) pour la séparation :

- **Solvant A** : 800 mL de méthanol, 200 mL de tampon acétate d'ammonium (0.5 mol/L, pH 7.2) et 0.1 g d'hydroxytoluène butylé (BHT) ;
- **Solvant B** : 875 mL d'acétonitrile, 125 mL d'eau ultrapure et 0.1 g de BHT ;
- **Solvant C** : Acétate d'éthyle.

Les proportions de chaque solvant sont consignées dans le Tableau 10. Chaque analyse CLHP dure 40 minutes, le débit est fixé à 1 mL/min, et la pression se situe autour de 800 PSI.

Tableau 10 : Gradient de solvant utilisé au cours des analyses. Les molécules ciblées par chaque type de solvants sont présentées dans Jégou *et al.* (à soumettre)

Temps (min)	%A	%B	%C
0	90	10	0
1	0	100	0
11	0	78	22
27.5	0	10	90
29	0	100	0
36	90	10	0

2.4 ANALYSE STATISTIQUE DES DONNÉES

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel R ([R Development Core Team, 2011](#)), avec un seuil d'erreur $\alpha=5\%$. La distribution des espèces a été mise en évidence grâce aux différences de niveau d'installation des populations observées le long du transect. Après rejet des conditions de l'analyse de variances (normalité et homoscedasticité des données non vérifiées d'après les tests de Shapiro-Wilk et de Levene), même après transformation des données comme le suggère [Underwood \(2000\)](#), nous avons déterminé les différences de position sur l'estran en fonction du facteur « espèce » par un test de Kruskal-Wallis et un test *a posteriori* adapté ([Siegel & Castellan, 1988](#)).

Les trois variables écologiques (tailles des individus, densité et indice de maturité dans les quadrats) ont été étudiés de deux façons. D'abord, par analyse en fonction du seul facteur « espèce ». Les données de l'ensemble du suivi écologiques ont été rassemblées par espèces pour cette analyse. A nouveau, les données n'ont pas pu satisfaire les conditions de l'analyse de variance, nous avons donc réalisé un test de Kruskal-Wallis et son test associé. Ensuite, au sein de chaque espèce, nous avons déterminé les différences pour chaque variable (taille, densité, indice de maturité) l'effet des deux facteurs « saison » et « site d'échantillonnage ». Lorsque cela était possible, nous avons procédé à une analyse de variance et à un test de Tukey (Honestly Significant Difference) et dans le cas contraire, nous avons procédé à un test de Kruskal-Wallis.

Les différences de teneurs pour chaque pigment ont été mises en évidence par analyse de variance et test de (Honestly Significant Difference). Le cas échéant, des corrélations entre variables ont été étudiées grâce au test de Pearson.

3 RÉSULTATS

3.1 DISTRIBUTION ET ÉVOLUTION SPATIO-TEMPORELLE DES POPULATIONS

3.1.1 ÉTUDE PRINCIPALE

Les résultats de l'étude de la distribution des populations de cystoseires et du suivi spatio-temporel de leurs populations sont rassemblés dans un manuscrit qui sera soumis à la revue « Estuarine, Coastal and Shelf Science », sous la référence suivante :

Jégou C., Bihannic I. and Stiger-Pouvreau V.

Living in rockpools – ecological parameters of *Cystoseira* populations from Brittany (France) in relation with vertical distribution

Le manuscrit, incluant différentes figures et tableaux, est présenté dans les pages suivantes. En résumé, nous avons mis en évidence la distribution particulière des espèces de *Cystoseira* sur l'estran en Bretagne, en montrant que d'une part, certaines espèces étaient strictement inféodées aux cuvettes de l'étage médiolittoral, et que d'autre part, chaque espèce possédait une capacité à coloniser différents niveaux sur l'estran. Au sein des populations, la densité et la taille des individus sont liées à la hauteur d'installation sur l'estran. Très probablement sous l'effet de la compétition interspécifique plus forte en bas de l'étage médiolittoral, les populations de cystoseires de ces niveaux sont caractérisées par de très faibles densités d'individus. Les populations (hautes) de *Cystoseira humilis* sont caractérisées par un fort dynamisme, avec un renouvellement perpétuel des générations lié à un recrutement élevé et de grands épisodes de mortalités ; à l'opposé, les populations de bas niveaux de *C. baccata* et *C. tamariscifolia* sont en équilibre plus statique, avec un faible recrutement et des individus durablement installés sur leur substrat. Enfin, nous proposons une analyse des cycles saisonniers de chacune des espèces.

Living in rockpools – ecological parameters of *Cystoseira* populations from Brittany (France) in relation with vertical distribution

Camille Jégou¹, Isabelle Bihannic, Valérie Stiger-Pouvreau

Laboratoire d'Écophysiologie et de Biotechnologies des Halophytes et des Algues Marines EA 3877 et Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin UMR 6539. Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, rue Dumont D'Urville, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

¹ Author for correspondence: Tel.: +33 2 98 49 86 68;

E-mail address: camille.jegou@univ-brest.fr

Condensed title: *Cystoseira* distribution and population biology.

Abstract

On the intertidal zone, the patterns of settlement of tide pool species remain poorly described, in contrast with the largely-studied distribution of emerged macroalgae. For the first time, we highlighted a relationship between the zonation and the population biology of five *Cystoseira* species (Fucales, Sargassaceae) in tide pools, suggesting a phenomenon resembling the “algal belts”. First, we examined the distribution of five *Cystoseira* species inhabiting rockpools from Brittany (France). Secondly, we surveyed populations during eighteen months on several sites, measuring the density, the length of individuals and the maturity index. We also investigated salinity and temperature variations and species richness across the shore. We gave evidences for the existence of a distribution between pools depending on their location along the intertidal zone, probably in relation with biotic and abiotic factors. Each species was settled around a general position on the shore and had a typical ability to depart from it. The maturity index turned out to be a specific biological characteristic, not depending on the distribution of the species. Conversely, we noticed a gradient of the measured lengths and densities along the shore: the higher a species was settled, the denser and the smaller its individuals were. We also investigated temporal variability of these populations, and proposed possible explanations for the different degrees of dynamism (concerning recruitment and mortality) that were observed in the populations, according to their position on the shore.

Keywords: *Cystoseira*, density, distribution, length, maturity index, population, rockpool, tide pool

Introduction

One of the most outstanding features of benthic ecosystems is their unique diversity, especially concerning species richness and ecological organization. On the rocky shores of Brittany (France), the biomass is mostly made of macroalgae, especially brown algae (Phaeophyceae), which represent a singular habitat for many vegetal and animal species. The existence of monospecific algal belts, described two hundred years ago in Europe (d'Orbigny, 1820), and later observed in other temperate waters, such as California, Scotland, and Australia (Barnes & Hughes, 1999), highlights the remarkable pattern of settlement for brown algae on the intertidal zone. An “algal belt” is a precise distribution of one alga on the shore, indicating that individuals are not observed beyond precise limits. The sea shore is characterized by this succession of macroalgae delimiting several habitats, which are associated to specific emersion times during a daily tide cycle. Resistance to emersion and its consequences is currently presented as one of the reasons why some species do not settle beyond an upper bound (because on the shore, the upper means the longer exposed to emersion), and interspecific competition explains why an alga do not settle under its lower limit (see for examples Schonbeck & Norton, 1978; Lubchenco, 1980; Foster, 1982). However, this general explanation is actually still subject to discussions. As the patterns observed for brown algae vary geographically, as observed by Ingólfsson (2005) under the high latitudes of several oceans, it remains difficult to determine absolute factors at the origin of the zonation in intertidal habitats.

In recent years, more attention has been paid to a kind of rocky formations occurring on the sea shore, known as “tide pools”. These biotopes represent isolated puddles found all over the rocky substrate on the intertidal zone, naturally retaining water at low tide. Despite pools are sometimes not considered as intertidal habitats (Underwood, 1981), because of the absence of emersion periods, they cannot be classified as subtidal areas either, but rather as a “refuge” for both intertidal and subtidal organisms (Underwood & Skilleter, 1996), which will remain immersed, contrary to the surrounding algae outside the pool. Nevertheless, as for the emerged substrata, physical and chemical variations of the water in pools according to their tidal level have been analyzed (Daniel & Boyden, 1975; Morris & Taylor, 1983; Huggett & Griffiths, 1986; Noël *et al.*, 2010), so as to get a putative explanation for the observed zonation patterns. Actually, the composition in macroalgae found in tide pools can vary according to the position on the shore (Huggett & Griffiths, 1986; Kooistra *et al.*, 1989), like it does on emerged substrata, or not (Araújo *et al.*, 2006; Wallenstein *et al.*, 2010). Tide pools

were once considered as unstable systems under the dependency of sudden disturbance (Dethier, 1984), but a contradictory conclusion was brought out by Astles (1996). As a consequence, it appears very hard to state definitively about the organization of algae in these pools.

In a whole, little is known about ecology in such pools, compared to the extensive literature concerning the emerged substrata on the intertidal zone, and only fragmental or sometimes contradictory information has been evidenced. For the coast of Brittany (France), a pattern of distribution of seaweeds, depending on the location of the pool along the sea shore, has been introduced by Cabioc'h *et al.* (2006), and a bathymetric distribution inside some pools, analog to the algal belts observed along the sea shore, has been evidenced (Kooistra *et al.*, 1989). However, to our knowledge, most of the literature data details the adaptation to tide pools of several species that are most commonly settled on emerged substrata. A particularly important missing data is, in our opinion, a monitoring about typical or even exclusive tide pool species, concerning both distribution patterns and spatial and temporal variations of their populations.

Our study was designed to evidence the distinctive distribution of the genus *Cystoseira* (Phaeophyceae, Fucales, Sargassaceae) occurring in tide pools, according to their position on the shore, and at the determination of a putative implication of such a distribution on the phenology of the populations. We analyzed the distribution of five species inhabiting tide pools, and surveyed the spatial and temporal variations of some biological characteristics of their populations during 18 months on several different sites.

Materials & Methods

Biological material

Five native *Cystoseira* species were chosen as referent material of this study. The reason is twofold. Within the fucoids, the members of the dominant family Fucaceae less frequently settle in pools; as an example, Lubchenco (1982) even indicated their absence in tide pools from the North-Western Atlantic. In Europe, the species from the family Sargassaceae are typically located in such pools, especially those from the genus *Cystoseira*. Moreover, they are quite common in Brittany, and together they occupy pools located at

nearly all tide levels. Actually, the genus *Cystoseira* has been subject of a few studies concerning ecology, in comparison with the numerous data available for the surrounding *Fucus* species. So, the genus *Cystoseira* represents an opportunity to investigate a putative link between tidal level of the populations and their population parameters.

According to Cabioc'h *et al.* (2006), *Cystoseira humilis* Schousboe ex Kützinger would be strictly located on the intertidal zone, in exposed pools. In Brittany (Atlantic Ocean), this species exclusively occurs in tide pools, contrary to the Mediterranean Sea, where it can extend down to the subtidal zone (Pardi *et al.*, 2000 and references therein). *C. nodicaulis* (Withering) M. Roberts and *C. tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss would settle from the intertidal to the subtidal zones (Arenas *et al.*, 1995; Rico & Fernández, 1997; Viejo, 1999; Le Lann & Stiger-Pouvreau, 2009). *C. baccata* (S.G. Gmelin) P.C. Silva and *C. fœniculacea* (Linnaeus) Greville would only inhabit subtidal areas. But earlier, Sauvageau (1912) indicated that *C. baccata* (that he called "*C. fibrosa*") and *C. tamariscifolia* ("*C. ericoides*") could be frequently observed together in the pools from the intertidal. Hence, these indications need to be supplemented, as they do not seem to fit well the situation on all rocky shores. Second reason for the selection of these species is that, when occurring on the field, they can represent an important biomass, making it easily suitable for such a study. The correct identification of the specimens was here ensured using characteristic morphological features (see Jégou *et al.*, 2010 for details about the criteria).

Characterization of rock pools colonized by Cystoseira species

In Brittany, the populations of *Cystoseira* spp. are located at different levels on the intertidal zone, and their presence has been reported in several places (Dizerbo & Herpe, 2007). However, the sites where the five species can be observed altogether are very rare, because they have to fit some conditions. First, they must be sheltered, as some species are absent in case of swell exposure and second, the intertidal zone has to be extended enough so as to be populated by these algae from the upper to the lower intertidal zone. While small cliffs and sandy bays are very common in Western Brittany, flat and sheltered rocky shores are not that frequent. So, only one site was selected in order to study the distribution patterns of the *Cystoseira* populations. We chose to set up our experiment at Saint-Pierre (town of Penmarc'h), where the slope of the shore is so low that the intertidal zone goes beyond 400 meters in direction to the sea. Prior to this study, we briefly confirmed the occurrence of the five species to validate the selection of this spot (unpublished data).

A globally West-to-East transect was drawn on the shore between two points: [47.80019°N; 4.37927°W] and [47.79991°N; 4.37533°W]. The first corresponds to the limit between the subtidal and intertidal zones; at the West of the first point is a natural prominent rocky barrier to the swell. The second point can be regarded as the upper limit of the population of the brown alga *Pelvetia canaliculata*; beyond, the area is not populated by macroalgae anymore. These precise coordinates were also chosen for two reasons: they allowed us to target a maximum number of rock pools, leading in optimal informative data, and the resulting transect showed a regular slope, with a good correspondence between position on the transect and tidal height. To ensure no departure from this transect, it was divided into 6 parts, each about 50 meters long. Their location was checked on the field using a MagellanTM Triton 200 GPS system, with an approximate 1 meter precision, in order to keep the global progression straight on the shore. These tracks were deployed with a 60 meters StanleyTM long tape rule. The presence of the *Cystoseira* species was investigated using a 0.5 m × 0.5 m quadrat. For example, a 40 meters track consisted in the observation of 80 aligned quadrats. This way, we could notice for each species the presence of individuals, and precisely locate them on the intertidal zone. For statistical analyses purposes, we converted the location of all the individuals (latitude and longitude) into a one-dimensional position on the sea shore. We also evaluated the species richness within the 6 parts of the transect. This operation was repeated five times, from July 2010 to April 2011, to ensure the validity of the results, as suggested by Underwood (2000).

In addition, temperatures and salinity variations were recorded for three kinds of pools (upper, mid and lower), during a sunny day of winter 2011, so as to get an overview of the amplitude of both parameters, and to determine whether manifest differences existed between pools from different tidal height. We measured salinity and temperature in three extended pools, from 8 a.m. to 2 p.m. (with low tide happening at 10 a.m.). Concerning these, the shallowest was on the very upper shore and the deepest on the mid shore.

Investigations about ecological variables in the populations

Sites were chosen in order to study the populations of the genus *Cystoseira*. Their geographical separation was a key for this choice, in order to take into account a putative environmental source of variability. The first site (hereinafter designated as “South”) is located in southern Brittany, near Kérity (town of Penmarc’h). Its position in Brittany is at the interface of the Atlantic Ocean and the Bay of Biscay. We chose a place near the spot where

the transect was used, and the selected rock pools presented this frequent characteristic: the lower on the shore, the deeper. Moreover, swell exposure can be considered null. The other site (“North”) is in northern Brittany, and comes in three spots, as the local geomorphology does not allow the occurrence of the five species altogether. So, this northern site is the union of the upper and semi-exposed shore of Plougonvelin [48°21’N, 4°42’W], where a population of *C. humilis* is settled, and the middle and sheltered shore of Portsall [48°34’N, 4°42’W], populated by *C. faeniculacea* and *C. nodicaulis*, and the low and sheltered shore of Porspoder [48°29’N, 4°46’W] where *C. tamariscifolia* and *C. baccata* occur. It is located in the Iroise Sea, and surrounding waters are the Atlantic Ocean and the English Channel. All of the three spots are made of rock pools located on (or near of) sandy beaches.

At each site, several ecological variables were measured for each species, every month from February 2009 to July 2010 (period equivalent to 6 seasons). We notably measured the length of individuals, hereinafter indicated as *length*, the number of individuals per quadrat, *i.e.* the *density*, and the proportion of individuals bearing receptacles in the quadrat, referred to as the *maturity index*. No sexual dimorphism could be considered because of the monoecy of all species (Jégou, pers. obs.). For each species, the optimal dimensions and number of quadrats to be employed were determined in a prior study (unpublished data), following the procedure described by Frontier (1983). As a result, 3 quadrats of 0.25 m² were used for sampling information in all cases, excepted in South, where 4 quadrats were required in the case of *C. humilis*.

Statistical analyses

All analyses were realized using the R statistical software (R Development Core Team, 2011), with a type I error level $\alpha=0.05$.

Considering the study of the distribution across the shore, we evaluated the differences between the positions of the species. Homogeneity of variances was rejected (Fligner-Killeen’s test), even after the use of common transformations of data, as proposed by Underwood (1997), so we used a Kruskal-Wallis test, and an associated multiple comparison test using the package “pgirmess” (Siegel & Castellan, 1988).

The three ecological variables were investigated from two points of view. First, the length of individuals, density and maturity index were compared between species, without any consideration of site or season. For such purpose, the whole dataset was used, pooling the

data collected during all the survey. As once again homoscedasticity was rejected even after transformation, we used a Kruskal-Wallis test and the previously introduced *post-hoc* to discuss the differences. Then, we investigated, for each species, the effects of season and site on the three variables. Consequently, when possible, we used two-way analyses of variance, considering “site” and “season” as fixed factors, supplemented with Tukey’s Honestly Significant Difference (HSD) test. In case of heteroscedasticity of data, logarithmic, square-root, or arcsine transformations were applied. When the transformed variables still did not satisfy the homoscedasticity requirement, the Kruskal-Wallis test and an associated *post-hoc* test were used.

Results

Repartition of Cystoseira species, diversity and physical-chemical parameters in rock pools

The transect gave evidences for a typical pattern of distribution of the 5 *Cystoseira* species. Figure 1 presents only the results obtained from the experiment that took place in October 2010, because no matter the period of the year, the major results about the distribution remained unchanged (the succession of the populations remained the same). Median positions significantly differed between species (Kruskal-Wallis test, $p < 0.0001$). On Figure 1 are plotted the position of the quadrats where individuals were found, for each species, and the statistical overlapping of the median position is also indicated. The species richness of each pool is also presented, as well as the correspondence of the level on the shore with the classical algal belts present on rocky shores of intertidal temperate coasts. In summary, the succession from the lower to the upper shore was: *C. tamariscifolia*, *C. baccata*, *C. fœniculacea*, *C. nodicaulis* and *C. humilis* (Figure 1).

Cystoseira humilis and *C. tamariscifolia* had in common a narrow distribution on the shore. *C. humilis* was strictly settled on the upper pools, just underneath the *Fucus spiralis* belt. The macroalgal species richness associated to the rock pools dominated by *C. humilis* was low. Only 7 species, mostly brown and green algae, were identified in its vicinity (Figure 1). *C. tamariscifolia* was located roughly from the *Bifurcaria bifurcata* / *Himanthalia elongata* belt to the *F. serratus* belt, in the very lower shore. In such pools, the high species richness (from 13 to 35 different taxa) is mainly due to the occurrence of red algae.

C. baccata, *C. foeniculacea* and *C. nodicaulis* had a wider distribution and colonize several pools along the rocky shore. The first had a scattered distribution under the *Ascophyllum nodosum* / *F. vesiculosus* belt (species richness from 10 to 35), and the two others were located on the mid shore between *F. spiralis* and the *F. serratus* belts (species richness from 7 to 13), where brown, green and red macroalgae coexist.

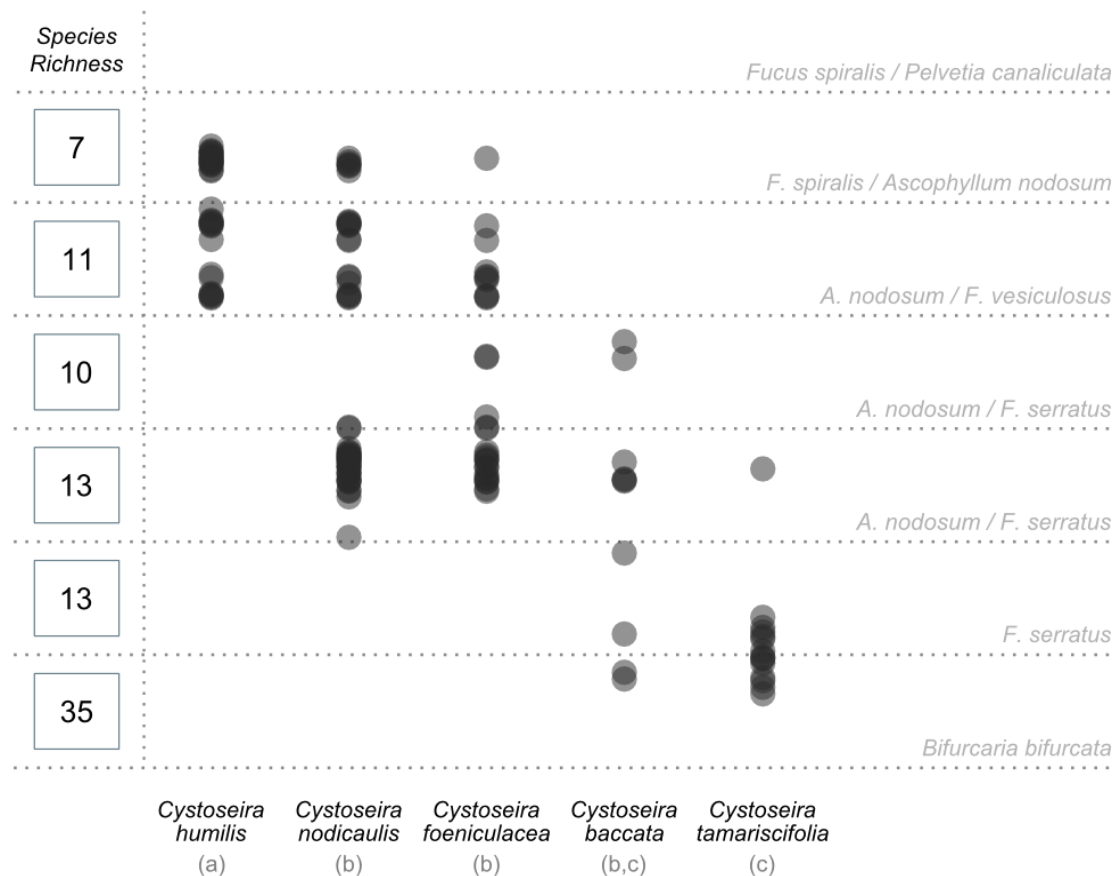


Fig. 1. Occurrence of *Cystoseira* individuals on the intertidal zone at Penmarc'h. The presence of individuals in one quadrat on a precise position along the transect is indicated by one semi-transparent grey circle. A common letter under the name of two species implies that statistical analyses revealed a common median position. Correspondence between levels and Fucal belts is given (right side), as well as the observed species richness (left side).

Investigating temperature and salinity ranges within pools, we could notice that during the measurement, only temperature was variable between pools and in time. Actually, salinity values oscillated around 35.3 for every pool, no matter the moment of the day. Conversely,

temperature varied during the day, in ranges depending on the considered pool. The temperature data are presented in Table 1.

Table 1. Variations of temperature in pools according to their tidal height and in seawater, during 6 hours, in a sunny day of winter 2011. Data $\pm$ SD.

Location on the shore	Minimum temperature	Maximum temperature
Highest pool	4.9°C $\pm$ 0.1°C	12.0°C $\pm$ 0.1°C
Mid pool	6.0°C $\pm$ 0.1°C	9.3°C $\pm$ 0.1°C
Lowest pool	4.9°C $\pm$ 0.1°C	10.0°C $\pm$ 0.1°C
Sea Water	7.3°C $\pm$ 0.1°C	9.3°C $\pm$ 0.1°C

Phenology of Cystoseira populations

General considerations

Phenological variables frequently fluctuated in space and time; however the five species did not share a common strategy either for growth, reproduction or settlement on the substrate. Table 2 indicates the differences existing between the taxa, considering the length of individuals, the density and maturity index within each population.

Length of individuals significantly differed between species ($p < 0.001$), and from the smallest to the tallest, the order was *Cystoseira humilis*, *C. nodicaulis*/*C. fœniculacea*, *C. tamariscifolia* and *C. baccata*. Density also varied significantly ($p < 0.001$), with maximal values found for the populations of *C. humilis*, then the density decreased for *C. nodicaulis*, *C. fœniculacea*, and *C. baccata*, and it was minimal for *C. tamariscifolia*. Regarding the maturity index observed in the quadrats, it appeared maximal for *C. nodicaulis* and *C. baccata* (with no statistical difference between them), and the individuals of the other species less frequently bore receptacles (Table 2).

A plot of length versus density for each species, together with the position on the shore of the studied tide pools, was drawn for each species (Figure 2). This result illustrates a kind of opposition between the density within the populations and the length of individuals. Maximal lengths of individuals were found in populations where the density remained low (*i.e.* *C. baccata* and *C. tamariscifolia*), and at the opposite, *C. humilis* which could present the densest population was characterized by the smallest individuals. *C. fœniculacea* and

C. nodicaulis were intermediate cases: individuals of these species were neither small nor tall, and a medium density range was observed in the quadrats.

Table 2. Statistical tests used to compare the length of individuals, the density and maturity index within the quadrats, between species, during all the survey on both sites (Southern and Northern Brittany, France). “B”: *Cystoseira baccata*; “F”: *Cystoseira foeniculacea*; “H”: *Cystoseira humilis*; “N”: *Cystoseira nodicaulis*; “T”: *Cystoseira tamariscifolia*

Variable	Test	Test Value	Df	P-value	Post-hoc results
Length	Kruskal-Wallis	H=361,89	4	<0.001	$H < \{N=F\} < T < B$
Density	ANOVA, Tukey's HSD	F=41,35	4	<0.001	$T \leq B \leq N < F < H$
Maturity index	Kruskal-Wallis	H=66,39	4	<0.001	$\{F=H=T\} < \{N=B\}$

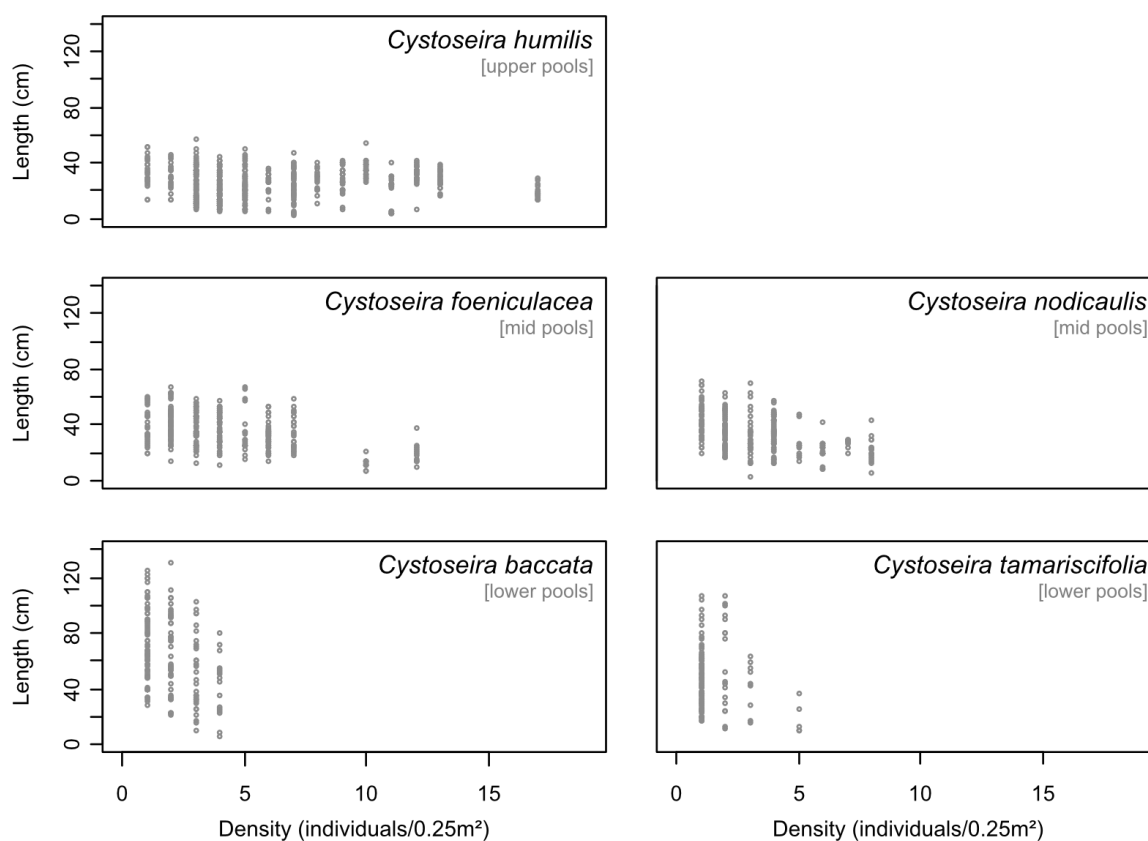


Fig. 2. Length versus density plots within each species. Position of the species on the shore is also indicated.

Seasonal and spatial variations of the populations

Even based on a few observations on the field, it was remarkable how the five species could evolve differently (1) throughout the season, and (2) between sites. It is particularly true concerning the length of individuals, illustrated on Figure 3, for which seasonal patterns could not be observed for all the species, even if seasonal effects were highlighted by statistical analyses (Table 3). Similarly, the density, parameter under the dependency of recruitment and mortality, changed during the season for some species (Table 3), because of the occurrence of exceptional high density periods, as observed on Figure 4. An example of this phenomenon is the high density periods observed between summer and autumn 2009, and between spring and summer 2010 in *Cystoseira humilis*' southern population. Finally, the variations of the maturity index detailed on Figure 5 gave supplementary evidences for a marked phenology of several species, but this was modulated according to the site (see differences for *C. baccata*). A description of the spatial and temporal variations of the length, density and maturity index is proposed hereafter for each species.

In both sites, the thalli of *Cystoseira humilis* were characterized by their small length (Figure 3). Site, season and their interaction affected the length in the *C. humilis* populations (Table 3). The thalli measured in South were globally longer than in North. However, no precise model of variations in length could be highlighted here. Similarly, the site and the season had a significant effect on the density. The maximum occurred in the South; once again it appears uneasy to determine a marked season of particular high (or low) density (Figure 4). Finally, considering the maturity index, there was an effect of the season (Table 3). Focusing on North in Figure 5, *C. humilis* was in a non reproductive period in late winters 2009 and 2010. In South, fertile individuals could be observed anytime of the year.

Cystoseira fæniculacea and *C. nodicaulis* thalli appeared taller than for *C. humilis* (Figure 3). The populations of both species showed a noticeable seasonality of length, and each species revealed an overall resemblance between South and North sites, notably regarding a seasonal pattern for length and maturity index (Table 3, Figure 3, and Figure 5). These variables were minimal between summer and autumn 2009 for both species at both sites. In opposition, results about density were less clear. Effects of site and season were found for *C. fæniculacea* but no unambiguous conclusion could be drawn from Figure 4. No effect of these factors was evidenced for *C. nodicaulis* (Table 3).

Table 3. Statistical tests and related post-hoc tests used to determine spatial and temporal variations in the length of individuals, the density and maturity index within the quadrats, for each species during the survey. Effects are presented for factors “Site”, “Season” and their interaction (only in the case of the ANOVA). “df”: degree of freedom. Significant results are underlined in light grey

<i>Species</i>	Length	Density	Maturity index
	ANOVA/HSD	ANOVA/HSD	KRUSKAL-WALLIS
<i>Cystoseira humilis</i>	Site: df=1, F=96.8, p<0.001 Season: df=5, F=2.85, p=0.015 Interaction: df=5, F=2.43, p=0.034	Site: df=1, F=15.0, p<0.001 Season: df=5, F=2.85, p=0.018 Interaction: df=5, F=0.283, p=0.922	Site: df=1, H=2.30, p=0.130 Season: df=5, H=60.9, p<0.001
	KRUSKAL-WALLIS	ANOVA/HSD	ANOVA/HSD
<i>C. fœniculacea</i>	Site: df=1, H=0.491, p=0.483 Season: df=5, H=108, p<0.001	Site: df=1, F=12.3, p<0.001 Season: df=5, F=2.60, p=0.030 Interaction: df=5, F=1.78, p=0.125	Site: df=1, F=2.90, p=0.092 Season: df=5, F=5.42, p<0.001 Interaction: df=5, F=2.61, p=0.029
	ANOVA/HSD	ANOVA/HSD	KRUSKAL-WALLIS
<i>C. nodicaulis</i>	Site: df=1, F=0.906, p=0.342 Season: df=5, F=18.5, p<0.001 Interaction: df=5, F=2.37, p=0.040	Site: df=1, F=2.37, p=0.127 Season: df=5, F=2.06, p=0.078 Interaction: df=5, F=2.37, p=0.002	Site: df=1, H=0.00540, p=0.941 Season: df=5, H=31.2, p<0.001
	ANOVA/HSD	ANOVA/HSD	ANOVA/HSD
<i>C. baccata</i>	Site: df=1, F=106, p<0.001 Season: df=5, F=5.50, p<0.001 Interaction: df=5, F=6.83, p<0.001	Site: df=1, F=21.2, p<0.001 Season: df=5, F=2.75, p=0.023 Interaction: df=5, F=4.06, p=0.002	Dataset restricted to northern site Season: df=5, F=5.48, p<0.001
	ANOVA/HSD	ANOVA/HSD	KRUSKAL-WALLIS
<i>C. tamariscifolia</i>	Site: df=1, F=7.04, p=0.009 Season: df=5, F=24.7, p<0.001 Interaction: df=5, F=5.45, p<0.001	Site: df=1, F=6.87, p=0.010 Season: df=5, F=0.763, p=0.578 Interaction: df=5, F=0.861, p=0.510	Site: df=1, H=0.249, p=0.618 Season: df=5, H=88.8, p<0.001

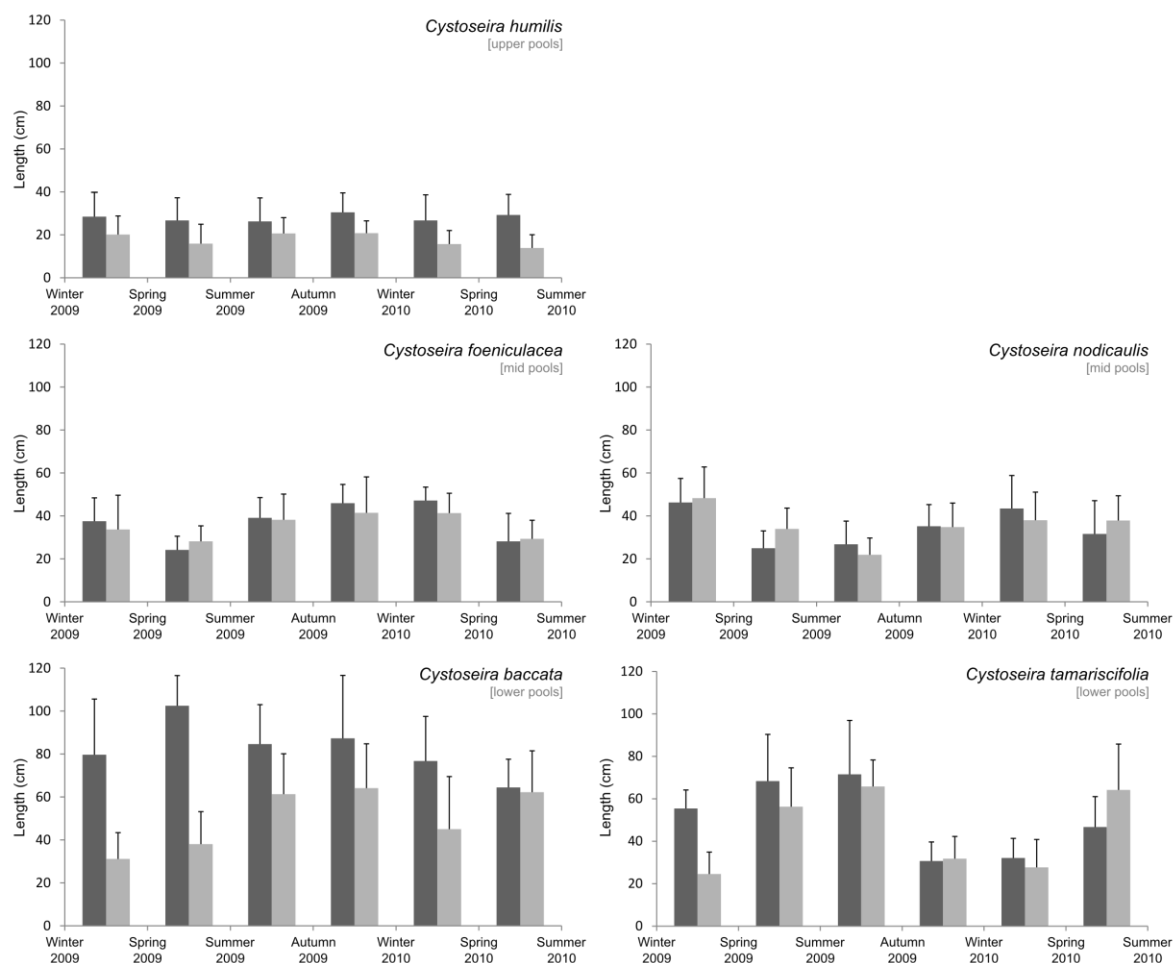


Fig. 3. Evolution of the mean length of individuals for the five species, between sites and throughout the seasons. Southern site data is in dark grey, northern site in light grey. Data $\pm$ SD.

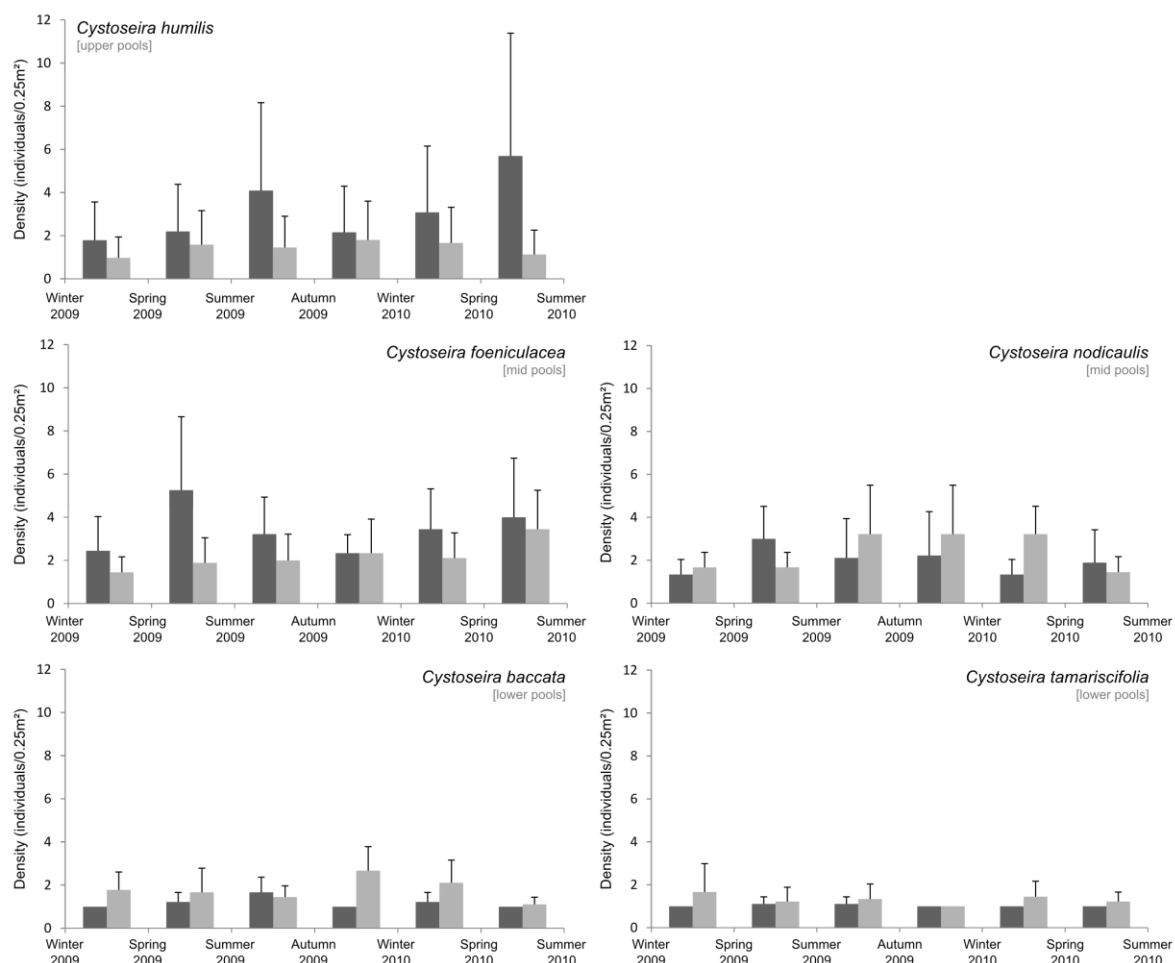


Fig. 4. Evolution of the mean density for the five populations, between sites and throughout the seasons. Southern site data is in dark grey, northern site in light grey. Data $\pm$ SD.

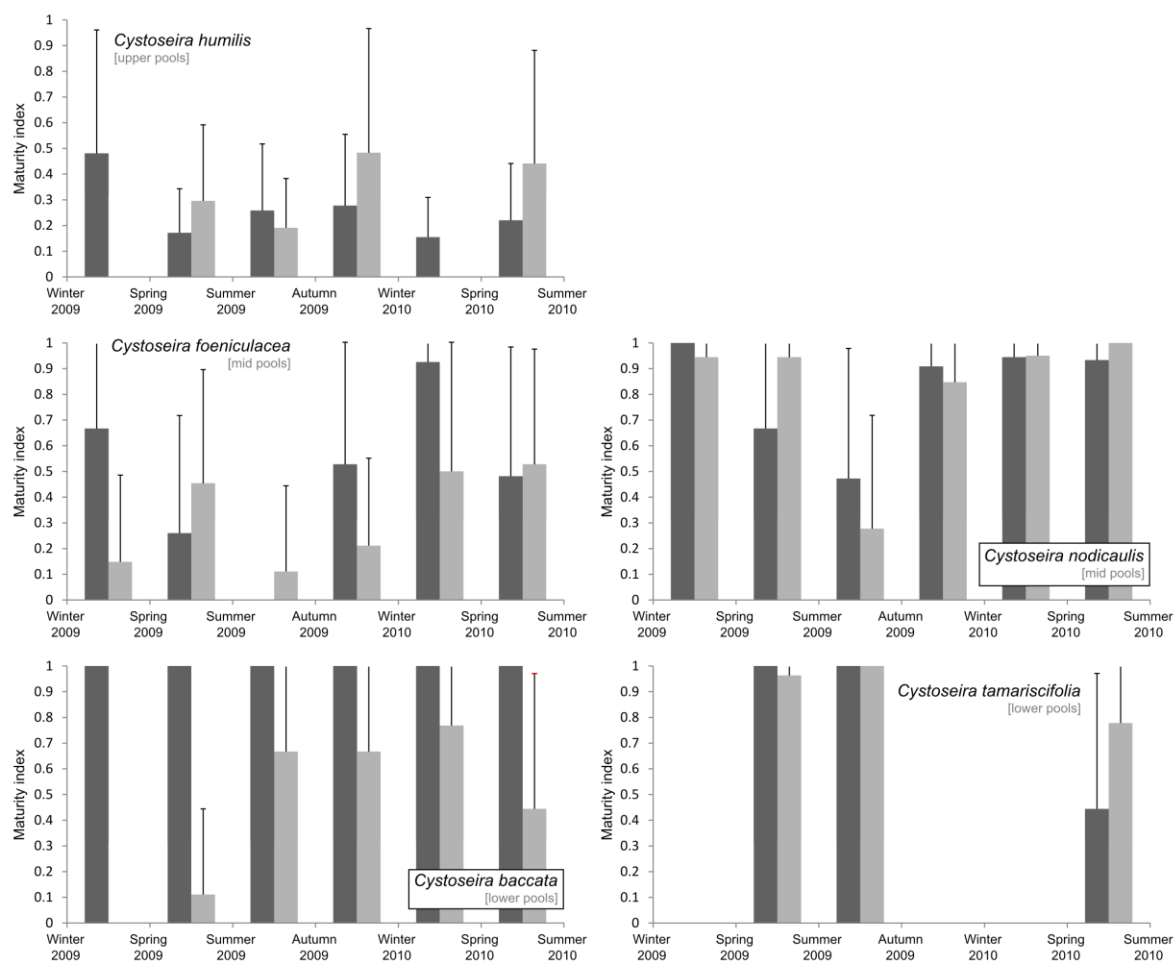


Fig. 5. Evolution of the mean maturity index for the five populations, between sites and throughout the seasons. Southern site data is in dark grey, northern site in light grey. Data $\pm$ SD.

Cystoseira baccata and *C. tamariscifolia* were characterized by the tallest thalli and the lowest density in their population. Length was affected by site and season for *C. baccata* (with taller plants in South) and for *C. tamariscifolia*. No seasonal tendency could be drawn from Figure 3 for *C. baccata*, contrary to *C. tamariscifolia*, demonstrating that only the latter has a marked seasonal growth, beginning in late winter, and ending around the summer when receptacles are fully developed (Figure 5). This is in accordance with the observations on the maturity index (Figure 5). For the two populations of *C. tamariscifolia*, the seasonal effect was significant, and for both populations, no individual was mature from autumn to spring (2009 and 2010). In South, the *C. baccata* population turned out to be only made of mature individuals, no matter the season. In North, the reproductive season was a large time period around winter 2010. Finally, density was under the dependence of site for both species. Furthermore, seasonal effect was highlighted for *C. baccata* only; however, as for *C. tamariscifolia*, no cyclic variation could be observed (Figure 4).

Discussion

This study focuses on the description of the zonation pattern of five *Cystoseira* species frequently or exclusively occurring in tide pools in Brittany, aiming at highlighting a relation between their settlement on pools from precise tidal heights and their phenological variables.

Results about the distribution detail two points: (1) a median position of the individuals on the shore and (2) the scattering of the populations. Considering this, not only succession is interesting, but co-occurrence as well. We can notice (Figure 1) that *C. humilis* and *C. tamariscifolia* are characterized by the most restricted populations, in terms of vertical extent, respectively on the very upper and the very lower intertidal zone. In Brittany, *C. tamariscifolia* does not extend to the medium intertidal, contrary to Roberts' (1970) observations in the British Isles. Conversely, *C. baccata* can settle from the lower to the medium intertidal zone, and *C. fœniculacea*, as *C. nodicaulis*, colonizes from the median nearly to the upper intertidal zone. Surprisingly, we observed for *C. nodicaulis* a lower limit set in the intertidal zone, which can settle down to the subtidal zone in other sites in Europe (see for examples Roberts, 1977; Viejo, 1999).

The transect gives evidences for the suspected distribution. Indeed, the fragmentary information obtained from the literature needed to be corrected or, at least, supplemented to fit

the observations in Brittany. In addition, the tide pools selected for our 18 months survey are like a caricature of what is described in Figure 1: *C. humilis* in the upper pools, *C. faeniculacea* and *C. nodicaulis* together in mid pools, and *C. baccata* and *C. tamariscifolia* together in lower pools.

The stability of the distribution throughout several seasons is one of the most important characteristic highlighted in this study. Previous investigations on vertical distribution on the shore frequently revealed seasonal variations, as experienced on emerged substrata by Underwood (1981). The author suggested that, except the cases of species appearing only during one season, the upper limit of some algae could shift due to seasonal variations of environmental factors. Here, the life cycle of the genus *Cystoseira*, with a unique macroscopic generation (de Reviers, 2003), which is, at least, partially persistent throughout the seasons (Roberts, 1967), makes all individuals observable at anytime. No seasonal appearance/disappearance of the species, and the attenuation, in rock pools, of severe variations of physico-chemical parameters throughout seasons, may represent relevant explanations for the stability of the distribution.

However, the putative factors at the origin of this zonation are still to be discussed. Lewis (1964), and more recently Cabioc'h *et al.* (2006) presented tide pools as habitats on the intertidal zone where some subtidal species can extend their distribution, thanks to the occurrence of more favorable conditions. While this is marked in the North Eastern Atlantic Ocean concerning *Bifurcaria bifurcata* and *Himanthalia elongata*, this argument cannot be given in the case of the genus *Cystoseira*. As an example, *C. humilis* is strictly limited to the upper shore (Figure 1), as we did not report its presence elsewhere on the shore. It is a typical tide pool species, as it cannot be observed, either in the subtidal or in the emerged areas of the intertidal zone. *C. faeniculacea* and *C. nodicaulis*, for which we could indicate an absolute lower limit, also turn out to be typical tide pools species in our study. Consequently, singularities of tide pools must be taken into account before investigating the causes of the zonation pattern.

However, an analogy can be found between the precise distribution of the species along the pools of the sea shore and the existence of belts for Fucales. On the intertidal zone, the dominant fucoids (in North Eastern Atlantic: genera *Pelvetia*, *Fucus*, *Ascophyllum*, etc.) succeed to each other, and their vertical limits are marked on the field. These bounds are depending on the ability of individuals to face (1) the stresses due to a given daily time of

emersion and (2) the competition with other species (Barnes & Hughes, 1999). In tide pools, most of the time there is no emersion of brown macroalgae. The parameters of water (temperature and salinity for example) can vary much more than in open seawater due to the pools getting isolated at low tide. Consequently, these abiotic factors, associated with the interspecific competition, must be relevant parameters in explaining the repartition of the *Cystoseira* species on the field.

On the first hand, we have observed that the maximal variation range of temperature occurred in the highest pools ($\Delta=7.1^{\circ}\text{C}$ within only 6 hours). According to Daniel & Boyden (1975), temperature would be of prime importance regarding ecology in pools, and the major factor controlling it would be the direct sun exposure. In our study, all the pools remained unshaded. Consequently, we can establish a correspondence between sun exposure and tidal height. The highest pools being longer exposed to the sun explains their maximal variation range of temperature. Furthermore, the phenomenon is amplified by the low depth in upper pools, often resulting in a high Surface/Volume ratio, making temperature decrease faster when the atmosphere is cold, and increase quicker during sunny days. During that sunny day when we measured salinity, we did not observe any significant variation or difference between pools. Though, for similar reasons, we can hypothesize that during rainy days, salinity varies much more in upper pools than in lower ones. In a few words, different tidal heights imply different degrees of “buffer action” by the sea on the concerned pool.

On the other hand, in tide pools as in anywhere else on the sea shore, interspecific competition is depending on bathymetry. Species richness increases in rock pools in direction to the lower intertidal zone, as it can be observed on Figure 1, and as it was already described by Cabioc’h *et al.* (2006) in Brittany, and elsewhere by other authors (Araújo *et al.*, 2006). As an illustration, in some upper pools in Brittany, the vegetation is patchy, most of the substrate appears free, and the rest is colonized by *C. humilis*, rarely by the brown alga *Scytosiphon lomentaria*, so the competition for the substrate seems extremely limited. On the opposite, lower rock pools where *C. baccata* and *C. tamariscifolia* live are characterized by very high species richness, due to the presence of green, brown, and more particularly red algae. This important species richness and the associated interspecific competition gradient were evidenced for both sites of the survey (unpublished data).

Consequently, the distribution of *Cystoseira* populations must result of a balance between (1) the capacity of the species to survive to a variable environment - the most

changing zones being found on the upper shore (Kemp, 2009), and the local species needing to be tolerant regarding temperature and salinity - and (2) their capacity to settle on a substrate yet colonized by competitors. So here is a possible explanation of what is observed on the field:

Cystoseira humilis must be particularly resistant to changing environments, and so it can colonize the upper shore. In addition, rare are the other species with such an ability, as suggested by the low species richness (equal to 7, see Figure 1), and by the low covering of the substrate by living organisms (C. Jégou, pers. obs.). So the competition is low, and the recruits of *C. humilis* have much space to settle, which permits high densities within populations. Small length of individuals could be regarded as an adaptation of this species to shallow pools, or to pools in which depth can become very low due to evaporation in summer, as it can be observed in upper pools (Cabioc'h et al., 2006).

At the very opposite, *C. tamariscifolia* cannot face such intense environmental changes, and so, it cannot develop on mid and upper pools. However, it can grow on lower tide pools, but as the competition for the substrate is strong, only low densities occur on the field. The high depth occurring more frequently in lower rock pools - in our survey, from 30 cm to more than 1 meter - let the individuals get taller than anywhere else. *C. baccata* turns out to follow this principle/tendency; however it has greater ecological amplitude, allowing it to grow in mid pools too.

C. nodicaulis and *C. faeniculacea* can be regarded as intermediate cases. Living in mid tide pools implicates a slightly higher variability of the parameters of the water than in lower pools, and a lower intensity of competition. As these mid pools are frequently less deep than those found on the lower intertidal, this would lead to the occurrence of medium-sized individuals with an intermediate density in population.

All the information detailed here is visible on Figure 2. We can note on the “length versus density” graph that there is a tendency in the populations that determine the parameters of the population along the intertidal zone: the upper a species is set, the smaller and the denser its individuals are.

So here are introduced a few elements that could explain the observed distribution of the five species, based on an analogy with the “algal belt” phenomenon. Although it seems reasonable to state that competition and specific resistance to physico-chemical variations are

of prime importance to explain the succession of the five species, our observations about the trend concerning length and density depending on tidal height need to be supported by precise arguments. A next step would be to survey the margins of the upper and lower populations, so as to evaluate whether, when a significant difference in tidal height exists between them, it is associated to some differences in size and density. *Cystoseira baccata*, *C. fœniculacea* and *C. nodicaulis* would be good choices for such purpose, as they have the largest distribution on the shore (Figure 1). However, as these margins are extreme conditions for those species, high mortality could be expected near the upper limit, so results concerning density could be hard to discuss.

Then, transplantation of algae and removal of competitor appear as one of the most valuable approach to determine the role of competition in determining the lower limits of algal belts, as demonstrated by [Schonbeck & Norton \(1980\)](#) and [Foster \(1982\)](#). Using this procedure, the authors managed to prove that some species could settle beyond their apparent limits, thanks to an artificially-maintained absence of competitors, and so, that their distribution range was under dependency of competition. Transplanting one species in another kind of pool and regularly removing competitors seems definitively as a good way to test whether biological interactions are a key factor that establishes the observed zonation pattern.

Additionally, laboratory cultures could be another good way to answer several questions left: do the five species share the same potential reproductive success? Do they have a phenotypic plasticity? Are their development influenced by the depth of the pool? Without such results, we have to remain very careful concerning the tendency between length, density and tidal height.

Checking if this general principle reported here for the genus *Cystoseira* could be extended to other Sargassaceae would be also interesting. In Brittany, *Halidrys siliquosa*, *Sargassum muticum* and *Bifurcaria bifurcata* are also living in rock pools, but are more abundant on the low shore, the latter forming a real algal belt at limit between the subtidal and the intertidal zones. So, it appears relevant to compare the ecological parameters of the sub-populations of each species (from the subtidal to pools in the intertidal zone) and see if the parameters “length” and “density” fit the model of organization proposed for the *Cystoseira* species. We also consider pertinent to investigate populations from the Mediterranean, which is only possible for *C. fœniculacea*, *C. humilis* and *C. tamariscifolia* (see distribution in [Guiry & Guiry, 2011](#)). Actually, the local environmental conditions, with a warmer climate,

restricted tidal amplitude, and a different species composition, could have several consequences. An ecological shift between Atlantic and Mediterranean populations can be a great opportunity to improve our understanding about the origins of their settlement.

So, in a few words, the phenological parameters such as density and length vary according to the tidal height of the pools where the *Cystoseira* species settle. Each species has its own ecological niche, most probably in relation with its resistance to a changing environment and its competitive abilities. These capacities are linked to the reproductive success which also differs between species. Here is an illustration on two opposite cases, *C. humilis* and *C. baccata*.

Despite the seasonal variations on length and density highlighted for *C. humilis* and *C. baccata* (Table 3), no pattern could be observed looking at Figures 3-5. However, the explanation we can propose differs for the two species, keeping in mind their different distribution.

The southern *Cystoseira humilis* population seems in a dynamic equilibrium. The northern site is a particular case (see Figure 5), characterized by a limited number of individuals, that mathematically generates a smaller dynamism (see contrast with South focusing on density in Figure 4). Considering their positive maturity index all year-long, the populations are characterized by the co-occurrence of vegetative individuals – recruits, juveniles and adult plants – and mature individuals that will generate the next wave of recruits (Jégou, pers. obs.). This can be at the origin of the stability of the size within each site (Figure 3). However, even if some periods of high density exist, they are an epiphenomenon and after such periods, density returns to its previous state. So the populations seem globally stable throughout the 18 months sampling periods. There must be a high mortality in recruits (and/or juveniles), as observed for this species by Pardi *et al.* (2000) in the Western Mediterranean Sea, that can be counterbalanced by a new wave of recruits. The authors suggested that a high wave exposure in this period could explain the mortality they observed each year, in October. In our study, even if the northern site is somewhat exposed to the swell, the southern one, where a high mortality occurred in autumn 2009, is a perfectly sheltered area. So other hypotheses are to be given to explain this mortality. Intraspecific competition could regulate the density within the populations. Limited nutrients levels, in context of high densities, can make the germlings survival rate decrease, as observed within the genus *Fucus* (Creed *et al.*, 1997; Steen & Scrosati, 2004). However, to our knowledge, this has not been

studied concerning juveniles. Furthermore, the pools where *C. humilis* occur are not above MHWN, so the water inside is still renewed every day. Different mechanisms have to be proposed. Another explanation comes in that each year in late spring, the occurrence of a bloom of green macroalgae (such as *Chaetomorpha* sp.) generates a temporary thick carpet at the surface of the upper tide pools, and a barrier to light. On our northern and southern sites, it can persist during the summer, and limit photosynthesis for small plants attached to the bottom of the pool, particularly when the thalli are not tall enough to reach the surface. This phenomenon, in association with the highly variable environmental conditions occurring in summer, may be implicated in the high mortality of recruits and juveniles deduced for *C. humilis*.

The *Cystoseira baccata* populations were also characterized by seasonal variations in size and density; and once again it is hard to describe a cyclic evolution. The explanation for this is opposite to the one presented for *C. humilis*. Observations on density for this species (Figure 4) reveal that it remains low, and actually it only extends to 4 individuals per quadrat in one case (see Figure 2). Le Lann & Stiger-Pouvreau (2009) observed the same phenomenon on other sites from Brittany. So the populations of this species are in a static equilibrium, with a nearly null recruitment. For example in southern site, no recruit was ever observed during the 18 months survey. In the populations, individuals were scattered, most of the time away from other conspecific individuals, and recruitment is likely to have been inexistent (due to the absence of “free space”). Variations observed in density as revealed by the ANOVA (Table 3) would only be induced by the restricted size of populations that consist in a few thalli, with the rare occurrence of several individuals in a same area. Using a random sampling strategy on the field, such an exceptional “dense” area must have been observed for *C. baccata* in the northern site during between autumn 2009 and winter 2010 (Figure 4), but this particularity has no link with any kind of seasonal variation. The same explanation can be given for the “seasonal effect” detected in the density of *C. tamariscifolia*.

Therefore, *C. baccata* (like *C. tamariscifolia*) and *C. humilis*, living in distinct ecological niches, adopt very different strategies to maintain their populations. Pardi *et al.* (2000) proved that in the Mediterranean, the individuals of *C. humilis* can hardly reach the age of 2 years. Nevertheless, adult thalli manage to get a good reproductive success. In spite of high mortality episodes occurring in October each year, the population can resist to these phenomena. Even if the recruitment is not good enough during one year, the substrate left free (characteristic of upper shore pools), allows a good recruitment for the next year.

Consequently, there is a high turnover in the populations. On the contrary, *C. baccata* and *C. tamariscifolia* live in a place where there is no spot left free on the rocks, and even if much energy is dedicated to reproduction, the success is extremely limited. However, these algae seem to be persistent during more than two years. As the time scale for reproduction seems larger than for *C. humilis*, even a small reproductive success must be efficient to maintain the population.

Finally, throughout the survey, seasonality is, at first sight, not a typical feature within the genus *Cytoseira*. Only three of them, *C. fœniculacea*, *C. nodicaulis* and *C. tamariscifolia* show unambiguous seasonal patterns, each population being characterized by a cycle in three phases: (1) active growth *via* the production of primary, secondary, tertiary (...) axes leading in (2) the development of mature receptacles, and after the release of the gametes, a loss of secondary axes that precedes (3) a dormancy period. This is not a surprise as it is the typical growth process known since Sauvageau (1912) and Roberts (1968; 1970; 1977) described it fairly. However a time shift in these phases is observed between species. For example, *C. fœniculacea* and *C. nodicaulis* begins dormancy in the middle of summer (in Summer 2009), while *C. tamariscifolia* is in its full maturity period (Figure 5). This is supported by the occurrence of these periods on both sites at the same time (Figures 3, 5).

Such an evident phenology could not be retrieved for *C. baccata* and *C. humilis* in the southern site (Figures 3 and 5). As previously mentioned, the small number of individuals for *C. humilis* in the northern site allows us to see a possible strictly vegetative periods between winter and spring (which corresponds to the minima of the maturity index observed in the southern site, Figure 5). Combining the results of both sites, this species is particularly mature between spring and winter, but maturity can be observed all year long, depending on the dynamism of the population. Moreover, in Portugal, the reproduction period seems to be summer (Engelen *et al.*, 2008). Reproduction period(s) must be under the influence of environmental parameters. Regarding *C. baccata*, it is not possible to determine seasonal patterns. Contrary to Le Lann & Stiger-Pouvreau (2009), we cannot deduce a unique reproductive period (Figure 5). On the contrary, in the southern site, all observed thalli were mature, all along the survey. However, the state of the algae differed throughout the seasons, even if it cannot be deduced from the results. It was obvious that during some periods, notably around summer, the number of receptacles was drastically reduced (Jégou, pers. obs.). A supplementary study on the evolution of the number of receptacles would probably highlight a seasonal pattern in the reproduction of *C. baccata*.

Conclusion

On the intertidal zone of the rocky shores of Brittany, *Cystoseira* species can be under the control of analogue parameters to the ones determining the macroalgal assemblages on the emerged substrata. Investigating typical tide pool species from this genus allowed us to determine a precise distribution, each species being characterized by a more or less wide tidal height. Resistance to changing environment and competitive abilities must be at the origin of this distribution, but the settlement at different height on the shore was associated to difference in terms of density and length of individuals within the populations. The variations of density, depending on the efficiency of the recruitment and the strength of mortality, could be used as indicator of reproductive success. *C. humilis*, the upper alga had the higher reproductive success, but many of the individuals disappeared during an annual mortality event. At the opposite, in the lower pools, the populations remained stable, and reproductive success was virtually null. The individuals of *C. baccata* and *C. tamariscifolia* in lower pools seem to be more perennial ones, with a reproduction success at a longer time scale. Finally, most of the populations did show a typical phenology, which was obvious for *C. fæniculacea*, *C. nodicaulis* and *C. tamariscifolia*. For *C. baccata* and *C. humilis* seasonal variations could not be detected in an absolute way, but separating the asynchronous signals of the individuals would surely permit to reveal a similar phenology.

Acknowledgements

This study is part of the Ph.D. thesis work carried out by the first author within the Laboratory of Ecophysiology and Biotechnologies of Halophytes and Marine Algae (LEBHAM EA 3877) set at the IUEM (UBO-UEB). It was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and by the Interreg IVB project Biotecmar. Gratitude is due to Jean-Jacques Jégou and Ludovic Jean for assistance during field measurements.

Literature Cited

- Araújo, R., Sousa-Pinto, I., Bárbara, I. & Quintino, V. 2006. Macroalgal communities of intertidal rock pools in the northwest coast of Portugal. *Acta Oecol.* 30: 192-202
- Arenas, F., Fernández, C., Rico, J., Fernández, E. & Haya, D. 1995. Growth and reproductive strategies of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Cystoseira nodicaulis* (Whit.) Roberts. *Sci. Mar.* 59: 1-8
- Astles, K. L. 1993. Patterns of abundance and distribution of species in intertidal rock pools. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 73: 555-569
- Barnes, R. S. K. & Hughes, R. N. 1999. An Introduction to Marine Ecology. Wiley-Blackwell, 296 pp.
- Cabioc'h, J., Floc'h, J. Y., Le Toquin, A., Boudouresque, C. F., Meinesz, A. & Verlaque, M. 2006. Guide des Algues des Mers d'Europe. Delachaux et Niestlé, 272 pp.
- Creed, J. C., Norton, T. & Kain (Jones), J. M. 1997. Intraspecific competition in *Fucus serratus* germlings: The interaction of light, nutrients and density. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 212: 211-223
- Daniel, M. J. & Boyden, C. R. 1975. Diurnal variations in physico-chemical conditions within intertidal rockpools. *Field Stud.* 4: 161-176
- Dethier, M. N. 1984. Disturbance and Recovery in Intertidal Pools: Maintenance of Mosaic Patterns. *Ecol. Monogr.* 54: 99-118
- De Reviers, B. 2003. Biologie et phylogénie des algues, Tome 2. Belin, Paris, 255 pp.
- Dizerbo, A. & Herpe, E. 2007. Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique, Iles Anglo-Normandes incluses. Éditions Scientifiques Anaximandre, 315 pp.
- D'Orbigny, C. 1820. Essai sur les plantes marines des côtes du Golfe de Gascogne, et particulièrement sur celles du département de la Charente-Inférieure. *Mémoires du Muséum d'Histoire Naturelle* 6: 163-203
- Engelen, A. W., Espirito-Santo, C., Simões, T., Monteiro, C., Serrão, E. A., Pearson, G. A. & Santos, R. O. P. 2008. Periodicity of propagule expulsion and settlement in the competing native and invasive brown seaweeds, *Cystoseira humilis* and *Sargassum muticum* (Phaeophyta) *Eur. J. Phycol.* 43: 275-282

- Foster, M. S. 1982. Factors controlling the intertidal zonation of *Iridaea flaccida* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 18: 285-294
- Frontier, S. 1983. Stratégies d'échantillonnage en écologie. Masson, Paris, 494 pp.
- Guiry, M. & Guiry, G. 2011. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 14 April 2011
- Huggett, J. & Griffiths, C. L. 1986. Some relationships between elevation, physico-chemical variables and biota of intertidal rock pools. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 29: 189-197
- Ingólfsson, A. 2005. Community structure and zonation patterns of rocky shores at high latitudes: an interocean comparison. *J. Biogeogr.* 32: 169-182
- Jégou, C., Culioli, G., Kervarec, N., Simon, G. & Stiger-Pouvreau, V. 2010. LC/ESI-MSⁿ and ¹H HR-MAS NMR analytical methods as useful taxonomical tools within the genus *Cystoseira* C. Agardh (Fucales; Phaeophyceae). *Talanta* 83: 613-622
- Kemp, J. 2009. Effects of Temperature and Salinity on Resting Metabolism in Two South African Rock Pool Fish: The Resident Gobiid *Caffrogobius caffer* and the Transient Sparid *Diplodus Sargus Capensis*. *Afr. Zool.* 44: 151-158
- Kooistra, W. H. C. F., Joosten, A. M. T. & van den Hoek, C. 1989. Zonation Patterns in Intertidal Pools and their Possible Causes: A Multivariate Approach. *Bot. Mar.* 32: 9-26
- Le Lann, K. & Stiger-Pouvreau, V. 2009. Spatio-temporal phenologies of temperate Sargassaceae: coexistence of invasive and native species. *Phycologia* 48: 74
- Lewis, J. R. 1964. Ecology of Rocky Shores. English University Press, London, 323 pp.
- Lubchenco, J. 1980. Algal Zonation in the New England Rocky Intertidal Community: An Experimental Analysis. *Ecology* 61: 333-344
- Lubchenco, J. 1982. Effects of grazers and algal competitors on Furoid colonization in tide pools. *J. Phycol.* 18: 544-550
- Morris, S. & Taylor, A. C. 1983. Diurnal and seasonal variation in physico-chemical conditions within intertidal rock pools. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 17: 339-355
- Noël, L. M.-L. J., Griffin, J. N., Thompson, R. C., Hawkins, S. J., Burrows, M. T., Crowe, T. P. & Jenkins, S. R. 2010. Assessment of a field incubation method estimating primary productivity in rockpool communities. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 88: 153-159

- Pardi, G., Piazzzi, L. & Cinelli, F. 2000. Demographic Study of a *Cystoseira humilis* Kützting (Fuciales: Cystoseiraceae) Population in the Western Mediterranean. *Bot. Mar.* 43: 81-86
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.r-project.org>.
- Rico, J. M. & Fernández, C. 1997. Ecology of *Sargassum muticum* on the North Coast of Spain. II. Physiological Differences between *Sargassum muticum* and *Cystoseira nodicaulis*. *Bot. Mar.* 40: 405-410
- Roberts, M. 1967. Studies on marine algae of the British Isles. 3. The genus *Cystoseira*. *Eur. J. Phycol.* 3: 345-366
- Roberts, M. 1968. Studies on marine algae of the British Isles. 6. *Cystoseira foeniculacea* (Linnaeus) Greville. *Eur. J. Phycol.* 3: 547-564
- Roberts, M. 1970. Studies on marine algae of the British Isles. 8. *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss. *Eur. J. Phycol.* 5: 201-210
- Roberts, M. 1977. Studies on marine algae of the British Isles. 9. *Cystoseira nodicaulis* (Withering) M. Roberts. *Eur. J. Phycol.* 12: 175-199
- Sauvageau, C. 1912. A propos des *Cystoseira* de Banyuls et de Guéthary. *Bull. Stat. Biol. Arcachon* 14: 133-556
- Schonbeck, M. W. & Norton, T. A. 1978. Factors controlling the upper limits of furoid algae on the shore. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 31: 303-313
- Schonbeck, M. W. & Norton, T. A. 1980. Factors controlling the lower limits of furoid algae on the shore. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 43: 131-150
- Siegel, S. & Castellan, N. J. 1988. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. McGraw-Hill, 399 pp.
- Steen, H. & Scrosati, R. 2004. Intraspecific competition in *Fucus serratus* and *F. evanescens* (Phaeophyceae: Fuciales) germlings: effects of settlement density, nutrient concentration, and temperature. *Mar. Biol.* 144: 61-70
- Underwood, A. J. 1981. Structure of a rocky intertidal community in New South Wales: Patterns of vertical distribution and seasonal changes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 51: 57-85
- Underwood, A. J. & Skilleter, G. A. 1996. Effects of patch-size on the structure of assemblages in rock pools. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 197: 63-90

Underwood, A. J. 2000. Experimental ecology of rocky intertidal habitats: what are we learning? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 250: 51-76

Viejo, R. 1999. Mobile epifauna inhabiting the invasive *Sargassum muticum* and two local seaweeds in northern Spain. *Aquat. Bot.* 64: 131-149

Wallenstein, F. M., Peres, S. D., Xavier, E. D. & Neto, A. I. 2010. Phytobenthic communities of intertidal rock pools in the eastern islands of Azores and their relation to position on shore and pool morphology. *Arquipél. Life Mar. Sci.* 27: 9-20

3.1.2 ÉLÉMENTS COMPLÉMENTAIRES : VARIABILITÉ SAISONNIÈRE DE LA DISTRIBUTION

Nous présentons en Tableau 11 et en Figure 53 des informations complémentaires relatives à la variabilité temporelle de la distribution des populations sur l'estran de Saint-Pierre. Le Tableau 11 recense les observations réalisées sur le terrain pour constituer le transect, et permettent de se figurer la dynamique, dans le temps, des populations de cystoseires sur le site.

Tableau 11 : Variation du nombre d'observations de chaque cystoseire sur le transect en fonction de la saison ; 1 observation représente au moins un individu d'une espèce observé dans un quadrat ; les cases présentant des valeurs maximales sont grisées.

	B	F	H	N	T	Total
Printemps 2010	7	18	21	25	19	90
Été 2010	11	15	21	14	16	77
Automne 2010	10	29	31	47	15	132
Hiver 2011	19	31	28	60	21	159
Printemps 2011	9	22	22	34	17	104

Ainsi d'après ces données, quelle que soit la population, le nombre d'individus observés au printemps 2011 est sensiblement le même que le nombre d'individus recensés un an plus tôt. De ce point de vue, les populations apparaissent particulièrement stables. Au fil des saisons, ce nombre d'observations varie avec un maximum du nombre d'observations en hiver 2011 pour toutes les espèces de *Cystoseira*, excepté *C. humilis* dont le maximum apparaît à l'automne 2010 (Tableau 4).

La Figure 53 trace les variations temporelles de la répartition des populations sur l'étage médiolittoral. La distribution des espèces y apparaît semblable au fil des saisons. Comme indiqué précédemment (Jégou *et al.*, à soumettre), *Cystoseira humilis* s'installe au plus haut sur l'estran, sous la ceinture à *Pelvetia canaliculata*, et cohabite sur place avec *C. nodicaulis* et *C. fœniculacea*. Les individus de ces deux dernières espèces parviennent à s'établir au niveau de mi-marée, sous la ceinture à *Ascophyllum nodosum*, avec *C. baccata* et de très rares individus de *C. tamariscifolia*. Ces deux dernières espèces colonisent le bas de l'étage infralittoral, jusqu'à la ceinture à *Bifurcaria bifurcata*. *C. tamariscifolia* y est d'ailleurs bien plus représentée que *C. baccata*.

La variabilité saisonnière de la répartition est imputable à quelques individus disséminés en limite de répartition, comme un individu de *Cystoseira fæniculacea* observé près de la population de *C. tamariscifolia* en hiver 2011. En ce qui concerne l'immense majorité des individus, ils restent regroupés dans les mêmes zones, quelle que soit la saison considérée (Figure 53).

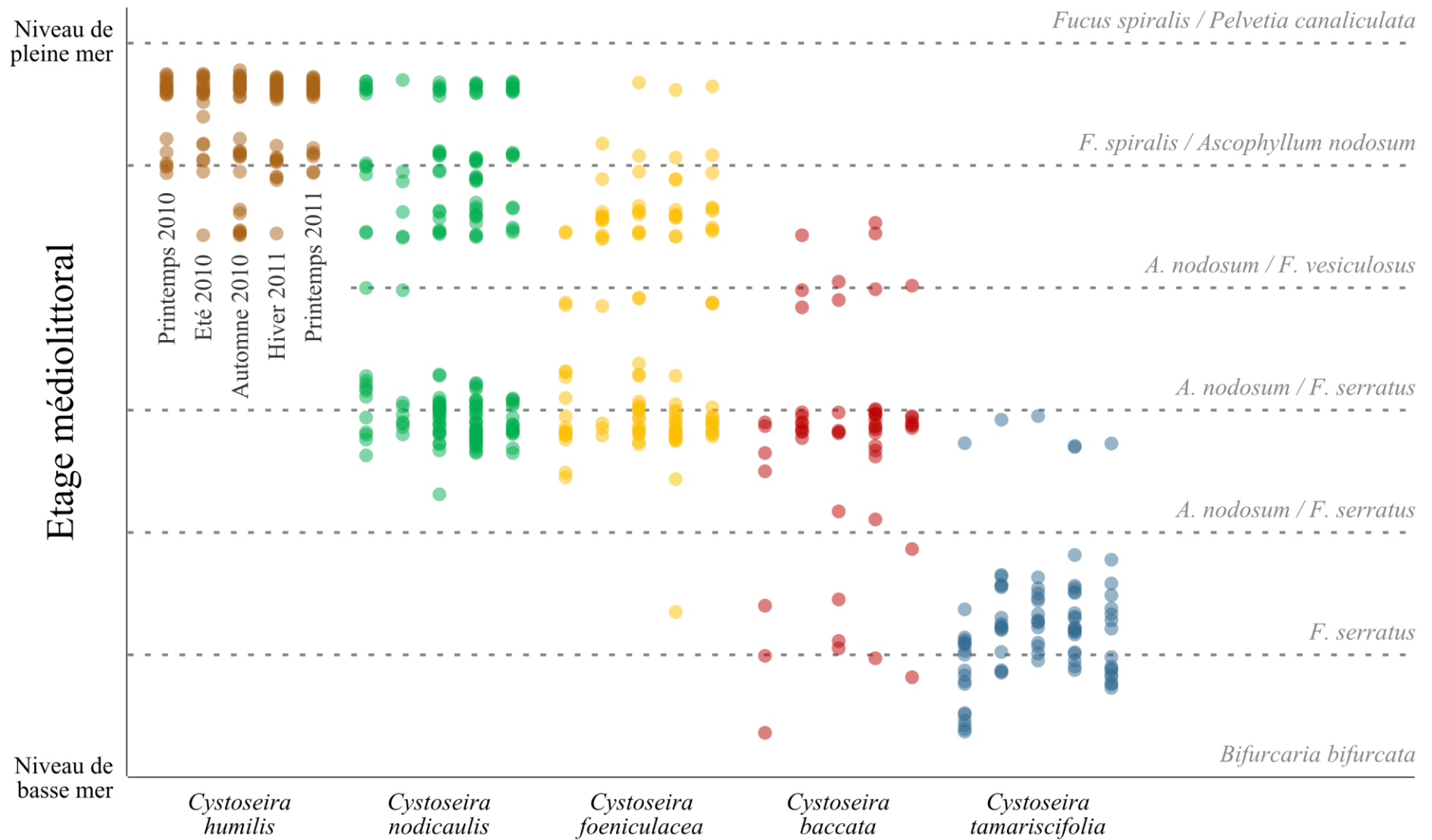


Figure 53 : Evolution temporelle de la répartition des espèces de *Cystoseira* à Saint-Pierre (France) ; 1 point = 1 observation.

3.2 VARIABILITÉ INTER- ET INTRASPECIFIQUE DES PRINCIPAUX PIGMENTS

Les résultats concernant l'analyse de la variabilité intra- et inter-populationnelle de la production de pigments chez les cystoseires sont consignés dans le manuscrit suivant :

Jégou C., Connan S., Guérard F. and Stiger-Pouvreau V.

Variability of pigment production in *Cystoseira* species from Brittany (France) as a function of tidal height

En résumé, nous avons pu mettre en évidence de fortes teneurs en chlorophylle a, fucoxanthine et chlorophylle c, qui représentent les pigments photosynthétiques de ces algues brunes. Les teneurs de l'ensemble des pigments étudiés (excepté la zéaxanthine) sont étroitement liées. De façon générale, elles sont les plus fortes chez les algues qui s'installent dans les cuvettes de bas niveaux, quelle que soit l'espèce considérée. Il semble ainsi qu'il y ait une réponse photo-adaptative au sein des populations. Les algues produisent plus de pigments lorsqu'elles s'installent dans des zones à plus faible luminosité. L'analyse de la variabilité de la zéaxanthine, pigment intervenant dans un mécanisme photoprotecteur (le cycle des xanthophylles), n'indique pas de réponse aussi franche. Il semble ainsi que même dans les cuvettes les plus hautes (à forte luminosité), les algues n'éprouvent pas la nécessité de développer ce mécanisme photoprotecteur. Les cuvettes semblent donc être des milieux protégés face à des excès de lumière sur l'estran. En ce sens, elles se distinguent des zones émergées à marée basse, où les mécanismes photoprotecteurs des algues sont bien plus sollicités.

Variability of pigment production in *Cystoseira* species from Brittany (France) as a function of tidal height

Camille Jégou^{1,*}, Solène Connan², Fabienne Guerard¹, Valérie Stiger-Pouvreau¹

¹Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin UMR 6539. Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, rue Dumont D'Urville, Technopôle Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

²INTECHMER – CNAM, Digue de Collignon, BP 324, 50103 Cherbourg Cedex, FRANCE.

* Author for correspondence: Tel.: +33 2 98 49 86 68;

E-mail address: camille.jegou@univ-brest.fr

Abstract

In this study, several pigments were extracted from five *Cystoseira* species and quantified using HPLC. We sampled algae from different parts of the shore (in rock pools), in order to investigate whether different photoprotective or photo-adaptive strategies could be employed by the algae depending on their tidal height. Most of the pigment contents were significantly correlated, varying among each population according to the bathymetric level: the lower the individuals were set on the shore, the bigger their pigment pool was. This result suggested a photo-adaptive process by which the decreasing light irradiance toward the low shore was compensated by a high production of pigments to ensure efficient photosynthesis. Conversely, no general photoprotective mechanism could be retrieved. High levels of zeaxanthin rarely occurred in the upper shore, which implies that the energy dissipation phenomenon was low. Consequently, tide pools could be regarded as light-protected areas on the intertidal zone, in comparison with the exposed emerged substrata where photoprotective mechanisms are essential.

Keywords: *Cystoseira*, pigment, bathymetry, tide pool, chlorophyll, xanthophyll, fucoxanthin

Introduction

Sargassaceae species, altogether with Fucacean ones, are among the most abundant brown algae occurring along the coasts of Brittany (France) (Dizerbo & Herpe, 2007). Their populations settle in the subtidal zone and in rock pools of the intertidal zone. Within this family, the genus *Cystoseira* in Brittany consists in five species: *C. baccata*, *C. fœniculacea*, *C. humilis*, *C. nodicaulis* and *C. tamariscifolia* (Cabioc'h *et al.*, 2006; Jégou *et al.*, 2010). Each one has its own pattern of distribution on the shore (Jégou *et al.*, 2011); consequently, the populations have to face different environmental conditions.

The intertidal zone can be defined as the portion of the littoral which is progressively covered by seawater during flood tides and discovered at ebb tides. Consequently, during a tidal cycle, the higher on the shore implies the longer exposed to the air and to direct solar radiations. On the emerged substrata (*i.e.* outside tide pools), drought tolerance is known to be a key parameter to explain the distribution of macroalgae (Schonbeck & Norton, 1978). In Europe, the populations of *Pelvetia canaliculata* (Fucales, Phaeophyceae) are located on the highest part of the intertidal zone. Consequently, the individuals have to face long emersion periods, sometimes during several days (Pfetzing *et al.*, 2000). They can survive a loss of 96 % of their water content which explains, at least partially, their ability to settle near Mean High Water Spring (Schonbeck *et al.*, 1979). In addition, light intensity also regulates the settlement of macroalgae on the shore. On the one hand, low light irradiances prevent the highest species such as *Pelvetia canaliculata* from settling further down on the intertidal zone (Schonbeck & Norton, 1980). On the other hand, the high light levels occurring on the highest part of the shore require specific photoprotective mechanisms (Hupel *et al.*, 2011). More precisely, the distribution of macroalgae appears under dependency of UV radiations (Bischof *et al.*, 2006).

As they colonize tide pools, the *Cystoseira* species do not face desiccation trouble. However, there are several abiotic factors varying in pools along the shore (Huggett & Griffiths, 1986; Morris & Taylor, 1983) and especially in Brittany (Jégou *et al.*, 2011). For example, macroalgae in tide pools are submitted to variations of temperature, even if the range of variation is narrower than on the emerged substrata, due to the persistence of water in pools. In addition, the light irradiance can dramatically fluctuate in pools depending on their location on the intertidal zone. In the uppermost pools, the intense photosynthetically active and ultraviolet radiations can disturb the development of macroalgae. This way, different

photoadaptive strategies could be expected for the *Cystoseira* species, according to their distribution on the shore.

Among brown algae, two kinds of compounds are implicated in the tolerance to excessive light irradiance: carotenoids and phlorotannins (Karsten, 2008). Phlorotannins are typical phenols from brown algae, composed of phloroglucinol units, which are accumulated in cellular vesicles called physodes (Ragan & Glombitza, 1986). Numerous studies have investigated their ecological and cellular roles. Phlorotannins are notably thought to have a sunscreen action, but some studies revealed contradictory results (Amsler & Fairhead, 2006). Carotenoids are the main class of photoprotective compounds, consisting in xanthophylls and carotenes. Under high light irradiance, the thermal dissipation of excessive energy is ensured by the xanthophyll cycle (Goss & Jakob, 2010; Demmig-Adams & Adams, 1996). It consists in two de-epoxidation of the photosynthetic pigment “violaxanthin”, then transformed in the photoprotective “zeaxanthin”, a molecule which can dissipate excessive energy (Schofield *et al.*, 2002). Carotenoids can also be implicated in the detoxification of reactive oxygen species formed during photosynthesis, altogether with other carotenoids such as fucoxanthine and β -carotene (Heo & Jeon, 2009; Burton & Ingold, 1984).

The xanthophyll cycle has been unequivocally evidenced as a major photoprotective mechanism of the brown algae on the intertidal zone. Gévaert *et al.* (2003, 2002) showed that *Laminaria saccharina* (located on the low intertidal zone) used the xanthophyll cycle to dissipate energy at low tide. Furthermore, Harker *et al.* (1999) proved that *Pelvetia canaliculata* had a greater xanthophyll pool than *L. saccharina*. This could partially explain the aptitude of the alga to settle very high on the shore. Uhrmacher *et al.* (1995) revealed that photoinhibition was realized by the xanthophyll cycle in *Dictyota dichotoma*.

In this study, we analyzed the pigment composition of five *Cystoseira* species distributed at three tidal heights on the intertidal zone of Brittany. Our purpose was to verify whether the photosynthetic capacity and the photoprotective mechanisms are specific characters, hence explaining the distribution of the species, or if they can be modulated within populations according to the tidal height where individuals settle.

Materials & Methods

Sampling

The five *Cystoseira* species were sampled on May 2011 at Penmarc'h [47.80°N; 4.38°W]. According to our previous observations of their distribution in Brittany (Jégou *et al.*, 2011), we sampled three individuals per species and per possible tidal height (Table 1).

Table 1: Number of thalli collected per species and per tidal height

Species	Higher pools	Median pools	Lower pools
<i>Cystoseira humilis</i>	3		
<i>C. nodicaulis</i>	3	3	
<i>C. fœniculacea</i>	3	3	
<i>C. baccata</i>		3	3
<i>C. tamariscifolia</i>			3

The different pools were selected on the shore on the basis of similar characteristics, especially regarding depth (approximately 20 cm). We collected only individuals that were not epiphyted. Just after sampling, the thalli were thoroughly rinsed with deionized water, freeze-dried and stored at the obscurity and at -20°C until extraction.

Extraction and preparation

Algal samples (apical parts, cleaned from epiphytes) were ground using liquid nitrogen with a mortar and a pestle. 50 mg of the powdered alga was subsequently extracted twice with 1 mL of a mixture of acetone/water (90:10, V/V), at 4°C and under agitation. The first extraction lasted 30 minutes, the second 12 hours. The two extracts were then pooled, centrifuged at 5 000 rpm during 5 minutes. The resulting supernatant was filtered using a 0.45 µm Nylon membrane (Millipore). Prior to injection in the HPLC system, 150 µL of the filtered extract were mixed with 50 µL of buffer (ammonium acetate aqueous solution at 0.5M, pH 7.2).

HPLC analysis

These samples were analyzed using a HPLC system using UV-Visible detection. For this purpose, a Waters HPLC system equipped with a Waters 717 Plus autosampler, a Water

600 Controller pump and a Photodiode Array Detector was used. The wavelength range of the detector was set at 210-700 nm. The pigments were separated following the method described by Wright *et al.* (1991) modified by Bidigare *et al.* (2005). Each analysis consisted in the injection of 10 µL of sample. Molecules were separated using reverse-phase chromatography with a Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6×150 mm; 5 µm; Agilent Technologies) equipped with a C₁₈ guard cartridge (SecurityGuard, Phenomenex) and maintained à 40°C. A ternary mobile phase was used: eluent A was constituted by 80 % methanol, 20 % ammonium acetate buffer at pH 7.2, and BHT at 0.1 g/L; eluent B was constituted by 87.5 % acetonitrile, 12.5 % water, and BHT at 0.1g/L; eluent C was pure ethyl acetate. The gradient of elution is indicated in Table 2. Several concentrations of chlorophyll a, chlorophyll c, fucoxanthin, violaxanthin, zeaxanthin and beta-carotene (standards furnished by DHI, Denmark) were injected in different concentrations so as to get correspondence between area of the peaks and quantity of pigments.

Table 2: Solvents gradient used during HPLC analysis of pigments in *Cystoseira* species

Time (min)	Flow	% A	% B	% C	Event
0	90	10	0	1	Injection
1	0	100	0	1	Linear gradient
11	0	78	22	1	Linear gradient
27.5	0	10	90	1	Linear gradient
29	0	100	0	1	Linear gradient
36	90	10	0	1	Equilibration

Statistical analysis

All analyses were performed using the R statistical software (R Development Core Team, 2011), with a type I error level $\alpha=0.05$. We investigated the effects of the factors “species” and “tidal height” on pigment content, using two-way analyses of variance, and differences were highlighted by Tukey’s Honestly Significant different test. For this purpose, we checked the required assumptions of normality (using Fligner-Kileen’s test) and homoscedasticity of data (Levene’s test). Correlations between variables were assessed using Pearson’s method.

Results

The chromatographic method clearly separated the six investigated molecules (Figure 1).

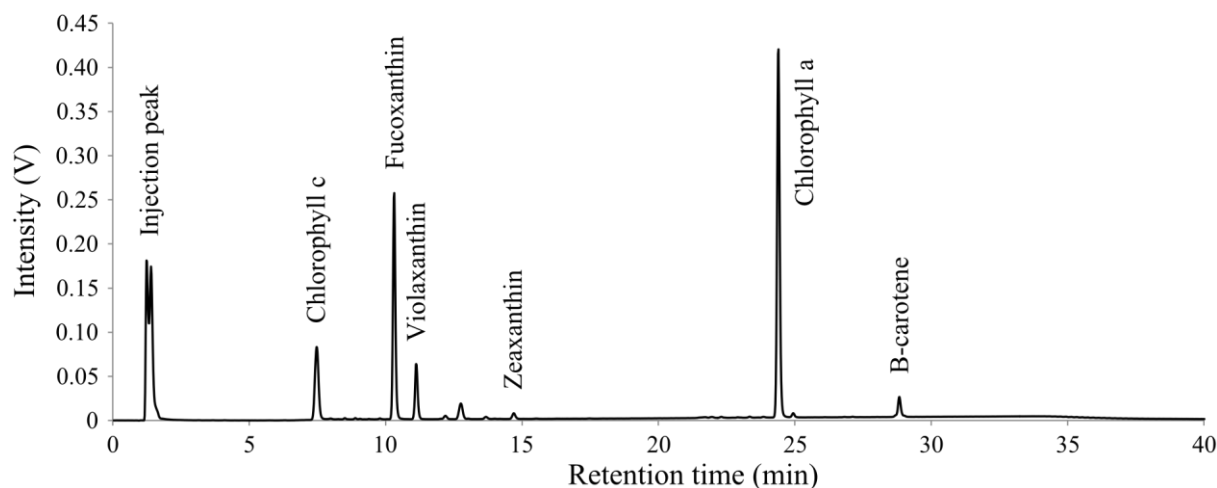


Figure 1: Chromatogram of a *Cystoseira baccata* sample revealing the presence of the 6 pigments (detection at $\lambda=435\text{nm}$)

In all samples, major pigments were chlorophyll a, fucoxanthin, and chlorophyll c. Their maximal mean contents reached 2.8, 1.0 and 0.3 mg.g^{-1} of Dry Weight, respectively (Figure 2). Maximal values were always observed in *Cystoseira tamariscifolia*. Violaxanthin, β -carotene and zeaxanthin contents were characterized by lower values, under 0.2, 0.14 and 0.08 mg.g^{-1} DW, respectively. Looking at Figure 2, it seems that there was an evolution of pigments contents according to tidal heights and species. Table 2 gives the results of the ANOVA and details the significant effects of these two factors on pigment levels.

All pigment contents depended on the considered species (Table 2, $p<0.05$). The “tidal height” effect could be evidenced only for chlorophyll a, fucoxanthin and violaxanthin. There was no significant interaction between the two factors, which means that the effect of tidal height on chlorophyll a, fucoxanthin and violaxanthin content did not depend on the species, and *vice versa*. Hence, for these three pigments, the content globally increased from the upper to the lower intertidal pools (HSD, $p<0.05$; Figure 2).

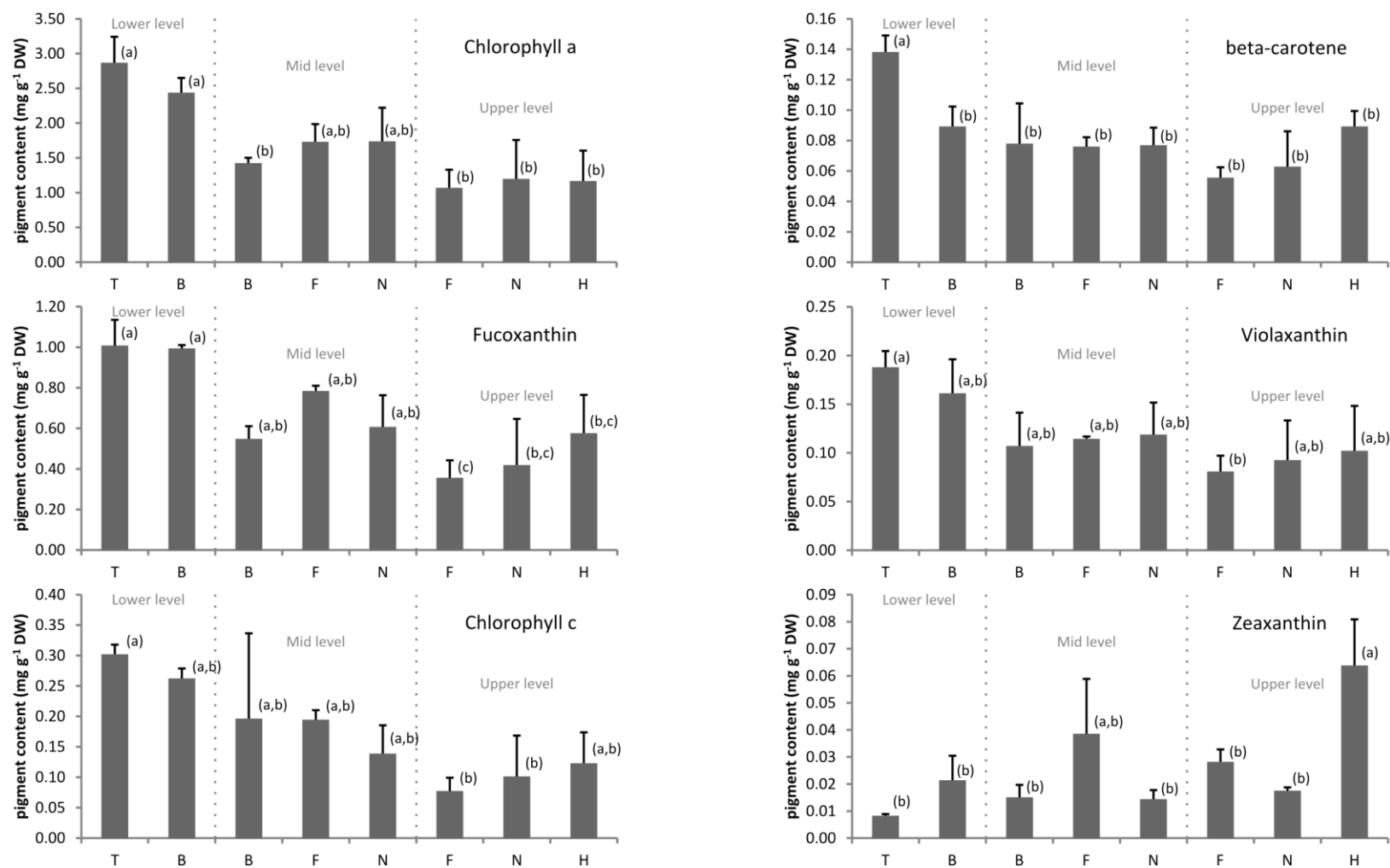


Figure 2: pigments contents in *Cystoseira* species from Brittany (France) according to their position on the shore. *Cystoseira baccata* “B”, *C. fœniculacea* “F”, *C. humilis* “H”, *C. nodicaulis* “N” and *C. tamariscifolia* “T”. For each pigment analysis, values sharing a common letter in parentheses were not statistically different according to Tukey’s HSD test. The scale for each graph is not similar.

Table 2: Results of the two-way analyses of variance (pigment levels as a function of the species and tidal height of settlement) Df: degree of freedom. Significant results are highlighted.

	Chlorophyll a			Chlorophyll c			Fucoxanthin		
	Df	F	p	Df	F	p	Df	F	p
Species	4	11.60	<0.001	4	6.73	0.002	4	9.09	<0.001
Tidal height	2	9.91	0.002	2	3.24	0.065	2	16.66	<0.001
Interaction	1	0.08	0.778	1	1.25	0.280	1	2.46	0.136

	β-carotene			Violaxanthin			Zeaxanthin		
	Df	F	p	Df	F	p	Df	F	p
Species	4	13.05	<0.001	4	5.20	0.007	4	15.53	<0.001
Tidal height	2	2.36	0.126	2	3.64	0.049	2	0.47	0.634
Interaction	1	0.13	0.724	1	0.042	0.840	1	1.31	0.269

Hence, the low shore species *Cystoseira tamariscifolia* and the low/mid shore *C. baccata* were characterized by high content for all pigments, except zeaxanthin for which they had minimal values (Figure 2, HSD test: $p < 0.05$). Conversely, the upper alga *C. humilis* had the maximal zeaxanthin level of all the dataset and low contents for the other pigments. Even if this was not always supported by statistical analyses, the levels of chlorophyll a, fucoxanthin, chlorophyll c, violaxanthin and β-carotene decreased for each species, from one location on the shore to a higher one (Figure 2). We evidenced the similar evolution of several pigments within species and tidal height using Pearson's correlation test (Table 3). Actually, except zeaxanthin, all pigments were highly correlated ($0.71 < \rho < 0.90$, $p < 0.001$). As a consequence, we can conclude that chlorophyll a, chlorophyll c, fucoxanthin and violaxanthin evolved in a same manner through species and tidal height, which is illustrated in Figure 2.

Table 3: Correlation between pigment levels according to Pearson's test; all indicated values are significant ($p < 0.001$), n.s.: no significant correlation (Chl: chlorophyll; Fuco.: fucoxanthin; Viola.: violaxanthine and Zea: zeaxanthin).

	β-carotene	Chl a	Chl c	Fuco.	Viola.	Zea.
β-carotene		0.74	0.81	0.71	0.87	n.s.
Chl a			0.80	0.90	0.84	n.s.
Chl c				0.85	0.88	n.s.
Fuco.					0.85	n.s.
Viola.						n.s.
Zea.						

Actually, the results of zeaxanthin quantification are less clear. The highest levels occurred in the uppermost pools with *C. humilis* (around 0.06 mg.g⁻¹ DW). On the contrary, the statistical analysis detected no difference in the rest of the dataset (Tukey's HSD test, Figure 2), and the analysis of variance only revealed a "species" effect, that was due to the high levels determined for *C. humilis* and in the mid population of *C. fœniculacea*.

Discussion

Chlorophyll a, fucoxanthin and chlorophyll c naturally appears as main pigments for all species on all tidal levels, as they are implicated in the collection antenna of the photosystems in brown algae (Alberte *et al.*, 1981). Analogue results have been obtained from *Pelvetia canaliculata* (De Martino *et al.*, 1997) and *Laminaria saccharina* (De Martino *et al.*, 2000). Zeaxanthin was the less concentrated pigment in all samples, according to our analyses.

All pigments except zeaxanthin were significantly correlated (Table 3). According to Figure 2 and to the statistical analyses, the pigments contents were maximal for algae settled in the lower shore, and minimal on the upper shore (Figure 2). This was observed:

1. Through different species settled at different levels: *Cystoseira tamariscifolia* produced more pigments than *C. humilis* (except zeaxanthin).
2. Through different individuals settled at different levels. For example, *Cystoseira baccata* produced more chlorophyll in the lower intertidal zone than in the mid zone.

Our results are consistent with the observations of pigment contents of *Ascophyllum nodosum* on two tidal heights (Stengel & Dring, 1998). The authors suggested that the increased production of pigments in lower levels counterbalanced the reduced level of irradiance in the lower part of the population. Aguilera *et al.* (2002) correspondingly showed that several arctic algae accumulated more pigments under reduced light condition. On the eulittoral zone of a temperate shore, Ramus *et al.* (1977) observed that pigment concentrations gradually increased with depth and shade.

Furthermore, on the higher shore, high levels of UV radiations could reduce pigment levels, as experimentally evidenced for *Fucus vesiculosus* (Döhler *et al.*, 1995).

No pattern could be observed looking at the evolution of zeaxanthin levels on different tidal heights (Figure 2). Only difference between species were observed (significant “species” effect, see Table 2), due to high levels occurring in *Cystoseira humilis* and in the mid *C. fæniculacea* populations. However, low zeaxanthin levels were determined in the upper individuals of *C. nodicaulis* and *C. fæniculacea* (Figure 2). Hence, zeaxanthin is not necessarily more produced on the upper shore.

Literature reports indicated that zeaxanthin production was deeply implicated in photoprotective mechanisms through the xanthophyll cycle. The double de-epoxidation of violaxanthin permitted the resistance to high irradiance as it was demonstrated in the lower shore for *Laminaria saccharina* (Gévaert *et al.*, 2003, 2002) and in the upper shore in *Pelvetia canaliculata* (Harker *et al.*, 1999). Moreover, very high quantities of violaxanthin occurring in the last species were considered as a potential zeaxanthin pool that would be used as a way to dissipate energy in case of extreme light conditions.

In this study, neither high stock of violaxanthin nor high quantities of zeaxanthin could characterize the algae settled in the upper shore. Apparently, there is no need to particular photoprotective mechanisms in these *Cystoseira* species from the upper pools.

Consequently, our study suggests that photo-adaptation exists in rock pools. Depending on the tidal height, the species receive different amounts of light, and regulates their pigment production in order to maintain a good photosynthetic activity. In opposition, the xanthophyll cycle does not seem to be particularly active in the upper pools, indicating that light irradiance is not high enough to over-active photosynthesis. The thin layer of water that persists in rock pools at low tide may represent an efficient screen against excessive light irradiance. Further investigations should be undertaken particularly during the sunniest days of summer, to state whether photoprotective mechanisms could be employed when the algae are submitted to exceptional light irradiance. Measuring the variations of the xanthophyll pigments *in situ* could also be a successful approach, as experienced by Gévaert *et al.* (2003).

References cited

- Aguilera, J., Bischof, K., Karsten, U., Hanelt, D. & Wiencke, C.** Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. II. Pigment accumulation and biochemical defence systems against high light stress. *Marine Biology*, **2002**, *140*, 1087-1095
- Alberte, R. S., Friedman, A. L., Gustafson, D. L., Rudnick, M. S. & Lyman, H.** Light-harvesting systems of brown algae and diatoms. Isolation and characterization of chlorophyll a/c and chlorophyll a/fucoxanthin pigment-protein complexes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1981**, *635*, 304-316
- Amsler, C. D. & Fairhead, V. A.** Defensive and Sensory Chemical Ecology of Brown Algae. *Incorporating Advances in Plant Pathology*, Academic Press, **2006**, *43*, 91 pp.
- Bidigare, R., Van Heukelem, L. & Trees, C.** Algal culturing techniques in Analysis of algal pigments by High-Performance Liquid Chromatography. Andersen, R. (ed.) Elsevier Academic Press, **2005**, 327-345
- Bischof, K., Gómez, I., Molis, M., Hanelt, D., Karsten, U., Lüder, U., Roleda, M. Y., Zacher, K. & Wiencke, C.** Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **2006**, *5*, 141-166
- Burton, G. & Ingold, K.** beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, **1984**, *224*, 569-573
- De Martino, A., Douady, D., Rousseau, B., Duval, J.-C. & Caron, L.** Characterization of two light-harvesting subunits isolated from the brown alga *Pelvetia canaliculata*: heterogeneity of xanthophyll distribution. *Photochemistry and Photobiology*, **1997**, *66*, 190-197
- De Martino, A., Douady, D., Quinet-Szely, M., Rousseau, B., Crépineau, F., Apt, K. & Caron, L.** The light-harvesting antenna of brown algae. *European Journal of Biochemistry*, **2000**, *267*, 5540-5549
- Demmig-Adams, B. & Adams, W. W. III.** The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, **1996**, *1*, 21-26
- Dizerbo, A. & Herpe, E.** Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique, Iles Anglo-Normandes incluses. *Editions Scientifiques Anaximandre*. **2007**, 315 pp.

- Döhler, G., Hagmeier, E. & David, C.** Effects of solar and artificial UV irradiation on pigments and assimilation of ^{15}N ammonium and ^{15}N nitrate by macroalgae. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1995**, 30, 179-187
- D'orbigny, C.** Essai sur les plantes marines des côtes du Golfe de Gascogne, et particulièrement sur celles du département de la Charente-Inférieure. *Mémoires du Muséum d'Histoire Naturelle*, **1820**, 6, 163-203
- Gévaert, F., Créach, A., Davoult, D., Holl, A.-C., Seuront, L. & Lemoine, Y.** Photo-inhibition and seasonal photosynthetic performance of the seaweed *Laminaria saccharina* during a simulated tidal cycle: chlorophyll fluorescence measurements and pigment analysis. *Plant, Cell & Environment*, **2002**, 25, 859-872
- Gévaert, F., Créach, A., Davoult, D., Migné, A., Levavasseur, G., Arzel, P., Holl, A.-C. & Lemoine, Y.** *Laminaria saccharina* photosynthesis measured *in situ*: photoinhibition and xanthophyll cycle during a tidal cycle. *Marine Ecology Progress Series*, **2003**, 247, 43-50
- Goss, R. & Jakob, T.** Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynthesis Research*, **2010**, 106, 103-122
- Guiry, M. & Guiry, G.** Algaebase. World-wide electronic publication. <http://www.algaebase.org/> **2011**
- Harker, M., Berkaloff, C., Lemoine, Y., Britton, G., Young, A. J., Duval, J.-C., Rmiki, N.-E. & Rousseau, B.** Effects of high light and desiccation on the operation of the xanthophyll cycle in two marine brown algae. *European Journal of Phycology*, **1999**, 34, 35-42
- Heo, S.-J. & Jeon, Y.-J.** Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2009**, 95, 101 - 107
- Huggett, J. & Griffiths, C. L.** Some relationships between elevation, physico-chemical variables and biota of intertidal rock pools. *Marine Ecology Progress Series*, **1986**, 29, 189-197
- Hupel, M., Lecointre, C., Meudec, A., Poupart, N. & Ar Gall, E.** Comparison of photoprotective responses to UV radiation in the brown seaweed *Pelvetia canaliculata* and the marine angiosperm *Salicornia ramosissima*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **2011**, 401, 36-47

- Karsten, U.** Defense Strategies of Algae and Cyanobacteria Against Solar UVR. Chapitre de “Algal Chemical Ecology”, Amsler, C.D. (ed.), Springer, **2008**, 273-296
- Morris, S. & Taylor, A. C.** Diurnal and seasonal variation in physico-chemical conditions within intertidal rock pools. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **1983**, 17, 339-355
- Pfetzinger, J., Stengel, D. B., Cuffe, M. M., Savage, A. V. & Guiry, M. D.** Effects of temperature and prolonged emersion on photosynthesis, carbohydrate content and growth of the brown intertidal alga *Pelvetia canaliculata*. *Botanica Marina*, **2000**, 43, 399-407
- R Development Core Team.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. **2011**, ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- Ragan, M. & Glombitza, K.-W.** Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progress in Phycological Research*, **1986**, 4, 129-241
- Ramus, J., Lemons, F. & Zimmerman, C.** Adaptation of light-harvesting pigments to downwelling light and the consequent photosynthetic performance of the eulittoral rockweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Marine Biology*, **1977**, 42, 293-303
- Schofield, O., Evens, T. J. & Millie, D. F.** Photosystem II quantum yields and xanthophyll-cycle pigments of the macroalga *Sargassum natans* (Phaeophyceae): responses under natural sunlight. *Journal of Phycology*, **1998**, 34, 104-112
- Schonbeck, M. W. & Norton, T. A.** Factors controlling the upper limits of furoid algae on the shore. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **1978**, 31, 303-313
- Schonbeck, M. W., Norton, T. A. & Heller, H.** An investigation of drought avoidance in intertidal furoid algae. *Botanica Marina*, **1979**, 22, 133-144
- Schonbeck, M. W. & Norton, T. A.** Factors controlling the lower limits of furoid algae on the shore. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **1980**, 43, 131-150
- Stengel, D. & Dring, M.** Seasonal variation in the pigment content and photosynthesis of different thallus regions of *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyta) in relation to position in the canopy. *Phycologia*, **1998**, 37, 259-268
- Uhrmacher, S., Hanelt, D. & Nultsch, W.** Zeaxanthin content and the degree of photoinhibition are linearly correlated in the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Marine Biology*, **1995**, 123, 159-165

Wright, S. W., Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C., Llewellyn, C. A., Bjornland, T., Repeta, D. & Welschmeyer, N. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids in marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, **1991**, 77, 183-196

4 DISCUSSION

Notre étude des populations du genre *Cystoseira* en Bretagne constitue à notre connaissance la première démarche visant des espèces uniquement installées dans les cuvettes de l'étage médiolittoral. Elle représente également un essai de transposition du phénomène de « ceintures », bien connu pour les espèces exondées (comme celles de *Fucaceae* par exemple) aux cuvettes de l'estran. Par ailleurs, nous présentons ici un état des lieux des populations qui peut être considéré comme un point de référence des populations. Notre étude révèle ainsi différents schémas d'évolution saisonnière des populations, grâce à une étude réalisée sur deux sites pour chaque espèce.

De plus, notre travail met en relation la distribution des espèces avec des variables d'état (densité et taille des individus), de reproduction (indice de maturité) et d'adaptation (cortège pigmentaire) des populations.

Nous exposons ici une analyse de la variabilité des teneurs en principaux pigments aux niveaux inter- et intrapopulationnels, pour déterminer si la distribution particulière de chaque espèce se traduit par des mécanismes photoprotecteurs adaptés.

4.1 LA DISTRIBUTION DES CYSTOSEIRES, UNE CONSTANTE À TRAVERS LES SAISONS

Chaque population de cystoseire s'établit sur une hauteur précise sur l'estran. *Cystoseira humilis* est l'espèce qui s'installe le plus haut, juste sous la ceinture à *Pelvetia canaliculata* - *Fucus spiralis*, dans des cuvettes peu profondes (jusqu'à 20 cm à Penmarc'h, observation personnelle). Elle y représente l'espèce la plus abondante, devant *C. nodicaulis* et loin devant *C. fœniculacea* qui a rarement été observée à ce niveau (Figure 53). Plus bas, au niveau de la ceinture à *Ascophyllum nodosum*, *C. nodicaulis* et *C. fœniculacea* deviennent les espèces les plus représentées, et ne s'étendent pas plus bas que le niveau correspondant à la mi-marée. On peut également observer dans la ceinture à *Ascophyllum nodosum* la présence de *C. baccata*, qui s'établit préférentiellement à ce niveau, mais dont certains individus sont observés plus haut ou plus bas dans l'étage médiolittoral. *C. baccata* est de ce fait l'espèce qui possède la plus grande valence écologique sur l'estran. En effet, le seul niveau qu'elle ne peut coloniser est celui de *C. humilis*. Enfin, *C. tamariscifolia* est l'espèce la plus basse sur l'estran, observable dans les cuvettes des ceintures à *Fucus serratus* et *Bifurcaria bifurcata*.

La distribution-type observée à Penmarc'h n'admet pas de fortes variations saisonnières. Néanmoins, d'après la Figure 53, les observations de la distribution des espèces (entre les printemps 2010 et 2011) ne sont pas rigoureusement identiques d'une saison à l'autre. Plusieurs explications à ce constat peuvent être avancées.

Nous avons choisi d'implanter notre transect grâce à une succession de points GPS, ce qui nous a permis de baliser notre progression sur l'estran. Chaque tronçon a été matérialisé sur le terrain en déployant un ruban de 50 mètres entre deux points géolocalisés. Cependant, la précision du système GPS est de ± 1 mètre ; de plus, en cas de fort vent latéral, le ruban prenait une trajectoire légèrement courbe à la surface des cuvettes. Ainsi, il ne nous a pas été possible de suivre rigoureusement le même parcours au cours des 5 observations que nous avons pu réaliser. Ceci pourrait expliquer, par exemple, que nous ayons observé en hiver 2011 (et uniquement à ce moment) un thalle de *C. fœniculacea* en position « anormalement » basse sur l'estran.

L'épiphytisme et la phénologie des espèces de *Cystoseira* constituent une explication complémentaire. En effet, à certains moments de l'année, les individus peuvent être réduits à leur axe primaire ou à leur disque basal, et s'ils sont complètement couverts d'algues épiphytes, l'identification devient impossible. De ce fait, nous avons pu ignorer quelques individus le long du transect, en dépit de nos efforts pour être exhaustifs dans notre recensement.

Les différentes stations retenues pour notre suivi de populations sont en accord avec cette distribution-type. Nous avons en effet échantillonné *Cystoseira humilis* en haut de l'estran, *C. fœniculacea* et *C. nodicaulis* au niveau de mi-marée et *C. baccata* et *C. tamariscifolia* au niveau de basse mer. Nos résultats permettent notamment d'affiner les indications de distribution fournies par Cabioc'h *et al.* (2006). En Bretagne, contrairement aux Îles Britanniques (Roberts, 1970), *C. tamariscifolia* ne peut se développer plus haut que *C. baccata*, et contrairement aux côtes espagnoles (Viejo, 1999), *C. nodicaulis* semble être strictement inféodée aux cuvettes des niveaux de mi-marée. Nous confirmons la restriction des populations de *C. fœniculacea* aux cuvettes du niveau de mi-marée indiquée par Roberts (1968). *C. baccata* et *C. tamariscifolia* sont classiquement implantées dans le bas de l'étage médiolittoral (Figure 53) ainsi que dans l'étage infralittoral (observations personnelles), ce qui corrobore les informations de Roberts (1970, 1967).

A la lumière de notre étude, *Cystoseira humilis*, *C. fæniculacea* et *C. nodicaulis* semblent ne vivre que dans les cuvettes de l'étage médiolittoral. *C. baccata* peut s'installer partout sauf aux niveaux les plus hauts. Plus généralement, *C. baccata* comme *C. tamariscifolia* colonisent à la fois les cuvettes basses de l'estran et l'étage infralittoral. Par analogie au concept de ceintures de macroalgues, nous pouvons proposer une typologie des cuvettes sur les estrans abrités :

- « Cuvettes à *Cystoseira humilis* » : cuvettes en position haute sur l'estran, à proximité de la ceinture à *Pelvetia canaliculata* – *Fucus spiralis*.
- « Cuvettes à *C. fæniculacea* – *C. nodicaulis* » : cuvettes des niveaux de mi-marée, dans la ceinture à *Ascophyllum nodosum*.
- « Cuvettes à *C. tamariscifolia* » : cuvettes des niveaux de basse mer, dans la ceinture à *Fucus serratus* et à la limite de la ceinture à *Bifurcaria bifurcata* – *Himanthalia elongata*.

La distribution caractéristique des cystoseires dans les cuvettes de l'estran en Bretagne est présentée en Figure 54.

Les raisons de cette répartition singulière des cystoseires dans les cuvettes sont très probablement similaires à celles qui expliquent les phénomènes de ceintures de l'estran. Concernant les algues établies en dehors des cuvettes, [Barnes & Hughes \(1999\)](#) indiquent que deux facteurs sont à l'origine de leur répartition sur l'estran :

1. Leur capacité de résistance aux cycles d'immersion/émersion et aux perturbations qui en découlent : dessiccation, variations de température et de salinité, exposition directe aux radiations UV, etc.
2. La compétition interspécifique, qui voit le développement préférentiel (dans le cas de vraies ceintures) d'une ou deux espèces d'algues au détriment d'autres qui auraient les capacités de se développer au même endroit.

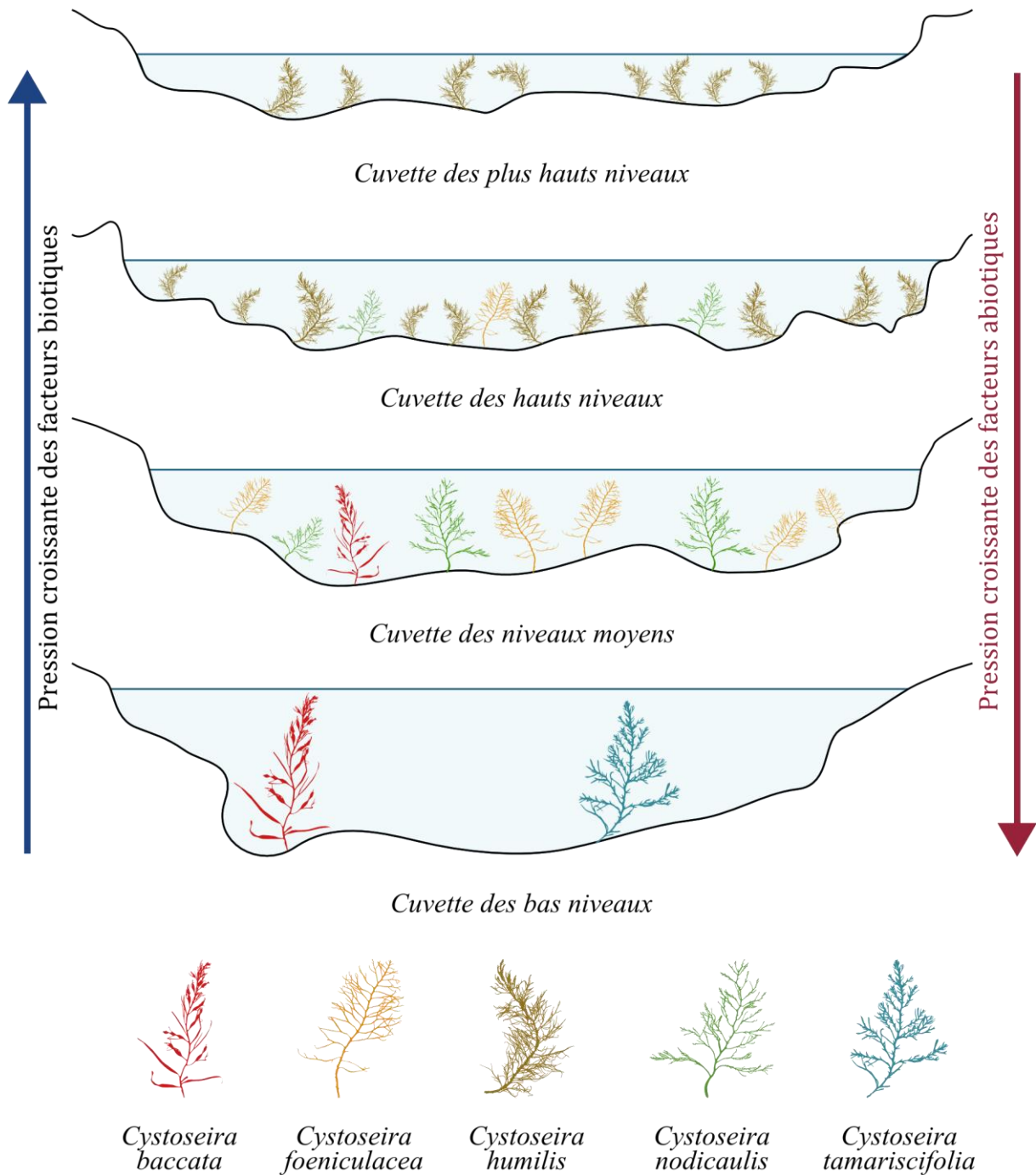


Figure 54 : Bilan de la distribution des cystoseires en Bretagne dans les cuvettes de l'estran

D'après Kemp (2009), les zones les plus hautes sur l'estran sont les plus changeantes. Nous avons illustré ce phénomène au travers de l'étude des variations de température dans les cuvettes pendant un demi-cycle de marée, plus importantes dans les cuvettes hautes à *Cystoseira humilis*. Certes, les conditions environnementales sont moins changeantes dans les

cuvettes que sur l'estran exondé. Cependant, à cause d'un temps d'émersion plus importants sur un cycle de marée, les cuvettes les plus hautes constituent le biotope le moins favorable pour l'installation de macroalgues. C'est la raison pour laquelle seules quelques espèces y sont observées (Figure 47). En conséquence, le nombre d'espèces augmente à mesure que l'on s'approche des niveaux les plus bas (Cabioc'h *et al.*, 2006 ; Araújo *et al.*, 2006), ce que nous avons pu vérifier le long du transect. Ainsi, la compétition interspécifique est plus forte sur les niveaux les plus bas.

En conclusion, il nous semble pertinent (1) d'adapter le concept de ceintures de macroalgues au cas des cuvettes de l'estran, en caractérisant chaque hauteur de l'estran par une ou deux espèces dominantes et (2) de rechercher les origines de cette zonation de la même façon que sur l'estran « exondé », par une action mêlée de facteurs biotiques et abiotiques.

En outre, les populations de cystoseires de Saint-Pierre (commune de Penmarc'h) témoignent d'un bon état écologique de la station. D'après Díez *et al.* (2012) et Juanes *et al.* (2008), la présence de cystoseires est un bon indicateur de qualité de milieu. Nous avons pu montrer (Figure 53) que les populations de cystoseires étaient plutôt stables au cours des 5 saisons d'échantillonnage. En considérant le nombre d'observations réalisées à chaque saison (Tableau 11), nous ne pouvons indiquer de réelle variation, ce qui confirme l'impression de stabilité des populations. Ce site semble particulièrement adéquat pour fournir un état zéro des estrans en Bretagne, comme préconisé par la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin.

4.2 DIFFÉRENTES RÉPARTITIONS, DIFFÉRENTES STRATÉGIES

Dans un premier temps, nous avons utilisé les résultats du suivi des populations pour caractériser les différentes cuvettes d'après leur hauteur sur l'estran (haute, médiane et basse). Nous avons observé une tendance dans l'évolution des paramètres « densité » et « taille des individus » selon les différentes cuvettes. De façon générale :

- Les plus fortes densités d'individus sont observées dans les populations des cuvettes les plus hautes, et les plus faibles densités sont mesurées dans les cuvettes proches des niveaux de basse mer.

— *A contrario*, les plus grands individus ont été recensés dans les cuvettes les plus basses, et réciproquement les cuvettes les plus hautes n'étaient constituées que de petits individus.

La variation de densité est cohérente avec les hypothèses que nous avons détaillées précédemment pour expliquer la répartition. En considérant que les cuvettes les plus hautes sont les moins propices pour les macroalgues, la richesse spécifique y est faible et la compétition interspécifique pour le substrat rocheux est presque nulle. Dès lors, *Cystoseira humilis* qui tolère ce milieu peu favorable peut s'y développer facilement, ce qui laisse la place pour de très fortes densités d'individus. La petite taille des thalles de cette algue est peut-être une adaptation à la faible profondeur des cuvettes hautes de l'estran. A l'opposé, dans les cuvettes basses où l'on trouve *C. baccata* et *C. tamariscifolia*, la compétition interspécifique pour le substrat est très forte. C'est la raison pour laquelle la densité d'individus est souvent minimale (1 individu par quadrat de 0.25 m²) dans les populations basses de *C. baccata* et *C. tamariscifolia*.

L'étude de l'indice de maturité et de la densité des populations met en évidence des différences de stratégie de colonisation entre espèces, selon leur hauteur d'installation sur l'estran. Le succès reproducteur et l'espérance de vie sont les critères qui différencient les populations.

Une analyse détaillée de la densité de la population de *Cystoseira humilis* à Penmarc'h révèle des périodes ponctuelles de fortes densités (à la fin à la fois de l'été 2009 et du printemps 2010) suivies d'un retour à des valeurs plus faibles. On peut en déduire des périodes de forte mortalité. La taille moyenne des thalles ne varie pas ; cependant, nous avons observé de grands écarts de taille entre individus, ce qui suggère la coexistence de recrues, juvéniles et adultes dans la population (confirmée par des observations personnelles). Cette coexistence justifie le fait que jamais l'indice de maturité de la population de Penmarc'h n'a été nul. La population est donc en équilibre dynamique : les individus se reproduisent rapidement, investissent beaucoup d'énergie dans la reproduction et de nombreuses plantules s'installent sur le substrat. Cependant, l'environnement très changeant doit réguler drastiquement les populations, ce qui explique la stabilité de la densité, de la taille des individus et de l'indice de maturité. Pardi *et al.* (2000) ont observé le même phénomène pour des populations de *C. humilis* en Italie, et ont montré que les populations étaient fréquemment renouvelées car l'espérance de vie des thalles ne dépassait pas deux ans.

A l'opposé, les populations de *Cystoseira baccata* sont en équilibre plus « statique ». La densité n'a quasiment pas varié au cours des saisons, et de façon générale, les individus sont peu abondants et relativement dispersés dans leur milieu. Le Lann (2009) rapporte les mêmes observations sur deux sites dans le Finistère Nord. A Penmarc'h, où la population étudiée était relativement restreinte, nous n'avons observé aucune recrue en 18 mois. La compétition pour le substrat est si forte qu'en dépit d'individus présentant perpétuellement des réceptacles, le recrutement reste nul. Dans ce contexte, les thalles doivent avoir une forte espérance de vie ; dans le cas contraire, la population serait amenée à disparaître. Les populations de *Cystoseira tamariscifolia* partagent ces traits de vie.

Nous sommes tentés de définir deux stratégies fondamentalement opposées. *Cystoseira humilis*, qui s'installe dans les cuvettes hautes de l'estran, adopterait à Penmarc'h une stratégie d'espèce colonisatrice : elle investit beaucoup d'énergie à sa reproduction, l'espérance de vie des individus est limitée, de nombreuses recrues sont produites et rapidement détruites par des conditions de vie peu propices. Pardi *et al.* (2000) considèrent en fait *C. humilis* comme une espèce « sélectionnée par l'adversité » (au sens de Whittaker & Goodman, 1979). En raison d'un environnement plutôt défavorable (mais prévisible), cette espèce connaît des épisodes de forte mortalité, mais parvient tout de même à se maintenir. Cette définition semble bien correspondre à la population de Penmarc'h.

Au contraire, *Cystoseira baccata* et *C. tamariscifolia* sont des espèces qui doivent avoir une espérance de vie plus grande, car en dépit d'un recrutement très limité, leurs effectifs restent très stables. Elles s'établissent dans un milieu où la compétition intraspécifique est maximale. La production de gamètes doit être très importante comme chez *C. humilis*, mais contrairement à cette dernière, très peu de zygotes parviennent à s'installer. Ainsi, leur stratégie s'inscrit plus sur le long terme.

On peut alors considérer que *Cystoseira nodicaulis* et *C. fœniculacea* sont dans une situation intermédiaire entre *C. baccata* et *C. humilis*, ce qui se voit au travers des résultats de densité de leurs populations.

Cependant, les explications que nous fournissons sur la densité ne sont encore que des hypothèses. En effet, s'il semble que la compétition interspécifique a un impact sur les densités de populations, nous ne pouvons prouver cette théorie sans expérimentations complémentaires. Ainsi, il serait intéressant de procéder à des manipulations d'arrachage

d'espèces compétitrices dans les cuvettes du bas de l'estran afin de vérifier si cela générerait une augmentation de la densité des populations de *C. baccata* et *C. tamariscifolia*.

4.3 LA SAISONNALITÉ, UN CARACTÈRE SPÉCIFIQUE

La phénologie des cystoseires est un élément extrêmement variable au sein du genre *Cystoseira*. *C. tamariscifolia* est l'espèce dont la saisonnalité est la plus marquée : à la fin de l'été, les rameaux secondaires deviennent sénescents puis tombent naturellement. L'espèce reste en dormance jusqu'en hiver, et reprend sa croissance jusqu'à la fin du printemps, où les premiers réceptacles commencent à poindre. Nos résultats sont identiques aux observations de [Roberts \(1970\)](#). *C. tamariscifolia* n'admet en Bretagne qu'une seule période de maturité, contrairement aux populations d'Aquitaine pour lesquelles une deuxième vague de maturité survient à l'automne ([Sauvageau, 1912](#)). Les paramètres climatiques ont sans doute une influence directe sur le développement de l'algue.

Cystoseira nodicaulis et *C. fœniculacea* sont également deux espèces saisonnières, et sont en période de repos vers le milieu ou la fin de l'été. *C. fœniculacea* devient progressivement fertile en hiver et au printemps puis ses rameaux fertiles dégénèrent en été. La phénologie est assez similaire chez *C. nodicaulis*, à ceci près que les individus deviennent plus rapidement matures, dès l'automne. Les données sont relativement cohérentes avec la littérature ([Roberts, 1977 ; 1968](#)). Cependant, de légers décalages temporels existent par rapport aux populations britanniques.

A l'opposé, *Cystoseira humilis* et *C. baccata* n'admettent pas de variations saisonnières particulières. Pour la première espèce, les générations s'enchaînent sans lien particulier avec un cycle temporel. Pour la deuxième, des individus fertiles toute l'année ont été observés à Penmarc'h ; à Porsmeur, les thalles étaient plutôt fertiles autour de l'hiver, comme observé par [Le Lann & Stiger-Pouvreau \(2009\)](#). Cependant, si [Hudson \(1778\)](#) signale des individus continuellement fertiles en Angleterre, [Roberts \(1977\)](#) rapporte des observations contradictoires. La phénologie de *C. baccata* semble donc variable selon les populations, à petite comme à grande échelle géographique.

4.4 ANALYSE QUANTITATIVE DES PIGMENTS EN LIEN AVEC LA DISTRIBUTION

L'étude présentée dans ce chapitre constitue à notre connaissance la première approche biochimique pour quantifier les pigments des cystoseires afin d'explicitier les causes (ou les conséquences) de la distribution de ces espèces sur l'estran.

Nous avons pu montrer qu'au sein du genre *Cystoseira*, la chlorophylle a, la fucoxanthine et dans une moindre mesure la chlorophylle c sont les pigments majoritaires. Des résultats similaires ont été observés chez *Laminaria saccharina* (De Martino *et al.*, 2000) et chez *Pelvetia canaliculata* (De Martino *et al.*, 1997). Cela ne semble pas étonnant puisque ces trois pigments sont ceux qui se trouvent directement impliqués dans les antennes collectrices de lumière chez les algues brunes (Alberte *et al.*, 1981). D'un point de vue quantitatif, la violaxanthine est le deuxième pigment xanthophylle derrière la fucoxanthine, et d'un point de vue qualitatif, le β -carotène est le seul représentant des carotènes. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature relatives aux pigments des algues brunes (Haugan & Liaaen-Jensen, 1994).

Par ailleurs, nous avons mis en évidence une corrélation nette entre les teneurs en chlorophylle a, chlorophylle c, fucoxanthine, violaxanthine et β -carotène. De façon générale, les cystoseires prélevées dans les niveaux les plus bas possèdent plus de pigments que les algues prélevées en position médiane ou en position haute sur l'estran. Le même phénomène a été observé chez *Ascophyllum nodosum*, entre sa limite basse et sa limite haute de répartition (Stengel & Dring, 1998). Les faibles teneurs sur le haut de l'estran peuvent s'expliquer par :

1. La forte quantité de lumière disponible à presque tout moment de la journée. Ainsi une algue installée en haut de l'estran n'est pas obligée de sur-synthétiser des pigments pour assurer sa photosynthèse ;
2. La forte quantité de rayonnements ultraviolets, qui peut faire diminuer les teneurs des principaux pigments, comme cela a été montré chez *Fucus vesiculosus* (Dohler *et al.*, 1995).

Réciproquement, les fortes teneurs des algues installées dans les niveaux les plus bas de l'estran sont liées à l'atténuation des radiations lumineuses lorsque les cuvettes sont immergées. Les algues doivent alors produire plus de pigments pour récupérer l'énergie nécessaire à leur photosynthèse.

D'après nos résultats, les teneurs en zéaxanthine évoluent différemment sur l'estran. Ce pigment est produit à partir de la violaxanthine en cas de fortes radiations lumineuses, afin de dissiper l'excès d'énergie, via le cycle des xanthophylles. Il est particulièrement sollicité dans la réponse de *Laminaria saccharina* à l'exposition à la lumière directe (Gévaert *et al.*, 2003, 2002), et encore plus chez *Pelvetia canaliculata* (Harker *et al.*, 1999). Dans le cas de cette espèce, un stock très important de violaxanthine est disponible à tout instant, et peut être transformé en zéaxanthine. Ce dernier pigment permet de dissiper un excès d'énergie lumineuse. L'importance du cycle des xanthophylles est un mécanisme photoprotecteur très efficace chez *Pelvetia canaliculata*, ce qui peut expliquer sa position haute sur l'estran.

Nous avons pu montrer que c'est la population de *Cystoseira humilis*, en position haute sur l'estran, qui présente les plus fortes teneurs en zéaxanthine. Cette espèce produit plus de zéaxanthine afin de limiter sa photosynthèse, en lien avec un surplus d'énergie lumineuse. Néanmoins, il semble étonnant que les individus de *C. nodicaulis* et *C. fœniculacea* installés en haut de l'estran n'adoptent pas cette stratégie. De plus, le stock de violaxanthine disponible n'est pas plus grand chez ces trois espèces par rapport aux autres.

Ainsi, la distribution dans les cuvettes des cystoseires s'accompagne d'une photo-adaptation. Celle-ci se concrétise par une surproduction de pigments dans les bas niveaux de l'estran, dans le but d'assurer la photosynthèse en dépit de niveaux de radiations lumineuses réduits. A l'opposé, les mécanismes de photoprotection, au travers du cycle des xanthophylles, semblent d'une importance plus réduite. La faible couche d'eau résiduelle caractéristique des cuvettes constitue probablement un filtre naturel face aux radiations lumineuses, limitant ainsi les phénomènes de surexposition à la lumière. Des analyses en conditions contrôlées ou *in situ* de la production de xanthophylles telles que décrites par Gévaert *et al.* (2003, 2002) pourraient apporter des éléments de réponse complémentaires à la question de la photoprotection dans les cuvettes de l'étage médiolittoral.

5 CONCLUSION

Cette étude écologique et chimique du genre *Cystoseira* constitue une approche originale qui combine l'analyse de la distribution, de la biologie des populations et des principaux pigments pour produire un état des lieux approfondi du mode de vie des cinq espèces sur le littoral breton.

Il ressort de notre étude de la distribution que trois espèces sont strictement inféodées aux cuvettes de l'étage médiolittoral, ce qui à notre connaissance n'avait jamais été mis en évidence chez des algues brunes. De plus, nous avons pu observer la répartition singulière des cinq espèces sur l'estran, phénomène analogue aux ceintures d'algues largement décrites sur les zones émergées de l'estran. Nous envisageons un concours de facteurs biotiques et abiotiques pour expliquer les différences de répartition. La compétition interspécifique plus accrue dans les cuvettes des bas niveaux et les conditions de vie plus variables dans les cuvettes des hauts niveaux constituent, à notre sens, des explications plausibles à la distribution observée. D'ailleurs, ces facteurs pourraient expliquer le lien qui semble exister entre la répartition sur l'estran et quelques variables d'état des populations comme la densité, plus forte au sein des populations établies dans les cuvettes hautes que dans les cuvettes basses. La stratégie de colonisation du substrat et la phénologie de chaque espèce ont également été appréhendées.

L'analyse quantitative des principaux pigments a mis en évidence une adaptation des cystoseires à la quantité de lumière disponible : les espèces les plus basses synthétisent plus de pigments afin de compenser le manque de lumière lié à des temps d'immersion plus importants. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si la vie dans les cuvettes de l'estran nécessite la sollicitation de mécanismes photoprotecteurs, comme le cycle des xanthophylles.

Si la question de la photoprotection reste ouverte en ce qui concerne les pigments, les phlorotannins sont une autre classe de molécules dont l'activité écran et le rôle photoprotecteur a été évoqué dans la littérature. Ainsi, nous nous proposons dans le Chapitre IV d'étudier les variations quantitatives et qualitatives des phlorotannins au sein du genre *Cystoseira*.

CHAPITRE IV

PHLOROTANNINS DU GENRE *CYSTOSEIRA*

1 INTRODUCTION

1.1 PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES PHLOROTANNINS

Les phlorotannins sont une famille de biomolécules caractéristique des algues brunes, issues de la polymérisation du phloroglucinol (1,3,5 trihydroxybenzène). Ils s'intègrent ainsi dans le groupe des polyphénols. Ces phlorotannins sont à la fois impliqués dans le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire des *Phaeophyceae* (Amsler & Fairhead, 2006). Dans les cellules des algues brunes, les phlorotannins sont accumulés dans les physodes, qui sont des vésicules mobiles générées par l'appareil de Golgi. Ces physodes s'agrègent le long de la paroi cellulaire, puis libèrent les phlorotannins qui participent à la construction pariétale (Schoenwaelder, 2008 et 2002).

Contrairement aux polyphénols des plantes vasculaires, qui sont issus de la voie biosynthétique du shikimate, les phlorotannins sont produits par condensation de malonate et d'acétate sous l'action d'une enzyme de type Polykétide synthase (PKS) (Arnold & Targett, 2002). La structure finale de chaque phlorotannin est fonction de trois paramètres :

1. Le degré de polymérisation, qui indique le nombre d'unités de phloroglucinol assemblées pour constituer la molécule considérée. Ce degré est extrêmement variable, et l'on retrouve aussi bien des hauts polymères (jusqu'à 650 kDa) que des oligomères (Targett & Arnold, 1998).
2. Le type de polymérisation, qui traduit le mode d'enchaînement des unités de phloroglucinol (Figure 55). Les liaisons s'opèrent de trois façons différentes, d'après Ragan & Glombitza (1986) ; Li & Glombitza (1991) et Li *et al.* (2009) :
 - a. Aryle-Aryle (C-C) dans le cas des **Fucols**,
 - b. Diaryle-Éther (C-O-C) dans le cas des **Phloréthols** et des (Iso-) **Fuhalols**,
 - c. Dibenzodioxine (C-O-C) dans le cas des **Eckols** et des **Carmalols**.
3. La présence de substitutions sur les cycles, notamment des halogénations (Koch & Gregson, 1984) et des sulfatations (Glombitza & Knöss, 1992).

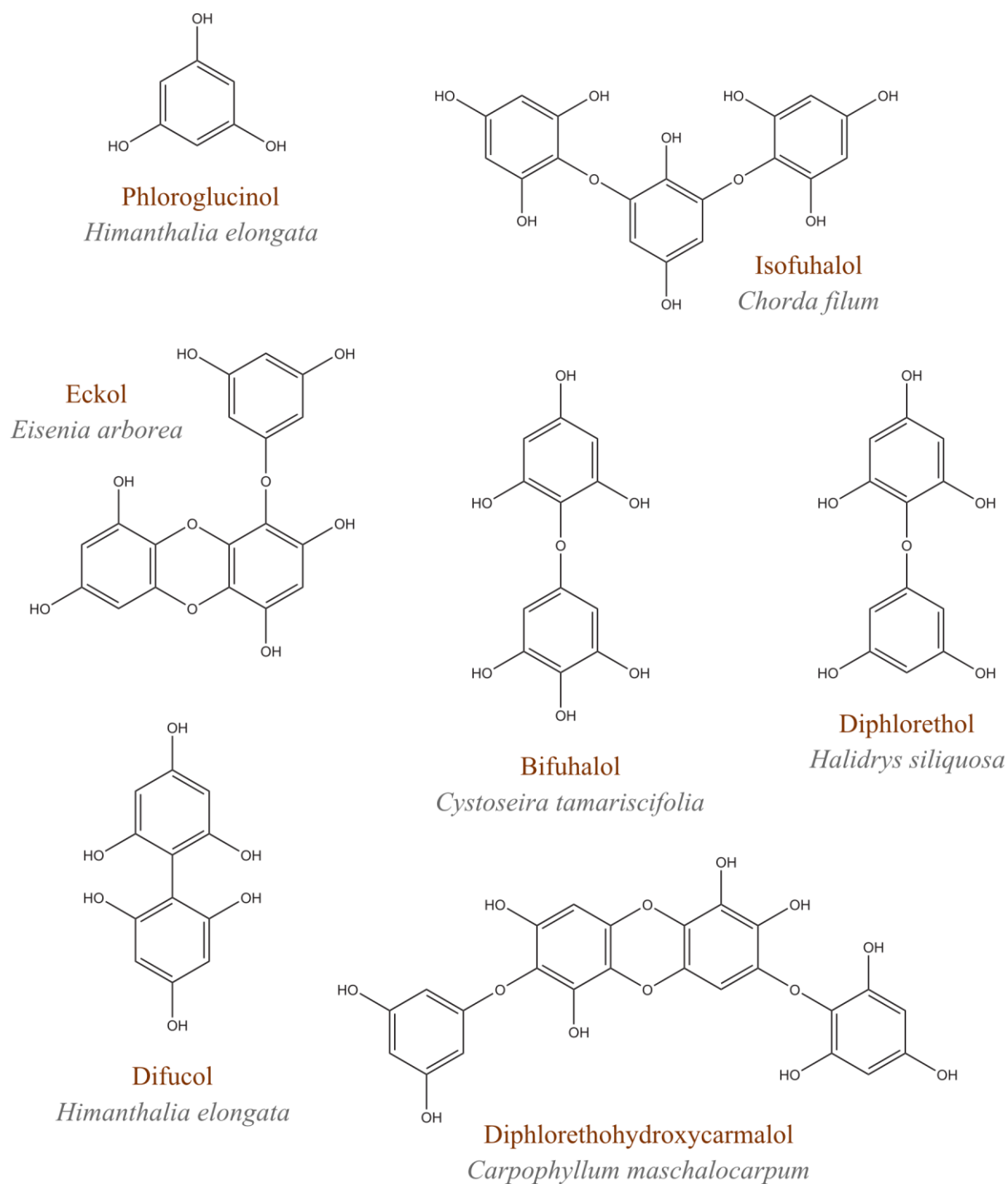


Figure 55 : Exemples du phloroglucinol et de phlorotannins isolés chez des algues brunes : types de composés et exemples d'espèces productrices (d'après Singh & Bharate, 2006)

1.2 MÉTHODES D'ANALYSE

La revue de Ragan & Glombitza (1986) permet de comprendre comment se sont forgées les connaissances que nous avons des phlorotannins. Dès le XIX^{ème} siècle, les particularités chimiques des algues brunes et de leurs extraits ont été soulignées : astringence, goût désagréable, capacité à précipiter les protéines et à fixer les ions métalliques. Toutes ces caractéristiques sont celles des tannins, polyphénols bien connus des plantes terrestres. En 1974, après analyse chimique d'extraits d'algues, Sattler propose le terme de phlorotannins pour désigner les polymères du phloroglucinol présents chez les algues brunes ayant des mêmes propriétés de tannins (Ragan & Glombitza, 1986). Depuis, on utilise cette définition dans une version plus large, qui inclut tous les polymères, y compris les oligomères qui ne présentent pas ces propriétés de tannins *sensus stricto*.

Les solvants utilisés pour extraire ces composés sont soit des mélanges alcool-eau, soit des mélanges acétone-eau, avec des quantités d'eau situées entre 20 % et 50 % (Ragan & Craigie, 1976 ; Ragan & Jensen, 1977). Les auteurs préfèrent généralement réaliser leurs extractions à partir d'algues fraîchement récoltées ou lyophilisées. L'acétone ou l'alcool présent dans le solvant est ensuite éliminé par évaporation rotative, et les composés les plus lipophiles sont éliminés par filtration ou par extraction liquide/liquide, par mélanges chloroforme/eau ou hexane/eau (Glombitza *et al.*, 1976). Les phlorotannins sont ensuite extraits de la phase aqueuse par de l'acétate d'éthyle. Ils peuvent ensuite être grossièrement séparés par chromatographie sur couche mince, ou sur colonne chromatographique utilisant des phases adaptées, type perméation de gel (Ragan & Glombitza, 1986). La séparation des différents polymères se fait sur systèmes préparatifs (Glombitza *et al.*, 1978).

De plus ces composés phénoliques sont susceptibles d'être oxydés s'ils sont exposés suffisamment longtemps à l'air libre. C'est la raison pour laquelle depuis les travaux de Glombitza & Rösener (1974), la grande majorité des auteurs transforment les phlorotannins pour empêcher ce phénomène d'oxydation non contrôlé. Ainsi, la plupart du temps, les composés sont acétylés grâce à un mélange d'anhydride acétique et de pyridine, avant d'être purifiés puis analysés (Glombitza *et al.*, 1975).

La caractérisation des phlorotannins est finalement réalisée par spectrométrie de masse, qui permet de dénombrer les cycles phénoliques, et par séquences RMN ¹H et ¹³C des fractions (Cérantola *et al.*, 2006 ; McInnes *et al.*, 1985, 1984).

1.3 RÔLES ÉCOLOGIQUES

Amsler & Fairhead (2006) ont dénombré dans la littérature plusieurs rôles écologiques à ces phlorotannins. Les résultats obtenus par des approches expérimentales sont bien souvent contradictoires, aussi il convient de les considérer avec précaution.

Les phlorotannins serviraient ainsi de défense contre les herbivores. La plupart des expériences ont porté sur le choix des herbivores entre de la nourriture enrichie ou non en phlorotannins. Cependant, les différentes études réalisées sur *Fucus vesiculosus*, dans des conditions similaires, n'ont pas abouti aux mêmes conclusions. Ainsi, Yates & Peckol (1993) ont montré que le gastropode *Littorina littorea* mange spécifiquement les tissus les moins riches en phlorotannins, tandis que l'isopode *Idotea baltica* aurait une préférence pour de la nourriture riche en phlorotannins (Jormalainen & Honkanen, 2004). De plus, la consommation de phlorotannins nuit à la digestion (Ireland & Horn, 1991) et à la reproduction de certains herbivores (Toth *et al.*, 2005).

Les phlorotannins auraient également une activité antifouling que semblent suggérer de nombreuses études (voir pour revue Ragan & Glombitza, 1986). Néanmoins, les résultats sont encore une fois très variables. De plus, la pertinence de certains tests *in vitro* pour étudier des phénomènes écologiques peut être sujette à caution (Amsler & Fairhead, 2006).

Du fait de leur absorption des radiations UV, les phlorotannins sont réputés pour être des composés photoprotecteurs. A nouveau, les résultats sont très différents d'une étude à l'autre. Par exemple, Pavia *et al.* (1997) ont montré qu'*Ascophyllum nodosum* peut synthétiser jusqu'à 30 % de phlorotannins en plus en cas d'exposition à des UV-B, alors qu'Hupel *et al.* (2011) n'ont pas constaté d'induction de leur synthèse chez *Pelvetia canaliculata* lors de traitement aux UV-B.

Enfin, les composés phénoliques des algues brunes ont la capacité de chélater les métaux lourds présents en solution. Cela a été démontré chez *Ascophyllum nodosum* et *Fucus vesiculosus* (Connan & Stengel, 2011). Toutefois, il a été montré pour certains extraits d'algues que leur capacité de chélation d'ions ferreux était indépendante de leur teneur en composés phénoliques (Wang *et al.*, 2009).

1.4 SOURCES DE VARIABILITÉ DES TENEURS EN PHLOROTANNINS

D'après nos références bibliographiques, de nombreux auteurs ont tâché d'identifier les différents facteurs de variabilité des teneurs en phlorotannins. Nous ne reprenons ici que quelques exemples de variabilité issus de la littérature, et renvoyons à [Amsler et Fairhead \(2006\)](#) pour une liste complète.

Ainsi, les teneurs en phlorotannins peuvent varier :

- Au sein d'un individu ([Connan et al., 2006](#)) ;
- Dans une même population ([Fairhead et al., 2005](#)) ;
- Entre espèces ([Connan et al., 2004](#) ; [Stiger et al., 2004](#) ; [Le Lann & Stiger-Pouvreau, 2009](#) ; [Le Lann et al., 2011](#)) ;
- Selon le stade de développement ou l'âge ([Stiger et al., 2004](#) ; [Pavia et al., 2003](#)) ;
- Entre différentes population d'une même espèce ([Stiger et al., 2004](#) ; [Plouguerné et al., 2006](#) ; [Le Lann & Stiger-Pouvreau, 2009](#) ; [Le Lann et al., 2011](#)) ;
- Selon la saison d'échantillonnage ([Connan et al., 2004](#) ; [Stiger et al., 2004](#) ; [Plouguerné et al., 2006](#) ; [Le Lann & Stiger-Pouvreau, 2009](#)).

Les facteurs pouvant influencer les teneurs en phlorotannins sont ainsi très nombreux. Avant toute étude de ces molécules, il convient donc de prendre en considération ces éléments.

1.5 PERSPECTIVES DE VALORISATION

Les phlorotannins présentent de nombreux intérêts, tout particulièrement dans le domaine médical, comme en témoignent les nombreuses études sur les phlorotannins des algues du genre *Ecklonia* et du genre *Eisenia*. [Li et al. \(2009\)](#) ont mis en évidence l'activité antioxydante de ces composés. [Kang et al. \(2005\)](#) ont observé l'induction par des eckols de mécanismes antioxydants dans des cellules de poumon chez un hamster. [Li et al. \(2011\)](#) recensent également des activités anti-VIH, anti-tumorales, antiallergiques et anti-inflammatoires. De nombreux brevets ont été déposés à l'international, dont un portant sur l'activité anti-VIH des phlorotannins d'*Ecklonia cava* ([WO/2010/064750](#)) ainsi qu'un autre relatif à la préparation d'un extrait algal à activité antioxydante ([US6774145](#)). Egalement

Zubia *et al.* (2009) présentent une valorisation de phlorotannins isolés d'algues brunes bretonnes (*Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira tamariscifolia*, *Fucus ceranoides* et *Halidrys siliquosa*) présentant à la fois de fortes activités antioxydantes et anti-tumorales.

1.6 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE DES PHLOROTANNINS DU GENRE *CYTOSEIRA*

Ce chapitre présente une étude quantitative et qualitative des phlorotannins des cinq espèces de cystoseires des côtes bretonnes.

A notre connaissance, les polyphénols de *Cystoseira fæniculacea* et de *C. humilis* n'ont pas encore été caractérisés. Les résultats obtenus pour *Cystoseira baccata*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia* seront confrontés aux données issues de la littérature (Glombitza *et al.*, 1981 ; Glombitza *et al.*, 1985 ; Glombitza *et al.*, 1975).

Notre approche se démarque par le choix d'analyser les composés dans leur état natif. En effet, la quasi-totalité des phlorotannins décrits dans la littérature ont été caractérisés après acétylation, méthylation ou peracétylation (Singh & Bharate, 2006). Ces étapes de dérivation avaient pour but de limiter la dégradation de ces composés connus pour être réactifs avec l'oxygène, et photosensibles. Aussi, au cours de nos analyses, nous avons pris soin de travailler en conditions dites « douces » : manipulations à l'obscurité, concentration des extraits à basse température, et conservation des échantillons à -20°C.

La caractérisation des phlorotannins s'inscrit dans le programme de recherches Phlorotann-ING (*cf.* Introduction générale du manuscrit), dont les attentes majeures sont, pour la partie « chimie » du projet, le développement et l'optimisation d'un protocole de purification des phlorotannins. En outre, nous serons amenés à discuter de l'intérêt des cystoseires en tant qu'espèces-modèles potentielles pour l'étude de ces composés phénoliques.

Notre approche des phlorotannins se décompose en trois volets.

Le premier est la détermination des teneurs globales en composés phénoliques de chaque espèce permettant ainsi d'appréhender la variabilité des teneurs en fonction de deux facteurs (espèce et saison d'échantillonnage). Grâce à un échantillonnage régulier couvrant 18 mois sur le site de Penmarc'h, nous avons cherché à appréhender la variabilité saisonnière

des teneurs en composés phénoliques, afin de relier ces données à la phénologie de chaque espèce, décrite au Chapitre III de ce manuscrit. Un protocole d'extraction et de pré-purification a été développé et son efficacité est évaluée par des analyses qualitative (par RMN) et quantitative (par dosage colorimétrique).

Le deuxième volet est la mise au point et l'optimisation d'un protocole avancé de purification des phlorotannins. A partir d'un protocole développé au laboratoire, un nouveau mode opératoire et de nouvelles étapes de purification sont proposés dans le but de décrire le(s) type(s) de liaisons impliquée(s) entre unités de phloroglucinol, et ainsi préciser la qualité du mélange de phlorotannins pour chaque espèce. Enfin, lorsque les quantités de phlorotannins purifiés étaient suffisantes, leur activité anti-radicalaire a été déterminée par le test de neutralisation du radical de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), d'après un protocole modifié.

Le troisième et dernier volet se situe dans la continuité des deux précédents. Après avoir caractérisé un composé phénolique majoritaire chez *Cystoseira tamariscifolia*, nous proposons deux nouvelles approches pour caractériser sa présence *in vivo* (par RMN-HRMAS) et pour le quantifier (par RMN des solutions).

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 VARIABILITÉ DES TENEURS EN PHLOROTANNINS

2.1.1 STRATÉGIE D'ÉCHANTILLONNAGE ET CONDITIONNEMENT

Le matériel végétal a été prélevé chaque mois à Penmarc'h, entre février 2009 et juillet 2010. Aucune récolte n'a eu lieu lorsqu'un trop important épiphytisme des thalles était observé. En effet, les espèces épiphytes animales et végétales sont particulièrement difficiles à décrocher du thalle-hôte sans dégrader ce dernier.

De plus, *Cytoseira fæniculacea*, *C. nodicaulis* et à plus forte raison *C. tamariscifolia* sont des espèces dont la saisonnalité est établie (voir Chapitre III). En période de sénescence (en été pour les deux premières espèces, en automne pour la dernière), les thalles sont réduits à leurs axes primaires, ou à leur disque basal, ce qui ne permet pas d'obtenir du matériel végétal en quantités suffisantes pour les extractions.

Pour toutes ces raisons, et afin de limiter l'impact de l'échantillonnage sur les populations, nous avons choisi de ne prélever que les parties terminales du thalle, qui sont régénérées chaque année. D'ailleurs, prélever mensuellement des thalles entiers n'aurait pas été possible sur 18 mois. A titre d'exemple, les populations de *Cytoseira baccata* et *C. tamariscifolia* présentent de faibles densités, des individus pérennes et un recrutement très faible (cf. résultats présentés au Chapitre III) ; ainsi, collecter des individus complets aurait détruit les populations en quelques mois.

Pour chaque espèce et pour chaque mois, l'échantillonnage a été réalisé en triplicats, chaque triplicat correspondant à un mélange de trois individus. Les triplicats sont indépendants entre eux : on ne retrouve pas dans deux triplicats des fragments issus d'un même individu.

Après récolte sur le terrain, les thalles sont débarrassés de leurs espèces épiphytes, et rincés trois fois à l'eau déminéralisée. Les échantillons sont congelés à -20°C, puis lyophilisés, et finement broyés. La poudre est conservée dans un flacon hermétique à l'obscurité avant l'extraction. Ainsi, on obtient trois lots de poudre pour chaque espèce et pour chaque mois (quand l'échantillonnage a été possible).

2.1.2 EXTRACTION DES PHLOROTANNINS

Le solvant d'extraction des phlorotannins est un mélange méthanol/eau 1:1 (MeOH50). Le protocole a été miniaturisé de façon à limiter les volumes de solvants et à faciliter la suite du protocole expérimental.

Dans un flacon à centrifuger de 30 mL, 200 mg de poudre sont extraits avec 20 mL de solvant, sous agitation magnétique et à l'obscurité. Les flacons sont disposés dans un bain-marie maintenu à 40°C (Figure 56). L'extraction dure deux heures, puis l'extrait brut est filtré sur coton de verre et centrifugé à 5000 tours/min pendant 10 min et à température ambiante. Ensuite, le méthanol qu'il contient est éliminé par évaporation rotative. Le volume est ajusté à 10 mL avec de l'eau déionisée. L'extrait brut est conservé au besoin en chambre froide à 8°C et à l'obscurité.



Figure 56 : Étapes principales de préparation de l'extrait brut en composés phénoliques

2.1.3 CHOIX DE LA MÉTHODE DE QUANTIFICATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

La méthode de quantification des phlorotannins utilisée est celle de Folin-Ciocalteu, couramment utilisée pour déterminer les teneurs en tannins de la vigne (voir paragraphe 2.1.5). Elle est, *a priori*, une des méthodes les plus efficaces pour quantifier les polyphénols, et réputée peu sensibles aux interférences pour des échantillons d'algues brunes (Van Alstyne, 1995). Cependant, certains composés non polyphénoliques apparaissent extrêmement sensibles à ce test, comme de nombreuses vitamines, des nucléotides, des acides gras, et des composés azotés (Everette *et al.*, 2010 ; Ikawa *et al.*, 2003). Nous avons donc choisi de procéder à une purification rapide des extraits bruts afin de limiter les interférences dans le dosage.

2.1.4 PURIFICATION PARTIELLE DES EXTRAITS BRUTS

D'après Ragan & Glombitza (1986), toutes les études des phlorotannins utilisent une étape de partition liquide/liquide entre l'eau et l'acétate d'éthyle (abrégé AE) afin de purifier les phlorotannins, qui ont beaucoup plus d'affinité pour l'AE, solvant organique, que pour l'eau. Au cours de nos essais, nous avons ainsi procédé à une extraction liquide-liquide entre de l'AE et l'extrait en solution aqueuse. De plus, nous avons cherché à savoir si certains composés apolaires (de nature lipidique) pouvaient également perturber les résultats du dosage. Ainsi, nous avons ensuite procédé à une partition liquide/liquide entre l'extrait (en phase aqueuse) et du dichlorométhane (DCM) afin de dégraisser l'extrait brut.

Ainsi, deux approches expérimentales ont été menées en parallèle (Figure 57).

Dans la première, les composés phénoliques sont isolés de l'extrait brut par une partition liquide/liquide eau/AE. Pour cela, 10 mL d'AE sont ajoutés à l'extrait brut, le mélange est homogénéisé, puis centrifugé à 5000 tours/min pendant 15 minutes (à 4°C). Les deux phases (Eau et AE) sont récupérées séparément. Les composés phénoliques de l'extrait brut, de la phase AE (jaune) et de la phase aqueuse (rouge) sont dosés, et les deux phases sont analysées par RMN (Figure 57, voie de gauche).

Dans la deuxième démarche, l'extrait brut est d'abord soumis à un nettoyage, par une extraction liquide-liquide au DCM : 10 mL de ce solvant sont ajoutés à l'extrait, le tout est homogénéisé, centrifugé à 5000 tours/min pendant 15 minutes (à 4°C). La phase DCM apolaire est éliminée. C'est seulement après cela que l'extrait (dégraissé) est soumis à une extraction de ses composés phénoliques par de l'AE. Les teneurs en composés phénoliques de l'extrait brut, de la phase aqueuse et de la phase AE sont également déterminées (Figure 57, voie de droite).

Ces deux approches ont été expérimentées sur des échantillons des cinq espèces prélevés en novembre 2009 à Penmarc'h. Les résultats de dosage et les analyses RMN ont été confrontés afin de déterminer l'efficacité de la purification et également de vérifier la pertinence des deux étapes de partition liquide-liquide. En conclusion, un protocole est retenu et appliqué à l'ensemble des échantillons collectés pendant le suivi écologique : depuis le mois de février 2009 jusqu'à juillet 2010.

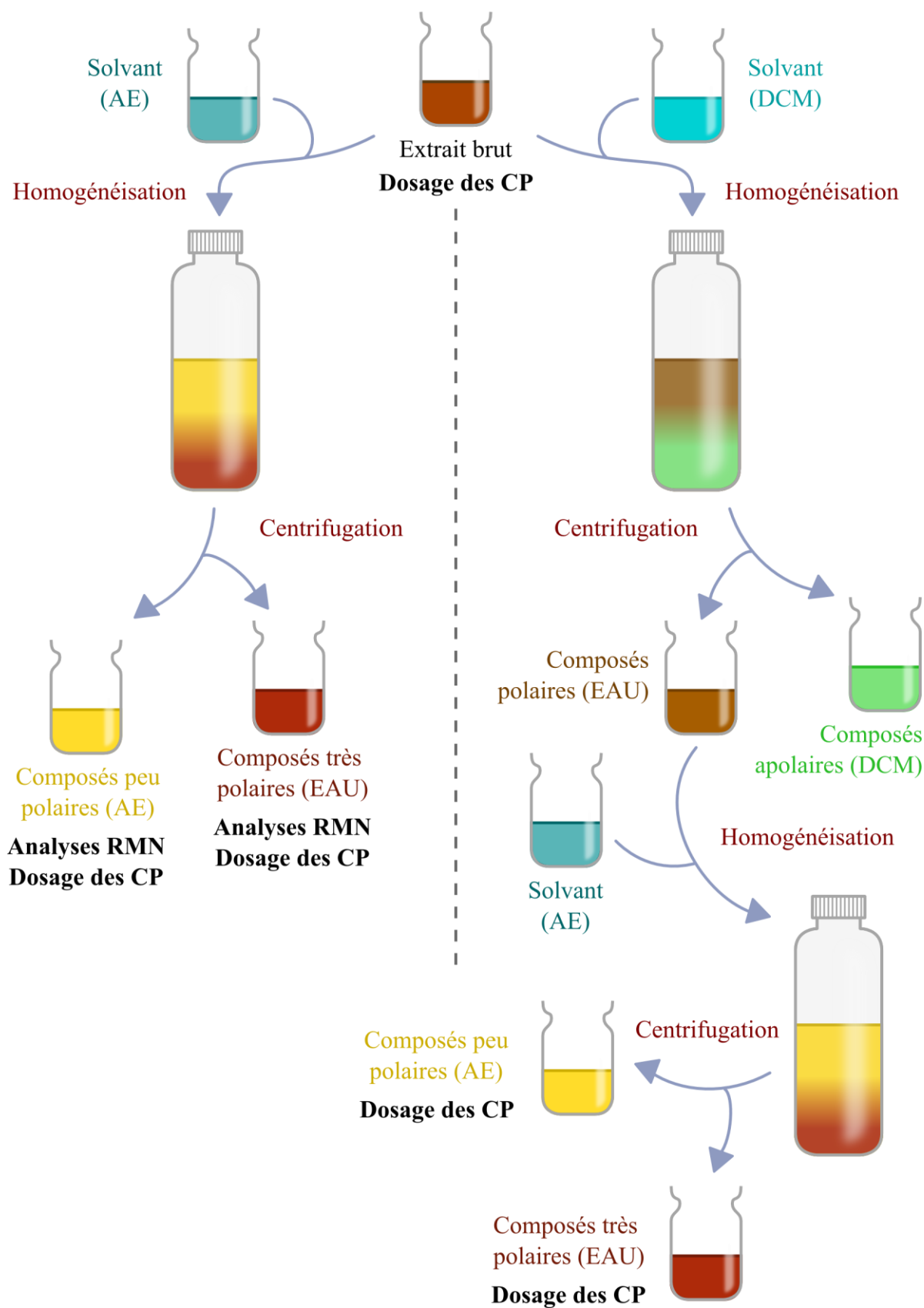


Figure 57 : Approches envisagées pour purifier partiellement les phlorotannins avant leur dosage par la méthode de Folin-Ciocalteu

2.1.5 DOSAGE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES PAR LA MÉTHODE DE FOLIN-CIOALTEU

Les teneurs en polyphénols de chaque extrait sont déterminées en suivant une méthode colorimétrique adaptée de celle de Folin-Ciocalteu par [Van Alstyne \(1995\)](#), et dont le protocole est détaillé en Figure 58. Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué en majeure partie d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Les composés phénoliques réduisent spécifiquement ce mélange en oxydes de tungstène et de molybdène, caractérisés par une couleur bleue. Cette réaction a lieu en milieu basique, c'est pourquoi est ajouté du carbonate de sodium. Le lithium sulfate présent dans le réactif de Folin-Ciocalteu limite la formation de précipités. La quantité d'oxydes métalliques formés est ainsi proportionnelle à la quantité de cycles phénoliques oxydés. L'absorbance de ces composés est mesurée à 750 nm. L'utilisation d'une gamme de différentes concentrations de phloroglucinol permet de rapporter les résultats en termes d'équivalents de cette molécule.

A l'issue du dosage, les teneurs sont exprimées relativement à la matière sèche, c'est-à-dire sous forme d'un rapport entre la quantité de phlorotannins (en g) et la quantité de poudre d'algue utilisée pour l'extraction (en g). Classiquement, les données sont indiquées en % MS (pourcentage de matière sèche).

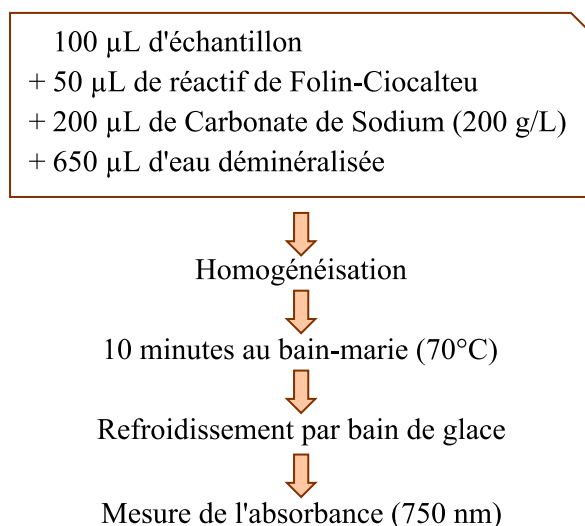


Figure 58 : Protocole de dosage des phlorotannins selon la méthode de Folin-Ciocalteu

2.1.6 ANALYSE STATISTIQUE DES DONNÉES

Les différences de teneurs en composés phénoliques, déterminées pour chaque espèce au travers du suivi mensuel entre février 2009 et juillet 2010, ont été mises en évidence par analyses de variance et tests *a posteriori* (Tukey's Honestly Significant Difference). Les conditions de validité de l'analyse que sont l'homoscédasticité et la normalité des données ont été vérifiées respectivement par les tests de Levene et de Shapiro-Wilk. En cas de rejet de l'une de ces hypothèses, les données ont été transformées mathématiquement (par fonction racine ou arcsinus). Si les hypothèses n'étaient toujours pas satisfaites, un test non paramétrique (type Kruskal-Wallis) et un test de comparaison multiple adapté ont été appliqués aux données : Kruskal Multiple Comparison, package *kruskalmc* du logiciel R (R Development Core Team, 2011).

Au cours de nos analyses, nous avons cherché à déterminer la variabilité interspécifique des teneurs en composés phénoliques. Nous avons donc commencé par une analyse des teneurs en fonction du seul facteur « espèce ». Ensuite, pour chaque espèce, nous avons cherché à déterminer d'éventuelles variations saisonnières. Aussi, nous avons procédé pour à des analyses à un facteur, en étudiant les variations des teneurs en fonction du facteur « saison ». Nous avons regroupé les données mensuelles en données saisonnières, selon la correspondance suivante : printemps : de février à avril ; été : de mai à juillet ; automne 2009 : d'août à octobre ; hiver : de novembre à janvier.

2.2 CARACTÉRISATION STRUCTURALE DES PHLOROTANNINS DU GENRE *CYTOSEIRA*

2.2.1 ÉCHANTILLONNAGE

Pour pouvoir purifier, fractionner et caractériser la structure des phlorotannins, il est préférable de travailler à partir de grandes quantités de matière végétale. Nous avons donc récolté les espèces à différents moments de l'année, en privilégiant les moments de fin de croissance chez les espèces saisonnières. Ainsi *Cystoseira baccata* a été échantillonnée à Penmarc'h en juillet 2009, *C. fœniculacea*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia* en mai 2009, et *C. humilis* en novembre 2009. Les algues ont été nettoyées, lyophilisées puis broyées en une fine poudre, qui a été conservée au congélateur jusqu'à l'extraction.

2.2.2 EXTRACTION DES PHLOROTANNINS

Le protocole d'extraction utilisé pour les expériences de caractérisation des phlorotannins est similaire à celui évoqué au paragraphe 2.1.2 de ce chapitre. Il a été adapté pour de grandes quantités de matière et de grands volumes de solvant. Ainsi pour chaque espèce, 50 g de poudre d'algues sont extraits avec 5 L de MeOH 50, pendant 3 heures, à 40°C au moyen d'un agitateur à pales. L'extrait est récupéré, conservé temporairement à -8°C, et la poudre est ré-extraite deux fois. Les trois extraits sont rassemblés, filtrés et centrifugés. Enfin, le méthanol est éliminé par évaporation rotative, et le volume final est réduit à 400 mL d'extrait en solution aqueuse. Il est techniquement impossible de purifier directement de grands volumes d'extraits, nous avons donc commencé par répartir équitablement l'extrait brut dans 4 flacons à centrifuger de 250 mL en Téflon.

2.2.3 PURIFICATION ET FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT

Un synoptique du protocole de purification est proposé en Figure 59 afin d'en faciliter la compréhension. Dans ce schéma comme dans les explications qui suivent, nous détaillons les manipulations opérées sur l'un des quatre flacons à centrifuger, et son « parcours » dans le protocole.

Extraction liquide-liquide : eau/dichlorométhane

Le dichlorométhane est utilisé pour sa capacité à solubiliser les composés apolaires, et notamment les pigments (chlorophylle a, fucoxanthine, etc.), les stérols, et diverses formes de lipides.

Dans chaque flacon, 100 mL de dichlorométhane (DCM) sont ajoutés aux 100 mL d'extrait brut. L'ensemble est homogénéisé, puis l'émulsion est rompue par centrifugation (4000 tours/min à 0°C, pendant 45 minutes), et deux phases (eau et dichlorométhane) sont individualisées. Ce lavage est réalisé trois fois : d'abord sur l'extrait brut, puis sur la phase aqueuse résultant du premier lavage, et enfin sur la phase aqueuse issue du deuxième lavage. Les phases DCM sont rassemblées avant analyse en RMN. La dernière phase aqueuse est récupérée, et son volume est réduit à 60 mL avant de procéder à l'étape suivante.

Précipitation à l'éthanol

L'ajout d'éthanol permet de diminuer la polarité du solvant final. De ce fait, certains dérivés osidiques et protéiques deviennent insolubles dans un mélange hydroéthanolique, et forment des précipités dont le développement est favorisé à basse température. La centrifugation permet ensuite de séparer les composés solubles, dont les phlorotannins, de ceux qui ne le sont pas.

Ainsi, 180 mL d'éthanol sont mélangés aux 60 mL d'extrait. Les flacons sont ensuite placés à -20°C pendant 3 heures. Après cela, les flacons sont centrifugés (4000 t/min, 0°C, 15min) et les résidus solides sont éliminés. Cette centrifugation-élimination des précipités est répétée 2 fois. A nouveau, les précipités sont analysés en RMN. En dernier lieu, les solutions hydroéthanoliques sont concentrées et leur volume est réduit à 60 mL de solution aqueuse.

Précipitation à l'acétone

La démarche est rigoureusement identique à celle utilisée pour la précipitation à l'éthanol. Tout comme l'éthanol, l'acétone modifie la polarité du solvant final, et permet d'exclure de la solution certaines molécules. L'éthanol et l'acétone sont deux solvants utilisés de manière complémentaire pour faire précipiter un maximum de composés osidiques et protéiques.

En fin de manipulation, l'acétone est éliminée de la solution par évaporation rotative, et le volume d'eau est complété à 100 mL.

Extraction liquide-liquide : eau/acétate d'éthyle

Dans chaque flacon, 100 mL d'acétate d'éthyle (AE) sont ajoutés aux 100 mL d'extrait en solution aqueuse. Les deux phases sont vigoureusement mélangées, puis séparées par centrifugation (4000 t/min, 0°C, 15 min). La phase AE est récupérée et stockée temporairement au froid, tandis que la phase aqueuse est ré-extraite deux fois à l'AE. Les trois phases AE obtenues sont ensuite rassemblées, puis l'AE est totalement évaporé. Les produits

secs sont alors re-solubilisées dans un 1 mL d'éthanol. Cette solution très concentrée est ensuite diluée avec 99 mL d'eau.

D'après la littérature, les phlorotannins sont facilement extractibles dans de l'AE. Une fois isolés dans ce solvant, ils sont moins solubles dans l'eau (observation personnelle), c'est la raison pour laquelle on utilise un peu d'éthanol pour les récupérer avant de les diluer dans de l'eau. En effet, l'étape suivante de purification est une extraction liquide-liquide au dichlorométhane (DCM). L'AE étant parfaitement miscible au DCM, nous avons dû le remplacer par de l'eau afin d'obtenir deux phases non miscibles.

Extraction liquide-liquide : eau/dichlorométhane

Cette étape est la même que la première du protocole. Elle a pour but de dégraisser davantage l'extrait. La phase aqueuse est récupérée, le solvant est entièrement évaporé et les produits sont solubilisés dans un volume minimal d'acétate d'éthyle (autour de 10 mL).

Fractionnement sur colonne de silice

Une colonne de 50 g de silice (Silice en phase normale, 0.63-0.200 mm, Merck) est conditionnée dans de l'acétate d'éthyle. L'échantillon est déposé en haut de colonne, et trois fractions sont récupérées par élution à (1) l'acétate d'éthyle, (2) l'éthanol et (3) au méthanol.

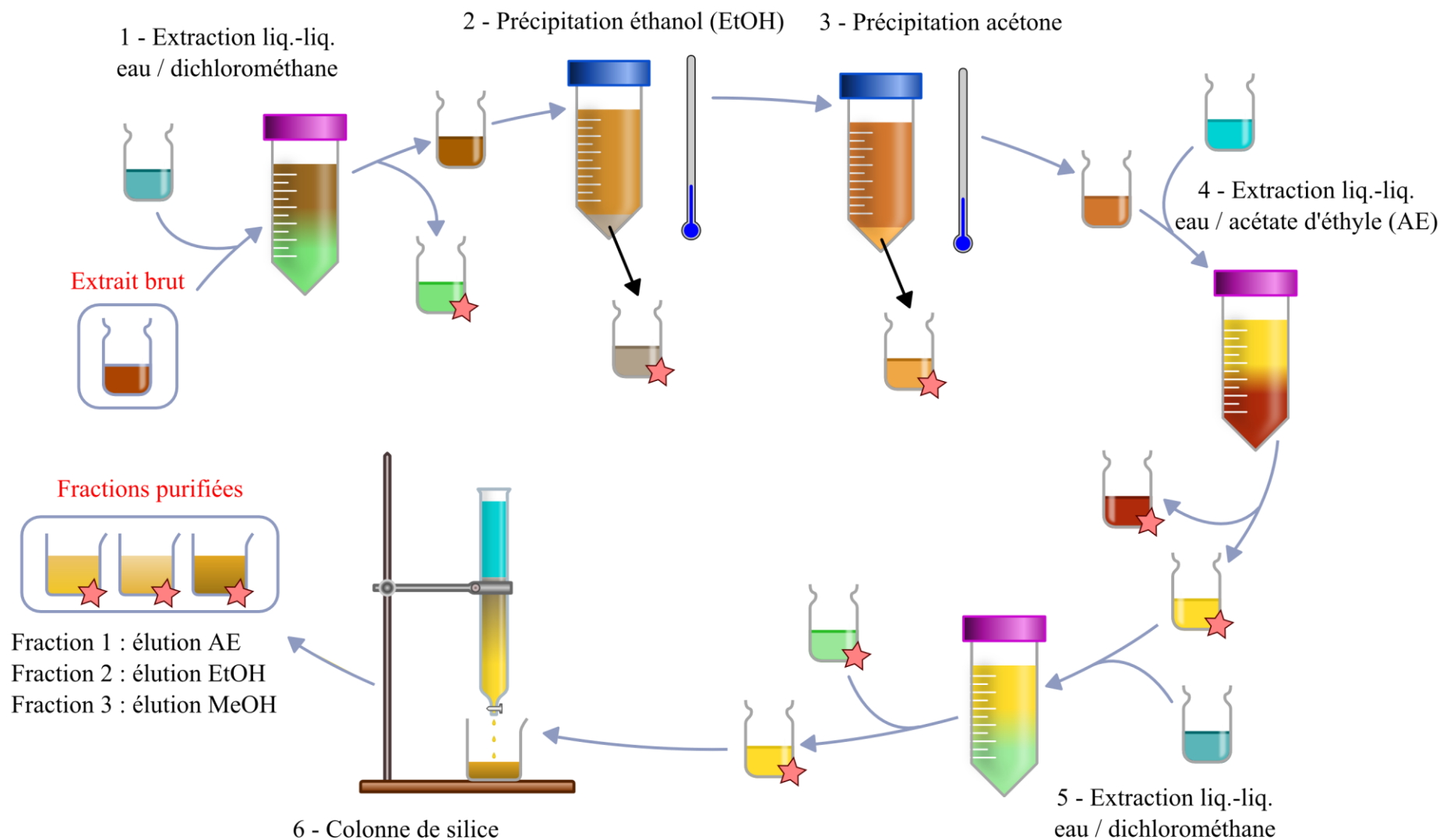


Figure 59 : Synoptique du protocole de purification avancée des phlorotannins. Les fractions analysées par RMN sont indiquées par des étoiles rouges.

2.2.4 ANALYSES PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE

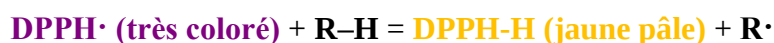
A chaque étape du protocole de purification, un suivi a été assuré par des analyses des différentes fractions, précipités, et lavages, par analyses en RMN ^1H 1D, sur un spectromètre BRUKER DRX 400 MHz avec une sonde accordable multinoyaux à triple résonance (acquisition réalisées à 25°C). Pour chaque espèce, la fraction la plus intéressante a été caractérisée en RMN 2D ^1H - ^{13}C par séquence de corrélation hétéronucléaire sur liaisons multiples (HMBC) sur un spectromètre BRUKER DRX 500 Mhz équipé d'une cryosonde.

La séquence HMBC permet de déterminer les corrélations entre ^1H et ^{13}C à plus de 2 ou 3 liaisons. L'intérêt est ici de montrer la proximité entre des protons aromatiques compatibles avec des phlorotannins ($5.7 \text{ ppm} \leq \delta \text{ } ^1\text{H} \leq 6.5 \text{ ppm}$) avec les carbones des cycles phénoliques, et tout particulièrement ceux impliqués dans la liaison entre unités de phloroglucinol, ce qui permet de déterminer les grands types de phlorotannins dans chaque espèce (Cérantola *et al.*, 2006).

2.2.5 DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ANTIRADICALAIRE DES FRACTIONS PURIFIÉES

Suite à l'obtention de fractions purifiées de phlorotannins, la recherche d'une activité antiradicalaire, associée aux fractions, a été menée.

Le test utilisé est une adaptation du protocole du 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl proposé pour la première fois par Blois (1958). Le principe est de faire réagir un oxydant puissant et coloré [DPPH $\cdot$] avec un ou plusieurs réducteur(s) présent(s) dans l'extrait [R-H], et de suivre la neutralisation du radical par la décoloration du milieu réactionnel :



La coloration violette intense est le fait de l'électron célibataire délocalisé sur l'ensemble de la molécule, qui donne au radical un maximum d'absorbance à 517 nm. La coloration jaunâtre facilement observable sur la forme réduite de la molécule est caractéristique du groupement picryl (Molyneux, 2004). Classiquement, la détermination de l'activité antiradicalaire se fait par le calcul d'un pourcentage d'inhibition I défini ci-après, avec A_0 l'absorbance à 517 nm d'un mélange radical/solvant, et A_C l'absorbance du mélange radical/extrait à une concentration donnée.

$$I = 100 \times (A_0 - A_C) / A_0$$

Cette construction apparaît limitée. En effet, avec ce calcul le niveau de 100 % d'inhibition n'est jamais atteint. Il faudrait pour cela obtenir $A_C = 0$, ce qui est impossible puisque à l'état réduit, le DPPH-H possède une couleur jaunâtre, qui représente environ 10 à 15 % de l'absorbance du radical à 517 nm (observation personnelle). Le choix a été fait d'utiliser des courbes de décoloration pour déterminer l'activité antiradicalaire de nos extraits, afin de s'affranchir de ce problème et de déterminer le réel EC_{50} , concentration efficace qui neutralise 50 % du radical.

La méthode consiste en l'utilisation d'une gamme de solutions d'extrait ou de fraction à tester, de concentrations variables, mises en présence d'une solution de radical (de concentration fixe). La neutralisation de cet oxydant entraîne une décoloration du mélange, plus importante pour des concentrations d'extraits plus fortes. Cela est valable jusqu'au moment où toute la quantité initiale de radical est réduite, de sorte que l'utilisation d'un extrait plus concentré ne décolorera pas davantage le milieu réactionnel. Dans notre étude, 300 μ L d'échantillon (phlorotannins purifiés ou témoins positifs) sont ajoutés à 600 μ L de solution de DPPH $\cdot$ à 0.1 mmol/L. Le milieu est homogénéisé, et son absorbance est déterminée au bout d'une heure, à 517 nm.

Dans la pratique, pour réaliser le test d'activité antiradicalaire, nous avons dû répéter la manipulation pour chaque échantillon. En effet nous ne devons pas utiliser une gamme de concentrations trop fortes. Si toutes les concentrations en fractions (et donc en phlorotannins) sont trop fortes, alors peu importe la dilution, le radical est complètement réduit (inhibition à 100 %), ce qui ne permet pas de déterminer la concentration efficace à 50%. A l'opposé, si les échantillons sont trop dilués, le radical n'est presque pas réduit, et on n'atteint jamais 50% d'inhibition. Il nous a donc fallu multiplier les tentatives pour déterminer de bonnes gammes de concentrations pour chaque fraction testée.

2.3 ÉTUDE DU POOL DE PHLOROTANNINS CHEZ *CYSTOSEIRA TAMARISCIFOLIA*

L'étude présentée au Chapitre II de ce manuscrit nous a permis, en plus d'affiner la taxinomie du genre *Cystoseira*, d'explorer la composition chimique des espèces par l'obtention de spectres RMN *in vivo*. Nous présentons en Figure 60 les résultats de composition globale de chaque espèce.

Chez *Cystoseira baccata*, *C. fœniculacea*, *C. humilis* et *C. nodicaulis*, nous avons observé une multitude de signaux dans la zone des phlorotannins, plus ou moins bien définis. A l'opposé, chez *C. tamariscifolia*, nous avons pu souligner la présence d'un singulet très bien défini à 6.00 ppm (Figure 60). Nous avons choisi de concentrer nos efforts sur le composé à l'origine de ce signal, en l'identifiant et en proposant une nouvelle démarche afin de caractériser sa présence *in vivo*, et de le quantifier directement par analyse d'extraits en RMN des solutions.

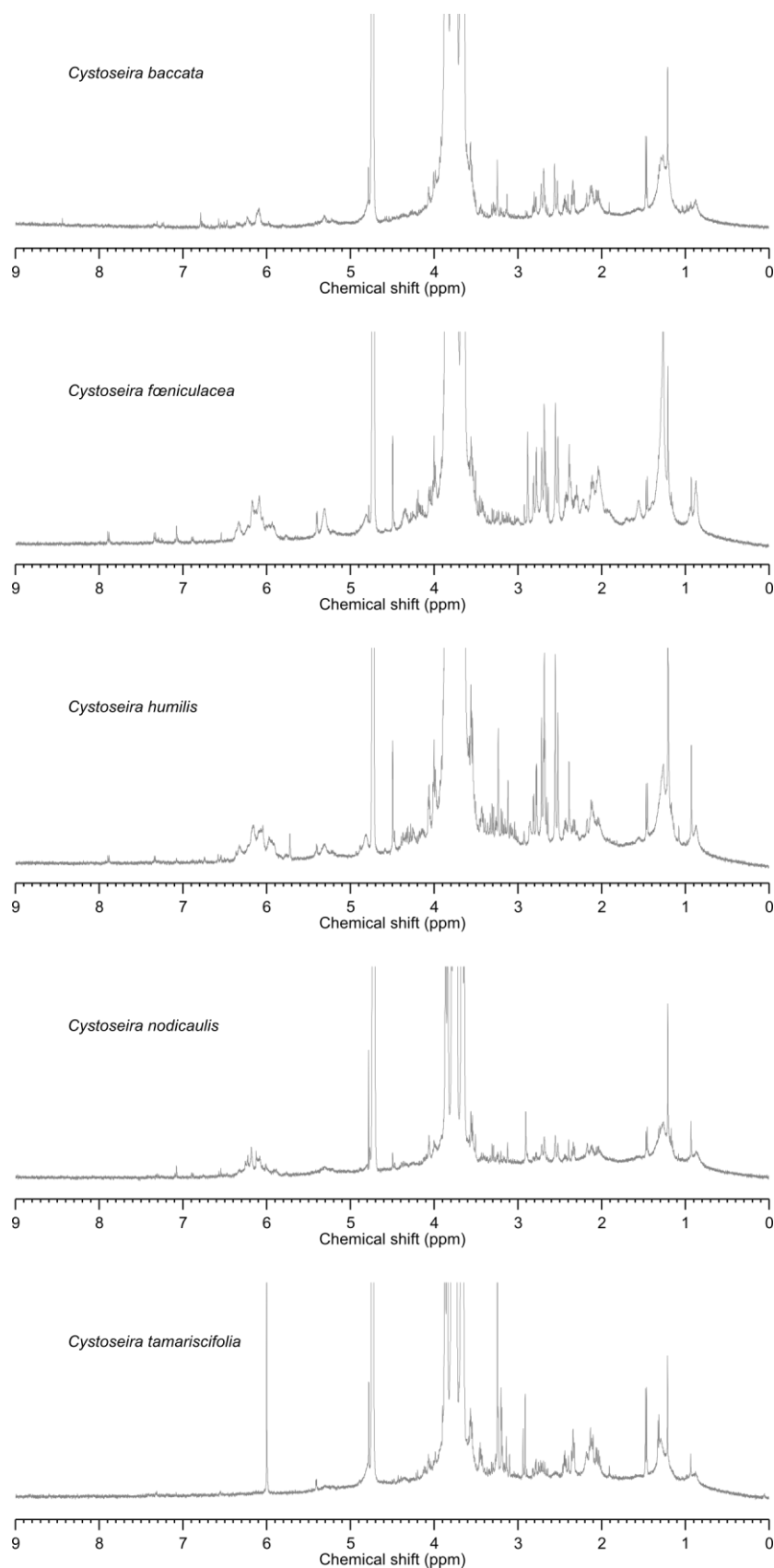
2.3.1 IDENTIFICATION DU PHLOROGLUCINOL

Le phloroglucinol a été caractérisé par Résonance Magnétique Nucléaire, via l'enrichissement d'un extrait brut de *Cystoseira tamariscifolia*. La démarche est la suivante :

1. Un tube RMN contenant un extrait brut est préparé, et analysé en RMN ^1H .
2. Dans le même tube, on ajoute quelques milligrammes de phloroglucinol, on homogénéise et on réitère l'analyse.

Si l'extrait brut contient du phloroglucinol, l'enrichissement a deux conséquences :

1. Aucun signal supplémentaire n'apparaît sur le spectre suite à l'enrichissement,
2. Un signal est amplifié dans la zone des protons aromatiques.



2.3.2

Figure 60 : Spectres RMN ^1H HR-MAS de rameaux apicaux prélevés sur chaque espèce de cystoseire, d'après Jégou *et al.* (2010)

2.3.3 VARIABILITÉ INTRA-INDIVIDUELLE

La question de la variabilité intra-thalle des teneurs en composés phénoliques chez les algues brunes n'admet pas de réponse absolue. A titre d'exemples, chez *Desmarestia menziesii*, les teneurs sont identiques dans le crampon, l'axe primaire et les latérales (Fairhead *et al.*, 2005), tandis que chez *Ecklonia radiata*, de nettes différences ont été observées entre les organes constituant le thalle (Steinberg, 1989). En Bretagne, Connan *et al.* (2006) ont observé des variations de teneurs en composés phénoliques au sein des thalles de *Laminaria digitata* et *L. hyperborea*.

Nous avons caractérisé la production de phloroglucinol chez *Cytoseira tamariscifolia*, en différenciant l'axe primaire basal de ses rameaux apicaux. En effet, chez cette espèce, on peut aisément distinguer l'équivalent d'une tige, qui représente la partie pérenne du thalle, et des rameaux, renouvelés de façon saisonnières (Cabioc'h *et al.*, 2006).

A partir de trois thalles lyophilisés, deux lots ont été préparés (constitués chacun de répliquats) et broyés. Nous avons ainsi obtenu 6 échantillons de poudre (3 « axes primaires », 3 « rameaux ») que nous avons utilisés pour des extractions, selon le protocole présenté à la Figure 61.

Ensuite, le phloroglucinol a été dosé par analyse en RMN. Cette méthode de dosage originale utilise un système d'étalonnage interne pour quantifier des molécules grâce à l'intensité de leurs signaux RMN.

Une quantité connue d'acide triméthylsilyl-propionique (TSP), présenté sous sa forme de sel de Sodium en Figure 62, est ajoutée au tube analysé. Ce composé apparaît sur le spectre sous forme d'un singulet à 0 ppm, que l'on doit aux 9 protons des 3 groupements méthyles de la molécule.

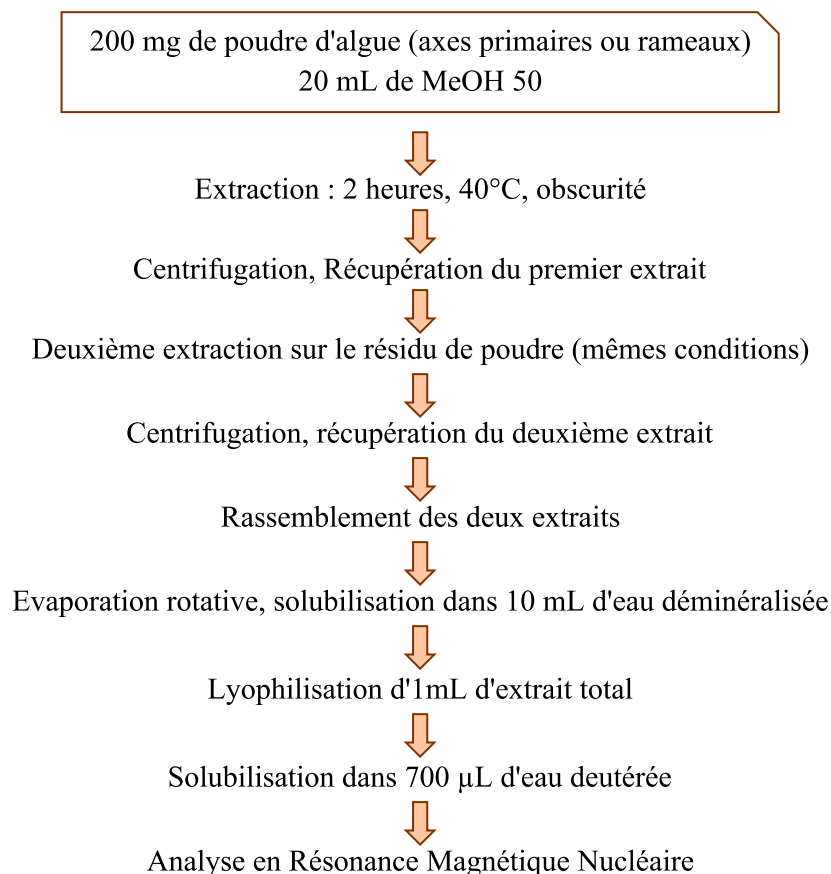


Figure 61 : Protocole de préparation d'échantillons en vue du dosage par RMN

Le phloroglucinol, mis en solution dans du D₂O, va échanger ses protons labiles (portés par les fonctions « phénol ») avec l'eau deutérée. Il en résulte que dans l'immense majorité des molécules en solution, le phloroglucinol n'est plus composé que de 3 atomes d'hydrogènes, et ce sont eux qui génèrent le signal caractéristique à 6.00 ppm.

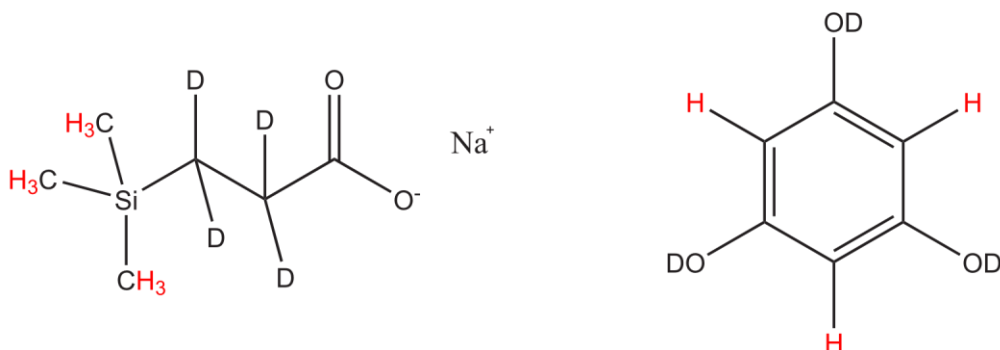


Figure 62 : Triméthylsilyl-propionate-d₄ de Sodium (à gauche) et phloroglucinol (à droite) en solution dans du D₂O. Les atomes d'Hydrogène détectés par RMN sont indiqués en rouge.

L'expérience RMN utilisée ici requiert des délais assez grands entre chaque acquisition de signaux magnétiques, de façon à ce que tous les noyaux puissent revenir à leur état initial par un phénomène de relaxation, après que le champ magnétique secondaire ait été appliqué. Avec ces précautions, on s'assure que pour toutes les molécules analysées dans l'échantillon, l'intensité des signaux est directement proportionnelle à la quantité de protons impliqués.

Ici, connaissant la quantité de TSP rajoutée dans l'échantillon, on connaît la quantité de protons qui génèrent le signal observé à 0 ppm. On peut donc établir la relation de proportionnalité entre « aire d'un pic » et « quantité de protons impliqués ». En mesurant l'intensité du pic de phloroglucinol (singulet à 6.00 ppm), on peut déduire la quantité de protons impliqués (en mol). Sachant que 3 protons résonnent pour 1 molécule de phloroglucinol en solution dans le D₂O (Figure 62), on peut ainsi en déduire la quantité de phloroglucinol dans l'échantillon dosé par RMN, puis dans l'extrait, et au final déterminer la teneur en phloroglucinol de l'échantillon.

2.3.4 VARIABILITÉ SAISONNIÈRE

Suite à l'étude présentée au Chapitre II de ce manuscrit, où nous avons montré que le singulet à 6.0 ppm (qui caractérise le phloroglucinol en solution aqueuse) était un marqueur chimiotaxinomique potentiel de *Cytoseira tamariscifolia* (Jégou *et al.*, 2010), nous avons analysé la variabilité temporelle de ce marqueur, d'abord en vérifiant s'il était détectable par analyse d'un fragment d'algue en RMN *in vivo* ¹H HR-MAS à tout moment de l'année. Ainsi chaque mois entre février 2009 et juillet 2010, nous avons analysé un rameau terminal de *C. tamariscifolia*, afin de vérifier si ce composé est bien un métabolite « omniprésent » chez cette espèce.

Nous avons ensuite quantifié les variations saisonnières des teneurs en phloroglucinol chez *Cytoseira tamariscifolia*. Nous avons échantillonné l'algue pendant sa saison de développement (de février à août, voir Chapitre III), en 2009 et en 2010. Nous avons dosé ce composé par RMN des solutions, selon le protocole présenté en page 236.

3 RÉSULTATS

3.1 DÉTERMINATION DES TENEURS EN PHLOROTANNINS

3.1.1 CHOIX DU PROTOCOLE D'EXTRACTION-PURIFICATION

Résultats de la méthode de Folin-Ciocalteu

La Figure 63 indique les teneurs en composés phénoliques (CP) de chaque espèce, calculées d'après les résultats de dosage des extraits bruts, des phases aqueuses, et des phases AE, d'après les deux protocoles (avec ou sans lavage au dichlorométhane). Les résultats sur les graphiques sont à analyser de la façon suivante. En dosant les composés phénoliques de l'extrait brut de *Cystoseira baccata*, on aboutit à une teneur moyenne de 4 % de composés (en équivalent de phloroglucinol). Si l'on considère que seule la phase aqueuse contient des composés phénoliques, le résultat de dosage indique une teneur moyenne de 3.4 %. En supposant que tous les composés phénoliques se retrouvent solubilisés dans l'acétate d'éthyle, la teneur de *C. baccata* se situe autour de 0.1 %.

De façon générale, on peut noter pour chaque espèce que le protocole employant un lavage au DCM n'apporte rien de particulier, puisque quel que soit le protocole utilisé, les résultats sont comparables (Figure 63). Ainsi, en se basant sur les résultats du dosage des CP par la méthode de Folin-Ciocalteu, avec ou sans lavage au DCM, *Cystoseira fæniculacea* et *C. humilis* ont les phases aqueuses les plus riches en composés phénoliques, suivies de *C. baccata* ; *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia* ont les teneurs les plus faibles. Au contraire, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia* ont les teneurs en composés phénoliques les plus fortes dans les phases AE, et les trois autres espèces apparaissent moins riches.

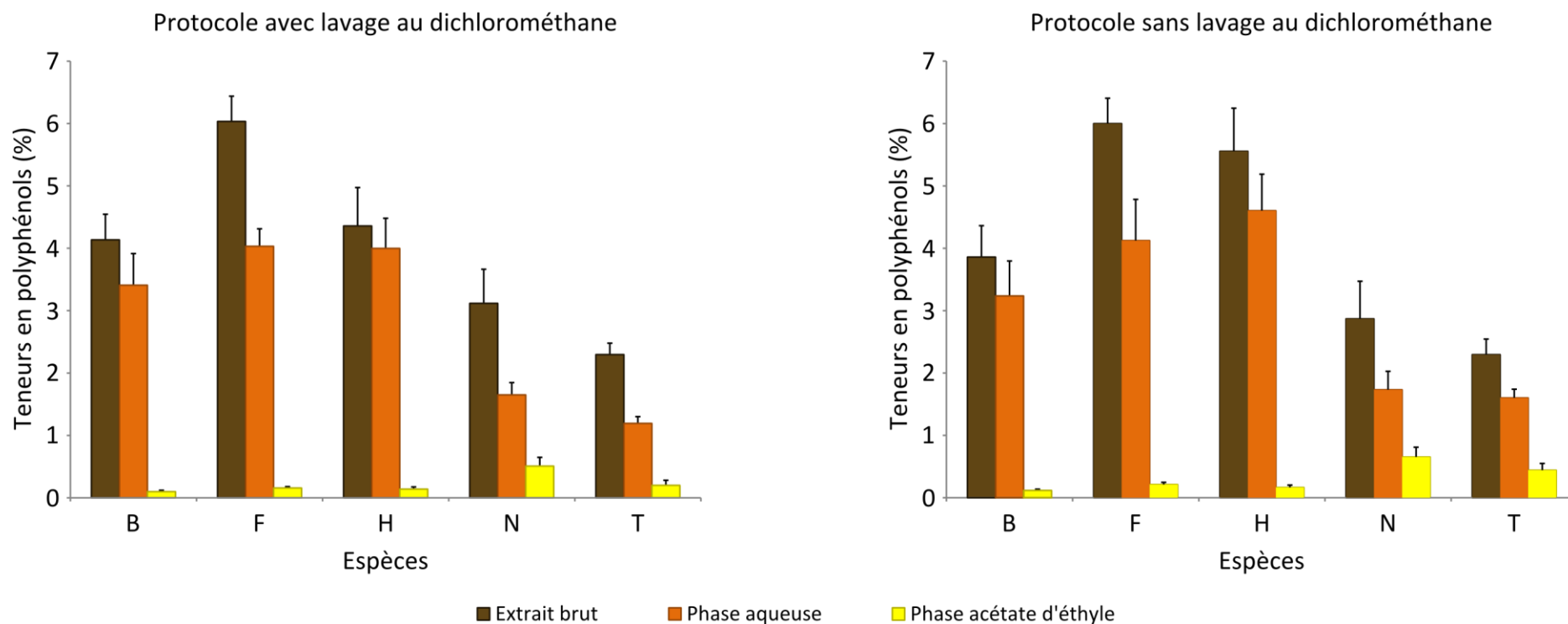


Figure 63 : Teneurs en composés phénoliques (moyenne + écart-type, données en pourcentage de matière sèche), en équivalent de phloroglucinol, pour les différentes phases et extraits, chez les cinq espèces de *Cystoseira*. B : *C. baccata* ; F : *C. faeniculacea* ; H : *C. humilis* ; N : *C. nodicaulis* ; T : *C. tamariscifolia*.

Résultats d'analyses RMN

Depuis la Figure 64 jusqu'à la Figure 68 sont présentés les spectres RMN des phases « aqueuses » et des phases « acétate d'éthyle » dont les composés phénoliques ont déjà été dosés selon la méthode de Folin-Ciocalteu. De façon simple, notre attention se portera sur la présence de signaux dans la zone caractéristique des phlorotannins entre 5.7 et 6.5 ppm.

Les deux phases se distinguent par la polarité du solvant utilisé. Concernant les cinq espèces, on observe de nombreuses similitudes en ce qui concerne la répartition des molécules entre les deux phases, « aqueuse » et « AE ».

La phase aqueuse se caractérise toujours par la présence d'un composé majoritaire, le mannitol, qui est le sucre-alcool de réserve des algues brunes. Il se caractérise en RMN par une multitude de signaux intenses entre 3.4 et 4 ppm approximativement. De 4.7 à 4.8 ppm, un singulet net se dégage, il correspond aux protons résiduels du solvant (D₂O). De façon moins évidente, quelques signaux sont observables entre 2 et 3.5 ppm, dans une gamme de déplacement chimique qui peut correspondre à des acides aminés, des dérivés sucrés ou des polyalcools. Pour ce qui est de la zone des phlorotannins, on observe, exception faite de *Cytoseira tamariscifolia*, des signaux qui n'existent qu'à l'état de traces.

La phase AE renferme les composés les moins polaires issus de l'extrait brut. On distingue, en plus des protons résiduels du solvant (MeOD, vers 3.3 ppm et 4.7 ppm), de nombreux signaux dans une gamme assez large de déplacements chimiques proches de 1.0 ppm, probablement dus à des groupements méthyles (que l'on trouve par exemple sur des chaînes aliphatiques). De plus, de nombreux composés aromatiques qui correspondent potentiellement à des phlorotannins sont observés entre 5.7 et 6.5 ppm.

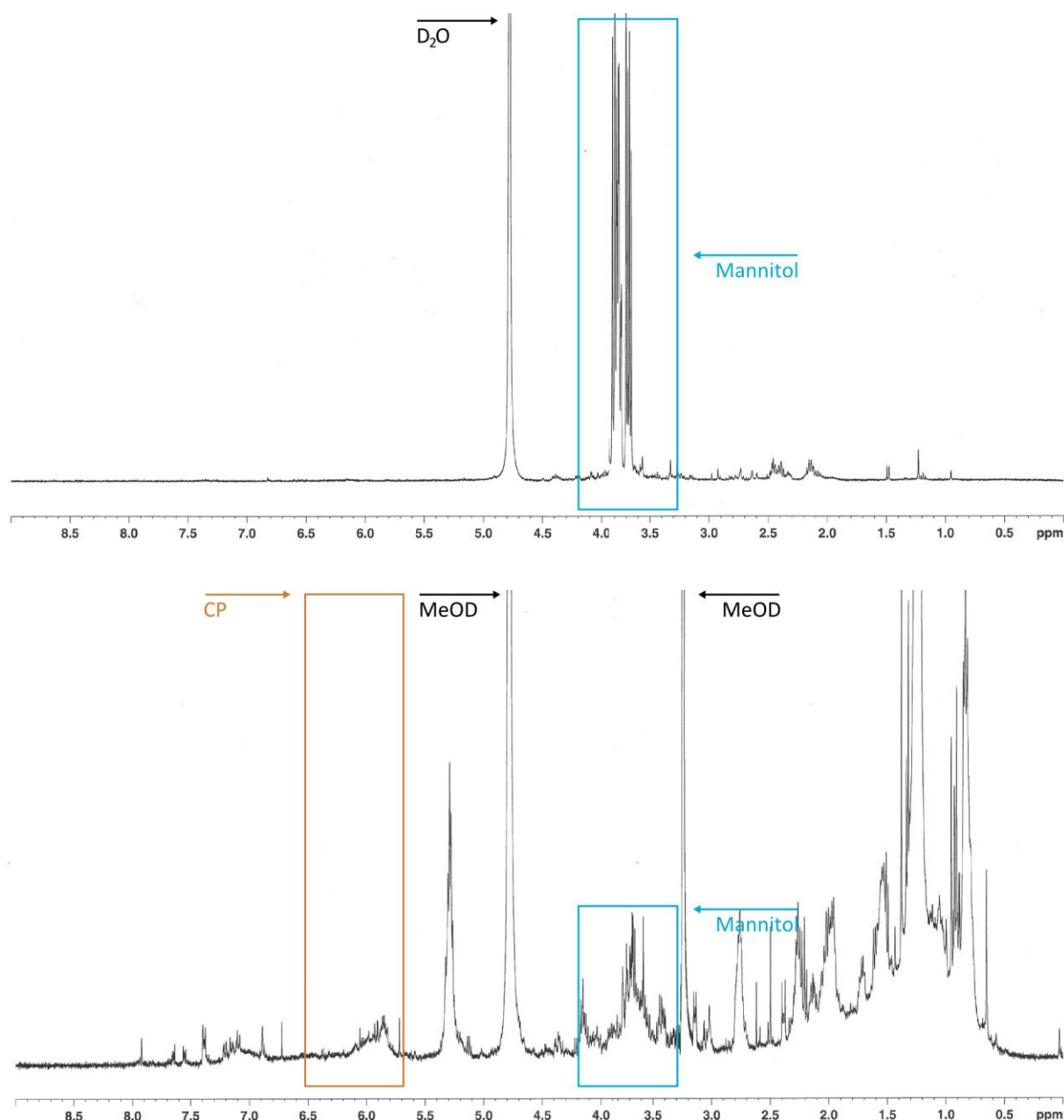


Figure 64 : Spectres ¹H de la phase aqueuse (en haut) et de la phase acétate d'éthyle (en bas) de *Cystoseira baccata* ; CP = Composés phénoliques

Chez *Cystoseira baccata* (Figure 64), nous n'observons dans la phase aqueuse quasiment pas de signaux entre 5.7 ppm et 6.5 ppm (zone des phlorotannins). Au contraire, la phase AE renferme quelques signaux potentiels de phlorotannins (entre 5.7 ppm et 6.1 ppm) en plus de nombreux composés apolaires, caractérisés par les nombreux signaux de 0.5 à 2.5 ppm.

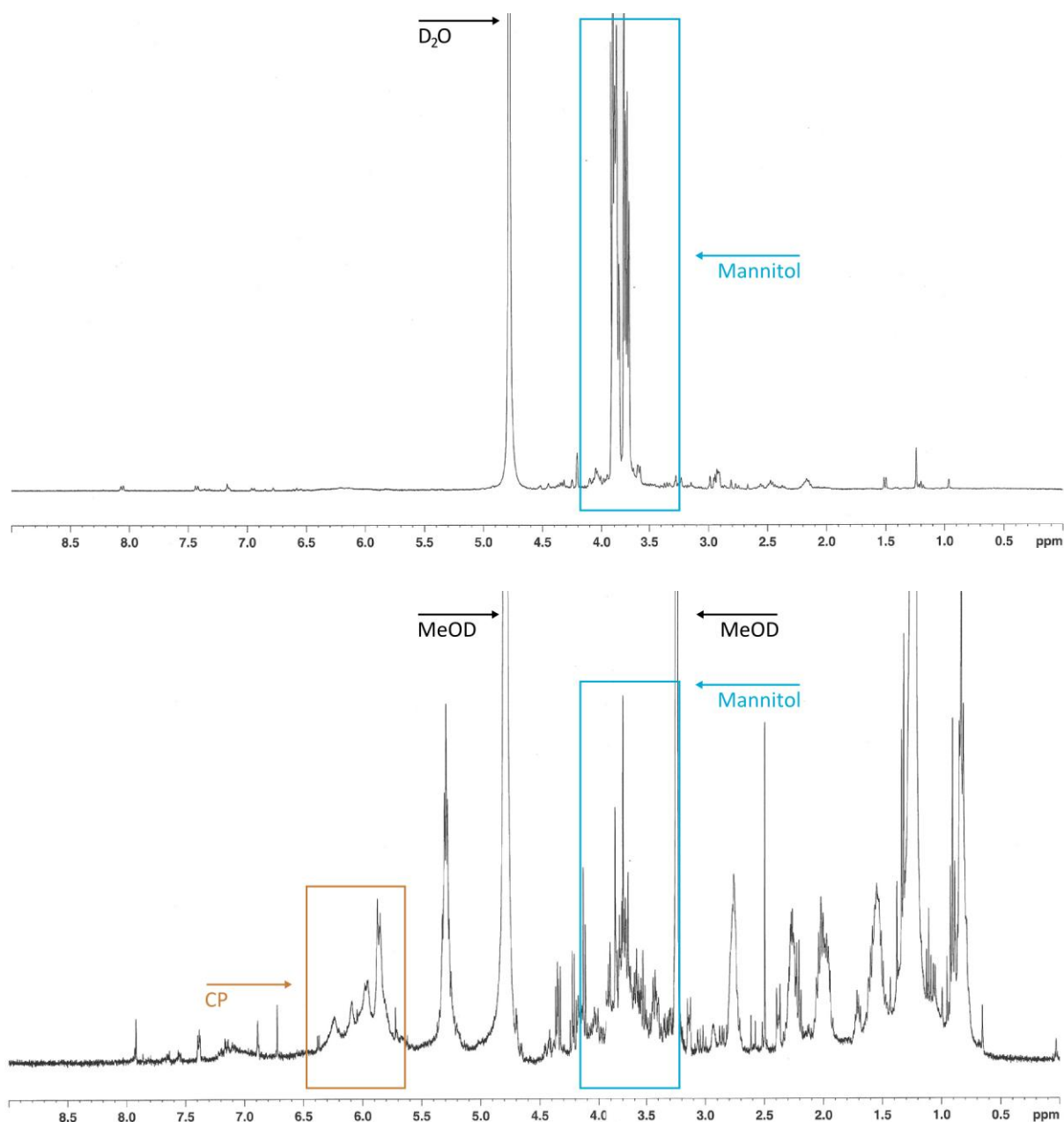


Figure 65 : Spectres ^1H de la phase aqueuse (en haut) et de la phase acétate d'éthyle (en bas) de *Cystoseira fœniculacea* ; CP = Composés phénoliques

La phase aqueuse de *Cystoseira fœniculacea* ne contient des phlorotannins qu'en quantités infimes, qui sont largement négligeables face aux composés dont les signaux apparaissent entre 1.0 et 4.5 ppm. A l'opposé, on observe dans la phase AE plusieurs signaux entremêlés (multiplets) correspondant potentiellement à des phlorotannins, de 5.6 ppm à 6.4 ppm.

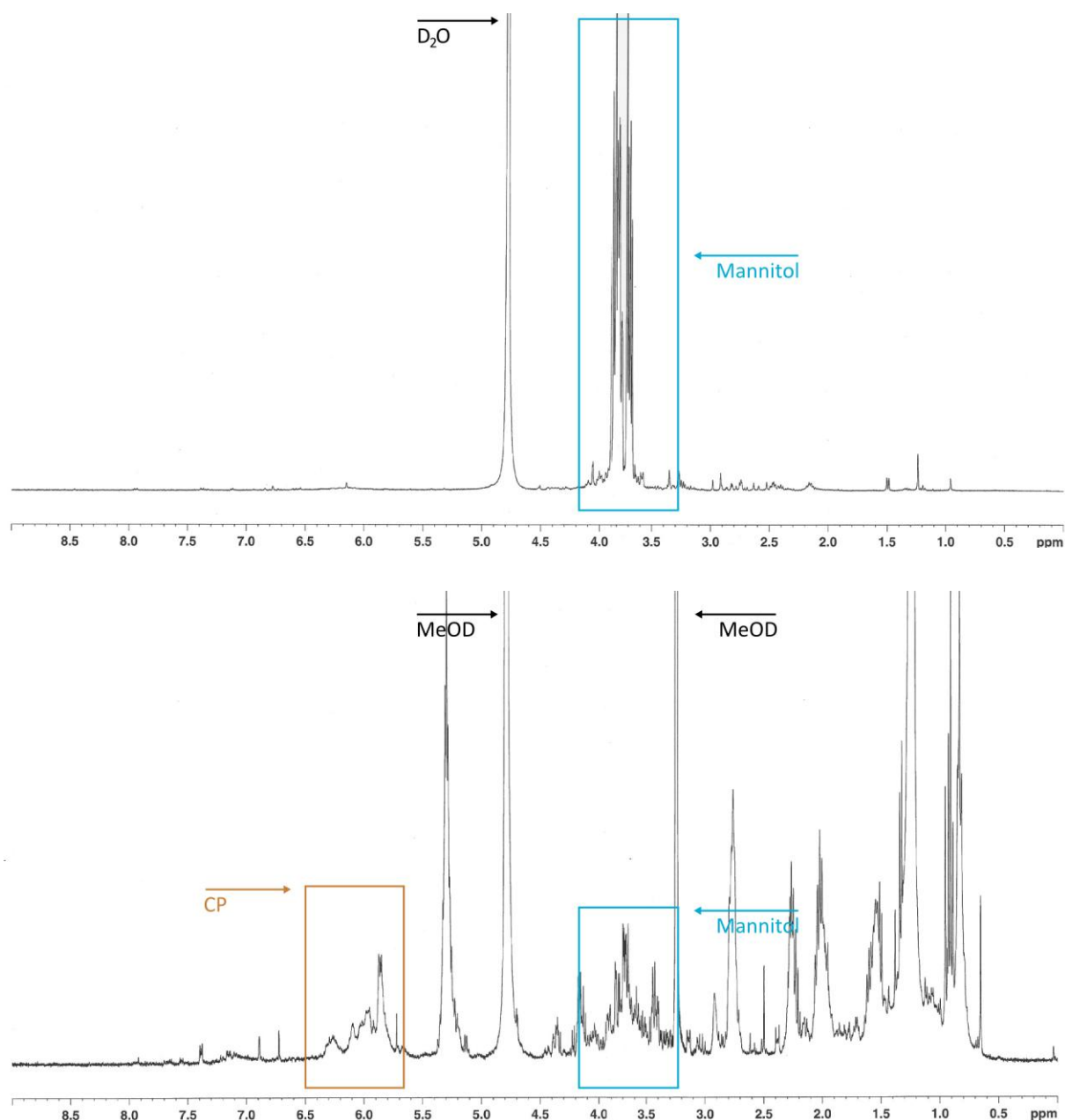


Figure 66 : Spectres ^1H de la phase aqueuse (en haut ; solvant : D_2O) et de la phase acétate d'éthyle (en bas ; solvant : MeOD) de *Cystoseira humilis*

On observe chez *Cystoseira humilis* quasiment la même chose que chez *C. foeniculacea*, d'un point de vue qualitatif : les composés phénoliques ont été isolés dans la phase AE, tout comme de nombreux composés apolaires.

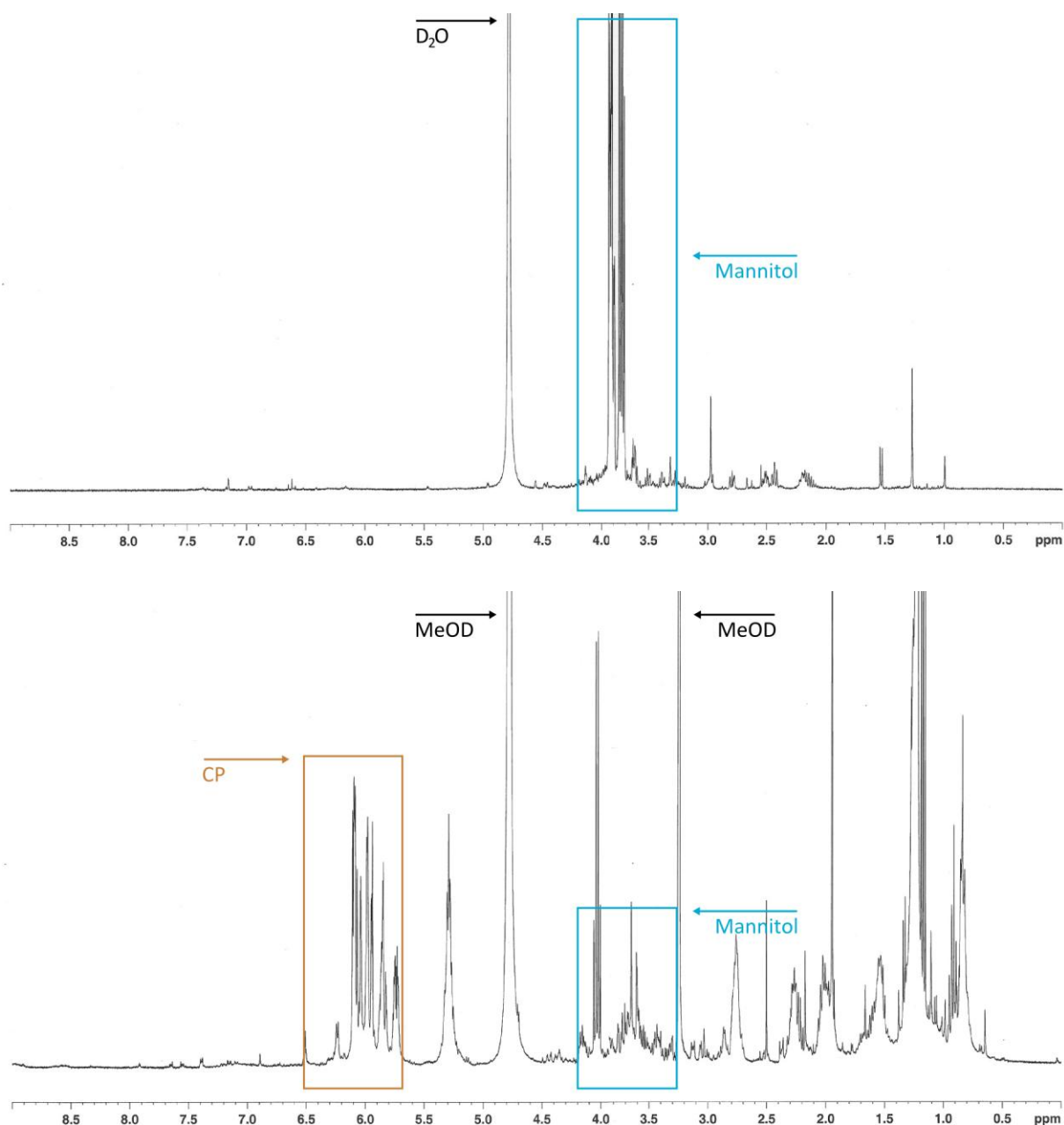


Figure 67 : Spectres ^1H de la phase aqueuse (en haut ; solvant : D_2O) et de la phase acétate d'éthyle (en bas ; solvant : MeOD) de *Cystoseira nodicaulis*

Chez *Cystoseira nodicaulis*, les spectres RMN des deux phases sont moins chargés. A nouveau, la phase aqueuse ne semble pas contenir de phlorotannins, contrairement à la phase AE. Cette dernière est caractérisée par de nombreux signaux particulièrement bien résolus, entre 5.7 ppm et 6.2 ppm.

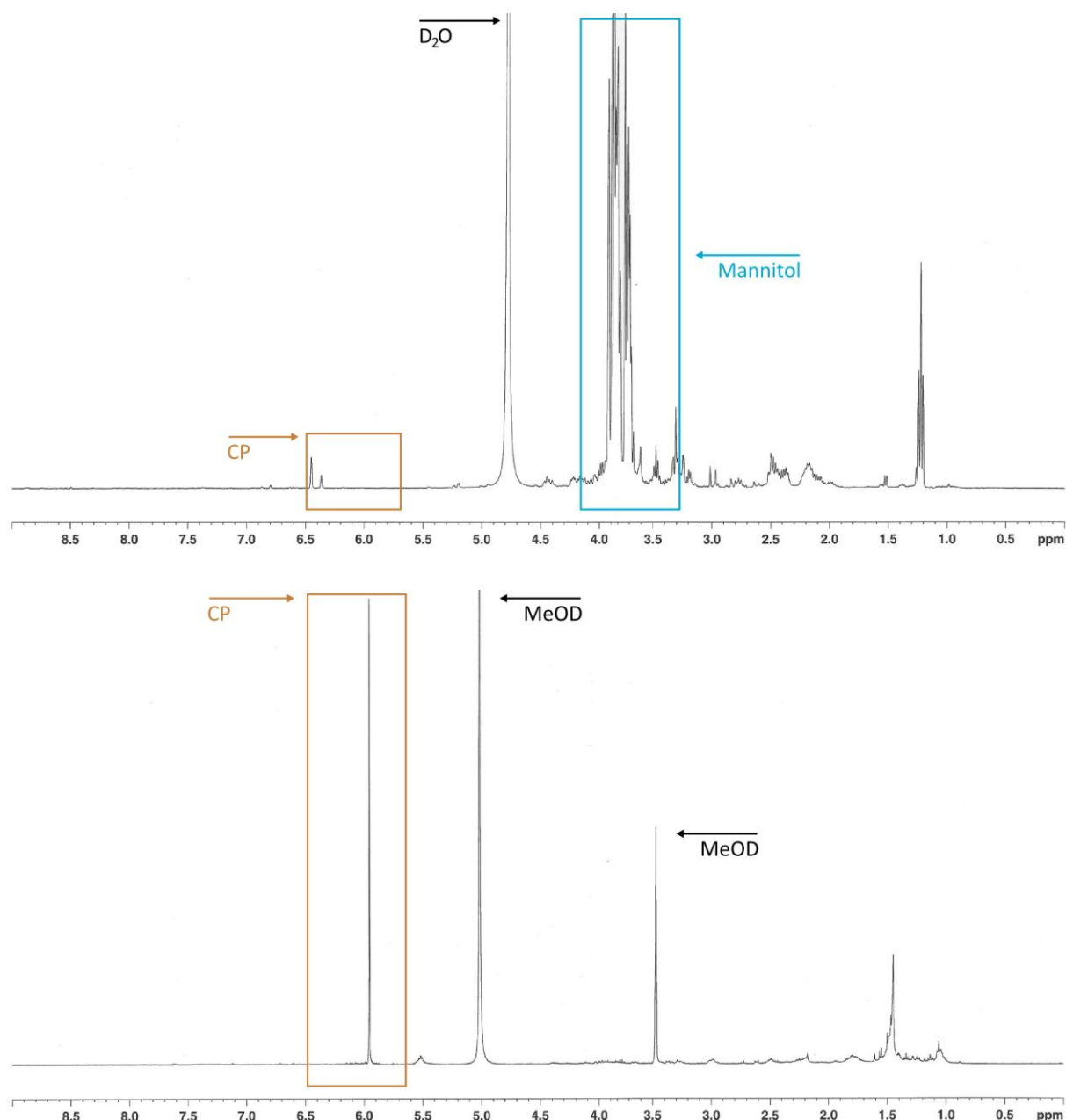


Figure 68 : Spectres ^1H de la phase aqueuse (en haut ; solvant : D_2O) et de la phase acétate d'éthyle (en bas ; solvant : MeOD) de *Cystoseira tamariscifolia*

Les spectres RMN obtenus pour *Cystoseira tamariscifolia* sont différents des quatre précédentes espèces. Un singulet à 6.0 ppm est identifié dans la phase AE, correspondant potentiellement à un phlorotannin, qui se retrouve majoritaire dans la phase ; cette dernière est également constituée de composés aliphatiques minoritaires (signaux de 1.0 ppm à 2.0 ppm). Dans la phase aqueuse, on retrouve également deux signaux dans la zone des phlorotannins (entre 6.4 et 6.5 ppm), qui apparaissent moins intenses que le singulet de la phase AE.

Bilan et choix du protocole pour le suivi temporel des teneurs en phlorotannins

Contrairement aux résultats du dosage de Folin-Ciocalteu, les spectres RMN indiquent de façon générale que c'est dans la phase AE que sont ségrégués les phlorotannins, qui sont invisibles de la phase aqueuse. Il apparaît judicieux de procéder à une partition liquide-liquide entre extrait aqueux et AE afin d'éliminer un certain nombre de contaminants interférant dans le dosage de Folin-Ciocalteu, et de doser les phlorotannins dans cette phase AE. En revanche, nous n'avons pas observé de différence majeure des teneurs en CP, selon que l'on ajoute ou pas au protocole une étape de « lavage » au DCM.

Aussi, afin de déterminer les teneurs en composés phénoliques des cystoseires, nous avons choisi de procéder à une partition eau/AE pour purifier l'extrait brut. Nous avons ensuite dosé les composés phénoliques dans la phase AE afin de limiter les interférences avec d'autres types de molécules (exclues en phase aqueuse). C'est ce protocole qui a été suivi et qui a permis d'obtenir les résultats présentés dans le paragraphe suivant.

3.1.2 VARIABILITÉ DES TENEURS EN COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Les teneurs moyennes en composés phénoliques (CP) varient en fonction des cinq espèces de cystoseires bretonnes et de la saison d'échantillonnage.

Variabilité interspécifique

Les cinq espèces de *Cystoseira* présentent des teneurs en CP significativement différentes (Figure 69, Kruskal-Wallis, $p < 0.001$). Ainsi, *C. tamariscifolia* présente la plus forte teneur en CP ($0.42 \pm 0.21\%$ MS). *C. nodicaulis* possède moins de polyphénols (différence statistiquement significative par rapport à l'espèce précédente), avec $0.25 \pm 0.16\%$ MS, tout comme *C. baccata*, dont la teneur moyenne à $0.21 \pm 0.10\%$ MS n'est pas différente de celle de *C. nodicaulis*. Les teneurs déterminées pour *C. humilis* ($0.19 \pm 0.09\%$ MS) et *C. baccata* ne sont pas significativement différentes. *Cystoseira foeniculacea* ($0.13 \pm 0.06\%$ MS) est l'espèce qui admet les teneurs en CP les plus faibles parmi les cinq espèces.

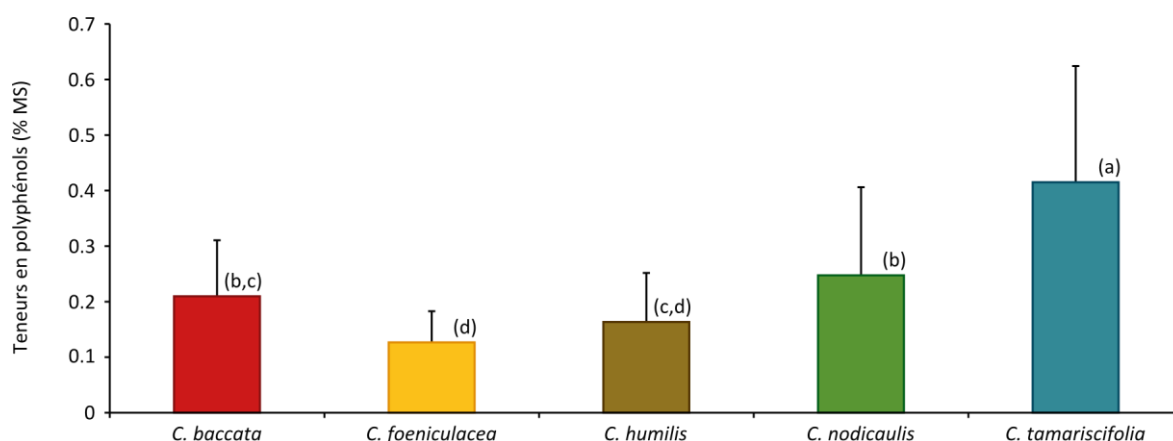


Figure 69 : Teneurs en composés phénoliques (moyenne $\pm$ écart-type, données en pourcentage de matière sèche), en équivalent de phloroglucinol, chez les cinq espèces de *Cystoseira*. Deux mêmes lettres entre parenthèses retrouvées chez 2 espèces indiquent que leurs teneurs ne sont pas statistiquement différentes suite à un test de Kruskal-Wallis.

Variabilité saisonnière

Parmi les cinq espèces étudiées, on peut distinguer deux groupes. *Cystoseira foeniculacea* et *C. humilis* sont deux espèces pour lesquelles il n'existe pas de tendance saisonnière dans l'évolution des composés phénoliques (Figure 70). Les teneurs de *C. foeniculacea* se situent entre $0.083 \pm 0.031\%$ MS (printemps 2009) et $0.151 \pm 0.065\%$ MS (été 2010). Cependant, les teneurs n'ont pas évolué de façon statistiquement significative pendant une année entière à compter de l'été 2009 (Figure 70). De façon similaire, les teneurs de *C. humilis* varient entre $0.100 \pm 0.038\%$ MS (printemps 2009) et $0.206 \pm 0.010\%$ MS (hiver 2010). A nouveau, elles n'ont pas évolué de manière significative après l'été 2009 (Figure 70).

A l'opposé, *Cystoseira baccata* présente une diminution de ses teneurs, depuis un maximum de $0.271 \pm 0.136\%$ MS atteint en été 2009 vers un minimum de $0.123 \pm 0.034\%$ MS en hiver 2010 (Figure 70) ; ensuite, les teneurs augmentent jusqu'à un plateau en été 2010 ($0.187 \pm 0.045\%$ MS). On peut ainsi dire que les teneurs de *C. baccata* sont maximales en été et minimales en hiver.

De la même manière, les teneurs de *C. nodicaulis* oscillent entre un maximum ($0.353 \pm 0.194\%$ MS) qui s'étend de l'automne 2009 à l'hiver 2010 (Figure 70), et un

minimum observé avant et après cette période (respectivement $0.045 \pm 0.009\%$ MS en été 2009 et $0.0196 \pm 0.06\%$ MS à l'été 2010). *C. tamariscifolia* présente des teneurs moyennes en du printemps à l'été 2009 ($0.382 \pm 0.146\%$ MS). Puis, la teneur en composés phénoliques diminue pour atteindre son minimum à l'automne 2009 ($0.110 \pm 0.053\%$ MS). En hiver 2010 (sénescence de l'espèce), nous ne pouvons présenter de valeurs pour les teneurs. Dès le printemps 2010, on peut observer de fortes teneurs (Figure 70), qui augmentent à nouveau pour devenir maximales l'été suivant ($0.601 \pm 0.128\%$ MS).

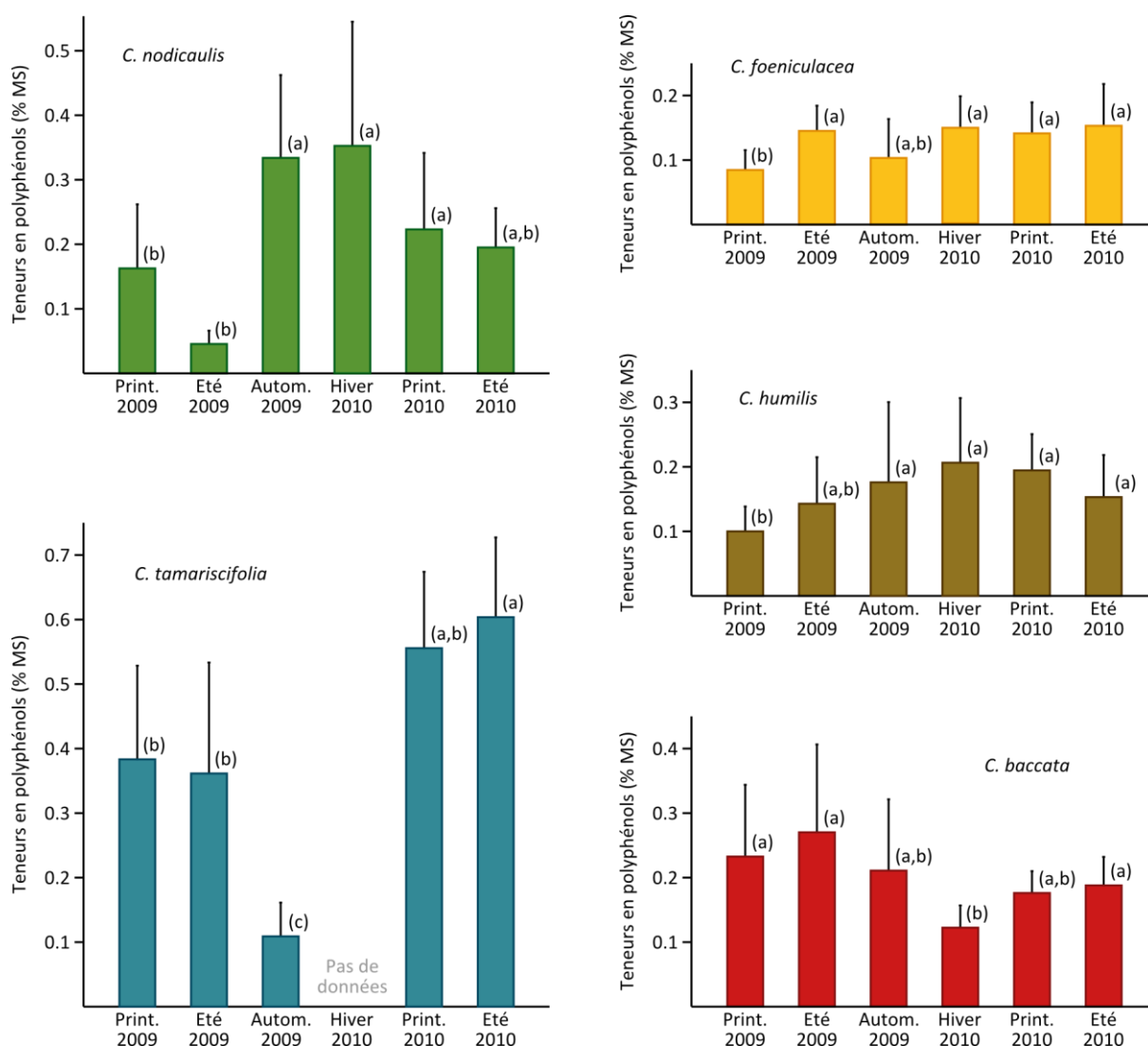


Figure 70 : Évolution des teneurs spécifiques en composés phénoliques (moyenne $\pm$ écart-type exprimées en pourcentage de matière sèche), en équivalent de phloroglucinol, chez les cinq espèces de *Cystoseira*. Deux mêmes lettres entre parenthèses retrouvées chez une espèce pendant 2 trimestres indiquent que leurs teneurs ne sont pas statistiquement différentes, après analyse de variance.

3.2 CARACTÉRISATION STRUCTURALE DES PHLOROTANNINS

3.2.1 EFFICACITÉ DU PROTOCOLE DE PURIFICATION

Les Figure 71 et Figure 72 illustrent les analyses relatives au protocole de purification appliqué à l'extrait hydrométhanolique de *Cystoseira nodicaulis*. Elles fournissent un exemple représentatif des résultats obtenus pour l'ensemble des cinq espèces ; aussi nous ne présenterons pas les spectres obtenus pour chaque étape de purification chez *C. baccata*, *C. fœniculacea*, *C. humilis* et *C. tamariscifolia*.

En Figure 71, nous montrons les spectres RMN des produits que notre protocole de purification nous a amenés à éliminer ; cette figure présente ainsi les spectres des précipités, des produits de lavage au dichlorométhane, et la phase aqueuse résultant de la partition liquide-liquide eau/AE. A l'opposé, en Figure 72 sont exposées les analyses des fractions dans lesquelles nous souhaitons isoler les composés phénoliques.

Le résultat principal est que le protocole induit une perte négligeable de signaux de type phlorotannins, au moins jusqu'à l'utilisation d'une colonne de silice (Figure 71). Les étapes d'extraction liquide-liquide et de précipitation sont ainsi particulièrement adaptées à la purification de ces biomolécules. La première extraction liquide-liquide au DCM permet d'éliminer une grande partie de composés apolaires, dont de nombreux pigments (chlorophylle, fucoxanthine, caroténoïdes) et dérivés lipidiques, dont les signaux sont notamment visibles sous forme de pics massifs entre 1 et 2 ppm.

Les précipitations utilisant l'éthanol et l'acétone agissent de façon complémentaire et permettent d'éliminer de très grandes quantités de mannitol (signaux entre 3.5 et 4 ppm). L'extraction liquide-liquide eau/AE permet de ségréguer la majorité du mannitol restant dans la phase aqueuse, et de solubiliser la quasi-totalité des composés phénoliques dans l'AE (Figure 72). Le deuxième lavage au DCM est efficace, puisque de nombreux pigments ont été ré-extraits, permettant de purifier davantage la solution de phlorotannins qui est déposée sur colonne de silice au cours de la dernière étape du protocole.

Enfin, la colonne de silice permet de récupérer la grande majorité des phlorotannins en fraction 1 (élution à l'AE) avec la plus grande pureté (Figure 72). La fraction 2 (élution à l'éthanol) apparaît bien moins riche en composés phénoliques, et à plus forte raison, dans la fraction 3 on en distingue à peine quelques traces.

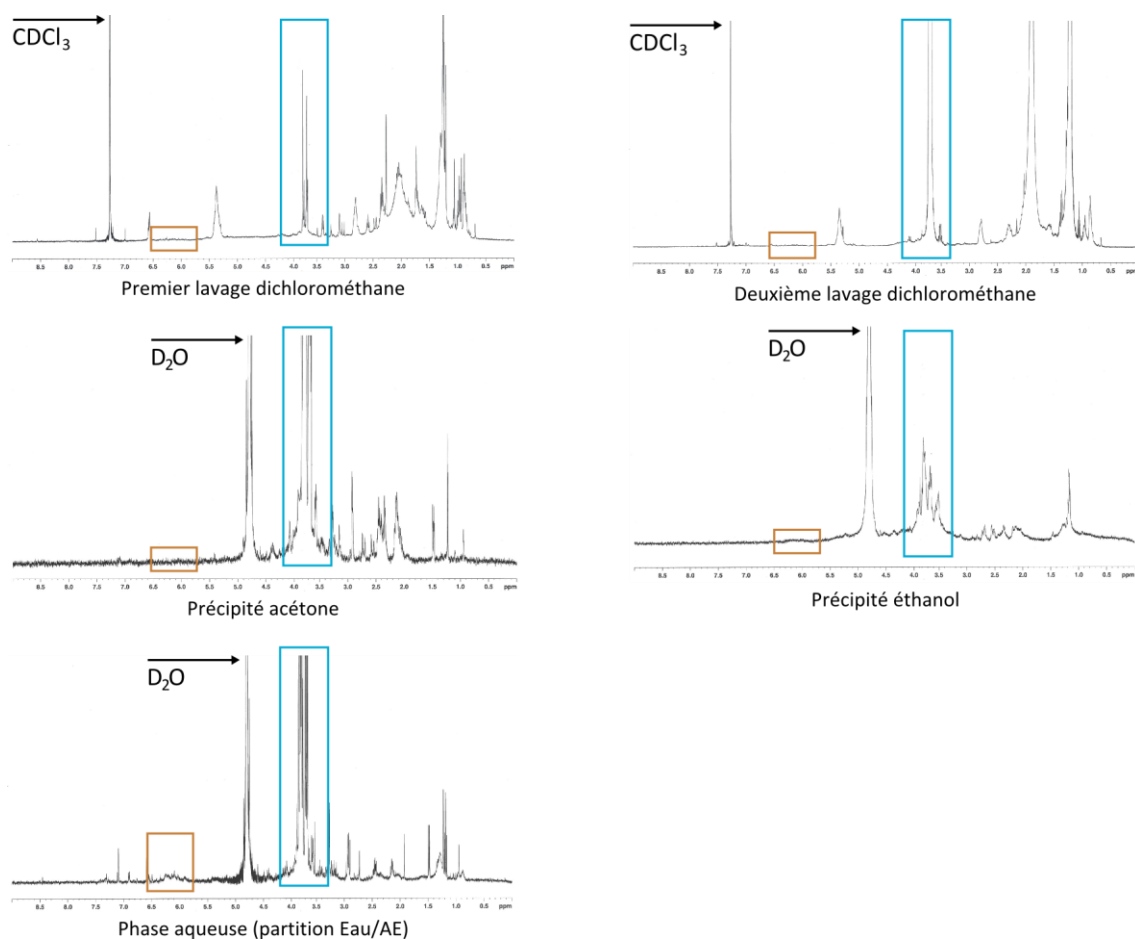


Figure 71 : Spectres RMN ^1H des fractions **éliminées** suite au protocole de purification. CDCl_3 : chloroforme deutéré ; D_2O : eau deutérée ; encadré marron : zone des phlorotannins ; encadré bleu : mannitol. Se référer à la figure 50 pour connaître la position de l'étape dans le protocole de purification.

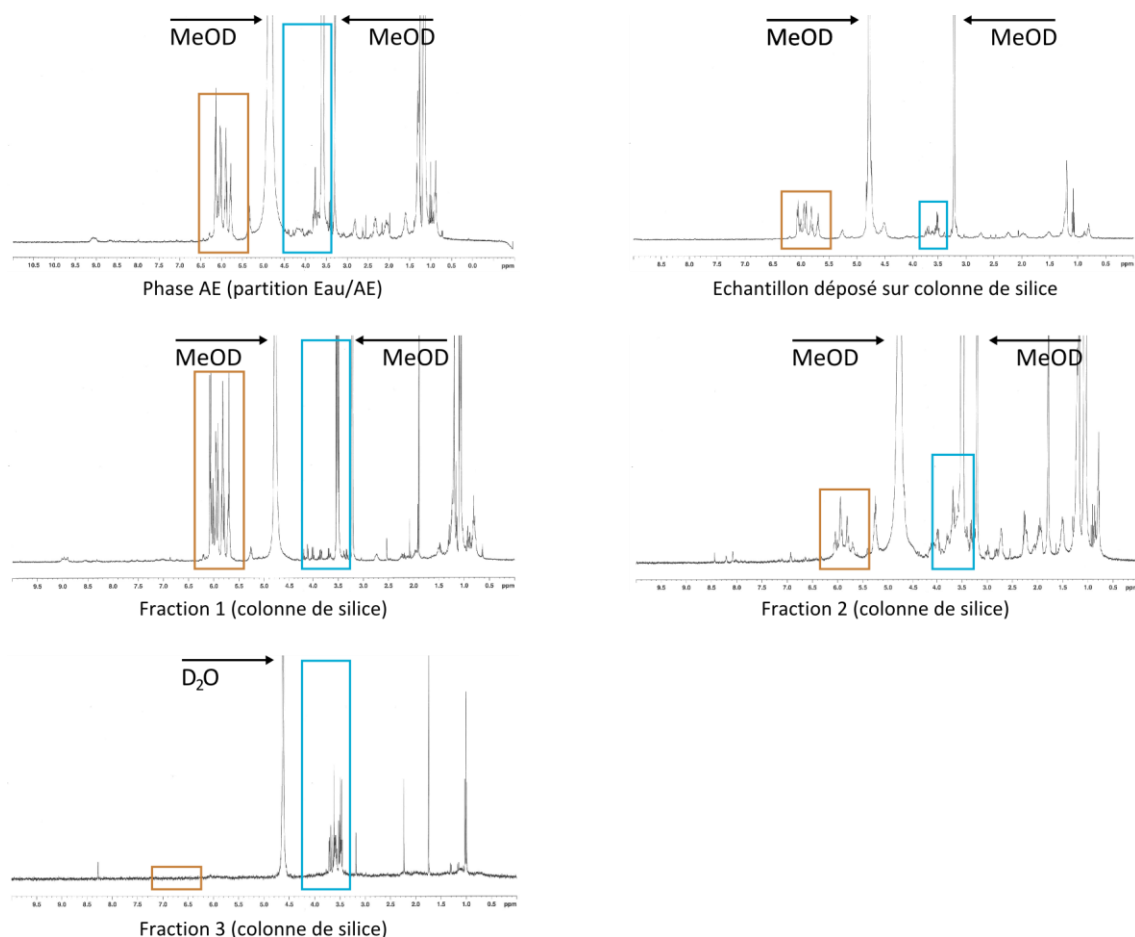


Figure 72 : Spectres RMN ^1H des fractions **récupérées** suite au protocole de purification. MeOD : méthanol deutéré ; D_2O : eau deutérée ; encadré marron : zone des phlorotannins ; encadré bleu : mannitol. Se référer à la figure 50 pour connaître la position de l'étape dans le protocole de purification.

En vue de la caractérisation des phlorotannins par RMN 2D ^1H - ^{13}C (séquence HMBC), nous avons choisi d'analyser les fractions 1 issues du protocole de purification, pour chaque espèce, car elles sont les plus riches et les mieux purifiées. Dans le cas de *Cytoseira tamariscifolia*, nous avons obtenu un profil singulier pour la fraction 2. En effet, nous avons pu observer dans cette fraction des signaux dans la zone des phlorotannins qui

étaient absents dans la fraction 1. C'est la raison pour laquelle la fraction 2 de *Cystoseira tamariscifolia* a également été analysée.

La Figure 73 présente les spectres RMN ^1H des fractions obtenues grâce au protocole de purification des phlorotannins, pour les cinq espèces de *Cystoseira*. Il s'agit des « fractions 1 », qui correspondent aux fractions récupérées après élution de l'échantillon par de l'AE sur colonne de silice (Figure 59). Dans le cas de *Cystoseira tamariscifolia*, nous présentons également le spectre de la fraction 2 dans laquelle nous avons également observé des signaux aromatiques originaux.

A l'issue du protocole, nous pouvons noter la présence de larges signaux aromatiques dans la zone de déplacements chimiques entre 5.7 et 6.5 ppm, attestant de la présence potentielle de phlorotannins dans toutes les fractions (Figure 73). De plus, ces signaux sont différents selon l'espèce considérée. On peut également souligner des signaux aliphatiques d'intensité non négligeable dans les fractions de *Cystoseira baccata*, *C. fœniculacea*, *C. humilis* et *C. nodicaulis*, qui témoignent de la présence d'autres composés que des phlorotannins dans ces fractions.

Par contre, la fraction 1 de *Cystoseira tamariscifolia* indique la présence très majoritaire d'un composé aromatique. Il se présente sous la forme d'un singulet à 5.78 ppm dans le méthanol deutéré (Figure 73, en bas à gauche), ce qui témoigne d'un seul type de protons dans la molécule, tous chimiquement équivalents. Ce signal est celui du phloroglucinol, monomère à l'origine des phlorotannins (voir sa caractérisation formelle au paragraphe 3.3 de ce chapitre, page 261). De plus, la fraction 2 de *C. tamariscifolia* renferme un autre composé singulier, sous forme de deux signaux d'intensité différente, l'un s'apparentant à un doublet vers 6.42 ppm, l'autre ressemblant à un triplet vers 6.32 ppm (Figure 73, en bas à droite). La résolution spectrale n'étant pas optimale, il est difficile de déterminer avec précision la multiplicité des signaux. Toutefois, l'examen du spectre dans son ensemble nous conduit à penser que dans la molécule impliquée :

1. Il existe au moins 2 types de protons chimiquement équivalents, car on observe deux signaux sur les spectres. En effet la présence de deux déplacements chimiques différents indique l'existence de deux environnements chimiques différents ;
2. Ces deux types de protons sont portés par deux carbones voisins, puisqu'on observe une multiplicité dans les signaux (doublet, triplet).

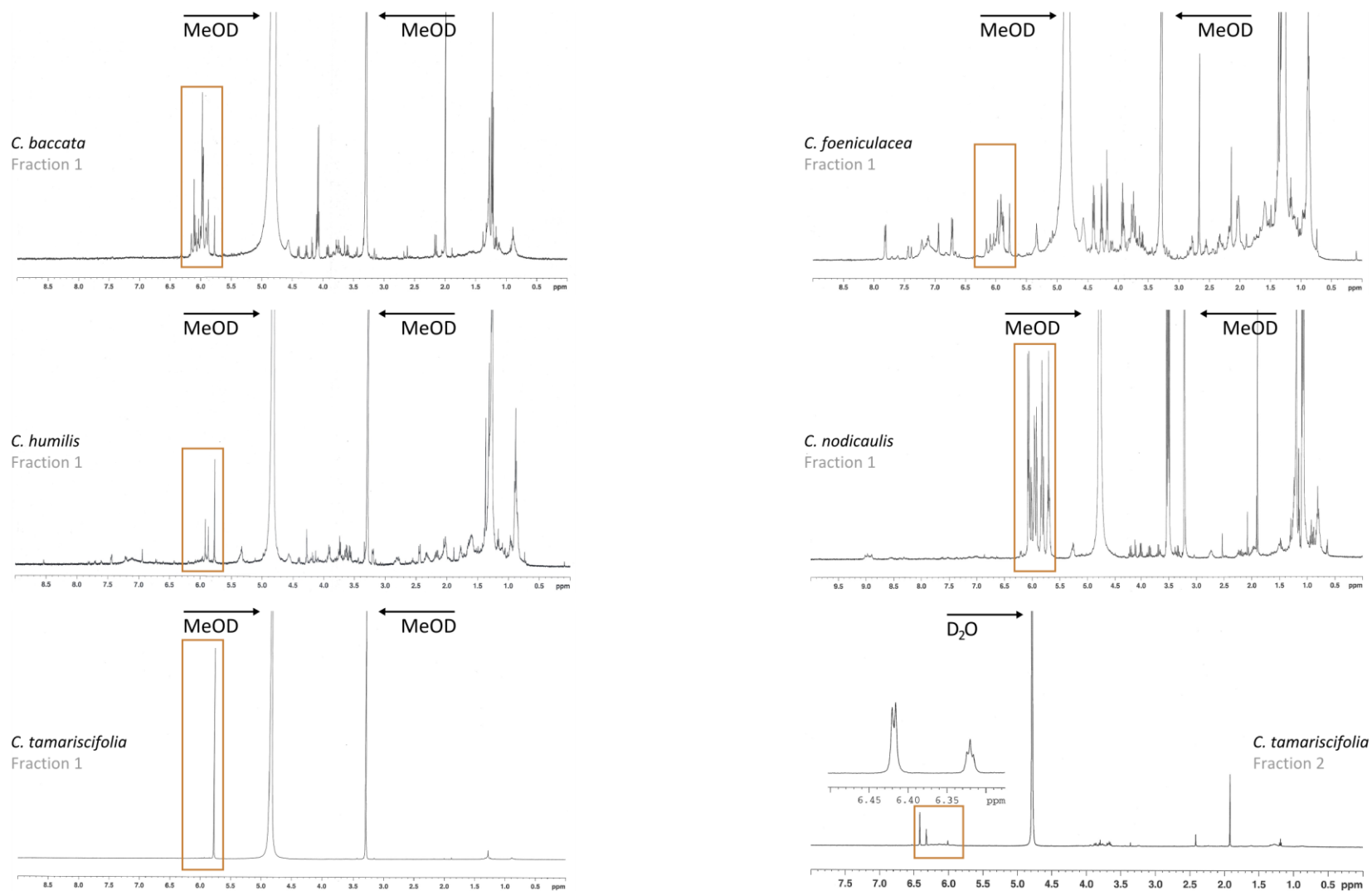


Figure 73 : Fractions enrichies en composés phénoliques pour chaque espèce du genre *Cystoseira* collectée en Bretagne

En observant la diversité des phlorotannins (Figure 55), on peut s'apercevoir que ces molécules, en tant que polymères du phloroglucinol, partagent une caractéristique structurale : parmi toutes ces molécules, les protons observables en RMN ^1H dans le MeOD ou le D_2O sont ceux des groupements « méthine » (C-H des cycles aromatiques). Or les seuls voisins des protons « méthine » sont des protons portés par des groupements phénols (C-OH). Il n'y a donc pas de corrélation directe $^3\text{J H-H}$, et donc *a priori*, pas de multiplicité dans les signaux sur les spectres de phlorotannins.

Ainsi, nous pouvons émettre des réserves sur le composé aromatique de la fraction 2, qui n'est probablement pas un phlorotannin *sensus stricto*.

3.2.2 CARACTÉRISATION DES FRACTIONS PURIFIÉES PAR RMN 2D ^1H - ^{13}C (HMBC)

Suite aux résultats obtenus en Figure 73, nous avons effectué une analyse par RMN 2D ^1H - ^{13}C des fractions enrichies en phlorotannins. Toutefois, les très faibles teneurs en phlorotannins chez *Cytoseira fæniculacea* (Figure 69), associées à une instabilité chimique de la fraction purifiée ne nous permettent pas de présenter ici un spectre pour cette espèce. Sur les cinq espèces étudiées, nous ne présentons donc de résultats d'analyse en RMN 2D que pour quatre d'entre elles (de la Figure 74 à la Figure 76, spectres HMBC).

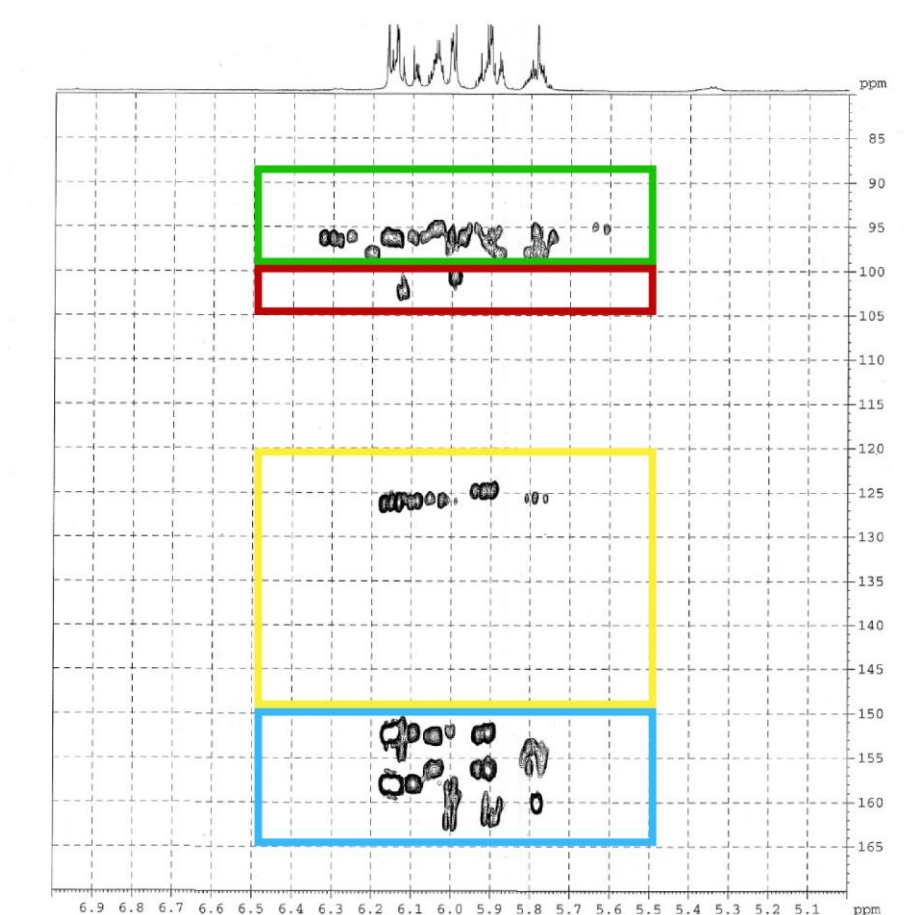
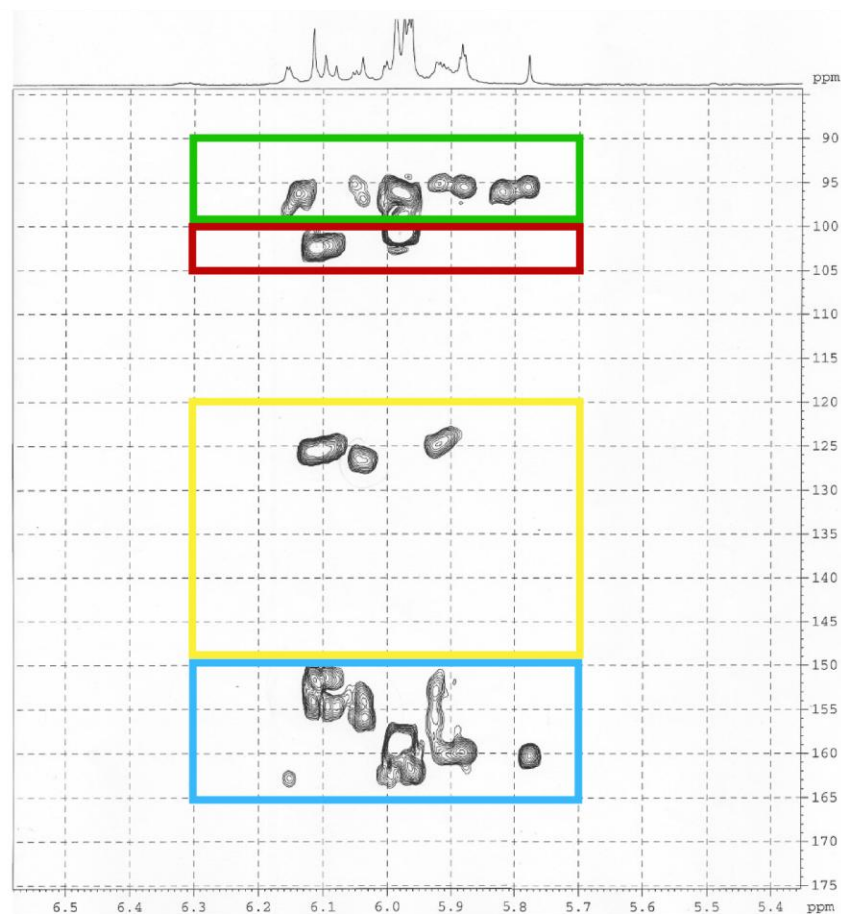
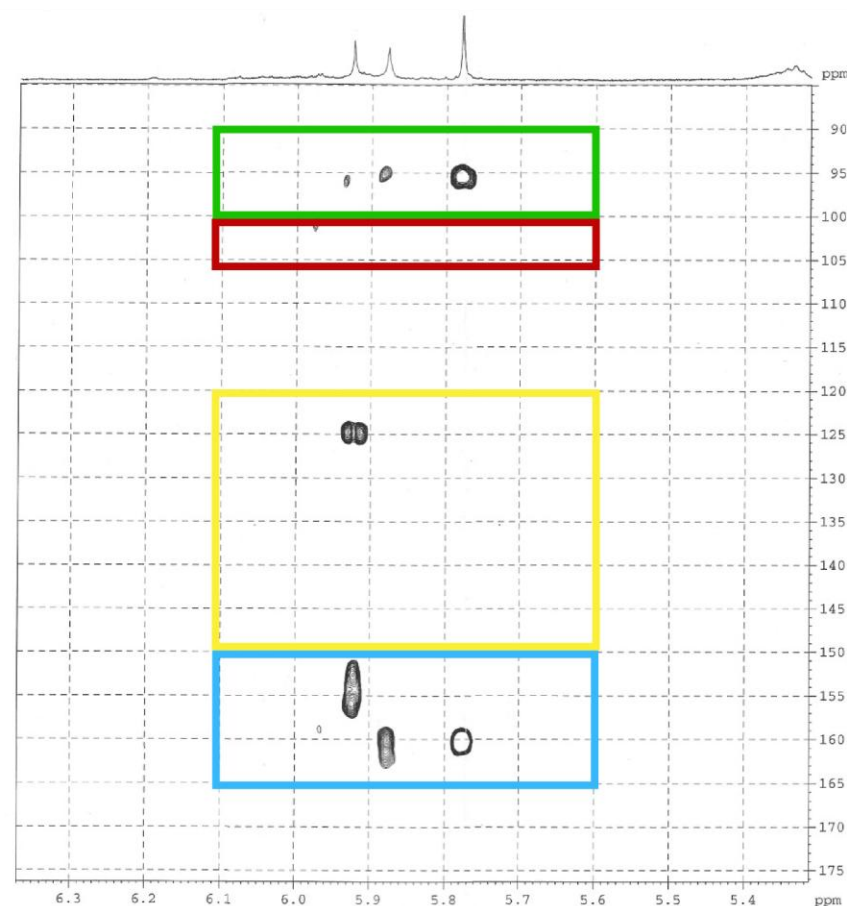


Figure 74 : Spectres HMBC des fractions enrichies en phlorotannins de *Cystoseira nodicaulis*. En vert (90-100 ppm en dimension Carbone) : zone des méthines ; en rouge (100-105 ppm) : carbones impliqués dans une liaison aryle-aryle entre deux unités de phloroglucinol ; en jaune (120-150 ppm) : liaison diaryle-éther ; en bleu (150-165 ppm) : carbones à fonction phénol.

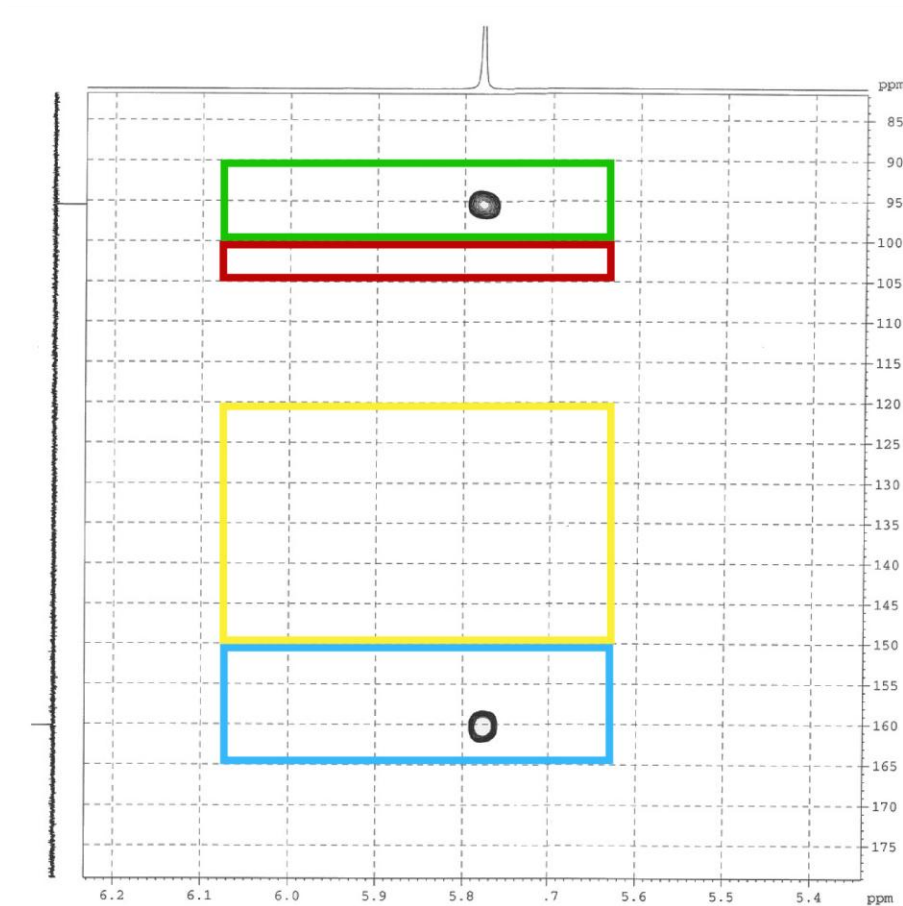


C. baccata (Fraction 1)

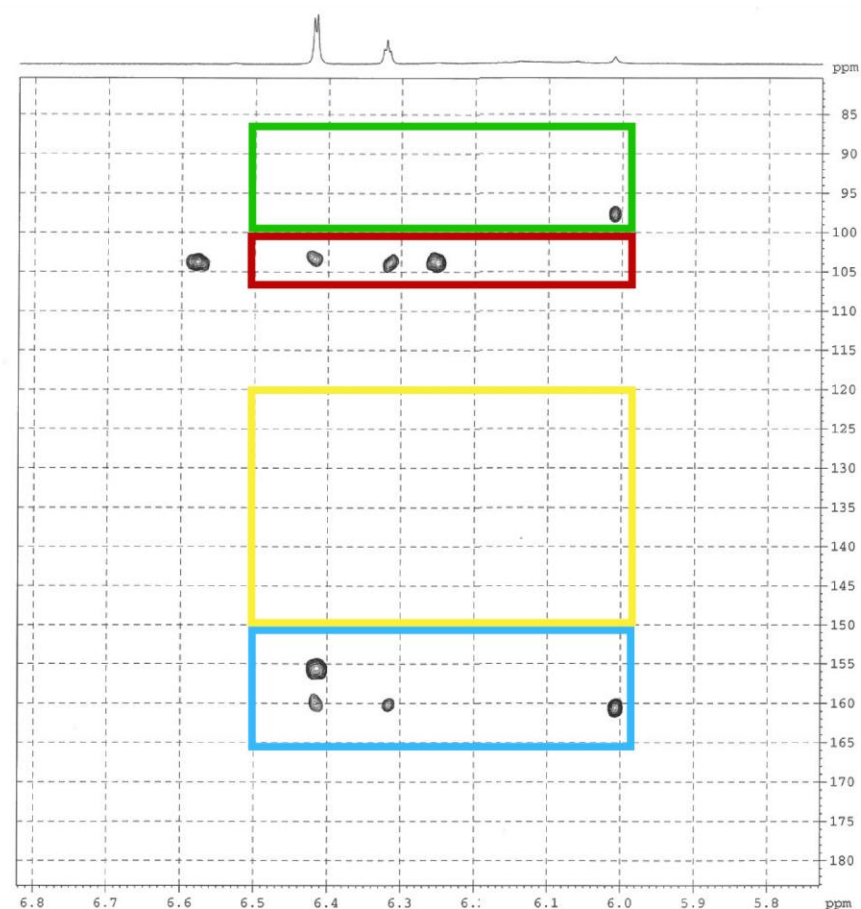


C. humilis (Fraction 1)

Figure 75 : Spectres HMBC (solvant : MeOD) des fractions 1 de *Cystoseira baccata* et *C. humilis*. En vert (90-100 ppm en dimension Carbone) : zone des méthines ; en rouge (100-105 ppm) : carbones impliqués dans une liaison aryle-aryle entre deux unités de phloroglucinol ; en jaune (120-150 ppm) : liaison diaryle-éther ; en bleu (150-165 ppm) : carbones à fonction phénol.



C. tamariscifolia (Fraction 1)



C. tamariscifolia (Fraction 2)

Figure 76 : Spectres HMBC des fractions 1 (solvant : MeOD) et 2 (solvant : D₂O) de *Cystoseira tamariscifolia*. En vert (90-100 ppm en dimension Carbone) : zone des méthines ; en rouge (100-105 ppm) : carbones impliqués dans une liaison aryle-aryle entre deux unités de phloroglucinol ; en jaune (120-150 ppm) : liaison diaryle-éther ; en bleu (150-165 ppm) : carbones à fonction phénol.

Le spectre HMBC (Figure 74) de *Cystoseira nodicaulis* montre une multitude de signaux sur la dimension ^1H , qui sont corrélés avec des carbones de type méthine (C-H des noyaux aromatiques), de carbones de type phénol (C-OH), de rares carbones impliqués dans des liaisons aryle-aryle entre cycles (C-C) et une majorité de carbones impliquées dans des liaisons diaryle-éther entre cycles (C-O-C).

Chez *Cystoseira baccata* on observe un nombre plus restreint de tâches de corrélation (Figure 75). On peut ainsi noter, face au signal à 5.98 ppm en dimension ^1H , une grosse tâche de corrélation à 101 ppm en dimension ^{13}C . Cependant il n'y a pas de tâche de corrélation entre 120 et 150 ppm. On peut ainsi caractériser un gros polymère linéaire de type fucol. En effet des ramifications latérales généreraient de petites variations de déplacements chimiques en dimension ^1H , et on n'observerait alors une tâche de corrélation moins bien définie. Par un raisonnement similaire, on peut détecter un phlorotannin de type phloréthol ($\delta=5.92$ ppm en dimension ^1H), et un fucophloréthol ($\delta=6.10$ ppm). On retrouve également un signal à $\delta=5.78$ ppm (signal isolé en dimension ^1H), qui n'est corrélé qu'à des méthines et à des carbones phénoliques (Figure 75). Ce composé, qui se traduit par un singulet en dimension ^1H , présent à l'état pur dans la fraction 1 de *C. tamariscifolia* (Figure 76), est aussi le composé majoritaire de la fraction 1 de *C. humilis* (Figure 75). Il s'agit du phloroglucinol (voir sa caractérisation chez *C. tamariscifolia* au paragraphe 3.3 de ce chapitre, en page 261).

Chez *C. humilis*, on retrouve également un composé type phloréthol linéaire ou peu ramifié ($\delta=5.92$ ppm en dimension ^1H), ainsi qu'un autre composé à $\delta=5.88$ ppm (dimension ^1H), qui ne montre ni liaison aryle-aryle, ni liaison diaryle-éther (Figure 75). Ce composé, qui « ressemble » au phloroglucinol (^1H $\delta=5.78$ ppm), s'en démarque par un dédoublement de la tâche de corrélation C-OH vers 160-163 ppm en dimension ^{13}C .

Chez *Cystoseira tamariscifolia*, la fraction 1 ne présente qu'un composé majoritaire identifié comme le phloroglucinol. Dans la fraction 2 de cette espèce, on peut observer un autre composé, qui se décline en deux signaux, à 6.32 et 6.42 ppm (Figure 76). On observe une tâche de corrélation dans la zone des liaisons aryle-aryle, qui pourrait correspondre à un fucol. Cependant, comme indiqué précédemment, la multiplicité des signaux ne semble pas compatible avec un phlorotannin.

En constatant la multiplicité apparente des signaux (un doublet et un triplet, voir Figure 73), nous avons analysé par RMN du pyrogallol (1,2,3 trihydroxybenzène), dont la

formule était compatible avec l'obtention de tels signaux (Figure 77). En effet, le proton présent en position 5 sur le cycle a 2 voisins chimiquement équivalents (en position 4 et 6) et génère ainsi un triplet en RMN ^1H ; réciproquement, les protons en position 4 et 6 ont un seul voisin (en position 5), et ils génèrent ensemble un doublet en RMN ^1H .

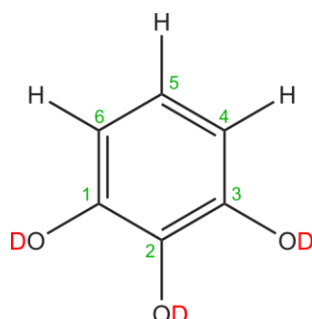


Figure 77 : Pyrogallol en solution dans du D_2O . Sur les carbones 1, 2 et 3, les protons des fonctions hydroxyles sont substitués par des atomes de deutérium.

L'analyse a montré que le composé isolé dans la fraction 2 chez *C. tamariscifolia* n'était pas du pyrogallol. En effet, les signaux du composé de la fraction 2 et ceux du pyrogallol n'ont pas les mêmes déplacements chimiques (données non présentées).

3.2.3 DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ ANTIRADICALEIRE DES FRACTIONS PURIFIÉES

En raison des très faibles teneurs en phlorotannins chez *Cystoseira fœniculacea* et *C. humilis* (Figure 69), nous n'avons pu obtenir que des quantités très limitées de phlorotannins purifiés, qui ne nous ont pas permis de procéder au test d'activité antiradicalaire du DPPH. Ainsi, nous présentons de résultats que pour les fractions purifiées de *C. baccata*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia*, à la Figure 78.

Les trois fractions purifiées possèdent un grand potentiel antiradicalaire. Les EC_{50} de la fraction 1 de *C. baccata* (0.015 g/L) et du phloroglucinol de *C. tamariscifolia* (0.011 g/L) sont même inférieures à celle d'un témoin positif - le BHT, ce qui implique que les phlorotannins sont plus actifs que ce composé. L'activité antiradicalaire de la fraction 1 de *C. nodicaulis*, si elle est un peu faible, reste tout de même dans le même ordre de grandeur. La vitamine C demeure le composé le plus actif, avec une EC_{50} (0.0087 g/L) deux fois inférieure au mélange de phlorotannins de *C. baccata*, mais son activité reste très comparable au phloroglucinol observé chez *C. tamariscifolia*.

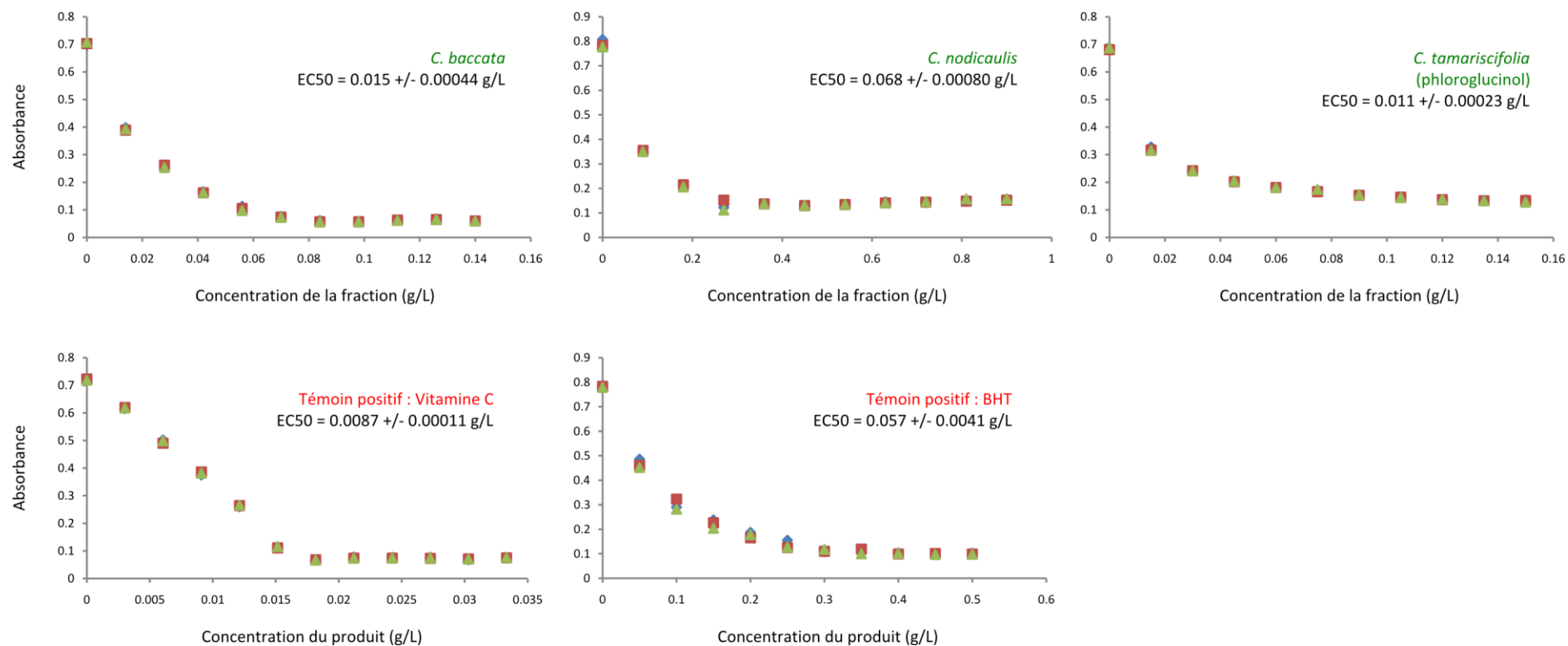


Figure 78 : Droite de décoloration du test antiradicalaire par méthode du DPPH. Les activités sont données sous forme de concentrations massiques efficaces pour inhiber 50% du radical (EC50 : moyenne +/- écart-type). La vitamine C et le BHT sont utilisés en tant que témoins positifs.

3.3 ÉTUDE DU PHLOROGLUCINOL CHEZ *CYTOSEIRA TAMARISCIFOLIA*

Les résultats de caractérisation et de dosage du phloroglucinol par des techniques innovantes chez *Cystoseira tamariscifolia* sont rassemblés dans un manuscrit qui sera soumis à la revue internationale « Biochemical Systematics and Ecology », sous la référence :

Jégou C., Kervarec N., Simon G., Cérantola S. and Stiger-Pouvreau V.

Phloroglucinol as the major phenolic compound in the brown macroalga *Cystoseira tamariscifolia* from Brittany (France): detection using solid-state NMR spectroscopy, quantification of seasonal variations using liquid NMR spectroscopy

Le manuscrit est présenté dans les pages suivantes. Il inclut l'ensemble des illustrations nécessaires à la compréhension du propos et se présente sous la forme adaptée à la revue *Biochemical Systematics and Ecology*.

En résumé, nous avons mis en évidence la présence de phloroglucinol chez *Cystoseira tamariscifolia*, qui apparaît comme le composé phénolique majoritaire à presque tout moment de l'année. Ce composé est détectable dans des quantités infimes de matériel végétal par analyse en RMN HR-MAS, ce qui fait du phloroglucinol un marqueur chimiotaxinomique particulièrement robuste de cette espèce.

De plus, le phloroglucinol n'est produit que dans les rameaux secondaires de l'algue, et pas dans l'axe principal (analogue à une « tige » pérenne). Ceci suggère que l'algue investit une grande partie de son énergie dans la défense chimique de ses rameaux secondaires, qui sont amenés à générer des réceptacles à partir du mois de mai en Bretagne.

Les résultats du dosage du phloroglucinol par RMN dans les extraits de *Cystoseira tamariscifolia* indiquent que ce composé s'accumule de plus en plus dans les tissus à l'approche de la période de maturité, et disparaît progressivement à la fin de l'été, avec la chute des rameaux et la période de dormance. Cela nous amène à penser que ce composé pourrait avoir un rôle de protection des gamètes, et que sa relative « disparition » en été pourrait être liée à la sénescence progressive des rameaux qui s'observe à cette période de l'année.

Phloroglucinol as the major phenolic compound in the brown macroalga *Cystoseira tamariscifolia* from Brittany (France): identification, detection using solid-state NMR spectroscopy, quantification of seasonal variations using liquid NMR spectroscopy

Camille Jégou^{1,2}, Nelly Kervarec^{1,3}, Gaëlle Simon^{1,3}, Stéphane Cérantola^{1,3}, Valérie Stiger-Pouvreau^{1,3}

¹ University of Western Brittany, European University of Brittany

² Laboratory of Sciences of Marine Environment (LEMAR UMR 6539), European Institute of Marine Studies, rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France

³ Service de Résonance Magnétique Nucléaire - Résonance Paramagnétique Électronique6 avenue Victor Le Gorgeu CS93837, 29238 Brest, France.

Corresponding author: Camille Jégou - camille.jegou@univ-brest.fr;

Keywords: *Cystoseira tamariscifolia*, phloroglucinol, seasonal variation, NMR, HR-MAS, chemotaxonomy

Abstract

The pool of phenolic compounds in the brown alga *Cystoseira tamariscifolia* (Fucales, Phaeophyceae) was investigated using both solid-state and liquid-state NMR spectroscopy. Phloroglucinol was detected as the major phlorotannin nearly all year-long in small algal fragments using ¹H HR-MAS NMR, confirming the usefulness of this molecule as a chemotaxonomic marker of the species. However, through analyses of extracts, we observed that phloroglucinol levels dramatically varied within algal tissues, virtually absent from primary axes, and found in high quantities in apical parts. A seasonal pattern of production could be observed: phloroglucinol levels increased until the beginning of the maturity period, and tended to decrease after. This molecule can also be regarded as a phenological marker.

Subject and source

Cystoseira (Fucales, Phaeophyceae) is a widespread genus within brown algae, relatively species-rich, with currently 43 valid taxa (Guiry and Guiry, 2011). In Brittany (France) only 5 species are reported (Dizerbo and Herpe, 2007). *Cystoseira tamariscifolia* is one of them, typically settled along Atlantic shores of Europe, but its distribution can extend to the western Mediterranean Sea.

Thalli of *Cystoseira tamariscifolia* were sampled at Penmarc'h, in Brittany (Atlantic coasts of France). The correct identification was ensured using morphological criteria described in the literature (Cabioc'h *et al.*, 2006; Roberts, 1970). A voucher specimen (Number: CJ-CT-01) has been deposited in the Laboratory of Sciences of Marine Environment at the European Institute for Marine Studies (Plouzané, France). In this study we used Nuclear Magnetic Resonance to detect phenolic compounds in small thalli fragments (using HR-MAS experiments) and to determine intra-thallus and seasonal variations of their levels (using liquid-state experiments).

Previous work

Within brown algae, the species of the genus *Cystoseira* are particularly uneasy to discriminate. Even if molecular data have evidences taxonomic issues within this genus (Draisma *et al.*, 2010; Harvey and Goff, 2006), the classification remains ambiguous. So far the most comprehensive classification has been established using chemicals and the usefulness of terpenoids as chemical markers has been highlighted many times (see Pellegrini *et al.*, 1997; Valls and Piovetti, 1995; Amico, 1995 for review). Phenolic compounds and more precisely phlorotannins (phloroglucinol polymers) are another kind of natural products intensively investigated within brown algae (Blunt *et al.*, 2007; Ragan and Glombitza, 1986). Their use as chemotaxonomic markers has not been proposed yet. In the course of our study of the genus *Cystoseira* (Jégou *et al.*, 2010), we investigated the chemical content of *C. tamariscifolia* (Withering) M. Roberts. Several phenols have already been described in this species (Glombitza *et al.*, 1975). However, to our knowledge, they have not been quantified, and their variability has not been evaluated.

Present work

Two sets of samples were collected: (1) small fragments of algal material, collected monthly from February 2009 to August 2010 and (2) larger samples collected from February to September 2009 and from March 2010 to August 2010. From October 2009 to February 2010, *C. tamariscifolia* was in a dormancy state (Jégou, 2011), only occurring as drastically reduced thalli. Then, we could not sample suitable quantities of algal material in this period. On the return to the laboratory, the samples were cleaned with deionized water and freeze-dried.

Phloroglucinol was identified as the major phenolic compound using a commercial standard (Sigma-Aldrich, France). After an extraction using a methanol/water (1:1) solvent mixture on a *Cystoseira tamariscifolia* powder, we analyzed the extract (dissolved in deuterium oxide) with a simple ^1H NMR acquisition on a Bruker DRX 500. Then we added pure phloroglucinol to the sample and analyzed it again. This resulted in the amplification of the singlet at 6.02 ppm observed in the crude extract, allowing us to characterize phloroglucinol as the major phenolic compound in this alga (Figure 1).

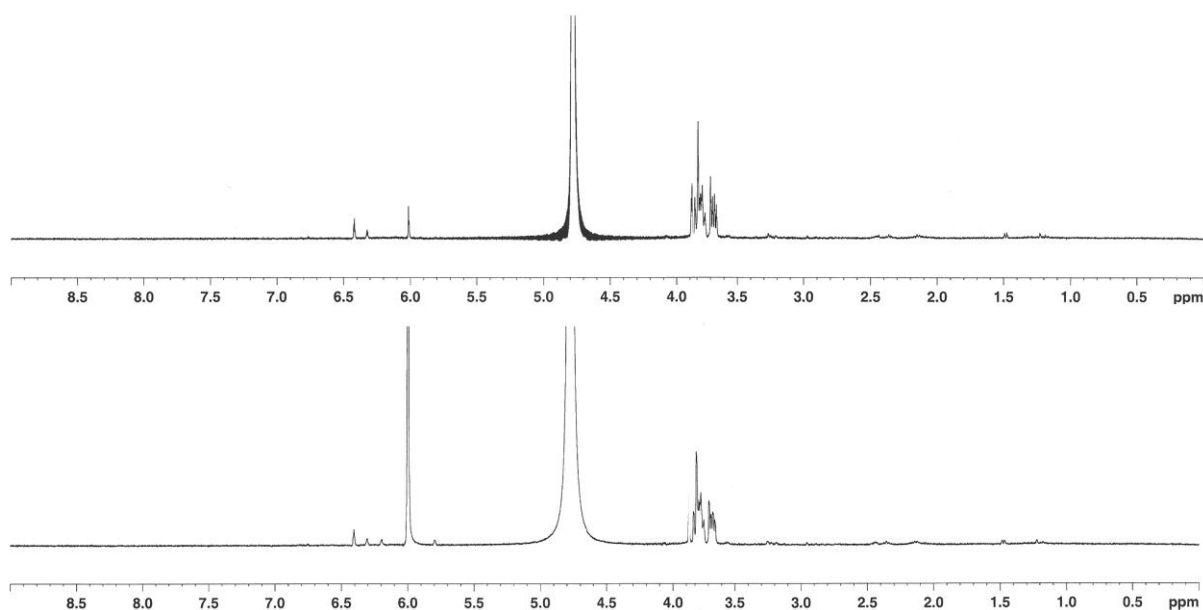


Figure 1: ^1H NMR spectra of crude extract of *Cystoseira tamariscifolia* (up), and the same extract enriched with phloroglucinol (down) ; water peak around 4.7 ppm, mannitol signals between 3.6 and 3.9 ppm.

The presence of phloroglucinol was evaluated in fragments of algae throughout the 19 months sampling period using ^1H HR-MAS NMR spectroscopy. All spectra were acquired on a Bruker DRX 500 spectrometer using equipped with an indirect HR-MAS $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ probe-head with gradient Z at 25°C. One spectrum consisted in 64 scans, with presaturation of the water signal. Around 5 mg of algal freeze-dried fragment of alga was placed in the rotor, and then around 30 μL of D_2O was added to lock the ^2H field. Rotor turned on an axis placed at the “magic angle” (54.7°) to the magnetic field B_0 , and the spinning frequency was set at 5000 Hz. Table 1 indicates the intensity of the signal of phloroglucinol throughout the months.

Table 1: Intensities of the *in vivo* phloroglucinol determined with ^1H HR-MAS spectra. (-): absence; (+): signal barely apparent; (++) : signal clearly noticeable; (+++): highest intensity of phloroglucinol

Month	Feb. 09	Mar. 09	Apr. 09	May 09	Jun. 09	Jul. 09	Aug. 09	Sep. 09	Oct. 09	Nov. 09	Dec. 09
Intensity	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	+++
Month	Jan. 10	Feb. 10	Mar. 10	Apr. 10	May 10	Jun. 10	Jul. 10	Aug. 10			
Intensity	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			

Phloroglucinol levels were evaluated through NMR analyses of liquid extracts using Trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteriopropionate- d_4 (TSP) as internal standard. Phenolic compounds were extracted twice from 200 mg of powdered algae with a methanol/water (1:1) mixture during 2 hours, at 40°C at the obscurity. The two extracts were pooled, methanol was evaporated and the volume of crude extract was set to 10 mL of aqueous solution. Then, 1 mL of extract was sampled, evaporated to dryness and dissolved in exactly 700 μL of D_2O in a NMR tube. 5 μL of a TSP stock solution (5 mg/L) were subsequently added in the NMR tube, which was homogenized. A high delay ($d_1=10\text{s}$) between each scan was set in order to let all nuclei relax, resulting in a perfect correspondence between intensity of the signal and quantity of nuclei on the spectra. The concentration of phloroglucinol in the sample was calculated using the intensity of its signal (singulet at 6.02 ppm for 3 protons per molecule) and the factor linking quantity of protons and intensity of signal for the TSP (deduced with the

integration of the singulet at 0.00 ppm, 9 protons per molecule). A typical spectrum used to determine phloroglucinol levels is presented at Figure 2.

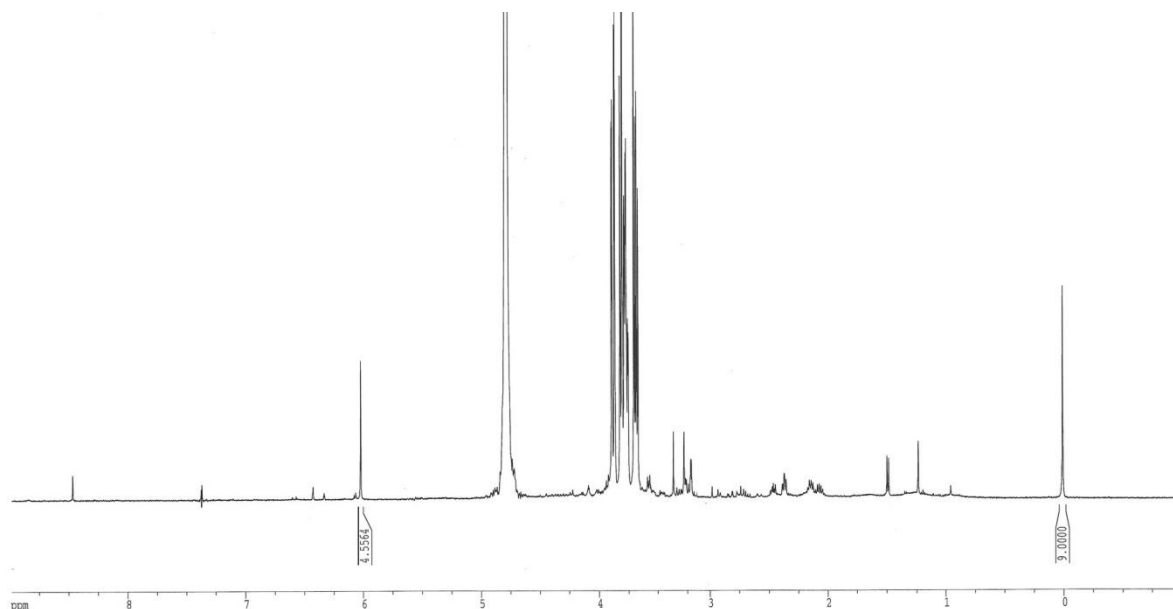


Figure 2: ^1H NMR spectra of crude extract of *Cystoseira tamariscifolia* (apical parts of the thallus) with TSP as an internal standard (signal at 0.00 ppm); phloroglucinol signal is at 6.02 ppm.

We extracted phenolic compounds from primary axes (morphologically similar to “stems”) and apical parts of the thallus (“leaves”), according to the protocol described before, and then analyzed the content of the extracts using ^1H NMR. Phloroglucinol was virtually absent from primary axes, only occurring as a hardly noticeable signal near the baseline of the spectra (Figure 3). Conversely, significant quantities of phloroglucinol were detected in apical parts of the thallus (Figure 2).

Seasonal variations of phloroglucinol contents in the apical parts of *C. tamariscifolia* are illustrated in Figure 4, for years 2009 and 2010. During both years, mean content increased up to May (0.30 ± 0.06 % DW in 2009 and 0.47 ± 0.04 % DW in 2010), and then decreased during summer to very low values (under 0.02 % DW for both years) just before apical parts shed in September.

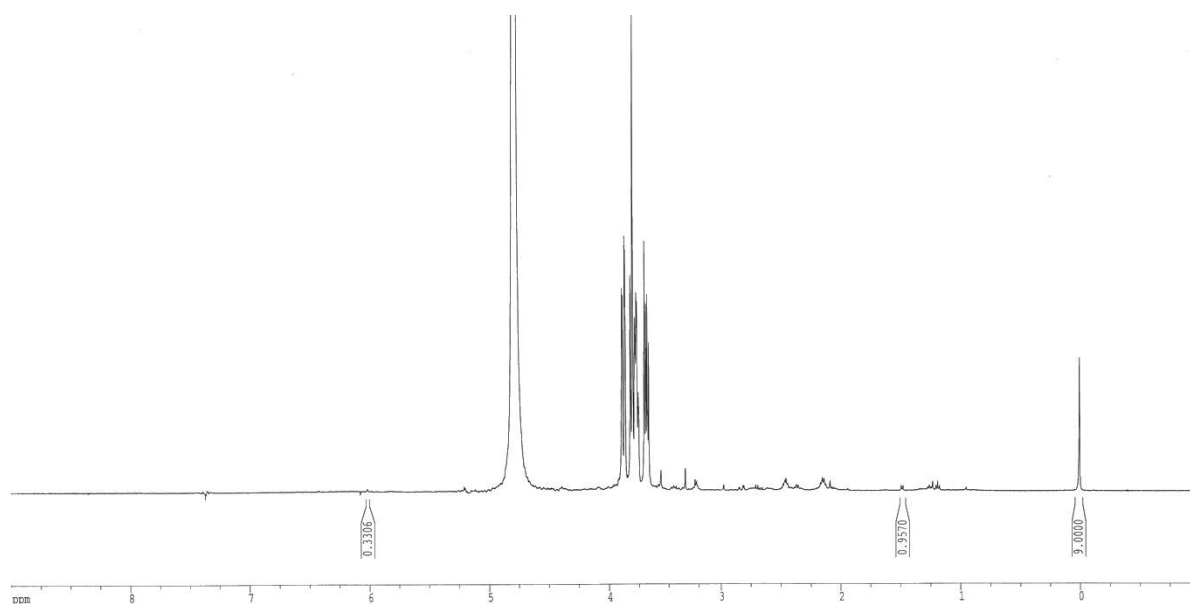


Figure 3: ^1H NMR spectra of crude extract of *Cystoseira tamariscifolia* (primary axes of the thallus) with TSP as an internal standard (signal at 0.00 ppm); phloroglucinol signal is at 6.02 ppm.

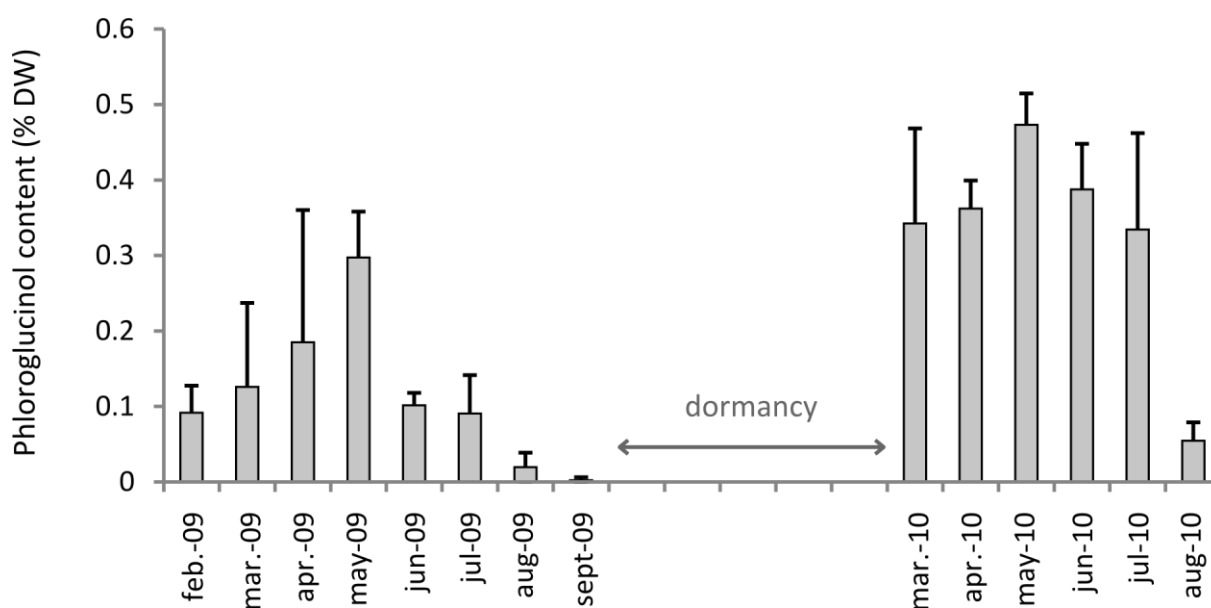


Figure 2: Monthly evolution of phloroglucinol contents (mean $\pm$ standard deviation expressed in % relative to dry weight), as determined by NMR quantification using TSP as internal standard.

Chemotaxonomic and ecological significance

We could easily identify phloroglucinol as a major compound from *Cystoseira tamariscifolia*. This molecule is clearly noticeable *in vivo* (Table 1). Like previous studies on brown algae (Jégou *et al.*, 2010; Le Lann *et al.*, 2008), ^1H NMR HR-MAS appears as a strong taxonomical tool, because the chemical composition of the analyzed taxa remained globally the same throughout seasons. Phloroglucinol appears as the most obvious chemotaxonomic marker of *C. tamariscifolia* in Brittany. However, large quantities of phloroglucinol were also detected in *Cystoseira discors* like in *C. tamariscifolia* (Ragan and Glombitza, 1986). *C. discors* is presently referred to as *Cystoseira fœniculacea* (Guiry and Guiry, 2011). In opposition, during our previous taxonomical investigation on the genus *Cystoseira*, we did not detect phloroglucinol from *C. fœniculacea* (Jégou *et al.*, 2010), using ^1H HR-MAS technique. Phloroglucinol is likely to be present in this species too, however in very small quantities that could not be detected *in vivo*. We can hypothesize that Ragan and Glombitza (1986) and Jégou *et al.* (2010) did not investigate the composition of the same alga. The numerous heterotypic synonyms within the genus *Cystoseira* might still be a problem dealing with chemical investigation.

In our study, strong differences in phloroglucinol concentrations exist between primary axes and apical parts of the thallus. The apical parts, which consist in secondary, tertiary (etc.) axes regenerated each year, produce large amounts of phloroglucinol. On the contrary, primary axes seem not to produce phloroglucinol. Furthermore, we did not observe in the related spectra any signal around between 5.7 and 6.5 ppm, where the signals of phlorotannins usually occur (Cérantola *et al.*, 2006). Our results indicate an absence of phlorotannins and phloroglucinol in primary axes. A similar intra-thallus variation in phenolic compounds has been highlighted in *Ecklonia radiata* by Steinberg (1989), in which the stipe (primary axis) had much lower levels than the other tissues. If phenols in brown algae play an important role against epiphytes, as suggested by Brock *et al.* (2001), their absence in primary axes may be the reason why the main axis of *C. tamariscifolia* is permanently covered by epiphytes all year long (pers. obs.). Hence, this species favors the chemical defense of its apical organs to the detriment of its main axis.

Phlorotannins are also known to accumulate in brown algae according to seasonal patterns. Stiger *et al.* (2004) highlighted that the maximal phenolic content in two sargassacean species from tropical areas, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata*,

occurred in austral summer. Plouguerné *et al.* (2006) and Le Lann (2009) showed maximal content before or around the fertile period in several populations of *Sargassum muticum* and *Cystoseira baccata* from Brittany, and Connan *et al.* (2004) observed the same phenomenon for eight species of Fucales, assuming a photoprotective role of phlorotannins. Steinberg (1995) evidenced a negative correlation between phlorotannins production and growth rate; nevertheless, the author noticed the co-occurrence of high phlorotannins levels and high growth rates in spring. In Brittany, *C. tamariscifolia* grows intensively from May to August, and all individuals get mature in May. Later on, the apical parts of the thalli fall off and the macroalgae begin dormancy until next February. We cannot assume a photoprotective role of phloroglucinol, as its concentration dramatically decreased at the beginning of summer in 2009 and 2010. Our observations tend to indicate that the energetic cost of growth could prevent phloroglucinol production in summer. Phloroglucinol can be regarded as a phenological status indicator of *Cystoseira tamariscifolia*, with the highest levels occurring when receptacles begin to develop, probably in order to protect them.

Finally, as phloroglucinol is a precursor of phlorotannins, *Cystoseira tamariscifolia* is of prime interest, and should be considered further for investigation about biosynthetic pathways of phlorotannins production.

Acknowledgements

This study is part of the Ph.D. thesis work carried out by the first author within the Laboratory of Sciences of Marine Environment (LEMAR UMR 6539). It was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and by the GIS Européle Mer project Phlorotann-ING.

References

- Amico, V. 1995. *Phytochemistry*, 39, 1257
- Blunt, J., Copp, B., Hu, W.-P., Munro, M., Northcote, P., Prinsep, M. 2007. *Nat. Prod. Rep.* 24, 31
- Brock, E., Åberg, P., Pavia, H. 2001. *J. Phycol.* 37, 8
- Cabioc'h, J., Floc'h, J.-Y., Le Toquin, A., Boudouresque, C.-F., Meinesz, A., Verlaque, M. 2006. *Guide des algues des mers d'Europe*. Delachaux et Niestlé
- Cérantola, S., Breton, F., Ar Gall, E., Deslandes, E. 2006. *Bot. Mar.* 49, 347
- Connan, S., Goulard, F., Stiger, V., Deslandes, E., Ar Gall, E. 2004. *Bot. Mar.* 47, 410

- Dizerbo, A., Herpe, E. 2007. Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la manche et de l'Atlantique, Iles Anglo-Normandes incluses. Anaximandre
- Draisma, S., Ballesteros, E., Rousseau, F., Thibaut, T. 2010. J. Phycol. 46, 1329
- Glombitza, K.-W., Rosener, H.-U., Müller, D. 1975 Phytochemistry 14, 1115
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2011. [Http://Www.Algaebase.Org](http://Www.Algaebase.Org)
- Harvey, J.B.J., Goff, L.J. 2006. J. Phycol. 42, 707
- Jégou, C., Culioli, G., Kervarec, N., Simon, G., Stiger-Pouvreau, V. 2010. Talanta 83, 613
- Jégou, C. 2011 PhD Thesis
- Le Lann, K., Kervarec, N., Payri, C.E., Deslandes, E., Stiger-Pouvreau, V. 2008. Talanta 74, 1079
- Le Lann, K. 2009 PhD Thesis
- Pellegrini, M., Valls, R., Pellegrini, L. 1997. Lagasalia 19, 145
- Plouguerné, E., Le Lann, K., Connan, S., Jechoux, G., Deslandes, E., Stiger-Pouvreau, V. 2004. Aquat. Bot. 85, 337
- Ragan, M., Glombitza, K.-W. 1986. Prog. Phyc. Res. 4, 129
- Roberts, M. 1970. Eur. J. Phycol. 5, 201
- Steinberg, P. D. 1989. Oecologia 78, 373
- Steinberg, P. D. 1995. Oecologia 102, 169
- Stiger, V., Deslandes, E., Payri, C.E. 2004. Bot. Mar. 87, 402
- Valls, R., Pioveti, L. 1995. Biochem. Syst. Ecol. 23, 723

4 DISCUSSION

4.1 DÉTERMINATION DES TENEURS EN PHLOROTANNINS

4.1.1 OPTIMISATION DU PROTOCOLE DE PURIFICATION DES EXTRAITS BRUTS

A notre connaissance, cette étude est la première à caractériser la variabilité saisonnière des phlorotannins au sein du genre *Cystoseira*. Elle est également la première à utiliser une étape de purification avant de doser ces composés, afin de limiter les interférences possibles avec d'autres molécules, la méthode de Folin-Ciocalteu dosant également des composés non polyphénoliques (Everette *et al.*, 2010 ; Ikawa *et al.*, 2003 ; Singleton, 1999).

Au cours de notre étude quantitative des phlorotannins du genre *Cystoseira*, nous avons choisi de réaliser une purification de ces composés phénoliques par une extraction liquide-liquide eau-acétate d'éthyle (AE) avant de procéder à leur dosage par la méthode de Folin-Ciocalteu, qui est une étape de purification couramment employée pour isoler des phlorotannins (Ragan & Glombitza, 1986). Ce choix s'est avéré pertinent, puisque nous avons pu mettre en évidence de très grands écarts de teneurs en composés phénoliques entre les deux phases du protocole (Figure 63). D'après les résultats de dosage, les composés phénoliques se répartissent très inégalement entre phase aqueuse et phase AE. De plus, que l'on utilise les résultats de dosage de la phase aqueuse ou ceux de la phase AE, la hiérarchie des teneurs entre espèces est fondamentalement différente. A titre d'exemple, d'après les échantillons de novembre 2009, *Cystoseira nodicaulis* serait une des espèces les moins riches en composés phénoliques, avec des teneurs avoisinant 1.7 % (contre 3 % et plus pour *C. baccata*, *C. fœniculacea* et *C. humilis*) en considérant les résultats de la phase aqueuse (Figure 63). D'ailleurs, phase aqueuse et extrait brut indiquent une hiérarchie similaire entre espèces, avec par exemple des teneurs maximales pour *C. fœniculacea* et minimales pour *C. nodicaulis*. A l'opposé, les résultats du dosage des composés phénoliques dans la phase AE indiquent les plus fortes teneurs chez *C. tamariscifolia*, et les plus faibles chez *C. baccata*. Ainsi, les résultats d'analyse par RMN ont permis de savoir dans quelle phase se trouvent réellement les phlorotannins.

Ainsi, il s'avère qu'exception faite de *Cystoseira tamariscifolia*, des signaux de polyphénols n'ont été observés que dans les phases acétate d'éthyle (Figure 64 à Figure 68). Même chez *C. tamariscifolia*, les signaux aromatiques présents dans la phase aqueuse sont

d'intensité bien moindre par rapport à ceux que l'on retrouve dans la phase AE (Figure 68). Dès lors, il apparaît extrêmement pertinent de procéder à une purification sommaire de l'extrait brut via une extraction liquide-liquide, puisque de nombreux composés non phénoliques dans l'extrait brut interagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu, et leur réponse dans le dosage est supérieure à celle des phlorotannins. Ainsi, au sein du genre *Cystoseira*, il apparaît nécessaire de ne pas doser directement les phlorotannins à partir des extraits hydrométhanologiques bruts.

De plus, nous avons pu déterminer directement les teneurs du composé phénolique ultra-majoritaire chez *C. tamariscifolia* (voir ci-après, dosage du phloroglucinol par RMN). Les résultats de ce dosage spécifique sont du même ordre de grandeur que ceux du dosage sur les phases acétate d'éthyle : entre 0.1 % et 0.5 % MS. Ceci renforce notre conviction quant à l'intérêt et l'efficacité de notre protocole de purification. En considérant ces résultats, il apparaît indispensable de purifier les composés phénoliques des cystoseires avant de les doser par la méthode de Folin-Ciocalteu, pour éviter les problèmes d'interférences.

Comme nous avons pu également le mettre en évidence au sein du genre *Cystoseira* des côtes bretonnes, d'autres auteurs ont déterminé des variations saisonnières des teneurs en composés phénoliques d'algues brunes: [Le Lann \(2009\)](#) chez *Cystoseira baccata*, *Sargassum muticum* et *Bifurcaria bifurcata* en Bretagne ; [Kamiya et al. \(2010\)](#) chez plusieurs Sargassacées japonaises ; [Abdala-Diaz et al. \(2006\)](#) chez *C. tamariscifolia* en Espagne ; [Plouguerné et al. \(2006\)](#) chez *Sargassum muticum* en Bretagne ; [Connan et al. \(2004\)](#) chez diverses Fucales en Bretagne ; [Stiger et al. \(2004\)](#) chez deux sargassacées tropicales, *Sargassum mangarevense* et *Turbinaria ornata* et [Steinberg \(1995\)](#) chez *Ecklonia radiata*, en Australie. Ces études ont déterminé les teneurs en phlorotannins par dosage selon les méthodes de Folin-Ciocalteu ou Folin-Denis réalisés sur des extraits bruts.

Nos résultats ne remettent pas nécessairement en question les résultats publiés dans les études citées. En effet, [Parys et al. \(2009\)](#) ont réalisé en parallèle deux dosages des phlorotannins chez *Ascophyllum nodosum*, par détermination spécifique en RMN, et par méthode de Folin-Ciocalteu. Leur conclusion était que la méthode de Folin-Ciocalteu sous-estimait légèrement la teneur en phlorotannins par rapport à la méthode spécifique par RMN. Les deux méthodes renseignaient cependant les mêmes évolutions saisonnières des teneurs chez cette espèce.

Notre avis sur la question est donc le suivant. Avant de doser les phlorotannins chez une espèce, nous considérons pertinent de vérifier par RMN la cohérence du dosage de Folin-Ciocalteu, et en fonction des résultats, de doser directement les composés phénoliques dans les extraits bruts, ou dans des phases AE si une purification semble judicieuse.

4.1.2 TENEURS SPÉCIFIQUES

Dans la littérature, quelques études se sont attachées à quantifier les teneurs en composés phénoliques de différentes espèces de *Sargassaceae* en Bretagne. [Connan et al. \(2006\)](#) ont montré des teneurs supérieures à 3 % MS chez *Bifurcaria bifurcata* ; [Plouguerné et al. \(2006\)](#) ont mis en évidence des teneurs parfois supérieures à 6 % MS chez *Sargassum muticum* ; enfin, [Le Lann \(2009\)](#) a observé des teneurs oscillant entre 0.1 % MS et 0.4 % MS chez *Sargassum muticum*, *Cystoseira baccata* et *Bifurcaria bifurcata*. Néanmoins, les auteurs ayant dosé les phlorotannins dans les extraits bruts, et réalisé leurs extractions à partir de matériel frais broyé à l'ultra-turax, le protocole qu'ils ont utilisé est trop différent du nôtre pour que nous puissions raisonnablement comparer nos données.

Sur l'ensemble du suivi à Penmarc'h, nous avons pu déterminer que les teneurs en composés phénoliques sont les plus fortes chez *Cystoseira tamariscifolia*, *C. nodicaulis* et *C. baccata*, tandis que *C. fœniculacea* et *C. humilis* présentent des teneurs plus faibles (inférieures à 0.2 % MS) (Figure 69). Parmi les différents rôles prêtés aux composés phénoliques, un rôle de photoprotection des phlorotannins a été envisagé par [Pavia et al. \(1997\)](#) et [Pavia & Brock \(2000\)](#). Ces auteurs ont montré une induction de la production de phlorotannins chez *Ascophyllum nodosum* suite à une soumission des thalles à de fortes doses d'UV-B. Du fait des nombreux cycles aromatiques constituant ces molécules, elles absorbent fortement certaines radiations UV.

Peut-on alors envisager un rôle photoprotecteur des phlorotannins dans le cas des espèces de *Cystoseira* étudiées ?

Les données du Chapitre III nous ont permis de préciser la répartition de chaque espèce sur l'estran. Ainsi *C. baccata* et *C. tamariscifolia* sont en position basse sur l'estran, à la limite des niveaux de basse mer ; *C. nodicaulis* et *C. fœniculacea* sont en position médiane, au niveau de mi-marée, et *C. humilis* est en position haute, au niveau de marée haute.

C. humilis est l'espèce qui reçoit la plus grande quantité de rayons ultra-violet, puisque sur un cycle de marée, les cuvettes peu profondes dans lesquelles elle s'installe ne sont immergées qu'un court laps de temps. Pourtant, ses teneurs en composés phénoliques sont bien plus faibles que chez *C. tamariscifolia*, qui demeure bien moins exposée à de fortes radiations de par sa position basse sur l'estran. Il est donc impossible d'établir une relation directe entre distribution des espèces sur l'estran et teneurs en composés phénoliques. Cependant, les phlorotannins sont également exsudés dans le milieu environnant, comme cela a été démontré par Swanson & Druehl (2002) et Jennings & Steinberg (1994). Si les phlorotannins des espèces que nous avons étudiées ont une action anti-UV, peut-être sont-ils plutôt exsudés dans le milieu. Les teneurs observées *in vivo* sont probablement dépendantes d'autres facteurs.

A l'opposé, les teneurs en composés phénoliques semblent « influencées » par le groupe taxinomique de l'espèce considérée. Au Chapitre II, nous avons mis en évidence la polyphylie du genre *Cystoseira* au travers de ses représentants en Bretagne, en mettant en évidence deux groupes : « *C. fœniculacea* et *C. humilis* » d'une part, et « *C. baccata*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia* » d'autre part. Les groupes monophylétiques ont également été renforcés par des arguments en termes de composition chimique (Jégou *et al.*, 2010). Notre étude quantitative des phlorotannins appuie l'idée selon laquelle *C. fœniculacea* et *C. humilis* adoptent une stratégie de défense chimique fondamentalement différente de celle de *C. baccata*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia* qui produisent des phlorotannins en quantités bien plus importantes que les deux premières espèces.

4.1.3 VARIABILITÉ SAISONNIÈRE

Les teneurs en composés phénoliques chez *Cystoseira humilis* n'indiquent pas de schéma d'évolution saisonnière (Figure 70). Ce résultat n'est pas étonnant ; en effet, au Chapitre III, nous avons montré qu'à Penmarc'h, la population de cette espèce est en équilibre dynamique, et se renouvelle perpétuellement. Aucune saisonnalité n'y a été observée, que ce soit dans la taille des individus, les densités observées ou la présence d'individus arrivés à maturité.

Nous pouvons dresser le même constat pour *Cystoseira fœniculacea*, dont les teneurs en composés phénoliques n'ont pas franchement varié pendant les 18 mois (Figure 70). Au

contraire, cette espèce se développe de façon saisonnière, les individus perdant leurs rameaux vers la fin du printemps, et se développant progressivement jusqu'à la fin de l'hiver. Ainsi, les teneurs en phlorotannins chez cette espèce semblent indépendantes de l'état phénologique des individus.

Même si nous n'avons pas déterminé de cycle phénologique chez *Cystoseira baccata* (voir Chapitre III), dont les individus étaient à l'état reproducteur tout au long de l'année à Penmarc'h, nous avons noté des teneurs plus faibles en composés phénoliques en hiver 2010, et des teneurs plus fortes en été (Figure 70). Nos résultats sont contradictoires avec ceux établis par [Le Lann \(2009\)](#), qui a observé des teneurs plus fortes durant l'hiver et l'été à partir d'échantillons prélevés à Porsmeur (Finistère Nord). L'origine de cette différence tient peut-être à l'étape de purification que nous avons incluse dans notre étude, alors que l'auteur a dosé les polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu dans l'extrait brut et également à un effet du site et/ou de l'année d'échantillonnage sur les teneurs observées. Des études complémentaires doivent être menées pour déterminer l'origine de la variabilité saisonnière observée, puisqu'ici la relative stabilité des paramètres des populations contraste avec la saisonnalité des teneurs en composés phénoliques. Un facteur environnemental qui n'influencerait cependant ni la taille, ni la densité ou la maturité des individus, pourrait expliquer ces variations saisonnières des concentrations en phlorotannins. Une contrainte variable dans le temps, telle que l'épiphytisme ou la pression des herbivores pourrait expliquer nos résultats.

Nous pouvons estimer que les teneurs en polyphénols de *Cystoseira nodicaulis* évoluent en parallèle de la phénologie de l'espèce. Les concentrations sont minimales de mai à juillet, lorsque les rameaux commencent à tomber naturellement. On peut ainsi considérer qu'une forme de sénescence progressive dès le mois de mai entraîne une diminution des teneurs, après quoi les rameaux sont régénérés à partir de l'automne, avec une augmentation des teneurs. Enfin, en hiver, certains rameaux commencent à se détacher, et les teneurs diminuent, annonçant la période de repos et de plus faibles teneurs observées au début de l'été (cf. résultats sur la Figure 70).

Cystoseira tamariscifolia est caractérisée par des variations saisonnières encore plus nettes (Figure 70). En effet, on peut opposer la fin de l'été aux autres moments de l'année. De plus, les teneurs sont particulièrement faibles (0.1% MS) entre août et octobre 2009, contrairement au printemps ou à l'été où elles dépassent les 0.4% MS. Tout comme

C. nodicaulis, on peut justifier cela par le fait que la perte des rameaux des *C. tamariscifolia* est amorcée pendant l'été, et est maximale en août-septembre (voir Chapitre III). Ainsi, la sénescence estivale des rameaux est une explication plausible à ces teneurs particulièrement faibles. Nos résultats ne sont pas incompatibles avec les observations d'Abdala-Díaz *et al.* (2006) qui ont montré une augmentation progressive des teneurs entre février et juin, puis une décroissance de juillet à décembre en Espagne. Les auteurs ont également montré que les niveaux de composés phénoliques sont corrélés au niveau de radiations lumineuses, et en ont déduit un rôle photoprotecteur de ces composés. Dans notre étude, nous observons une diminution plus drastique des teneurs en été, qui nous semble liée à la sénescence qui se déclenche à cette période. Malheureusement, Abdala-Díaz *et al.* (2006) ne précisent pas la phénologie de *C. tamariscifolia* en Espagne. Cette donnée serait particulièrement intéressante pour pouvoir comparer la stratégie de cette espèce entre les populations françaises et les populations espagnoles.

De façon générale, il ressort de notre étude du genre *Cystoseira* qu'il n'existe pas de schéma-type dans la production de phlorotannins, et que chaque espèce doit être considérée indépendamment. En Bretagne, Le Lann (2009), Plouguerné *et al.* (2006), ainsi que Connan *et al.* (2004) ont montré des teneurs en phlorotannins plus importantes chez diverse Fucalées à l'approche de la saison estivale, envisageant ainsi un rôle photoprotecteur de ces composés, à l'échelle saisonnière. Stiger *et al.* (2004) ont montré un phénomène similaire chez des Sargassacées dans le Pacifique Sud. Cette théorie peut être envisagée pour expliquer les fortes teneurs en composés phénoliques chez *C. baccata* durant la saison estivale.

Les variations saisonnières des teneurs en phlorotannins sont des données qu'il convient d'interpréter avec précaution. Même si nous avons limité les interférences dans le dosage de Folin-Ciocalteu en purifiant les extraits, nous avons quantifié un mélange de nombreux composés. C'est une des raisons qui nous a contraint à purifier les composés phénoliques du genre *Cystoseira*, pour éventuellement les quantifier de manière plus spécifique.

4.2 CARACTÉRISATION STRUCTURALE DES PHLOROTANNINS

4.2.1 EFFICACITÉ DU PROTOCOLE DE PURIFICATION

Le protocole de purification développé au cours de notre étude s'est avéré efficace pour isoler les phlorotannins à partir des extraits bruts de cystoseires. L'exemple le plus marquant est celui de *Cystoseira tamariscifolia*, pour laquelle nous avons pu isoler du phloroglucinol pur en fin de protocole (fraction 1), ainsi qu'un autre composé en fraction 2 (Figure 73). Nous avons observé de façon générale peu de pertes de composés, ce que démontre l'absence de signaux dans la zone de 5.7 à 6.5 ppm caractéristique des phlorotannins dans tous les produits éliminés (précipités, phases dichlorométhane, etc.). L'efficacité du protocole est sans doute à mettre en relation avec l'utilisation de bouteilles à centrifuger, que nous avons préférées aux ampoules à décanter pour les extractions liquide-liquide. En effet, la centrifugation permet de réduire au maximum les émulsions entre deux phases miscibles. Ainsi, il est possible de mélanger vigoureusement deux solvants non miscibles et d'obtenir *in fine* deux phases bien distinctes par centrifugation, ce que ne permet pas la simple décantation.

Notre protocole utilise la polarité des phlorotannins pour les séparer des autres molécules présentes dans les extraits. En général, nous avons obtenu un mélange de phlorotannins que nous avons ensuite analysé par RMN. Néanmoins, ce protocole ne permet pas de séparer les différents phlorotannins en mélange dans l'extrait, ce qui est nécessaire afin de les identifier. Nous avons tenté de séparer les phlorotannins d'après leur taille, puisqu'il existe des polymères de tailles extrêmement variées (Targett & Arnold, 1998). Nous avons testé un système de chromatographie moyenne pression par perméation de gel pour fractionner un échantillon enrichi en phlorotannins, en utilisant une colonne de résine Sephadex LH-20. Malheureusement, les phlorotannins semblent s'adsorber de manière irréversible sur ce type de phase. Même si les résultats de ce protocole n'ont pas été probants, cette piste ne doit pas être écartée, et peut constituer une voie judicieuse afin de purifier davantage ce type de composés.

4.2.2 FAMILLES DE PHLOROTANNINS CARACTÉRISÉES PAR RMN 2D

Les types de phlorotannins mis en évidence chez *Cystoseira baccata*, *C. humilis* et *C. nodicaulis* sont sensiblement les mêmes. On retrouve des liaisons C-C, caractérisant des fucols chez les trois espèces, ainsi que des liaisons C-O-C, dans une zone de déplacements chimiques typique des phloréthols (vers 120 ppm en dimension carbone). L'absence de signaux à 145-150 ppm semble indiquer que les extraits ne contiennent pas de polymère du type fuhalol (Cérantola *et al.*, 2006). Cela semble étonnant puisque des fuhalols ont été caractérisés chez *C. baccata* (Glombitza *et al.*, 1981) et chez *C. nodicaulis* (Glombitza *et al.*, 1985). Parallèlement, on retrouve chez *C. baccata* et *C. humilis* de faibles quantités de phloroglucinol.

Chez *Cystoseira tamariscifolia*, nous avons montré la présence en grandes quantités de phloroglucinol et d'un autre composé qui, du fait de la multiplicité observée dans ses signaux, ne peut pas être un simple fucol. Nous avons essayé de rechercher la trace de composés déjà identifiés chez cette espèce par Glombitza *et al.* (1975) : le bifuhalol et le diphloréthol. D'après les données RMN du diphloréthol et du bifuhalol (également décrit chez *Bifurcaria bifurcata* par Glombitza & Rösener, 1974), les signaux RMN des protons aromatiques de ces composés seraient un doublet et un triplet. Cependant, considérant leur déplacement chimique, ces composés ne sont pas compatibles avec la molécule que nous avons isolée en fraction 2 chez *C. tamariscifolia*. Seules des analyses par spectrométrie de masse permettraient de répondre à la question de la nature du composé incriminé.

Suite à notre étude, un bilan peut être dressé concernant les phlorotannins présents chez les cinq espèces de *Cystoseira* bretonnes (Tableau 12).

Tableau 12 : Types de phlorotannins observés au cours de notre étude chez quatre espèces du genre *Cystoseira*

	<i>C. baccata</i>	<i>C. humilis</i>	<i>C. nodicaulis</i>	<i>C. tamariscifolia</i>
Phloroglucinol	Traces	Oui	Non	Oui
Fucols	Oui	Non	Oui	Non
Fucophloréthols	Oui	Non	Oui	Non
Phloréthols	oui	Oui	Oui	Non

Afin de donner une réponse définitive à la question des fuhalols, il nous semble judicieux d'utiliser le protocole décrit par Glombitza *et al.* (1975) et de caractériser les composés sous forme acétylée. Nous pourrions ainsi plus facilement comparer les résultats des analyses RMN. En effet, à notre connaissance, un nombre très restreint d'études décrit les déplacements chimiques de phlorotannins sous leur forme originelle (Cérantola *et al.*, 2006 ; McInnes *et al.*, 1985, 1984).

D'après les résultats de notre étude, les types de phlorotannins ne sont pas un critère pertinent d'un point de vue chimiotaxinomique. En effet, fucols et phloréthols sont des molécules très courantes parmi les espèces envisagées. Si le phloroglucinol peut être utilisé comme chimiomarqueur de *Cystoseira tamariscifolia*, c'est aussi parce que même s'il est présent chez *C. humilis* et *C. baccata*, c'est en quantités bien moins importantes, et il ne constitue alors qu'un composé minoritaire. C'est la raison pour laquelle il n'est pas détecté dans les tissus de ces deux espèces par ^1H RMN HR-MAS (Figure 60).

4.2.3 ACTIVITÉ ANTIRADICALE DES PHLOROTANNINS

Les composés phénoliques de *Cystoseira baccata*, *C. nodicaulis* et *C. tamariscifolia* ont montré une activité significative lors du test antiradicalaire du DPPH. Les phlorotannins des trois espèces sont légèrement moins actifs que la vitamine C. Cependant, les fractions purifiées de *C. baccata* et *C. tamariscifolia* se sont révélées plus actives que le BHT. L'activité antiradicalaire des composés phénoliques de *C. nodicaulis* reste très proche de celle du BHT. De plus, les courbes de décoloration présentées en Figure 78 indiquent que dans le cas des trois fractions de cystoseires (et du BHT), la réaction de neutralisation du radical DPPH n'était pas terminée. Dans le cas de la Vitamine C, l'absorbance diminue de façon linéaire lorsque les concentrations en Vitamine C augmentent, jusqu'à ce que tout le radical soit neutralisé. A l'opposé, pour les fractions, la décoloration n'est pas directement proportionnelle à la concentration (et donc à la quantité de produit). On peut supposer que les produits d'oxydation des phlorotannins sont eux aussi antioxydants, ce qui expliquerait que les réactions DPPH-Phlorotannins ne soient pas terminées comme dans le cas de la réaction DPPH-Vitamine C.

En tout cas, les phlorotannins de ces trois cystoseires possèdent une très forte activité antiradicalaire, qui laisse présager de leur implication dans la gestion du stress oxydatif au

niveau cellulaire. Au stade actuel, en considérant le coût de purification de ces molécules, il n'est pas envisageable de valoriser leur activité antiradicalaire. En revanche, il serait intéressant de procéder à d'autres tests d'activités biologiques (anti-inflammatoire, anticancéreuse, anti-VIH). En effet, les phlorotannins représentent aujourd'hui une source importante de nouvelles molécules à forte valeur ajoutée qui intéressent l'industrie pharmacologique (Brevet US6774145 ; Kim *et al.*, 2005 ; Ahn *et al.*, 2006).

4.3 ÉTUDE DU PHLOROGLUCINOL CHEZ *CYTOSEIRA TAMARISCIFOLIA*

Notre étude a pu montrer que le phloroglucinol est le composé phénolique majoritaire de *Cystoseira tamariscifolia*. A notre connaissance, l'étude que nous présentons sur les variations intra-individuelles et saisonnières du phloroglucinol est la première qui détermine spécifiquement les teneurs du polyphénol majoritaire d'une algue brune, contrairement aux données de la littérature qui quantifient l'évolution du mélange de composés phénoliques.

Par analyses en RMN, nous sommes parvenus à déterminer la variabilité des teneurs en phloroglucinol, qui est le polyphénol majoritaire de *C. tamariscifolia*. Nos résultats ont d'abord montré une différence de teneurs entre les axes primaires – qui n'en produisent que des traces difficilement détectables – et les axes secondaires, tertiaires (...), au sein desquelles les teneurs sont élevées, jusqu'à 0.5% MS. Nous observons ainsi une différence très nette, encore plus forte que les différences de teneurs en phlorotannins observées par Fairhead *et al.* (2005) chez des espèces du genre *Desmarestia*, et similaire aux observations de Steinberg (1989) qui a montré que les stipes d'*Ecklonia radiata* présentaient des teneurs en phlorotannins bien plus faibles que les frondes. Si le phloroglucinol joue un rôle dans la défense chimique des thalles, alors d'après notre étude *Cystoseira tamariscifolia* privilégie la défense des rameaux qu'elle régénère chaque année, plutôt que défendre son axe principal qui est pérenne.

Le phloroglucinol peut également être considéré comme un chimiomarqueur particulièrement robuste de cette espèce en Bretagne, puisqu'il est possible d'en détecter des quantités importantes pendant presque toute l'année, grâce à la technique de la RMN ¹H HR-MAS. Nous confirmons donc l'utilité de cette technique à des fins de chimiotaxinomie. Il semble particulièrement intéressant d'élargir l'étude aux espèces proches de *Cystoseira tamariscifolia* afin de déterminer la nature des phlorotannins. D'après Amico (1995), *C. amantacea* et *C. mediterranea* sont dans le même groupe chimique que

C. tamariscifolia. De plus, ces trois espèces partagent de nombreuses similarités morphologiques. D'après des analyses préliminaires en RMN ^1H HR-MAS (Sihem Ouerghi, communication personnelle), l'espèce *C. mediterranea* a le même profil de phlorotannins que *C. tamariscifolia*. Ainsi, la production de phloroglucinol pourrait être le marqueur chimique du clade « *C. mediterranea*, *C. tamariscifolia* » (contenant peut-être également *C. amantacea*).

Le phloroglucinol est un composé dont les teneurs dans les thalles de *Cystoseira tamariscifolia* évoluent de façon nette, avec un maximum en début d'été, observé en 2009 comme en 2010, et une diminution drastique des teneurs en fin d'été, qui tendent à devenir nulle en début d'automne. A nouveau, nous ne pouvons pas indiquer de façon certaine un rôle photoprotecteur du phloroglucinol. En effet, les radiations lumineuses sont encore très fortes en juillet-août en Bretagne. Nous rejoignons cependant la position de [Le Lann \(2009\)](#) et [Stiger et al. \(2004\)](#), qui indiquent que les composés phénoliques chez les algues brunes peuvent s'accumuler avant la période de maturité afin de protéger les réceptacles et les zygotes. En effet, les composés phénoliques sont connus pour leur activité anti-herbivore ([Amsler & Fairhead, 2006](#)).

5 CONCLUSION

Notre étude sur le phloroglucinol et les phlorotannins du genre *Cystoseira* en Bretagne laisse entrevoir l'étendue des recherches qui restent à mener sur ce type de molécules. Nous avons pu mettre en évidence des différences de teneurs entre espèce, sans qu'il soit possible de relier directement les teneurs en phlorotannins et la répartition sur l'estran. De plus, chaque espèce est caractérisée par une dynamique saisonnière de teneurs en phlorotannins qui lui est propre. Dans le cas de *C. tamariscifolia* et *C. nodicaulis*, les teneurs en phlorotannins semblent évoluer en parallèle avec la phénologie de l'algue. Ces composés sont accumulés dans les tissus avant la période de maturité, probablement afin de protéger les réceptacles du broutage par les herbivores.

Des investigations supplémentaires, qui élargiraient le suivi sur plusieurs années et qui doseraient également les composés phénoliques exsudés pourraient apporter quelques éclaircissements sur le rôle écologique des phlorotannins.

D'un point de vue qualitatif, nous avons pu voir que chez *Cytoseira baccata*, *C. humilis* et *C. nodicaulis*, de nombreux polymères constituent le mélange de phlorotannins, et que les ramifications entre unités se font par liaison aryle-aryle (caractérisant ainsi la présence de fucols), ou aryle-éther (typique des phloréthols et des fuhalols). Le type de polymérisation des phlorotannins n'est alors pas un critère de distinction taxinomique.

Parallèlement, nous avons pu voir que *C. tamariscifolia* se distingue de ces trois espèces, avec la présence de phloroglucinol en quantité bien supérieure. Ce composé se révèle être un chimiomarqueur robuste de l'espèce, car il a pu être observé à presque tous les moments de l'année par des analyses en RMN HR-MAS. Un deuxième composé a été isolé grâce au protocole de purification, mais des études supplémentaires sont nécessaires afin d'en caractériser la structure. Grâce à une technique innovante en RMN des solutions, nous avons pu quantifier de manière spécifique les variations intra-individuelles et saisonnières du phloroglucinol.

Outre l'amélioration de la connaissance des phlorotannins du genre *Cytoseira* en Bretagne, ce travail aura permis de répondre à plusieurs attentes du projet de recherches Phlorotann-ING. Nous avons d'abord élaboré un protocole de purification des phlorotannins qui constitue une première étape pour aboutir à leur identification. Ce protocole devra être approfondi, et une thèse est en cours au laboratoire afin de compléter ce protocole et de caractériser les phlorotannins de *Sargassum muticum* (thèse d'Anaëlle Tanniou).

Nous avons également montré que *Cytoseira tamariscifolia*, qui synthétise de façon majoritaire du phloroglucinol, est une espèce de choix pour l'étude des voies de biosynthèse des phlorotannins. En effet, le phloroglucinol étant un composé très simple, facilement observable par RMN, il est très facile de le quantifier grâce à la méthode de dosage que nous avons développée. Ainsi, cette espèce est un très bon candidat à des approches écophysiologiques ou de génomique fonctionnelle. Des expériences de culture en conditions contrôlées devront être menées chez *C. tamariscifolia*, afin de déterminer quels paramètres (température, salinité, radiations lumineuses, nutriments, pression d'herbivores) induisent une synthèse de composés phénoliques, et de répondre aux objectifs du projet Phlorotann-ING.

CONCLUSION GÉNÉRALE

1 RÉSULTATS MAJEURS

Au cours de cette étude du genre *Cystoseira* des côtes bretonnes, nous avons pu apporter quelques éclaircissements à propos de :

- La taxinomie et la classification des différentes espèces. Pour cela, nous avons utilisé des techniques analytiques avancées, isolé un chimiomarqueur et établi une phylogénie moléculaire du genre.
- L'écologie des espèces. Nous avons analysé la distribution des espèces sur l'estran et sa variabilité saisonnière, au travers d'un suivi spatio-temporel des variables d'état et de reproduction des populations. Nous avons également étudié l'évolution intra- et inter-populationnelle des teneurs en pigments ;
- La variabilité quantitative et qualitative des phlorotannins. Nous avons appréhendé cette variabilité grâce à un suivi temporel des teneurs en phlorotannins d'après une nouvelle méthode et en proposant un protocole efficace de purification permettant d'isoler le pool de composés et de le caractériser par RMN. De plus, nous avons déterminé leur activité antiradicalaire, et fourni une étude plus détaillée du phloroglucinol, composé phénolique principal de *Cystoseira tamariscifolia*.

Le premier volet de cette thèse (Chapitre II) est ainsi consacré à l'étude de la taxinomie et la classification du genre *Cystoseira* des côtes bretonnes. Nous avons d'abord expérimenté une approche de séparation des composés lipidiques des espèces par CCM, qui ne nous a pas donné de résultat satisfaisant. Nous nous sommes alors tournés vers deux techniques analytiques innovantes (pour ce qui est de leur utilisation en taxinomie et classification) et plus puissantes, afin de réaliser une étude de chimiotaxinomie en deux temps :

1. Une étude du métabolome *in vivo*, par analyse d'échantillons par ^1H RMN HR-MAS ;
2. Une analyse chromatographique par LC-ESI-MSⁿ d'extraits lipophiles, qui contiennent potentiellement des terpènes, réputés pour être des marqueurs chimiotaxinomiques du genre *Cystoseira*.

Nous avons ensuite comparé ces résultats d'analyses chimiques à la phylogénie des espèces que nous avons obtenue par amplification et séquençage du marqueur ITS2. Ce

marqueur moléculaire est en effet connu pour être pertinent dans la résolution des relations phylogénétiques à l'échelle intra-générique. Enfin, nous avons extrait puis purifié (principalement sur colonne de silice et par injection répétée sur chaîne CHLP semi-préparative) le terpène synthétisé par *Cystoseira nodicaulis*.

Nos résultats ont permis de démontrer l'intérêt des deux techniques analytiques pour discriminer les différentes espèces de *Cystoseira*. La seule limite à ces analyses est la superposition des résultats concernant *C. faeniculacea* et *C. humilis*, qui forment un ensemble très cohérent à la fois dans leur composition chimique générale (observée par analyses *in vivo*) et par leur métabolisme qui privilégie la synthèse de stérols à celle de terpènes (chromatogrammes « plats » en LC-ESI-MSⁿ).

L'étude des composés lipophiles nous a ainsi permis de distinguer deux groupes, « producteurs » et « non producteurs » de terpènes. Ce critère, au regard de l'analyse des séquences ITS2, apparaît pertinent pour illustrer la classification des cystoseires de Bretagne. En effet, notre étude phylogénétique a confirmé la polyphylie du genre *Cystoseira* et démontré l'existence de deux clades parmi les espèces de Bretagne, ceux-là même qui ont été différenciés d'un point de vue chimique. En complément, nous sommes parvenus à identifier le mérodi-terpène majoritaire synthétisé par *C. nodicaulis*, qui avait déjà été isolé chez *C. elegans*, ce qui semble démontrer une forte affinité entre ces trois espèces.

La comparaison de nos résultats avec des travaux récents de phylogénie moléculaire conforte l'intérêt des terpènes pour établir des classifications parmi les *Sargassaceae*. En effet au sein de la famille des *Sargassaceae*, les espèces productrices de diterpènes sont réunies dans un même clade. Ainsi, les terpènes représentent de bons chimiomarqueurs, et il convient maintenant d'élargir l'étude chimique de la famille des *Sargassaceae* afin de confirmer la pertinence de ce critère chimiotaxinomique.

Le deuxième volet de ce travail (Chapitre III) est une étude d'écologie et d'écologie chimique des populations installées sur les côtes bretonnes. Nous avons analysé la distribution de chaque espèce sur l'étage médiolittoral, en prenant en compte sa variabilité saisonnière, et étudié la dynamique des populations grâce à un suivi spatio-temporel de variables d'état et de reproduction. En complément, nous avons étudié les variations des teneurs en pigments des cinq espèces en fonction de leur répartition sur l'estran.

Il ressort de nos résultats que les cystoseires s'établissent dans les cuvettes de l'estran selon une organisation bien précise, et que chaque espèce s'établit à une hauteur particulière. Le modèle-type de distribution ne varie pas en fonction des saisons. Parallèlement, nous avons pu observer des différences de densité entre populations en fonction de leur hauteur sur l'estran. Ainsi, les populations les plus proches de l'étage infralittoral étaient bien moins denses que les populations à la limite de l'étage supralittoral. Ce phénomène peut sans doute être relié à un gradient de compétition interspécifique fort sur l'estran. Parallèlement, différentes stratégies sont mises en place par les espèces. En haut de l'étage médiolittoral, la population de *Cystoseira humilis* se renouvelle perpétuellement, mais elle est soumise à de forts épisodes de mortalité. A l'opposé, *C. baccata* et *C. tamariscifolia* constituent deux populations des bas niveaux pour lesquelles, en contrepartie d'un faible recrutement, la pérennité est assurée par des individus plus « durables », avec une très faible mortalité. Enfin, nous avons également présenté la phénologie de chaque espèce.

L'analyse de la variabilité des teneurs en pigments souligne la photo-adaptation générale des cystoseires à des conditions lumineuses plus ou moins intenses. Ainsi, les cystoseires installées dans les cuvettes du bas de l'estran synthétisent plus de pigments que celles installées plus haut, qui comparativement reçoivent plus de lumière. Par ailleurs, la photoprotection (au travers de la synthèse de zéaxanthine) semble être d'une importance mineure, tout du moins durant la saison où nous avons réalisé notre expérience.

Le dernier volet de notre manuscrit décrit les variations quantitatives et qualitatives des phlorotannins au sein du genre *Cystoseira*. Nous avons dosé l'évolution des teneurs en phlorotannins des cinq espèces à travers les saisons, purifié ces composés de façon à les caractériser partiellement et à en déterminer l'activité antiradicalaire. Ensuite, nous avons concentré nos efforts sur *Cystoseira tamariscifolia*, en reconnaissant le phloroglucinol comme composé phénolique majoritaire, et en étudiant la variabilité de ses teneurs.

Ainsi, il apparaît que les teneurs en composés phénoliques évoluent de façon différente selon les espèces considérées. Il n'est d'ailleurs pas toujours possible de déterminer de réelles tendances dans l'évolution de ces valeurs.

Nous avons pu caractériser les types de composés phénoliques au sein de chaque espèce, en soulignant la présence de liaisons diaryle-éther (caractéristiques des phloréthols et

des fuhalols) et des liaisons aryle-aryle (typiques des fucols). D'après nos résultats, nous n'observons pas de liaison type fuhalol, ce qui est contradictoire avec les données de la littérature. Les conditions expérimentales que nous avons utilisées, sensiblement différentes par rapport à nos références bibliographiques, pourraient peut-être expliquer cela. Nous avons également mis en évidence l'activité anti-radicalaire des fractions enrichies en composés phénoliques de trois espèces, activité qui s'avère supérieure ou égale à celle du BHT, un antioxydant puissant couramment utilisé dans les industries agro-alimentaire et cosmétique. Ainsi, ces phlorotannins pourraient être sollicités dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène. Concernant le phloroglucinol, ce composé semble être produit spécifiquement dans les parties apicales du thalle, et être de plus en plus accumulé dans les tissus jusqu'à l'apparition des réceptacles.

2 PERSPECTIVES

Plusieurs perspectives de recherches sont ouvertes, suites aux résultats présentés dans ce manuscrit.

D'un point de vue taxinomique, il semble important d'élargir au maximum l'éventail de spécimens de *Cystoseira* soumis à des études chimiques. Ainsi, la constitution d'une banque de données recensant les profils chimiques des différentes espèces de cystoseires permettrait d'affiner notre connaissance de leur diversité chimique. Un échantillonnage plus exhaustif permettrait alors de statuer sur l'intérêt des dérivés de type « terpène » dans l'établissement de classification au sein de la famille des *Sargassaceae*. De plus, ce type de molécule étant souvent associé à des activités antimicrobiennes, la découverte de nouvelles molécules permettrait de répondre à la demande de composés à activité antifouling d'origine naturelle. De plus, contrairement aux phlorotannins, le rôle écologique des terpènes reste peu abordé dans la littérature. Il nous semble ainsi particulièrement judicieux de doser ces composés et de suivre les variations spatio-temporelles de leurs teneurs.

L'étude écologique a montré le parallèle existant entre l'étagement des cystoseires et celui des grandes populations de fucales et de laminariales sur l'estran émergé à marée basse. Ces cuvettes constituent des biotopes encore peu connus. Aussi, nous considérons nécessaire d'entamer les investigations sur les origines de la distribution des cystoseires. Il serait alors judicieux de procéder à des expériences de transplantation d'un niveau à un autre sur l'estran,

afin de déterminer si le développement de chaque espèce est théoriquement possible en dehors de sa zone de répartition constatée. Une telle étude permettrait de vérifier que la compétition spécifique et les facteurs abiotiques sont bien à l'origine de la distribution. Une autre façon de procéder serait d'initier une série de cultures et de simuler les conditions existant dans les différentes cuvettes de l'estran, et d'observer la survie des espèces dans les différentes conditions. Par ailleurs, il apparaît judicieux de poursuivre l'étude des pigments chez les *cystoseires* et, plutôt que d'étudier les variations des teneurs à un instant précis pour différents individus, nous proposerions plutôt de suivre la variation de ces teneurs à l'échelle d'un cycle de marée, afin de déterminer l'importance du cycle des xanthophylles chez ces espèces colonisant les cuvettes.

L'étude des phlorotannins nous a permis d'identifier une espèce qui se prête particulièrement bien aux études d'écophysiologie et de génomique fonctionnelle. En effet, *Cystoseira tamariscifolia* ne produit qu'un seul type de composé phénolique en majorité (le phloroglucinol) et nous avons pu montrer qu'il est relativement aisé de le doser dans des extraits bruts par RMN. En effet, la grande difficulté inhérente à l'étude de ces molécules est de les séparer pour pouvoir les doser. Jusqu'ici, la plupart des travaux de quantification ne présentaient que des résultats de dosage d'un mélange phlorotannins.

Dans le cas de *Cystoseira tamariscifolia*, nous avons pu observer un schéma d'évolution saisonnière précis. Aussi à l'avenir, des études en conditions contrôlées permettraient de comprendre quels facteurs peuvent influencer la production de phloroglucinol, et ainsi de répondre avec davantage de précision sur la question du rôle de ce composé. Par ailleurs, en considérant la grande palette d'activités biologiques des phlorotannins, nous suggérons de rechercher davantage d'activités pour les fractions enrichies que nous avons pu produire. Enfin, il serait intéressant d'approfondir le protocole de purification en incluant des étapes de chromatographie afin de pouvoir isoler chacun des phlorotannins qui constituent les fractions enrichies.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdala-Díaz, R. T., Cabello-Pasini, A., Pérez-Rodríguez, E., Conde Álvarez, R. M. & Figueroa, F. L.** Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Marine Biology*, **2006**, 148, 459-465
- Abourriche, A., Charrouf, M., Berrada, M., Bennamara, A., Chaib, N. & Francisco, C.** Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia* *Fitoterapia*, **1999**, 70, 611-614
- Agardh, C. A.** Species algarum rite cognitae, cum synonymis, differentiis specificis et descriptionibus succinctis. **1820**, 531 pp.
- Ahn, M.-J., Yoon, K.-D., Kim, C. Y., Kim, J. H., Shin, C.-G. & Kim, J.** Inhibitory activity on HIV-1 reverse transcriptase and integrase of a carmalol derivative from a brown Alga, *Ishige okamurae*. *Phytotherapy Research*, **2006**, 20, 711-713
- Alberte, R. S., Friedman, A. L., Gustafson, D. L., Rudnick, M. S. & Lyman, H.** Light-harvesting systems of brown algae and diatoms. Isolation and characterization of chlorophyll ac and chlorophyll afucoxanthin pigment-protein complexes. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, **1981**, 635, 304-316
- Alongi, G., Catra, M. & Cormaci, M.** Observations sur *Cystoseira susanensis* (Cystoseiraceae, Phaeophyta) : une espèce méditerranéenne rare et peu connue. *Cryptogamie Algologie*, **1999**, 20, 25-33
- Amico, V., Cunsolo, F., Piattelli, M. & Ruberto, G.** Five novel tetraprenylhydroquinols from the brown alga *Cystoseira algeriensis*. *Phytochemistry*, **1984**, 23, 2017-2020
- Amico, V., Giaccone, G., Piattelli, M. & Ruberto, G.** Inheritance of chemical constituents in algae: Tetraprenyltoluquinols of *Cystoseira elegans* × *C. algeriensis*. *Phytochemistry*, **1988**, 27, 1069-1071
- Amico, V. & Piattelli, M.** Metabolites of mixed biogenesis from *Cystoseira tamariscifolia* (Huds.) Papenf. *Gazzetta Chimica Italiana*, **1989**, 119, 467-470
- Amico, V., Piattelli, M., Cunsolo, F., Recupero, M. & Ruberto, G.** Tetraprenyltoluquinols as chemotaxonomic markers in the genus *Cystoseira*: *C. barbatula* and *C. barbata*. *Gazzetta Chimica Italiana*, **1990**, 120, 9-12
- Amico, V.** Marine brown algae of family Cystoseiraceae: chemistry and chemotaxonomy. *Phytochemistry*, **1995**, 39, 1257-1279
- Amsler, C. D. & Fairhead, V. A.** Defensive and Sensory Chemical Ecology of Brown Algae. *Incorporating Advances in Plant Pathology*, Academic Press, **2006**, 43, 91 pp.
- Amsler, C. D.** Algal chemical ecology. *Springer*, **2008**, 313 pp.
- Araújo, R., Sousa-Pinto, I., Bárbara, I. & Quintino, V.** Macroalgal communities of intertidal rock pools in the northwest coast of Portugal. *Acta Oecologica*, **2006**, 30, 192-202
- Ar Gall, E., Le Duff, M., Hily, C., Maguer, M., Derrien, S. & Le Gal, A.** Stationnel intertidal et subtidal rocheux. Journées Rebut 2010 de Brest. *Rebut*, **2010**
- Arenas, F., Fernández, C., Rico, J., Fernández, E. & Haya, D.** Growth and reproductive strategies of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Cystoseira nodicaulis* (Whit.) Roberts. *Scientia Marina*, **1995**, 59, 1-8

- Arévalo, R., Pinedo, S. & Ballesteros, E.** Changes in the composition and structure of Mediterranean rocky-shore communities following a gradient of nutrient enrichment: Descriptive study and test of proposed methods to assess water quality regarding macroalgae. *Marine Pollution Bulletin, Implementation of the Water Framework Directive in European marine waters*, **2007**, 55, 104-113
- Arnold, T. M. & Targett, N. M.** Marine Tannins: The Importance of a Mechanistic Framework for Predicting Ecological Roles. *Journal of Chemical Ecology*, **2002**, 28, 1919-1934
- Artan, M., Li, Y., Karadeniz, F., Lee, S.-H., Kim, M.-M. & Kim, S.-K.** Anti-HIV-1 activity of phloroglucinol derivative, 6,6'-bieckol, from *Ecklonia cava*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**, 17, 7921-7926
- Bachelot de la Pylaie, A. J. M.** Flora de l'Ile Terre-Neuve et des Iles Saint Pierre et Miclon. *A. Firmin Didot*, **1829**, 128
- Ballantine, D. & Aponte, N.** An annotated checklist of deep-reef benthic marine algae from Lee Stocking Island, Bahamas (western Atlantic), I. Chlorophyta and Heterokontophyta. *Nova Hedwigia*, **2003**, 76, 113-122
- Barnes, R. S. K. & Hughes, R. N.** An Introduction to Marine Ecology. Wiley-Blackwell (ed.) **1999**, 296 pp.
- Beleggratis, M., Bitis, I., Economou-Amilli, A. & Ott, J.** Epiphytic patterns of macroalgal assemblages on *Cystoseira* species (Fucales, Phaeophyta) in the east coast of Attica (Aegean Sea, Greece). *Hydrobiologia*, **1999**, 412, 67-80
- Bennamara, A., Abourriche, A., Berrada, M., Charrouf, M., Chaib, N., Boudouma, M. & Garneau, F. X.** Methoxybifurcarenone: an antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Phytochemistry*, **1999**, 52, 37-40
- Benedetti-Cecchi, L., Bulleri, F. & Cinelli, F.** The interplay of physical and biological factors in maintaining mid-shore and low-shore assemblages on rocky coasts in the north-west Mediterranean. *Oecologia*, **2000**, 123, 406-417
- Benedetti-Cecchi, L. & Cinelli, F.** Effects of canopy cover, herbivores and substratum type on patterns of *Cystoseira* spp. settlement and recruitment in littoral rockpools. *Marine Ecology Progress Series*, **1992a**, 90, 183-191
- Benedetti-Cecchi, L. & Cinelli, F.** Canopy removal experiments in *Cystoseira*-dominated rockpools from the Western coast of the Mediterranean (Ligurian Sea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **1992b**, 155, 69-83
- Bhadury, P. & Wright, P. C.** Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. *Planta*, **2004**, 219, 561-578
- Bhakuni, D. & Rawat, D.** Bioactive Marine Natural Products. *Springer*, **2005**, 400 pp.
- Bidigare, R., Van Heukelem, L. & Trees, C.** Algal culturing techniques. Chapitre de : Analysis of algal pigments by High-Performance Liquid Chromatography. Andersen, R. (ed.) *Elsevier Academic Press*, **2005**, 327-345
- Blanchette, C. A., C. T. & Gaines, S.** Effects of Wave exposure on Intertidal Furoid Algae. *Proceedings of the California Islands Symposium*, **2000**, 5, 347-355
- Blois, M.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **1958**, 181, 1199-1200

- Blunt, J., Copp, B., Hu, W.-P., Munro, M., Northcote, P. & Prinsep, M.** Marine natural products. *Natural Product Reports*, **2007**, 24, 31-86
- Bourgougnon, N. & Stiger-Pouvreau, V.** Chapter 4. Chemodiversity and Bioactivity within Red and Brown Macroalgae Along the French coasts, Metropole and Overseas Departements and Territories. Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology, First Edition. Se-Kwon Kim. *John Wiley Publication*, **2011**, 58-105
- Braud, J.-P. & Pérez, R.** Les grandes populations d'algues brunes de la Bretagne méridionale. *Science et Pêche*, **1975**, 246, 1-2
- Brock, E., Åberg, P. & Pavia, H.** Phlorotannins as chemical defense against macroalgal epiphytes on *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Phycology*, **2001**, 37, 8-8
- Bulleri, F., Benedetti-Cecchi, L., Acunto, S., Cinelli, F. & Hawkins, S. J.** The influence of canopy algae on vertical patterns of distribution of low-shore assemblages on rocky coasts in the northwest Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **2002**, 267, 89-106
- Cabioc'h, J., Floc'h, J.-Y., Le Toquin, A., Boudouresque, C.-F., Meinesz, A. & Verlaque, M.** Guide des Algues des Mers d'Europe. *Delachaux et Niestlé*, **2006**, 272 pp.
- Caron, L., Douady, D., De Martino, A. & Quinet, M.** Light harvesting in brown algae. *Cahiers de Biologie Marine*, **2001**, 42, 109-124
- Cérantola, S., Breton, F., Ar Gall, E. & Deslandes, E.** Co-occurrence and antioxidative activities of fucol and fucophlorethol classes of polymeric phenols in *Fucus spiralis*. *Botanica Marina*, **2006**, 49, 347-351
- Chevalier, E., Gévaert, F. & Créach, A.** *In situ* photosynthetic activity and xanthophylls cycle development of undisturbed microphytobenthos in an intertidal mudflat. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **2010**, 385, 44-49
- Cho, G. Y., Rousseau, F., de Reviere, B. & Boo, S. M.** Phylogenetic relationships within the Fucales (Phaeophyceae) assessed by the photosystem I coding psaA sequences. *Phycologia*, **2006**, 45, 512-519
- CNEXO** (Centre National pour l'Exploitation des Océans). Rapport technique. Étude écologique d'avant-projet sur le site de Saint-Vio Tréguennec. **1976**. 120 pp.
- Connan, S., Goulard, F., Stiger, V., Deslandes, E. & Ar Gall, E.** Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Botanica Marina*, **2004**, 47, 410-416
- Connan, S., Delisle, F., Deslandes, E. & Ar Gall, E.** Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Botanica marina*, **2006**, 49, 39-46
- Connan, S. & Stengel, D. B.** Impacts of ambient salinity and copper on brown algae: Interactive effects on phenolic pool and assessment of metal binding capacity of phlorotannin. *Aquatic Toxicology*, **2011**, 104, 1-13
- Cronin, G. & Hay, M.** Induction of seaweed chemical defenses by Amphipod grazing. *Ecology*, **1996**, 77, 2287-2301
- Culioli, G., Ortalo-Magné, A., Valls, R., Hellio, C., Clare, A. S. & Pioveti, L.** Antifouling activity of meroditerpenoids from the marine brown alga *Halidrys siliquosa*. *Journal of Natural Products, American Chemical Society*, **2008**, 71, 1121-1126

- Dawson, A. E. E.** Some observations on *Cystoseira foeniculacea* (L.) Grev. emend. Sauvageau. *New Phytologist*, **1941**, 40, 316-325
- De Martino, A., Douady, D., Rousseau, B., Duval, J.-C. & Caron, L.** Characterization of two light-harvesting subunits isolated from the brown alga *Pelvetia canaliculata*: heterogeneity of Xanthophyll distribution. *Photochemistry and Photobiology*, **1997**, 66, 190-197
- De Martino, A., Douady, D., Quinet-Szely, M., Rousseau, B., Crépineau, F., Apt, K. & Caron, L.** The light-harvesting antenna of brown algae. *European Journal of Biochemistry*, **2000**, 267, 5540-5549
- Demmig-Adams, B. & Adams, W. W. III.** The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, **1996**, 1, 21-26
- De-Paula, J. C., Bueno, L. B., Cavalcanti, D. N., Yoneshigue-Valentin, Y. & Laneuville Teixeira, V.** Diterpenes from the Brown Alga *Dictyota crenulata*. *Molecules*, **2008**, 13, 1253-1262
- Derrien-Courtet, S., Le Gal, A., Ar Gall, E., Le Duff, M., Rossi, N., Daniel, C., Perrot, T. & Bajjouk, T.** Exemple de bilan inter thématique : milieu rocheux. Journées Rebent 2010 de Brest. *Rebent*, **2010**
- Desmoulin, F., Bon, D., Martino, R. & Malet-Martino, M.** Étude critique de l'utilisation de la RMN HRMAS pour l'analyse des tissus biologiques. *Comptes Rendus Chimie*, **2008**, 11, 423 – 433
- Díez, I., Secilla, A., Santolaria, A. & Gorostiaga, J. M.** Phytobenthic intertidal community structure along an environmental pollution gradient. *Marine Pollution Bulletin*, **1999**, 38, 463-472
- Díez, I., Santolaria, A. & Gorostiaga, J. M.** The relationship of environmental factors to the structure and distribution of subtidal seaweed vegetation of the western Basque coast (N Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **2003**, 56, 1041-1054
- Díez, I., Bustamante, M., Santolaria, A., Tajadura, J., Muguerza, N., Borja, A., Muxika, I., Saiz-Salinas, J. & Gorostiaga, J.** Development of a tool for assessing the ecological quality status of intertidal coastal rocky assemblages, within Atlantic Iberian coasts. *Ecological Indicators*, **2012**, 12, 58-71
- Dizerbo, A. & Herpe, E.** Liste et répartition des algues marines des côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique, Iles Anglo-Normandes incluses. *Editions Scientifiques Anaximandre*. **2007**, 315 pp.
- Döhler, G., Hagmeier, E. & David, C.** Effects of solar and artificial UV irradiation on pigments and assimilation of ¹⁵N ammonium and ¹⁵N nitrate by macroalgae. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1995**, 30, 179-187
- D'orbigny, C.** Essai sur les plantes marines des côtes du Golfe de Gascogne, et particulièrement sur celles du département de la Charente-Inférieure. *Mémoires du Muséum d'Histoire Naturelle*, **1820**, 6, 163-203
- Draisma, S., Ballesteros, E., Rousseau, F. & Thibaut, T.** DNA Sequence data demonstrate the polyphyly of the genus *Cystoseira* and other Sargassaceae genera (Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, **2010**, 46, 1329-1345
- Dumay, J.** Contribution à l'étude de l'assimilation et du transport du carbone chez *Cystoseira nodicaulis* (Phéophycées). *Thèse de doctorat de l'Université de Paris VI*, **1981**

- El Hattab, M., Ben Mesaoud, M., Daoudi, M., Ortalo-Magné, A., Culioli, G., Valls, R. & Pioveti, L.** Trihydroxylated linear diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Fucales, Phaeophyta). *Biochemical Systematics and Ecology*, **2008**, 36, 484-489
- Engelen, A. H., Espirito-Santo, C., Simões, T., Monteiro, C., Serrão, E. A., Pearson, G. A. & Santos, R. O. P.** Periodicity of propagule expulsion and settlement in the competing native and invasive brown seaweeds, *Cystoseira humilis* and *Sargassum muticum* (Phaeophyta). *European Journal of Phycology*, **2008**, 43, 275-282
- Ercegović, A.** Fauna i Flora Jadrana. Jadranske Cistozire. Njihova morfologija, ekologija i razvitak / Fauna et Flora Adriatica. Sur les *Cystoseira* adriatiques - Leur morphologie, écologie et évolution. *Institut d'Océanographie et de Pêche, Split.*, **1952**, Volume 2, 173-210
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W. & Walker, R. B.** Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, 58, 8139-8144
- Fairhead, V., Amsler, C., McClintock, J. & Baker, B.** Variation in phlorotannin content within two species of brown macroalgae (*Desmarestia anceps* and *D. menziesii* from the Western Antarctic Peninsula. *Polar Biology*, **2005**, 28, 680-686
- Falace, A., Alongi, G., Cormaci, M., Furnari, G., Curiel, D., Cecere, E. & Petrocelli, A.** Changes in the benthic algae along the Adriatic Sea in the last three decades. *Chemistry and Ecology*, **2010**, 26, 77-90
- Feldmann, J.** Les algues marines de la côte des Albères. *Revue Algologique*, **1937**, 9, 1-197
- Fisch, K. M., Bohm, V., Wright, A. D. & König, G. M.** Antioxidative Meroterpenoids from the Brown Alga *Cystoseira crinita*. *Journal of Natural Products*, **2003**, 66, 968-975
- Floc'h, J.-Y.** Distribution verticale et écologie des algues marines sur les côtes bretonnes. *Penn Ar Bed*, **1964**, 4, 182-190
- Foster, M. S.** Factors controlling the intertidal zonation of *Iridaea flaccida* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, **1982**, 18, 285-294
- Frontier, S.** Stratégies d'échantillonnage en écologie. *Masson, Paris*, **1983**, 494
- Garrisson, T.** Essentials of Oceanography. *Cengage Learning*, **2011**, 496 pp.
- Gévaert, F., Creach, A., Davoult, D., Holl, A.-C., Seuront, L. & Lemoine, Y.** Photo-inhibition and seasonal photosynthetic performance of the seaweed *Laminaria saccharina* during a simulated tidal cycle: chlorophyll fluorescence measurements and pigment analysis. *Plant, Cell & Environment*, **2002**, 25, 859-872
- Gévaert, F., Créach, A., Davoult, D., Migné, A., Levavasseur, G., Arzel, P., Holl, A.-C. & Lemoine, Y.** *Laminaria saccharina* photosynthesis measured *in situ*: photoinhibition and xanthophyll cycle during a tidal cycle. *Marine Ecology Progress Series*, **2003**, 247, 43-50
- Glombitza, K.-W. & Rösener, H.-U.** Bifuhalol: Ein diphenyläther aus *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry*, **1974**, 13, 1245-1247
- Glombitza, K.-W., Rösener, H.-U. & Müller, D.** Bifuhalol und diphlorethol aus *Cystoseira tamariscifolia*. *Phytochemistry*, **1975**, 14, 1115-1116
- Glombitza, K.-W., Koch, M. & Eckhardt, G.** Polyhydroxyphenyläther aus *Laminaria ochroleuca*. *Phytochemistry*, **1976**, 15, 1082-1083
- Glombitza, K.-W., Forster, M. & Eckhardt, G.** Polyhydroxyphenyläther aus der phaeophyceen *Sargassum muticum*. *Phytochemistry*, **1978**, 17, 579-580

- Glombitza, K.-W., Schnabel, C. & Koch, M.** Antibiotica aus Algen, 27. Mitt. Niedermolekulare Phlorotannine der Braunalge *Cystoseira baccata* (Gmelin) Silva, Teil II. *Archiv der Pharmazie*, **1981**, 314, 602-608
- Glombitza, K.-W., Wegner-Hambloch, S. & Schulten, H.-R.** Antibiotics from Algae, XXXVI.1,2 Phlorotannins from the Brown Alga *Cystoseira granulata*. *Planta Medica*, **1985**, 51, 116-120
- Glombitza, K.-W. & Knöss, W.** Sulphated phlorotannins from the brown alga *Pleurophycus gardneri*. *Phytochemistry*, **1992**, 31, 279-281
- Gmelin, S. G.** Historia Fucorum. Petropoli, E. T. A. S. (ed.) **1768**, 239 pp.
- Goss, R. & Jakob, T.** Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynthesis Research*, **2010**, 106, 103-122
- Gotceitas, V., Fraser, S. & Brown, J. A.** Habitat use by juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the presence of an actively foraging and non-foraging predator. *Marine Biology*, **1995**, 123, 421-430
- Greville, R. K.** Algae Britannicae, or descriptions of the marine and other inarticulated plants of the British Isles belonging to the order Algae, with plates illustrative of the genera. Machlachlen & Stewart (ed.) **1830**, 218
- Gros, C.** Le genre *Cystoseira* sur la côte des Albères : répartition, écologie, morphogénèse. *Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie Paris VI*, **1978** 115 pp.
- Guern, M.** Sur les premiers stades de développement des oeufs de *Cystoseira* (Fuciales). *Extrait des Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*, **1959**, 249, 1-3
- Guern, M.** Embryologie de quelques espèces du genre *Cystoseira* Agardh *Vie et Milieu*, **1962**, 13, 649-679
- Guiry, M. & Guiry, G.** Algaebase. World-wide electronic publication. <http://www.algaebase.org/> (**2011** et **2008**)
- Häder, D.-P. & Figueroa, F. L.** Photoecophysiology of Marine Macroalgae. *Photochemistry and Photobiology*, **1997**, 66, 1-14
- Hall, T. A.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor an analysis program for Windows 96/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **1999**, 41, 95-98
- Harker, M., Berkaloff, C., Lemoine, Y., Britton, G., Young, A. J., Duval, J.-C., Rmiki, N.-E. & Rousseau, B.** Effects of high light and desiccation on the operation of the xanthophyll cycle in two marine brown algae. *European Journal of Phycology*, **1999**, 34, 35-42
- Haugan, J. & Liaaen-Jensen, S.** Algal carotenoids 54. Carotenoids of brown algae (Phaeophyceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **1994**, 22, 31-41
- Hellio, C., Thomas-Guyon, H., Culioli, G., Pioveti, L., Bourgougnon, N. & le Gal, Y.** Marine antifoulants from *Bifurcaria bifurcata* (phaeophyceae, cystoseiraceae) and other brown macroalgae. *Biofouling*, **2001**, 17, 189-201
- Heo, S.-J. & Jeon, Y.-J.** Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2009**, 95, 101 - 107

- Herrero, R., Lodeiro, P., Rey-Castro, C., Vilarino, T. & Sastre de Vicente, M. E.** Removal of inorganic mercury from aqueous solutions by biomass of the marine macroalga *Cystoseira baccata*. *Water Research*, **2005**, 39, 3199-3210
- Horiguchi, T. & Yoshida, T.** The phylogenetic affinities of *Myagropsis myagroides* (Fucales, Phaeophyceae) as determined from 18S rDNA sequences. *Phycologia*, **1998**, 37, 237-245
- Hoyer, K., Karsten, U., Sawall, T. & Wiencke, C.** Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. *Marine Ecology Progress Series*, **2001**, 211, 117-129
- Hudson, W.** Flora anglica. *London*, **1798**, 11, 397-690
- Huggett, J. & Griffiths, C. L.** Some relationships between elevation, physico-chemical variables and biota of intertidal rock pools. *Marine Ecology Progress Series*, **1986**, 29, 189-197
- Hupel, M., Lecointre, C., Meudec, A., Poupart, N. & Ar Gall, E.** Comparison of photoprotective responses to UV radiation in the brown seaweed *Pelvetia canaliculata* and the marine angiosperm *Salicornia ramosissima*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **2011**, 401, 36-47
- Ikawa, M., Schaper, T. D., Dollard, C. A. & Sasner, J. J.** Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 1811-1815
- Ioannou, E. & Roussis, V.** Natural Products from Seaweeds. *Plant-derived Natural Products*, Springer New York, **2009**, 51-81
- Ireland, C. D. & Horn, M. H.** Effects of macrophyte secondary chemicals on food choice and digestive efficiency of *Cebidichthys violaceus* (Girard), an herbivorous fish of temperate marine waters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **1991**, 153, 179-194
- Jégou, C., Culioli, G., Kervarec, N., Simon, G. & Stiger-Pouvreau, V.** LC/ESI-MSⁿ and ¹H HR-MAS NMR analytical methods as useful taxonomical tools within the genus *Cystoseira* C. Agardh (Fucales, Phaeophyceae). *Talanta*, **2010**, 83, 613-622
- Jennings, J. G. & Steinberg, P. D.** In situ exudation of phlorotannins by the sublittoral kelp *Ecklonia radiata*. *Marine Biology*, **1994**, 121, 349-354
- Jones, C., Lawton, J. & Shachak, M.** Organisms as Ecosystem Engineers. *Oikos*, **1994**, 69, 373-386
- Jormalainen, V. & Honkanen, T.** Variation in natural selection for growth and phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Journal of Evolutionary Biology*, **2004**, 17, 804-820
- Juanes, J., Guinda, X., Puente, A. & Revilla, J.** Macroalgae, a suitable indicator of the ecological status of coastal rocky communities in the NE Atlantic. *Ecological Indicators*, **2008**, 8, 351 – 359
- Kamiya, M., Nishio, T., Yokoyama, A., Yatsuya, K., Nishigaki, T., Yoshikawa, S. & Ohki, K.** Seasonal variation of phlorotannin in sargassacean species from the coast of the Sea of Japan. *Phycological Research*, **2010**, 58, 53-61

- Kang, K. A., Lee, K. H., Chae, S., Zhang, R., Jung, M. S., Lee, Y., Kim, S. Y., Kim, H. S., Joo, H. G., Park, J. W., Ham, Y. M., Lee, N. H. & Hyun, J. W.** Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. *FEBS Letters*, **2005**, 579, 6295-6304
- Karsten, U.** Defense Strategies of Algae and Cyanobacteria Against Solar UVR. Chapitre de "Algal Chemical Ecology", Amsler, C.D. (ed.), Springer, **2008**, 273-296
- Keeling, P. J., Burger, G., Durnford, D. G., Lang, B. F., Lee, R. W., Pearlman, R. E., Roger, A. J. & Gray, M. W.** The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*, **2005**, 20, 670-676
- Kelecom, A. & Laneuville Teixeira, V.** Diterpenes of marine brown algae of the family dictyotaceae: their possible role as defense compounds and their use in chemotaxonomy. *The Science of The Total Environment*, **1986**, 58, 109-115
- Kemp, J.** Effects of temperature and salinity on resting metabolism in two South African rock pool Fish: The resident Gobiid *Caffrogobius caffer* and the transient Sparid *Diplodus Sargus Capensis*. *African Zoology*, **2009**, 44, 151-158
- Kim, Y., An, R., Yoon, N., Nam, T. & Choi, J.** Hepatoprotective constituents of the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on tacrine-induced cytotoxicity in hep G2 cells. *Archives of Pharmacal Research, Pharmaceutical Society of Korea*, **2005**, 28, 1376-1380
- Koch, M. & Gregson, R.** Brominated phlorethols and nonhalogenated phlorotannins from the brown alga *Cystophora congesta*. *Phytochemistry*, **1984**, 23, 2633-2637
- Kornprobst, J.** Encyclopedia of Marine Natural Products. *John Wiley & Sons*, **2010**, 1680 pp.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. & Tamura, K.** MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics Advance*, **2008**, 9, 299-306
- Kützing, F. T.** Tabulae Phycologicae oder Abbildungen der Tange. **1860**, 144 pp.
- Lê, S., Josse, J. & Husson, F.** FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, **2008**, 25, 1-18
- Latasa, M., van Lenning, K., Garrido, J., Scharek, R., Estrada, M., Rodríguez, F. & Zapata, M.** Losses of chlorophylls and carotenoids in aqueous acetone and methanol extracts prepared for RP-HPLC analysis of pigments. *Chromatographia, Vieweg Verlag*, **2001**, 53, 385-391
- Le Lann, K., Ferret, C., VanMee, E., Spagnol, C., Lhuillery, M., Payri, C. & Stiger-Pouvreau, V.** Total phenolic, size-fractionated phenolics and fucoxanthin contents in tropical Sargassaceae species (Fuciales, Phaeophyceae) from the South Pacific Ocean: spatial and specific variability. *Phycol. Res.*, 2011, *Sous presse*
- Le Lann, K. & Stiger-Pouvreau, V.** Spatio-temporal phenologies of temperate Sargassaceae: coexistence of invasive and native species. *Phycologia*, **2009**, 48, 74
- Le Lann, K., Kervarec, N., Payri, C. E., Deslandes, E. & Stiger-Pouvreau, V.** Discrimination of allied species within the genus *Turbinaria* (Fuciales, Phaeophyceae) using HRMAS NMR spectroscopy. *Talanta*, **2008**, 74, 1079-1083
- Le Lann, K.** Étude de la biodiversité des Sargassaceae (Fuciales, Phaeophyceae) en milieux tempéré et tropical : écologie, chimiotaxonomie et source de composés bioactifs. *Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale*, **2009**, 340 pp.

- Leclerc, M. C., Barriel, V., Lecointre, G. & de Reviers, B.** Low Divergence in rDNA ITS Sequences Among Five Species of *Fucus* (Phaeophyceae) Suggests a Very Recent Radiation. *Journal of Molecular Evolution*, **1998**, 46, 115-120
- Leite, F. & Turra, A.** Temporal Variation in *Sargassum* Biomass, *Hypnea* Epiphytism and Associated Fauna. *Brazilian Archives of Biology and Biotechnology*, **2003**, 45, 665-671
- L'Hardy-Halos, M., Castric-Fey, A., Girard-Descatoire, A. & Lafarge, F.** Recherches en scaphandre autonome sur le peuplement végétal du substrat rocheux de l'Archipel des Glénans. *Bulletin de la Société Scientifique de Bretagne*, **1973**, 48, 103-128
- Li, S.-M. & Glombitza, K.-W.** Carmalols and phlorethofuhalols from the brown alga *Carpophyllum maschalocarpum*. *Phytochemistry*, **1991**, 30, 3417-3421
- Li, Y., Qian, Z.-J., Ryu, B., Lee, S.-H., Kim, M.-M. & Kim, S.-K.** Chemical components and its antioxidant properties in vitro: An edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, 17, 1963-1973
- Li, Y., Qian, Z.-J., Kim, M.-M. & Kim, S.-K.** Cytotoxic activities of phlorethol and fucophlorethol derivatives isolated from Laminariaceae *Ecklonia cava*. *Journal of Food Biochemistry*, Blackwell Publishing Inc, **2011**, 35, 357-369
- Linné, C.** Species plantarum. *Laurentius Salvius*, **1753**, 2, 673 pp.
- Lodeiro, P., Barriada, J., Herrero, R. & Sastre de Vicente, M.** The marine macroalga *Cystoseira baccata* as biosorbent for cadmium (II) and lead (II) removal: Kinetic and equilibrium studies. *Environmental Pollution*, **2006**, 142, 264-273
- Lobban, C. S. & Harrison, P. J.** Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, **1996**, 384
- Lubchenco, J.** Algal Zonation in the New England Rocky Intertidal Community: An Experimental Analysis. *Ecology*, **1980**, 61, 333-344
- Lüning, K.** Seaweeds: Their Environment, Biogeography, and Ecophysiology. Wiley-Interscience Publication, New York, **1990**, pp 527
- Maschek, J. A. & Baker, B. J.** The Chemistry of Algal Secondary Metabolism. *Algal Chemical Ecology*, Springer Berlin Heidelberg, **2008**, 1-24
- Mattio, L.** Taxonomie du genre *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) en Nouvelle-Calédonie et dans le Pacifique Sud. Approches morphologique et phylogénétique. *Université d'Aix-Marseille II*, **2008**, 300 pp.
- McInnes, A. G., Ragan, M. A., Smith, D. G. & Walter, J. A.** High-molecular-weight phloroglucinol-based tannins from brown algae: Structural variants. *Hydrobiologia*, Springer Netherlands, **1984**, 116-117, 597-602
- McInnes, A., Ragan, M., Smith, D. & Walter, J.** The high molecular weight polyphloroglucinols of the marine brown alga *Fucus vesiculosus* L. ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Canadian journal of chemistry*, **1985**, 63, 304-313
- Mokrini, R., Ben Mesaoud, M., Daoudi, M., Hellio, C., Maréchal, J.-P., El Hattab, M., Ortalo-Magné, A., Piovetti, L. & Culioli, G.** Meroditerpenoids and Derivatives from the Brown Alga *Cystoseira baccata* and Their Antifouling Properties. *Journal of Natural Products*, **2008**, 71, 1806-1811

- Molyneux, P.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, **2004**, 26, 211-219
- Moreau, D., Thomas-Guyon, H., Jacquot, C., Jugé, M., Culioli, G., Ortalo-Magné, A., Piovetti, L. & Roussakis, C.** An extract from the brown alga *Bifurcaria bifurcata* induces irreversible arrest of cell proliferation in a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. *Journal of Applied Phycology*, **2006**, 18, 87-93
- Munda, I. M.** Changes and degradation of seaweed stands in the Northern Adriatic. *Hydrobiologia*, **1993**, 260-261, 239-253
- Myung, C.-S., Shin, H.-C., Bao, H., Yeo, S., Lee, B. & Kang, J.** Improvement of memory by dieckol and phlorofucofuroeckol in ethanol-treated mice: Possible involvement of the inhibition of acetylcholinesterase. *Archives of Pharmacal Research, Pharmaceutical Society of Korea*, **2005**, 28, 691-698
- Nizamuddin, M.** Classification and the Distribution of the Fucales. *Botanica Marina*, **1962**, 4, 191-203
- Oliveras Plá, M. & Gómez Garreta, A.** Corología del género *Cystoseira* C. Agardh (Phaeophyceae, Fucales). *Anales Jard. Bot. Madrid*, **1989**, 46, 89-97
- Ortalo-Magné, A., Culioli, G., Valls, R., Pucci, B. & Piovetti, L.** Polar acyclic diterpenoids from *Bifurcaria bifurcata* (Fucales, Phaeophyta). *Phytochemistry*, **2005**, 66, 2316-2323
- Papenfuss, G.** Review of the genera of algae described by Stackhouse. *Hydrobiologia*, **1950**, 2, 181-208
- Pardi, G., Piazzzi, L. & Cinelli, F.** Demographic Study of a *Cystoseira humilis* Kützinger (Fucales: Cystoseiraceae) Population in the Western Mediterranean. *Botanica Marina*, **2000**, 43, 81-86
- Park, E., nae Ahn, G., Lee, N. H., Kim, J. M., Yun, J. S., Hyun, J. W., Jeon, Y.-J., Wie, M. B., Lee, Y. J., Park, J. W. & Jee, Y.** Radioprotective properties of eckol against ionizing radiation in mice. *FEBS Letters*, **2008a**, 582, 925-930
- Park, E., Lee, N. H., Joo, H.-G. & Jee, Y.** Modulation of apoptosis of eckol against ionizing radiation in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2008b**, 372, 792-797
- Parys, S., Kehraus, S., Pete, R., Küpper, F. C., Glombitza, K.-W. & König, G. M.** Seasonal variation of polyphenolics in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *European Journal of Phycology*, **2009**, 1-8
- Pavia, H., Cervin, G., Lindgren, A. & Åberg, P.** Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series*, **1997**, 157, 139-146
- Pavia, H. & Brock, E.** Extrinsic factors influencing phlorotannin production in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series*, **2000**, 193, 285-294
- Pavia, H., Toth, G., Lindgren, A. & Åberg, P.** Intraspecific variation in the phlorotannin content of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Phycologia*, **2003**, 42, 378-383
- Pellegrini, M., Valls, R. & Pellegrini, L.** Chimiotaxonomie et marqueurs chimiques dans les algues brunes. *Lagascalia*, **1997**, 19, 145-164

- Perrot, T., Dion, P., Mouquet, P., Guillaumont, B. & Populus, J.** Dynamique spatiale du couvert végétal : suivi de l'évolution de la couverture en fucales au moyen d'images SPOT. *Rebent*, **2006**
- Pfetzing, J., Stengel, D. B., Cuffe, M. M., Savage, A. V. & Guiry, M. D.** Effects of temperature and prolonged emersion on photosynthesis, carbohydrate content and growth of the brown intertidal alga *Pelvetia canaliculata*. *Botanica Marina*, **2000**, 43, 399-407
- Phillips, N., Smith, C. M. & Morden, C. W.** An effective DNA extraction protocol for brown algae. *Phycological Research*, **2001**, 49, 97-102
- Phillips, N., Burrowes, R., Rousseau, F., de Reviers, B. & Saunders, G. W.** Resolving evolutionary relationships among the brown algae using chloroplast and nuclear genes. *Journal of Phycology*, **2008**, 44, 394-405
- Piattelli, M.** Chemistry and taxonomy of Sicilian *Cystoseira* species. *New Journal of Chemistry*, **1990**, 14, 777-782
- Pinedo, S., García, M., Satta, M. P., de Torres, M. & Ballesteros, E.** Rocky-shore communities as indicators of water quality: A case study in the Northwestern Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin, Implementation of the Water Framework Directive in European marine waters*, **2007**, 55, 126-135
- Plouguerné, E., Le Lann, K., Connan, S., Jechoux, G., Deslandes, E. & Stiger-Pouvreau, V.** Spatial and seasonal variation in density, reproductive status, length and phenolic content of the invasive brown macroalga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt along the coast of Western Brittany (France). *Aquatic Botany*, **2006**, 85, 337-344
- Potin, P., Bouarab, K., Salaün, J.-P., Pohnert, G. & Kloareg, B.** Biotic interactions of marine algae. *Current Opinion in Plant Biology*, **2002**, 5, 308 – 317
- Pratsep, A., Lewmanomont, K. & Buapet, P.** Effects of wave exposure on population and reproductive phenology of an algal turf, *Gelidium pusillum* (Gelidales, Rhodophyta), Songkhla, Thailand. *Aquatic Botany*, **2009**, 90, 179-183
- R Development Core Team.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. **2011**, ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- Ragan, M. & Craigie, J.** Physodes and the phenolic compounds of brown algae. Isolation and characterization of phloroglucinol polymers from *Fucus vesiculosus* (L.). *Canadian Journal of Chemistry*, **1976**, 54, 66-73
- Ragan, M. & Jensen, A.** Quantitative studies on brown algal phenols. I. Estimation of the absolute polyphenol content of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. and *Fucus vesiculosus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **1977**, 30, 209-221
- Ragan, M. & Glombitza, K.-W.** Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progress in Phycological Research*, **1986**, 4, 129-241
- Ribeiro Soares, A., Laneuville Teixeira, V. L., Crespo Pereira, R. & Villaca, R.** Variation on diterpene production by the Brazilian alga *Stypopodium zonale* (Dictyotales, Phaeophyta). *Biochemical Systematics and Ecology*, **2003**, 31, 1347-1350
- Roberts, M.** The structure of the vegetative nuclei of the British species of *Cystoseira* C.Ag. *European Journal of Phycology*, **1966**, 3, 69-73
- Roberts, M.** Studies on marine algae of the British Isles. 3. The genus *Cystoseira*. *European Journal of Phycology*, **1967a**, 3, 345-366

- Roberts, M.** Studies on marine algae of the British Isles. 4. *Cystoseira baccata* (Gmelin) Silva. *European Journal of Phycology*, **1967b**, 3, 367-378
- Roberts, M.** Studies on marine algae of the British Isles. 6. *Cystoseira foeniculacea* (Linnaeus) Greville. *European Journal of Phycology*, **1968a**, 3, 547-564
- Roberts, M.** Studies on marine algae of the British Isles: An amendment to 'The genus *Cystoseira*'. *European Journal of Phycology*, **1968b**, 3, 565-566
- Roberts, M.** Taxonomic and nomenclatural notes on the genus *Cystoseira* C.Ag. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, **1968c**, 60, 251-264
- Roberts, M.** Studies on marine algae of the British Isles. 8. *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss. *European Journal of Phycology*, **1970**, 5, 201-210
- Roberts, M.** Studies on marine algae of the British Isles. 9. *Cystoseira nodicaulis* (withering) M. Roberts. *European Journal of Phycology*, **1977**, 12, 175-199
- Roberts, M.** Active Speciation in the genus *Cystoseira* C. Agardh. *Modern approaches to the taxonomy of red and brown algae : proceedings of an international symposium held at the Polytechnic of North London, Academic Press for the Systematics Association*, **1978**
- Rohfritsch, A., Payri, C., Stiger, V. & Bonhomme, F.** Molecular and morphological relationships between two closely related species, *Turbinaria ornata* and *T. conoides* (Sargassaceae, Phaeophyceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **2007**, 35, 91-98
- Rossi, N., Perrot, T., Daniel, C., Bajjouk, T. & Dion, P.** Évolution temporelle de la couverture en fucales sur les côtes bretonnes. *Rebent*, **2010**
- Rousseau, F., Leclerc, M. & De Reviers, B.** Molecular phylogeny of European Fucales (Phaeophyceae) based on partial large-subunit rDNA sequence comparisons. *Phycologia*, **1997**, 36, 438-446
- Rousseau, F. & De Reviers, B.** Phylogenetic relationships within the Fucales (Phaeophyceae) based on combined partial SSU+LSU rDNA sequence data. *European Journal of Phycology*, **1999**, 34, 53-64
- Rousseau, F., Burrowes, R., Peters, A. F., Kuhlenkamp, R. & de Reviers, B.** A comprehensive phylogeny of the Phaeophyceae based on nrDNA sequences resolves the earliest divergences. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Séries III - Sciences de la Vie*, **2001**, 324, 305-319
- Sachindra, N. M., Sato, E., Maeda, H., Hosokawa, M., Niwano, Y., Kohno, M. & Miyashita, K.** Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid Fucoxanthin and its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, 55, 8516-8522
- Saitou, N. & Nei, M.** The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, **1987**, 4, 406-425
- Sales, M., Cebrian, E., Tomas, F. & Ballesteros, E.** Pollution impacts and recovery potential in three species of the genus *Cystoseira* (Fucales, Heterokontophyta). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **2011**, 92, 347-357
- Sauvageau, C.** Sur les *Cystoseira* à anthérozoïdes sans point rouge. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, **1911**, 71, 472-473
- Sauvageau, C.** A propos des *Cystoseira* de Banyuls et de Guéthary. *Bulletin de la Station Biologique d'Arcachon*, **1912**, 14, 133-556

- Schoenwaelder, M.** The occurrence and cellular significance of physodes in brown algae. *Phycologia*, **2002**, 41, 125-139
- Schoenwaelder, M.** The Biology of Phenolic Containing Vesicles. *Algae*, **2008**, 23, 163-175
- Schonbeck, M. W. & Norton, T. A.** Factors controlling the upper limits of furoid algae on the shore. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **1978**, 31, 303-313
- Silberfeld, T., Leigh, J. W., Verbruggen, H., Cruaud, C., de Reviers, B. & Rousseau, F.** A multi-locus time-calibrated phylogeny of the brown algae (Heterokonta, Ochrophyta, Phaeophyceae): Investigating the evolutionary nature of the "brown algal crown radiation". *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **2010**, 56, 659-674
- Siegel, S. & Castellan, N. J.** Nonparametric statistics for the behavioral sciences. McGraw-Hill (ed.) **1988**, 399 pp.
- Silva, P. C.** A review of nomenclatural conservation in the algae from the point of view of the type method. *University of California Publications in Botany*, **1952**, 25, 241-323
- Singh, I. P. & Bharate, S. B.** Phloroglucinol compounds of natural origin. *Natural Product Reports*, **2006**, 23, 558-591
- Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants Part A*, Packer, L. (ed.) Academic Press, **1999**, Volume 299, 152-178
- Snirc, A., Silberfeld, T., Bonnet, J., Tillier, A., Tuffet, S. & Sun, J.-S.** Optimization of DNA extraction from brown algae (Phaeophyceae) based on a commercial kit. *Journal of Phycology*, **2010**, 46, 616-621
- Souhaili, Z., Lagzouli, M., Faid, M. & Fellat-Zerrouck, K.** Inhibition of growth and mycotoxins formation in moulds by marine algae *Cystoseira tamariscifolia*. *African Journal of Biotechnology*, **2004**, 3, 71-75
- Steinberg, P. D.** Biogeographical variation in brown algal polyphenolics and other secondary metabolites: comparison between temperate Australasia and North America. *Oecologia*, **1989**, 78, 373-382
- Steinberg, P. D.** Seasonal variation in the relationship between growth rate and phlorotannin production in the Kelp *Ecklonia radiata*. *Oecologia*, **1995**, 102, 169-173
- Stengel, D. & Dring, M.** Seasonal variation in the pigment content and photosynthesis of different thallus regions of *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyta) in relation to position in the canopy. *Phycologia*, **1998**, 37, 259-268
- Stengel, D., Connan, S. & Popper, Z.** Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*, **2011**, 9, 483-501
- Stiger, V.** Contribution à l'étude de la biologie des populations de deux grandes algues brunes *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh et *Sargassum mangarevense* (Grunow) Setchell, proliférant sur les récifs de Polynésie Française. *Thèse de doctorat de l'Université Française du Pacifique, Papeete*, **1997**
- Stiger, V., Horiguchi, T., Yoshida, T., Coleman, A. W. & Masuda, M.** Phylogenetic relationships of *Sargassum* (Sargassaceae, Phaeophyceae) with reference to a taxonomic revision of the section Phyllocystae based on ITS-2 nrDNA sequences. *Phycological Research*, **2000**, 48, 251-260

- Stiger, V., Horiguchi, T., Yoshida, T., Coleman, A. W. & Masuda, M.** Phylogenetic relationships within the genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae), inferred from ITS-2 nrDNA, with an emphasis on the taxonomic subdivision of the genus. *Phycological Research*, **2003**, 51, 1-10
- Stiger, V., Deslandes, E. & Payri, C. E.** Phenolic contents of two brown algae, *Turbinaria ornata* and *Sargassum mangarevense* on Tahiti (French Polynesia): interspecific, ontogenic and spatio-temporal variations. *Botanica Marina*, **2004**, 87, 402-409
- Swanson, A. K. & Druehl, L. D.** Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquatic Botany*, **2002**, 73, 241 - 253
- Targett, N. M. & Arnold, T. M.** Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. *Journal of Phycology*, **1998**, 34, 195-205
- Thibaut, T., Pinedo, S., Torras, X. & Ballesteros, E.** Long-term decline of the populations of Fucales (*Cystoseira* spp. and *Sargassum* spp.) in the Albères coast (France, North-western Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin*, **2005**, 50, 1472-1489
- Thomas, E.** Géologie succincte du massif armoricain (Bretagne). *Bureau de Recherches Géologiques et Minières*, **2005**, 6 pp.
- Toth, G. B., Langhamer, O. & Pavia, H.** Inducible and Constitutive Defenses of Valuable Seaweed Tissues: Consequences for Herbivore Fitness. *Ecology*, **2005**, 86, 612-618
- Tringali, C.** Bioactive metabolites from marine algae: recent results. *Current Organic Chemistry*, **1997**, 1, 375-374
- Tronholm, A., Steen, F., Tyberghein, L., Leliaert, F., Verbruggen, H., Antonia Ribera Siguan, M. & De Clerck, O.** Species delimitation, taxonomy, and biogeography of *Dictyota* in Europe (Dictyotales, Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, **2010**, 46, 1301-1321
- Underwood, A.J.** Experimental ecology of rocky intertidal habitats: what are we learning? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **2000**, 250, 51-76
- UNEP (United Nations Environment Programme).** The State of the Marine and Coastal Environment in the Mediterranean Region. **1996**, MAP Technical Reports Series No. 100, 153 pp.
- US6774145 : Brevet déposé par Lee, B.-H., Choi, B.-W., Ryu, G.-S., Kim, S.-K. & Shin, H.-C.** Material separated from *Ecklonia cava*, method for extracting and purifying the same, and use thereof as antioxidants. **2004**
- Valiante, R.** Le cystoseirae del golfo di Napoli. *Engelmann*, **1883**, 30 pp.
- Valls, R. & Pioveti, L.** The chemistry of the Cystoseiraceae (Fucales: Phaeophyceae): Chemotaxonomic relationships. *Biochemical Systematics and Ecology*, **1995**, 23, 723-745
- Van Alstyne, K. L.** Comparison of three methods for quantifying brown algal polyphenolic compounds. *Journal of Chemical Ecology*, **1995**, 21, 45-58
- Van den Hoek, C.** Phytogeographic provinces along the coasts of the northern Atlantic Ocean. *Phycologia*, **1975**, 14, 317-330
- Van Royen, A.** Florae Leydensis Prodromus, exhibens plantas quae in horto academico Lugduno-Batavo aluntur. *Samuelem Luchtmans*, **1740**, 538 pp.
- Viejo, R. M.** The effects of colonization by *Sargassum muticum* on tidepool macroalgal assemblages. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **1997**, 77, 325-340

- Wang, T., Jónsdóttir, R. & Ólafsdóttir, G.** Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, **2009**, 116, 240 - 248
- Wernberg, T., Thomsen, M. S., Staehr, P. A. & Pedersen, M.** Comparative Phenology of *Sargassum muticum* and *Halidrys siliquosa* (Phaeophyceae: Fucales) in Limfjorden, Denmark. *Botanica Marina*, **2001**, 44, 31-39
- Withering, W.** An arrangement of British plants, according to the latest improvements of the Linnaean system. To which is prefixed, an easy introduction to the study of botany. Illustrated by copper plates. **1796**, 4, 418 pp.
- WO2010064750 : brevet déposé par Kim, S.-K., Kim, M.-M. & Lee, S.-H.** Phloroglucinol derivatives from *Ecklonia cava* having anti-HIV-1 inhibitory activity, **2010**
- Whittaker, R. H. & Goodman, D.** Classifying Species According to Their Demographic Strategy. I. Population Fluctuations and Environmental Heterogeneity. *The American Naturalist*, *The University of Chicago Press for The American Society of Naturalists*, **1979**, 113, 185-200
- Wright, S. W., Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C., Llewellyn, C. A., Bjornland, T., Repeta, D. & Welschmeyer, N.** Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids in marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, **1991**, 77, 183-196
- Yates, J. L. & Peckol, P.** Effects of nutrient availability and herbivory on polyphenolics in the seaweed *Fucus Versiculosus*. *Ecology*, **1993**, 74, 1757-1766
- Yoshida, T., Stiger, V. & Horiguchi, T.** *Sargassum boreale* sp. nov. (Fucales, Phaeophyceae) from Hokkaido, Japan. *Phycological Research*, **2000**, 48, 125-131
- Zubia, M., Fabre, M.-S., Kerjean, V., Le Lann, K., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M. & Deslandes, E.** Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chemistry*, **2009**, 116, 693-701

RÉSUMÉ VULGARISÉ

Les algues sont un groupe de végétaux aquatiques très souvent marins qui nous racontent des histoires bien différentes. Avec les premières études menées il y a quelques siècles, il s'est avéré commode de regrouper derrière une unique appellation ces organismes dont on ne se savait finalement presque rien, par comparaison aux plantes qui peuplent nos prairies et forêts. Et pourtant ! A y regarder de plus près, ces algues ont souvent peu de choses en commun. On peut même dire qu'on a placé dans la même boîte des végétaux qui, dans l'arbre généalogique de la vie, se branchent à des endroits très éloignés les uns des autres.

Depuis cette époque, les chercheurs se sont attelés à améliorer toute la classification. En gros, ils ont changé les armoires et les tiroirs dans lesquels ils rangeaient toutes les espèces. Avec les progrès technologiques, les outils employés ont évolué. Au départ, la morphologie des algues était le seul critère utilisable. Ensuite, ils ont regardé de plus près au microscope, pour voir des choses que l'œil nu ne pouvait déceler. Puis, ils ont cherché des molécules caractéristiques chez les végétaux. Dernièrement, des séquences d'ADN ont permis de résoudre bien des situations, là où les anciens outils apportaient parfois plus de questions que de réponses.

A quoi bon faire le ménage dans ces connaissances ? Les raisons sont nombreuses. Avant de discuter d'écologie, ou de tout autre intérêt des algues, il est nécessaire de bien connaître (et de bien reconnaître !) chaque espèce.

Une partie de mes travaux s'est ainsi consacrée à l'étude des liens qui existent au sein d'un groupe d'algues brunes, qui peuplent les grandes flaques que l'on peut trouver dans les rochers, en bord de mer. Ce sont les algues du genre *Cystoseira*, le terme « genre » signifiant « petite boîte regroupant des espèces apparentées ». Elles sont largement répandues en Méditerranée et y sont beaucoup étudiées. Mais les cinq espèces communes sur nos côtes atlantiques ne sont pas forcément les mêmes. Elles sont plus discrètes dans leur milieu, et jusqu'alors personne n'avait tenté de jouer au jeu des sept familles avec ces algues. Grâce à l'analyse de certaines parties de leur ADN, j'ai abouti à la construction de l'équivalent d'un arbre généalogique, qui a montré que finalement... la « boîte » *Cystoseira* était, à son échelle, un petit fourre-tout ! J'ai pu mettre en évidence l'existence d'au moins deux groupes parmi les cinq espèces que j'étudiais, grâce à d'autres algues, que l'on considérait au départ comme des cousines éloignées, et qui finalement étaient de proches parentes.

Ces résultats ont ainsi permis d'affiner la connaissance des espèces du genre *Cystoseira*. D'ailleurs, en même temps que paraissaient les résultats sur ces cinq espèces, une association de chercheurs experts en « généalogie algale » publiait un arbre détaillant les liens de parenté entre un nombre d'espèces très conséquent, et leurs résultats ont également montré l'existence de plusieurs groupes. Finalement, les espèces de *Cystoseira* sont éparpillées dans différents genres !

D'une certaine façon, l'originalité de mon travail de thèse a été de multiplier les outils, afin d'obtenir une généalogie qui s'appuie sur des critères complémentaires. Car avant l'avènement de l'ADN, certains indices chimiques sont apparus pertinents pour faire du tri dans les espèces. Aussi, j'ai couplé la méthode ADN classique avec deux méthodes d'analyses chimiques très performantes, avec l'appui de collègues chimistes. Le but de ces méthodes était d'obtenir des « cartes d'identité chimique » pour chaque espèce, et de comparer ces informations. Pour ces études, c'est en fait la composition des algues (la présence de certaines molécules) qui est la clé du classement. Les résultats ont alors montré une bonne cohérence entre les données chimiques et les données ADN. Il apparaît ainsi que certaines espèces produisent des molécules originales, appelées terpènes, dont on trouve des dérivés dans les résines de pins par exemple. En Bretagne, les espèces de *Cystoseira* productrices de terpène sont en fait de proches parents, d'après les résultats ADN ! Pour compléter ce bilan, la fin de mes travaux de thèse a eu pour objet de déterminer la nature d'un terpène chez une espèce peu étudiée, et la formule chimique de ce terpène s'est avérée semblable à ce qui existe chez sa cousine la plus proche.

Finalement, ces études permettent de créer un arbre généalogique de ces espèces qui s'appuie sur tous les indices possibles : l'ADN, bien évidemment, mais aussi la présence de terpènes originaux. On cherche à savoir si finalement toutes les données vont dans le même sens, ce qui n'est pas forcément évident ! On peut également vérifier si la morphologie des algues, ainsi que tous les critères microscopiques mis en évidence par d'éminents savants pendant tout le XX^{ème} siècle, sont de bons indices pour distinguer les différents groupes d'espèces.

Après avoir caractérisé les relations de parenté existant entre les cinq espèces auxquelles j'ai consacré mes travaux, le deuxième volet de ma thèse s'inscrit dans une optique écologique. L'écologie, littéralement « science de la maison », est la partie de la biologie qui s'occupe notamment du milieu de vie, des interactions entre individus d'une même espèce, entre différentes espèces, et avec leur environnement. Sur le littoral, la zone où croissent les algues du genre *Cystoseira* est caractérisée par une organisation végétale très singulière. Les algues du littoral se répartissent en une succession de ceintures, chacune d'entre elle se définissant par la présence majoritaire d'une ou deux espèces d'algue, à une position précise sur l'estran (entre le niveau de marée haute et le niveau de marée basse).

L'origine de cette répartition tient en deux facteurs :

Chaque algue possède une capacité propre à résister à l'émersion (et donc à la vie à l'air libre) et à toutes les conséquences de ce phénomène. Plus une algue se trouve en position haute sur l'estran, plus ce temps d'émersion est grand et ses effets potentiellement importants.

Les végétaux engagent entre eux une lutte incessante pour occuper le sol qui n'est pas illimité. La compétition existant aux niveaux les plus longtemps immergés, plus propices pour ces végétaux marins, se fait au détriment de certaines espèces.

La problématique développée dans ma thèse a été de relier la répartition des algues sur l'estran et les paramètres caractérisant les populations d'algues, à savoir leurs capacités à pulluler, à croître, et à se reproduire. Aussi, j'ai entamé une série d'observations afin de recenser, depuis les niveaux de basse mer jusqu'aux niveaux de haute mer, l'alternance des populations des différentes espèces. En parallèle, j'ai suivi l'évolution de ces populations, observées sur deux sites, pendant 18 mois. Cela m'a permis de mettre en évidence la saisonnalité de la croissance et de la reproduction pour certaines espèces. En combinant ces travaux, j'ai pu lier répartition et paramètres des populations. Il apparaît que pour ces espèces, leur capacité à croître et à se multiplier est en relation avec leur positionnement sur l'estran, lui-même sous la dépendance de leur capacité à résister aux contraintes du milieu et de la compétition qui se développe avec les autres espèces pour coloniser les rochers.

En parallèle, j'ai mené des études sur les pigments avec l'aide d'une collègue enseignante. Ces molécules servent à absorber l'énergie lumineuse chez les végétaux. J'ai ainsi cherché à savoir s'il existe un lien entre la position des algues sur l'estran et les quantités de pigments qu'elles produisent.

Le troisième et dernier volet de ma thèse s'est orienté vers une toute autre thématique : les substances naturelles. Cette branche de la chimie vise à identifier de nouvelles molécules produites par des organismes vivants. Pourquoi se lancer dans une telle recherche ? A nouveau, les réponses sont multiples. D'abord, pour essayer de comprendre : comprendre comment les espèces se défendent dans leur milieu ; comprendre comment elles résistent à des conditions environnementales parfois extrêmes. Chez les végétaux, qui subissent de plein fouet tout ce qui se passe dans leur milieu, la meilleure défense, c'est la lutte chimique. Les algues vont produire, parfois en grandes quantités, des molécules qui ne sont pas strictement nécessaires à leur survie. On appelle ces molécules métabolites secondaires, en ce sens qu'elles sont produites par le métabolisme de l'individu, via une série de réactions chimiques contrôlées, et par la suite, elles ne seront pas impliquées dans les mécanismes indispensables au fonctionnement de base de la cellule. Ainsi, connaître les métabolites secondaires synthétisés par les algues est un point de départ pour comprendre leur façon de se défendre dans le milieu.

Mais comment une molécule peut-elle avoir un rôle aussi important ? Prenons le cas du facteur lumière. A marée basse, certaines algues se retrouvent transitoirement émergées – et directement confrontées à la lumière solaire. Or l'eau, dans laquelle les algues baignaient jusqu'alors, est un filtre naturel des rayonnements nocifs. La période d'émersion, à marée basse, implique un nouveau problème, car les rayons Ultra-Violets peuvent créer des dommages importants dans les cellules. Une stratégie pour tenir le choc, est de synthétiser des composés qui vont absorber l'énergie des rayons UV. Et ce sont notamment des métabolites secondaires qui vont pouvoir jouer ce rôle.

Dès lors apparaît un nouvel intérêt à l'étude de ces substances : la valorisation de ces composés. C'est-à-dire : mettre en exergue la valeur ajoutée que ces composés peuvent présenter pour la société. Si la défense chimique est efficace, il est possible de réutiliser de telles molécules, pour exploiter leurs propriétés dans un autre contexte. On peut ajouter, dans des peintures pour bateaux, un composé utilisé par une algue pour lutter contre les bactéries, afin de limiter l'apparition de salissures sur la coque. On peut aussi intégrer une molécule qui filtre les UV dans une crème solaire...

Mes travaux en chimie des substances naturelles se sont concentrés sur l'étude des phlorotannins, qui sont des molécules caractéristiques des algues brunes, analogues aux tannins de la vigne. Mon objectif a été de caractériser au moins partiellement les types de molécules produites par les espèces de *Cystoseira*, et le cas échéant, aboutir à l'identification complète de ces substances. Pour ce faire, avec l'aide d'un collègue étudiant, nous avons mis au point un protocole permettant d'extraire et d'isoler ces composés. Nous avons réussi à obtenir des composés purs, et à en caractériser quelques uns. Grâce à un travail commun avec une collègue doctorante, j'ai pu déterminer l'activité antioxydante de ces molécules, pour mettre en évidence un rôle possible dans la protection des algues face aux contraintes de leur milieu. J'ai également pu montrer que ces composés n'étaient pas produits dans les mêmes quantités selon la saison considérée.

Finalement, ce travail aura permis d'en savoir plus sur un genre d'algues jusqu'alors assez méconnu en Bretagne, en clarifiant les relations de parenté, en décrivant leurs modes de vie et en caractérisant certaines molécules-clés impliquées dans leur défense chimique.

Jégou, 2011. Étude du genre *Cystoseira* des côtes bretonnes : taxinomie, écologie et caractérisation de substances naturelles

Le long des côtes de l'Atlantique Nord-Est, le genre *Cystoseira* (algues brunes, famille des *Sargassaceae*) se décline en cinq espèces établies dans les cuvettes de l'étage médiolittoral. Au-delà de l'intérêt écologique de ces organismes, leur valorisation potentielle en tant que sources naturelles de composés bioactifs peut aujourd'hui être envisagée. Cependant, une telle démarche peut se voir freinée par des questions taxinomiques restées sans réponse depuis le début du XX^{ème} siècle. Le premier volet de ce projet de thèse consiste à résoudre ces difficultés, en combinant des approches aujourd'hui classiques (analyses phylogénétiques issues de données moléculaires) à des études chimiques exploitant de nouvelles techniques analytiques (RMN et LC-MS), pour proposer un cadre taxinomique à chaque espèce. En s'appuyant sur les données phylogénétiques les plus récentes, nos résultats ont permis de mettre en évidence la pertinence de critères chimiques pour illustrer les relations de parenté existant au sein du genre, et nous avons également pu obtenir des « cartes d'identité chimique » de chaque taxon. Un chimiomarqueur de type mérodioterpène a été identifié et isolé chez *Cystoseira nodicaulis*. La deuxième partie du travail consiste en une étude écologique des populations du genre *Cystoseira* du littoral breton. Contrairement au phénomène d'étagement des macroalgues sur l'étage médiolittoral, bien connu dans les zones tempérées, peu de données existent sur la répartition des macroalgues peuplant les cuvettes de l'estran. Aussi l'objectif est de décrire la distribution des algues du genre *Cystoseira*, qui comptent parmi les algues dominantes de ces cuvettes et, à travers un suivi écologique, de caractériser les populations, dans le temps et dans l'espace, en lien avec la distribution observée. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une répartition précise des espèces dans les cuvettes de l'estran, sous la dépendance de gradients de facteurs biotiques et abiotiques. Nous avons également caractérisé l'évolution spatio-temporelle de certaines variables des populations. Grâce à une étude complémentaire sur les pigments principaux de ces algues par HPLC, nous avons pu montrer l'existence d'une photo-adaptation aux niveaux intra- et inter-populationnels. Enfin, ce projet propose d'étudier les phlorotannins des cinq espèces bretonnes. Ces molécules sont connues pour leur activité antioxydante et la variété de leurs rôles *in vivo*. Aussi, le but de cette dernière étude est de mettre au point des protocoles d'extraction et de purification adaptés à ces composés, d'en caractériser la structure chimique, et d'en déterminer des activités au moyen de test *in vitro*. Une première démarche de quantification nous a permis d'appréhender les variations interspécifiques et saisonnières des teneurs en composés phénoliques chez les cinq espèces étudiées. Dans un deuxième temps, nous avons purifié et caractérisé partiellement les composés phénoliques extraits des algues, et enfin, nous avons pu déterminer les variations saisonnières du phloroglucinol, que nous avons pu identifier comme étant le composé phénolique majoritaire de *C. tamariscifolia*.

Jégou, 2011. The genus *Cystoseira* from the coasts of Brittany: taxonomy, ecology and natural products

Along the North-East Atlantic, the genus *Cystoseira* (brown algae, family *Sargassaceae*) is composed of five species, and their populations settle in rock pools from the intertidal zone. Beyond the ecological value of these organisms, they are now more and more studied as a source of natural products. However, taxonomical issues within this genus must be solved first. So, we investigated the taxonomy of the five species occurring in Brittany using two strategies: phylogenetic analyses (thanks to molecular markers) and chemical analyses (using NMR and LC-MS). Using recent phylogenetic data, our results highlighted the relevancy of the use of chemical criteria to illustrate the phylogenetic relationships. This way, we were able to associate a "chemical ID card" to each species. We also isolated a meroditerpene from *Cystoseira nodicaulis*. The second part of our work was an ecological study of several populations settled in Brittany. Concerning the emerged substrata of the intertidal zone, the available data about zonation patterns are plethoric; conversely, few authors have investigated the distribution of macroalgae in tide pools. We highlighted a singular distribution pattern for the *Cystoseira* species that must be under the dependency of biotic and abiotic factors. We also demonstrated the spatio-temporal variability of several variables of the populations. Additionally, we showed through the quantification of the main pigments by HPLC that different photo-adaptive behaviors exist within and between populations. Finally, we investigated the phlorotannins of the *Cystoseira* species. These molecules are known to exhibit several biological activities and many ecological roles have been demonstrated in the literature. We develop a new protocol for the purification and quantification of the compounds, and we also determined their radical-scavenging activity. This way, we revealed specific differences and seasonal patterns in phlorotannin production. We also purified phenolics and identified the main kind of compounds in the extracts. We identified phloroglucinol in *Cystoseira tamariscifolia*, and revealed a seasonal evolution of its production, in relation with its phenology.