



Caractérisation et sources de variation du métabolome : le cas de l'algue brune Lobophora des écosystèmes coralliens de Nouvelle-Calédonie

Julie Gaubert

► To cite this version:

Julie Gaubert. Caractérisation et sources de variation du métabolome : le cas de l'algue brune Lobophora des écosystèmes coralliens de Nouvelle-Calédonie. Biodiversité et Ecologie. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS530 . tel-02926162

HAL Id: tel-02926162

<https://theses.hal.science/tel-02926162>

Submitted on 31 Aug 2020

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

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

Sorbonne Université

Ecole doctorale des Sciences de l'Environnement (ED 129)

IRD Nouméa / UMR Entropie

NUI Galway / Marine Biodiscovery Laboratory

Caractérisation et sources de variation du métabolome : le cas de l'algue brune *Lobophora* des écosystèmes coralliens de Nouvelle-Calédonie

Par **Julie GAUBERT**

Thèse de doctorat de Biologie Marine – Ecologie Chimique

Dirigée par Claude PAYRI et co-dirigée par Olivier THOMAS

Présentée et soutenue publiquement le 12 Octobre 2018

Devant un jury composé de :

CULIOLI, Géraud (Maître de conférences, MAPIEM)

HELLIO, Claire (Professeur, UBO)

LEBLANC, Catherine (Directrice de Recherche, CNRS)

LEMEE, Rodolphe (Professeur, UPMC)

PRADO, Soizic (Professeur, MNHN-CNRS)

ZUBIA, Mayalen (Maître de conférences, UPF)

PAYRI, Claude (Directrice de Recherche, IRD)

THOMAS, Olivier (Professeur, NUIG)

Examineur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Rapporteur

Examinatrice

Directrice de thèse

Co-directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants Claude Payri & Olivier Thomas pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci de m'avoir soutenu depuis mon stage de master II dans ce projet. Merci pour tout ce que vous m'avez appris et vos précieux conseils.

Un très grand merci à Stéphane Greff pour toute l'aide que tu m'as apportée dans le traitement des données métabolomiques et les analyses. Merci pour m'avoir initiée à la GC-MS, appris les réseaux moléculaires, pour ta patience et ta sympathie ainsi que ton accueil à la Station Marine d'Endoume. C'est un plaisir de travailler avec toi. « Grâce » à mes échantillons, tu es devenu expert en remplacement de capillaires UHPLC-MS-qTOF.

Merci également à Thierry Pérez pour m'avoir permis de faire deux séjours à la Station Marine d'Endoume sur la plateforme Mallabar.

Merci à Jean-Charles Martin pour les scripts R de filtrage des matrices en sortie d'XCMS.

Un grand merci à toute l'équipe de l'Université de Galway avec qui j'ai passé 5 mois : Hiren Solanki, pour ton aide sur la VLC et la LC-MS, avec ces nombreux problèmes techniques à résoudre; Navdeep pour la purification de composés et la VLC ; Kevin Calabro, pour ta présence indispensable au labo, tes bons conseils et les analyses des spectres RMN ; Daniel Rodriguez pour ton aide sur la SPE. Merci à Perrine Lasserre pour les pauses café-gâteaux et les séances de sport qui m'ont fait beaucoup de bien entre de longues heures de labo.

Je tiens également à remercier les chercheurs qui m'ont aidé à Nouméa car on peut parfois se sentir éloignés dans un centre à l'autre bout du monde. Un grand merci à Vincent Dumontet pour tes conseils en chimie, ton aide au labo, ta sympathie et ta bonne humeur.

Merci à Linda Guentas pour ta gentillesse, ton accueil à l'UNC et ton aide dans les tests antibactériens. C'est toujours agréable de travailler avec toi.

Merci à toute l'équipe de l'IAC qui m'a permis de faire différents tests de bioactivité sur la mouche des fruits, les champignons et la tique des bovins: Marine Toussiro, Valérie

Kagy, Christian Mile, Thomas Hue et Carole Martin. Merci pour votre accueil chaleureux et votre sympathie.

Merci à Riccardo Rodolpho-Metalpa pour m'avoir aidé dans la réalisation de ma dernière expérience de thèse sur l'effet de l'acidification. J'ai enfin pu découvrir le fameux site de Bouraké !

Merci également aux membres du comité de thèse pour leurs conseils avisés : Christophe Vieira, Mayalen Zubia et Gérald Culioli ainsi qu'aux membres du jury et rapporteurs de cette thèse qui ont accepté de lire et d'évaluer ce travail.

Merci aux pilotes de l'IRD : Miguel, Sam et Philippe, ainsi qu'à mes binômes de plongée : Bertrand, Christophe, Eric, Thomas et Valentin, sans qui toutes ces sorties en mer n'auraient pu être réalisées. Premier dugong de ma vie lors d'une sortie avec vous !

Merci également à tous mes amis du caillou, aux nombreux doctorants et stagiaires qui m'ont soutenu dans les moments plus difficiles, les hauts et les bas de la thèse et qui ont su ne pas me tenir trop rigueur de mes gros coups de stress. Merci à ma chère collègue de bureau Chloé Martias pour tous les rires et les pleurs partagés. Ta joie de vivre des îles et ta générosité vont beaucoup me manquer.

Une pensée pour mes amies d'enfance, Sophie, Elodie et Charlotte ainsi que Manue, pour votre regard captivé quand je parle de ma thèse même si vous ne comprenez pas trop ce que je fais.

Un immense merci à ma famille et leur soutien sans faille dans tout ce que j'entreprends. Merci d'être toujours là malgré la distance, j'ai tellement de chance de vous avoir et de pouvoir partager la passion de la plongée avec vous.

Enfin merci à Germain Boussarie pour toute l'aide scientifique et psychologique que tu m'auras apporté tout au long de cette thèse. Sans toi, je n'en saurais pas là aujourd'hui et je serais probablement toujours derrière mon écran à chercher à résoudre mes erreurs sur R... Merci pour le bonheur que tu m'apportes chaque jour et pour supporter mes pics de stress...

Sorbonne Université

Ecole doctorale des Sciences de l'Environnement (ED 129)

IRD Nouméa / UMR Entropie

NUI Galway / Marine Biodiscovery Laboratory

Caractérisation et sources de variation du métabolome : le cas de l'algue brune *Lobophora* des écosystèmes coralliens de Nouvelle-Calédonie

Par **Julie GAUBERT**

Thèse de doctorat de Biologie Marine – Ecologie Chimique

Dirigée par Claude PAYRI et co-dirigée par Olivier THOMAS

Présentée et soutenue publiquement le 12 Octobre 2018

Devant un jury composé de :

CULIOLI, Géraud (Maître de conférences, MAPIEM)
HELLIO, Claire (Professeur, UBO)
LEBLANC, Catherine (Directrice de Recherche, CNRS)
LEMEE, Rodolphe (Professeur, UPMC)
PRADO, Soizic (Professeur, MNHN-CNRS)
ZUBIA, Mayalen (Maître de conférences, UPF)
PAYRI, Claude (Directrice de Recherche, IRD)
THOMAS, Olivier (Professeur, NUIG)

Examineur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Rapporteur
Examinatrice
Directrice de thèse
Co-directeur de thèse

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	11
1. Importance des algues dans les écosystèmes coralliens	13
2. Les macroalgues, un réservoir de molécules	15
2.1. La chimie et l'écologie chimique chez les macroalgues	15
2.2. Des connaissances sur l'écologie chimique des algues à renforcer	17
3. Le genre <i>Lobophora</i>	19
3.1. Une macroalgue commune des récifs coralliens	19
3.2. Un genre souvent associé aux récifs dégradés	20
3.3. Qu'en est-il des connaissances sur la chimie des <i>Lobophora</i> ?	21
3.4. Quatre espèces choisies pour notre étude	25
4. La métabolomique, un outil intéressant au service de l'écologie chimique des algues	28
4.1. Le métabolome: brève présentation	28
4.2. La métabolomique, la dernière branche des techniques « omiques »	28
4.3. Un peu de technique...	29
4.4. Les applications de la métabolomique	34
4.5. La métabolomique du côté des algues	34
4.6. La métabolomique pour étudier le métabolome de <i>Lobophora</i>	37
Sites d'étude	39
Objectifs de thèse	42
Plan de thèse	43
Références	47
PARTIE 1. DIVERSITE CHIMIQUE DE LOBOPHORA ET POTENTIEL DE VALORISATION	55
CHAPITRE 1. Caractérisation de la diversité chimique de trois espèces de <i>Lobophora</i>	57
1. Contexte de l'étude	59
2. Matériel & méthodes	60
2.1. Récoltes de <i>Lobophora</i>	60
2.2. Extraction brute	60
2.3. Chromatographie liquide sous vide (VLC Vacuum Liquid Chromatography)	61
2.4. Purification de la fraction F4 (100% MeOH) de <i>L. rosacea</i>	62
2.5. Purification de la fraction F4 (100% MeOH) de <i>L. sonderii</i>	63
2.6. Purification des fractions F3 et F4 <i>L. monticola</i>	63
2.7. SPE en phase normale des fractions F5 issues de la VLC (§ 2.3) de <i>L. rosacea</i> , <i>L. monticola</i> et <i>L. sonderii</i> .	64
2.7.1 Analyses en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	65
2.7.2 Purifications des fractions issues de la SPE en phase normale	65
2.8. Fractionnement sur colonne de silice ouverte des nouvelles collectes de masse	67
3. Résultats & discussion	69
3.1. Purification des premières collectes de masse de <i>L. sonderii</i> , <i>L. rosacea</i> et <i>L. monticola</i> fractionnées en phase inverse	69
3.2. SPE en phase normale des fractions F5 issues de la VLC de <i>L. rosacea</i> , <i>L. monticola</i> et <i>L. sonderii</i>	73
3.3. Fractionnement en phase normale de secondes collectes de masse	77

3.4. Bilan sur les études chimiques entreprises sur les trois espèces de <i>Lobophora</i>	78
4. Conclusion	79
Figures supplémentaires	81
Références	82
CHAPITRE 2. Mise au point des tests de bioactivité sur les fractions algales	83
<u>I- Recherche de bioactivités des extraits et fractions de <i>L. sonderii</i>, <i>L. rosacea</i> et <i>L. monticola</i></u>	85
A. Recherche d'activités pesticides à partir d'extraits bruts issus de <i>L. sonderii</i> et <i>L. monticola</i>	85
1. Contexte de l'étude	85
2. Activité insecticide sur la mouche des fruits	86
2.1. Matériel & méthodes	86
2.2. Résultats et discussion	88
3. Activités attractives et répulsives	89
3.1. Matériel & méthodes	89
3.1.1. Test d'attraction	89
3.1.2. Test de répulsion	90
3.2. Résultats et discussion	90
3.2.1. Test d'attraction	90
3.2.2. Test de répulsion	92
4. Discussion générale	93
B. Recherche d'activité antifongique d'extraits bruts issus de <i>L. sonderii</i> et <i>L. monticola</i>	96
1. Contexte et motivation de l'étude	96
2. Matériel & méthodes	96
2.1. Biotests antifongiques par disque de diffusion	97
2.2. Biotest antifongique en microplaque 96 puits	98
3. Résultats & discussion	99
C. Recherche d'activité acaricide d'extraits bruts issus de <i>L. sonderii</i> et <i>L. monticola</i>	103
1. Contexte de l'étude	103
2. Matériel & méthodes	105
2.1. Sélection des larves	105
2.2. Tests d'activités sur les larves	106
3. Résultats & discussion	107
4. Conclusion générale	109
D. Tests antibactériens sur les fractions apolaires de <i>L. rosacea</i>, <i>L. sonderii</i> et <i>L. monticola</i>	110
1. Contexte	110
2. Matériel & méthodes	112
3. Résultats & discussion	113
3.1. Fractions algales actives sur <i>S. aureus</i> de <i>L. monticola</i>	114
3.2. Fractions algales actives sur <i>S. aureus</i> de <i>L. sonderii</i>	115
3.3. Fractions algales actives sur <i>S. aureus</i> de <i>L. rosacea</i>	117
<u>II- Suivi temporel de la biomasse de <i>Lobophora rosacea</i> et <i>Lobophora sonderii</i> au site de Ricaudy</u>	121
1. Matériel & méthodes	121
1.1. Méthode des photo-quadrats	121
1.2. Traitement des photos-quadrats	122

1.3. Relevé des températures	123
2. Résultats & discussion	123
2.1. Suivi de <i>L. rosacea</i>	123
2.2. Suivi de <i>L. sonderii</i>	124
Références	127

SYNTHESE de la partie 1	131
-------------------------	-----

PARTIE 2. ETUDE DES SOURCES DE VARIATION DU METABOLOME DE LOBOPHORA

CHAPITRE 3. Etude de la variation du métabolome de *Lobophora* : mise au point de la méthode

I- Plan d'échantillonnage pour les études sur la variation du métabolome

II- Mise au point des protocoles d'analyses métabolomiques par UHPLC-MS-QToF

1. Récolte des échantillons	140
2. Préparation des échantillons	140
3. Analyses métabolomiques par UHPLC-MS-QToF	141
3.1. Choix de la phase mobile	142
3.2. Optimisation du gradient	142
3.3. Dilution des échantillons	143
3.4. Volume d'injection	144
3.5. Mode d'ionisation	145
3.6. Choix de la phase stationnaire	145
3.7. Paramètres MS et schéma d'injection	146
3.8. Traitement des données LC-MS	147
4. Analyses métabolomiques par ¹ H-RMN	148
5. Analyses métabolomiques par GC-MS	149
6. Problème rencontré en LC-MS: contamination de certains échantillons	150

III- Tests statistiques

Références	156
------------	-----

CHAPITRE 4. Etude de la variation intra et inter-spécifique du métabolome de *Lobophora*

I- Etude de la variation intra-spécifique du métabolome

1. Contexte de l'étude	159
2. Matériels et méthodes	160
2.1. Récoltes des échantillons	160
2.2. Extractions, analyses métabolomiques et traitement de données	161
3. Résultats	162
3.1. Cas de <i>Lobophora monticola</i> : le métabolome des frondes en contact avec le corail est-il différent de celles sans contact ?	162
3.2. Cas de <i>Lobophora rosacea</i> : les différentes parties du thalle présentent-elles des métabolites différents ?	163
4. Discussion sur l'étude intra-spécifique du métabolome	164

II- Etude de la variation inter-spécifique du métabolome

Résumé	169
Abstract	172
1. Introduction	172
2. Results	175
2.1. ¹ H-NMR	175
2.2. UHPLC- QToF	176
2.3. GC-MS	178
3. Discussion	179
4. Conclusion	183
5. Experimental	183
5.1. Sampling	183
5.2. Metabolites extraction	184
5.3. Metabolomic analyses	185
5.3.1. NMR	185
5.3.2 UHPLC- QToF	185
5.3.3 GC-MS	185
5.3.4 Data treatment	186
5.4. Statistical analyses	187
Supplementary information	188
Figures complémentaires à l'article	196
Références	198

CHAPITRE 5. Variation spatio-temporelle du métabolome de *Lobophora* : impact de l'environnement et de l'habitat 205

I- Variation spatio-temporelle du métabolome de *Lobophora* 207

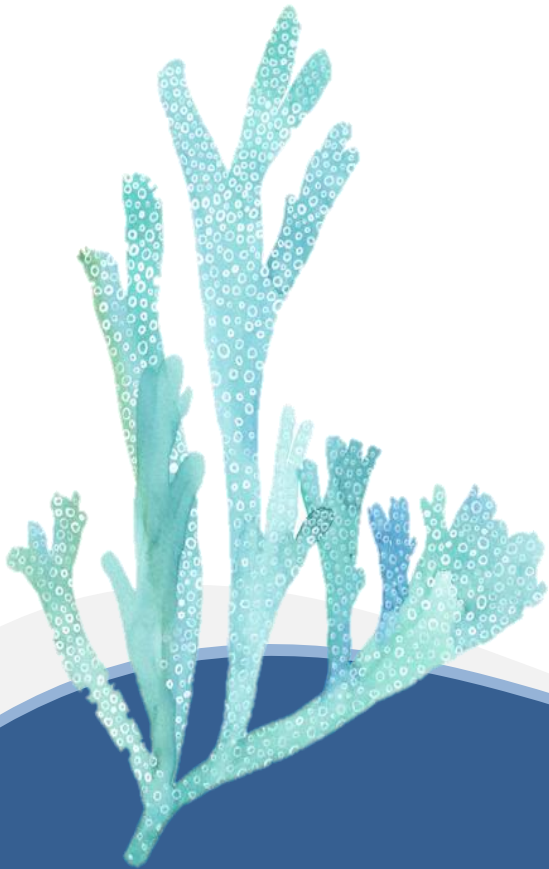
Résumé	207
Abstract	209
1. Introduction	209
2. Results	212
2.1. Temporal variation	212
2.2. Spatial variation	215
2.3. Transplantation experiments	218
3. Discussion	219
4. Methods	224
4.1. Sampling	224
4.2. Transplantations	225
4.3. Sample preparation	226
4.4. Metabolomic analyses	226
4.4.1. UHPLC-HRMS (QToF)	227
4.4.2. Data treatment and statistical analyses	227
4.4.3. Physico-chemical parameters	228
Supplementary information	230

II- Influence de l'habitat et du substrat sur le métabolome 239

1. Contexte	239
2. Matériel & méthodes	240
2.1. Les expériences de transplantations croisées	240
2.2. Extractions, analyses métabolomiques et traitement de données	243
3. Résultats	244
3.1. Influence de la saison sur le métabolome	244
3.2. Influence de l'habitat et de la durée de transplantation sur le métabolome	245
3.3. Marqueurs chimiques responsables de la discrimination en fonction des conditions de transplantations	248

3.4. Marqueurs chimiques communs entre les saisons	249
4. Discussion	250
Figure et tableau complémentaires	255
Références	257
CHAPITRE 6. Impact de l'acidification sur le métabolome de <i>Lobophora rosacea</i>: approches <i>in</i> et <i>ex situ</i>	263
Résumé	265
Abstract	267
1. Introduction	267
2. Methods	270
2.1. <i>In situ</i> experiment	270
2.2. <i>Ex situ</i> experiment	271
2.3. Metabolites extraction	272
2.4. Metabolomic analyses	272
2.5. Bioactivity test	274
2.6. Statistical analyses	275
3. Results	275
3.1. <i>In situ</i> experiment	275
3.2. Bioactivity assay	277
3.3. <i>Ex situ</i> experiment	277
3.4. Chemomarkers linked to pH condition	278
4. Discussion	281
Supplementary information	287
References	293
Synthèse de la partie 2	299
CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES	303
Références	312
Table des illustrations	314
Table des tableaux	321
Abréviations	325
Diffusion scientifique	327

Introduction générale



1. Importance des algues dans les écosystèmes coralliens

Les algues marines constituent un groupe majeur dans les écosystèmes coralliens et assurent de nombreux rôles écologiques. Le terme d' « algues » regroupe les macroalgues, généralement pluricellulaires et de quelques dizaines de centimètres, et les microalgues, unicellulaires, de quelques microns (ex : microalgues symbiotiques, diatomées) (Payri *et al.* 2018). Pour la suite de notre étude, nous nous intéresserons seulement aux macroalgues marines.

Le nombre d'espèces de macroalgues au niveau mondial est estimé entre 7 000 et 15 000. En Nouvelle-Calédonie, ce chiffre était estimé à 443 espèces en 2007 mais celui-ci ne cesse d'augmenter (Payri *et al.* 2018).

A la base du réseau trophique, les macroalgues sont une source de nourriture, directe ou indirecte, pour de nombreux organismes (herbivores, organismes filtreurs, bactéries) (*e.g.* da Gama *et al.* 2008; Aquilino & Stachowicz 2012). Les macroalgues marines forment également des habitats et des refuges pour d'autres organismes (Figure 1): microfaune, petits crustacés, poissons mais également des supports pour des épiphytes et micro-organismes (Egan *et al.* 2013). Les algues sont qualifiées d'organismes « bâtisseurs d'écosystèmes marins » et sont impliquées dans des systèmes biologiques tels que la circulation des nutriments, la production primaire, la stabilisation des sédiments et l'approvisionnement en oxygène atmosphérique (Kumar *et al.* 2016; Pereira *et al.* 2016).

Bien que certaines algues « molles » aient également un rôle dans l'établissement des larves de divers invertébrés (*e.g.* Chevolot *et al.* 1991), c'est surtout les algues rouges calcaires encroûtantes (ou CCA pour « crustose coralline algae ») qui sont les plus impliquées dans cette étape biologique. Elles favorisent notamment l'établissement ou la métamorphose d'oursins (Baskett & Salomon 2010), de gastéropodes (Daume *et al.* 1999) et de coraux (Tebben *et al.* 2015). De plus, les algues corallines participent à l'accrétion du carbonate de calcium à l'origine de structures tridimensionnelles (Webster *et al.* 2013).

Les macroalgues marines ont également une importance économique, notamment en alimentation humaine et animale (par exemple en supplément dans la nourriture de poissons

d'élevage), en agroalimentaire avec l'utilisation de leurs hydrocolloïdes aux propriétés gélifiantes et texturisantes, en nutraceutique et en pharmaceutique.



Figure 1. Exemples d'organismes trouvant refuge dans des habitats colonisés par *Lobophora*. (a) *Ablabys taenianotus* bien camouflé au milieu des *Lobophora sonderii* (© V. Bouvot), (b) juvénile *Miamira magnifica* sur *Lobophora* (© G. Boussarie), (c) *Goniobranchus fidelis* sur *Lobophora* (© G. Boussarie) et (d) *Hypselodoris tryoni* sur *Lobophora rosacea* (© J. Gaubert).

2. Les macroalgues, un réservoir de molécules

2.1. La chimie et l'écologie chimique chez les macroalgues

Bien que la structure des macroalgues soit relativement plus simple que celle des plantes terrestres, car ne possédant aucun des organes tiges, feuilles, racines et fleurs, elles arborent un panel de molécules chimiques qui font l'objet de recherches depuis les années 1960, notamment en pharmacologie (Amsler 2008). Du fait de leur environnement très compétitif et dynamique, les algues ont développé de nombreuses stratégies de défense et d'adaptation via différentes voies métaboliques, faisant d'elles un réservoir très riches en composés, aussi appelés métabolites secondaires ou spécialisés (Cardozo *et al.* 2007).

On distingue traditionnellement les métabolites primaires des métabolites secondaires, concept introduit par Kossel en 1981. Les métabolites primaires sont impliqués dans les voies métaboliques nécessaires à la maintenance, la survie, le développement et la croissance des cellules (ex: sucres, acides aminés, acides gras). A contrario, les métabolites secondaires sont impliqués dans des processus qui ne sont pas directement liés à la survie des cellules. La frontière entre métabolisme primaire et secondaire n'est pas toujours claire et il faut noter que les métabolites secondaires ou spécialisés, bien que n'étant pas essentiels à la survie de base des cellules, ont un rôle pouvant s'avérer crucial en cas de stress biotique ou abiotique (Kooke & Keurentjes 2011).

Bien que ces métabolites spécialisés soient à l'origine considérés comme des déchets du métabolisme, leur implication dans les interactions entre organismes est maintenant bien reconnue. Ils jouent un rôle de signaux ou médiateurs chimiques dans la communication entre les espèces, aussi bien animales que végétales.

Chez les végétaux, les métabolites spécialisés sont bien connus et ont un rôle crucial dans l'adaptation à leur environnement et à différents stress comme les variations de température ou de disponibilité en nutriments, les variations en rayonnement UV, ou encore la présence d'herbivores ou de polluants (Kooke & Keurentjes 2011). Plusieurs milliers de composés différents ont déjà été découverts, appartenant à de grandes familles comme les

polyphénols, terpènes, stérols, alcaloïdes ou polycétides (Akula & Ravishankar 2011), représentant une source riche et diversifiée pour la conception de médicaments, l'industrie cosmétique ou agroalimentaire.

A l'instar du milieu terrestre, la communication chimique est aussi très importante dans le milieu marin. Celle-ci est favorisée par les propriétés physico-chimiques intrinsèques de l'eau de mer (dont la viscosité et la densité sont élevées) qui facilitent grandement la diffusion et la solubilité des molécules. De plus, les métabolites secondaires retrouvés dans le milieu marin arborent des éléments rares en milieu terrestre, comme les halogénés, le zinc et bien d'autres (Bagnerès-Urbany *et al.* 2012).

Chez les macroalgues, les métabolites spécialisés sont impliqués dans de nombreuses fonctions. Étant généralement des organismes fixés, les algues n'ont pas la possibilité d'échapper physiquement aux prédateurs ou de s'extraire d'un environnement hostile, aussi ont-elles développé des stratégies de défense chimique via la synthèse de métabolites spécialisés spécifiques contre les herbivores (Hay & Fenical 1988; Meyer & Paul 1992; Cronin & Hay 1996; Amsler 2008), les épibiontes (da Gama *et al.* 2014) ainsi que les pathogènes, comme les bactéries, champignons ou virus (*e.g.* Kubanek *et al.* 2003; Manilal *et al.* 2012; Kremb *et al.* 2014). Les métabolites spécialisés peuvent également jouer un rôle de phéromones sexuelles (Pohnert & Boland 2002) et de protecteurs contre les rayons UV (*e.g.* Xue *et al.* 2005; Oren & Gunde-Cimerman 2007). Les composés chimiques algaux sont également impliqués dans la compétition pour l'espace avec d'autres organismes, notamment les coraux (*e.g.* Box & Mumby 2007; Slattery & Lesser 2014).

Aujourd'hui, plus de 3000 métabolites spécialisés issus de diverses voies métaboliques sont connus chez les trois grandes divisions : rhodophytes (algues rouges), chlorophytes (algues vertes) et chromophytes (algues brunes) (Maschek and Baker 2008 in Amsler, 2008). La majorité de ces composés proviennent d'espèces tropicales (Pereira *et al.* 2016a), supposées plus riches en métabolites spécialisés du fait de leur environnement à forte pression de compétition. Ces composés présentent des structures diverses, souvent halogénées mais ne représentent qu'une faible portion de la masse carbonée de l'algue, souvent comprise entre 0,5 et 5 %, exceptés les polyphénols des algues brunes qui peuvent atteindre 15% du poids sec de l'algue (Payo *et al.* 2011b; Pereira *et al.* 2016b). Parmi les classes de composés les plus

importants chez les algues, on retrouve les terpènes (aussi appelés terpénoïdes ou isoprénoïdes), représentant plus de la moitié des métabolites secondaires reportés chez les algues. Viennent ensuite les polyketides, qui représentent un quart des composés algaux connus, puis des produits naturels dérivés d'acides aminés, comme les alcaloïdes, peptides non ribosomiaux, etc. (Amsler *et al.* 2008). Les algues sont également riches en acides gras, lipopeptides, amides, lactones, pyrroles et stéroïdes (Payo *et al.* 2011b).

Les algues rouges sont les plus riches en métabolites spécialisés avec une grande variété de composés halogénés. Elles détiennent plus de la moitié des métabolites d'algues identifiés. Les algues vertes produisent majoritairement des composés sesquiterpénoïdes et diterpénoïdes. Enfin, les algues brunes, avec plus de 1140 métabolites reportés, sont connues pour leur production de diterpènes (pouvant représenter 10 à 20 % du poids sec), de phlorotannins, d'acétogénines en C11 et de composés aromatiques-terpénoïdes. Environ un tiers des composés connus chez les algues brunes viennent du genre *Dictyota*, dont plus de 250 sont des terpènes (Blunt *et al.* 2013; Pereira *et al.* 2016b).

2.2. Des connaissances sur l'écologie chimique des algues à renforcer

L'étude des métabolites spécialisés est essentielle pour mieux comprendre leur mode d'action et leur rôle écologique dans les interactions avec d'autres organismes. Cette grande diversité en métabolites spécialisés observée, notamment chez les algues, est le résultat de l'évolution des espèces et de leurs interactions avec l'environnement (Bagnerès-Urbany *et al.* 2012).

Il est maintenant reconnu que l'environnement influence la production de métabolites spécialisés (Viant 2007; Kooke & Keurentjes 2011). Cette production est fréquemment sujette à des variations spatiales et temporelles (Page *et al.* 2005; Abdo *et al.* 2007; Rohde *et al.* 2012) qui peuvent être influencées par des facteurs abiotiques tels que la température (Oliveira *et al.* 2013), la luminosité (Cronin & Hay, 1996) ou la disponibilité en nutriments (Yates & Peckol, 1993). Des facteurs biotiques comme la pression d'herbivorie (Paul & Van Alstyne, 1988) peuvent également agir sur la synthèse de métabolites spécialisés. La production de

métabolites spécialisés peut également varier à l'échelle intra-spécifique, aussi bien au sein d'une même population que d'un individu, ou en fonction des stades de vie. Ces variations au sein d'un thalle peuvent mettre en avant les fonctions des métabolites spécialisés et leurs rôles écologiques (Hay 1996). Cependant, en comparaison aux plantes terrestres, les mécanismes de défense chimique des macroalgues sont encore mal connus (Hay 2009) ce qui freine notre compréhension des interactions biologiques entre les algues et les autres organismes marins.

De plus, la plupart des études qui se sont intéressées aux sources de variations en métabolites ont ciblé des composés particuliers ou des familles de molécules, notamment les phlorotannins et terpènes (Connan *et al.* 2004; Campos De Paula *et al.* 2007). Les études plus globales sur le contenu en métabolites sont peu répandues mais demeurent nécessaires, notamment pour mieux comprendre les systèmes d'adaptation et d'acclimatation à des stress environnementaux, ainsi que les systèmes de défense. Ce type d'approche peut également aider à la compréhension des voies métaboliques impliquées chez les macroalgues en réponse à différents facteurs biotiques (ex : pression d'herbivorie, épibiontes) et abiotiques (ex : stress salin, variations de température), et permet ainsi de mieux appréhender les composantes structurant la biodiversité marine (Hay, 1996).

Le développement de nouvelles approches telles que la métabolomique, que nous aborderons à la section 4, peut permettre de faire avancer nos connaissances dans le domaine de l'écologie chimique, notamment en couplant ces données avec la transcriptomique ou la génomique.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la problématique de mon étude doctorale, centrée sur les sources de variation des métabolites spécialisés chez l'algue brune du genre *Lobophora* particulièrement présente dans les récifs coralliens.

3. Le genre *Lobophora*

3.1. Une macroalgue commune des récifs coralliens

Parmi la diversité de macroalgues associées aux écosystèmes coralliens, les algues brunes de l'ordre des Dictyotales sont particulièrement bien représentées, avec notamment le genre *Lobophora* (J. Agardh, 1894), appartenant à la famille des Dictyotaceae.

Avant la généralisation en taxonomie de l'analyse génétique, le genre *Lobophora* comprenait seulement trois espèces décrites morphologiquement (Vieira *et al.* 2014). Parmi ces espèces, *L. variegata* (espèce type du genre) est la plus communément citée dans les travaux, mais souvent à tort en l'absence d'identification taxonomique moléculaire. L'application des analyses génétiques au genre *Lobophora* a révélé une diversité cachée insoupçonnée, avec aujourd'hui une estimation de 98 à 121 espèces (entités ayant une identité génétique distincte), dont la plus grande diversité se trouve dans l'Indo-Pacifique central (Vieira *et al.* 2017).

Le genre *Lobophora* présente des morphologies très variées (Figure 2). Certaines espèces adhèrent fortement au substrat et sont dites encroûtantes alors que d'autres forment des lames en éventails érigés ou tapissant le substrat, ou bien disposés en forme de petites rosettes. Les frondes peuvent être fines ou épaisses, voire même présenter un aspect cuirassé chez les formes encroûtantes.

Lobophora se retrouve dans tous les bassins océaniques, des milieux chauds-tempérés à tropicaux. Les espèces se développent sur différents types de substrat (rochers, débris de coraux morts, coraux vivants, éponges, algues...) et peuvent coloniser divers habitats depuis les petits fonds (récifs coralliens, algueraies, mangroves...) jusqu'à une profondeur de 140 m pour certaines d'entre elles (Markager & Sand-Jensen, 1992). Leur cycle de vie est mal connu et les organes reproducteurs sont rarement présents. En Nouvelle-Calédonie, comme aux Antilles (de Ruyter van Steveninck 1987), *Lobophora* est supposée être reproductrice tout au long de l'année. *Lobophora* possède un taux de renouvellement des thalles élevé, avec une demi-vie d'environ 20 jours qui peut varier temporellement (de Ruyter van Steveninck & Breeman, 1987).

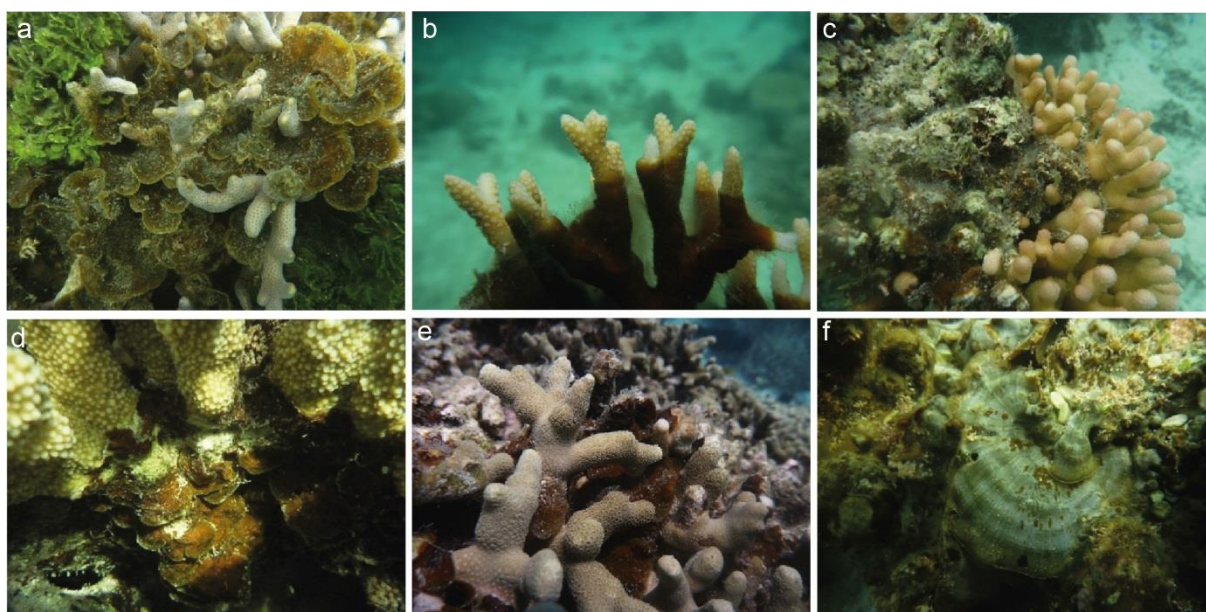


Figure 2. Exemples de *Lobophora* retrouvées en Nouvelle-Calédonie : (a) *Lobophora rosacea*, (b) *Lobophora hederacea* enveloppant un corail branchu, (c) *Lobophora hederacea* sous sa forme encroûtante, (d) et (e) *Lobophora hederacea* en association proche avec des coraux branchus et (f) *Lobophora obscura*, adhérant fortement au substrat, dont les iridescences grises sont bien visibles (© C. Vieira dans Payri *et al.* 2018).

3.2. Un genre souvent associé aux récifs dégradés

Le genre *Lobophora* est une algue commune des récifs coralliens. Elle est impliquée dans les interactions algues-coraux-brouetteurs et la compétition pour l'espace et la lumière avec les coraux (De Ruyter Van Steveninck *et al.* 1988; Coen & Tanner 1989; Diaz-Pulido *et al.* 2009; Rasher & Hay 2010). Cependant, dans des récifs endommagés par l'action de l'Homme ou de phénomènes naturels, ce genre peut proliférer et prendre le dessus sur des coraux affaiblis. On observe alors un changement de communauté (« phase shift ») où les macroalgues dominant sur les coraux.

Depuis les premières observations en 1973 d'une prolifération de *Lobophora* sur les récifs coralliens de la zone des Caraïbes (Glynn 1973), ce genre a été tristement associé à la dégradation de nombreux autres récifs dans les Antilles (*e.g.* De Ruyter Van Steveninck *et al.* 1988; Nugues & Bak 2006; Slattery & Lesser 2014), mais également avec une moindre ampleur dans l'océan Pacifique (notamment la Grande Barrière Australienne, Jompa & McCook 2002).

Cependant, la question de savoir si l'algue était la cause ou la conséquence de la dégradation des coraux n'a pas été complètement élucidée. Cause ou conséquence ont fait largement débat et il est aujourd'hui admis que les «phase shifts» sont dus essentiellement à la dégradation des coraux par une combinaison de facteurs, ce qui libère de nouvelles surfaces de colonisation propice aux algues.

En Nouvelle-Calédonie, une espèce de *Lobophora* présente des effets délétères sur certains coraux dans les récifs en bonne santé : *Lobophora hederacea* (Vieira *et al.* 2015). Elle est majoritairement retrouvée sur le corail *Seriatopora caliendrum* (Pocilloporidae), qu'elle englobe progressivement, entraînant ainsi sa mort. Il est suspecté que des mécanismes d'allélochimie sont impliqués dans ce phénomène.

3.3. Qu'en est-il des connaissances sur la chimie des *Lobophora* ?

Bien que le genre *Dictyota* soit le plus étudié parmi les Dictyotales, depuis 1982 plusieurs travaux se sont intéressés aux composés naturels de *Lobophora* (e.g. Gerwick & Fenical 1982a; Kubanek *et al.* 2003; Vieira *et al.* 2016). La grande majorité des études ayant eu lieu avant l'étude de la diversité spécifique et génétique de *Lobophora*, la plupart des molécules identifiées chez ce genre ont été attribuées (à tort, on le sait maintenant) à *L. variegata*. Le Tableau 1 répertorie les composés originaux isolés chez *Lobophora* ainsi que les bio-activités associées.

Tableau 1. Molécules identifiées chez *Lobophora*.

Molécules	Bioactivités	Références
Lobophorenol A-C	blanchissement des coraux	Vieira <i>et al.</i> 2016
Lobophorols A-C Lobophopyranones A & B, lobophorones A-E	antibactérien	Gutiérrez-Cepeda <i>et al.</i> 2015
3-(2-methoxy-4-((2,5,6,8a-tetramethyl-1,4,8,8a-tetrahydronaphthalen-1-yl)methyl)phenyl)propanoate	antioxydant	Sathyaseelan <i>et al.</i> 2015
Sulfoquinovosyl diacylglycerols	antiprotozoaire, blanchissement des coraux, lyse cellulaire	Cantillo-Ciau <i>et al.</i> 2010; Slattery & Lesser 2014
Lobophorolide	antifongique, cytotoxique	Kubaneck <i>et al.</i> 2003
2-(10-Oxohexadecyl)-1,3,5-trihydroxybenzene	antibactérien	Gerwick & Fenical 1982

Parmi ces composés originaux (voir Figure 3), nous pouvons notamment citer les lobophorénols A, B et C isolés chez *L. rosacae* en 2016 (Vieira *et al.* 2016). Ces composés relativement apolaires sont des alcools à longues chaînes carbonées polyinsaturées. Gutiérrez-Cepeda *et al.* (2015) ont également isolé 10 composés apolaires chez *L. variegata* d'Atlantique, présentant des similarités avec les lobophorénols.

Des composés algaux moins « originaux » ont également été étudiés chez *Lobophora* du point de vue de leurs bioactivités, principalement en santé humaine. Le groupe des polysaccharides (galactofucanes, fucanes, fucoidanes) a fait l'objet du plus grand nombre d'études, avec sept publications mettant en évidence des activités anti-oxydantes (Castro *et al.* 2015), anti-inflammatoires (Medeiros *et al.* 2008; Paiva *et al.* 2011; Siqueira *et al.* 2011; Castro *et al.* 2014), cytotoxiques (Queiroz *et al.* 2008; Castro *et al.* 2013), anti-angiogéniques (Castro *et al.* 2015) et anti-coagulantes (Medeiros *et al.* 2008; Castro *et al.* 2015). Les acides gras ont montré des activités antibactériennes, pupicides, nématocides et phytotoxiques (Manilal *et al.* 2012) même si tous les composés lipidiques identifiés n'ont pas été testés (Thennarasan 2015). Des composés phénoliques (Rao & Untawale 1991; Chkhikvishvili & Ramazanov 2000; Chung *et al.* 2003), carbonyles (Mota *et al.* 2006) et des pigments photosynthétiques (Hegazi 2002) ont également été décrits chez *Lobophora*.

Le genre *Lobophora* est donc une algue étudiée depuis les années 1970 ayant fait l'objet de plusieurs études, aussi bien du point de vue écologique que chimique. Bien représenté dans les récifs coralliens avec une grande diversité en espèces, aux habitats et morphologies variés, ce genre est un bon modèle pour étudier l'ensemble des métabolites spécialisés (métabolome) et ses sources de variations.

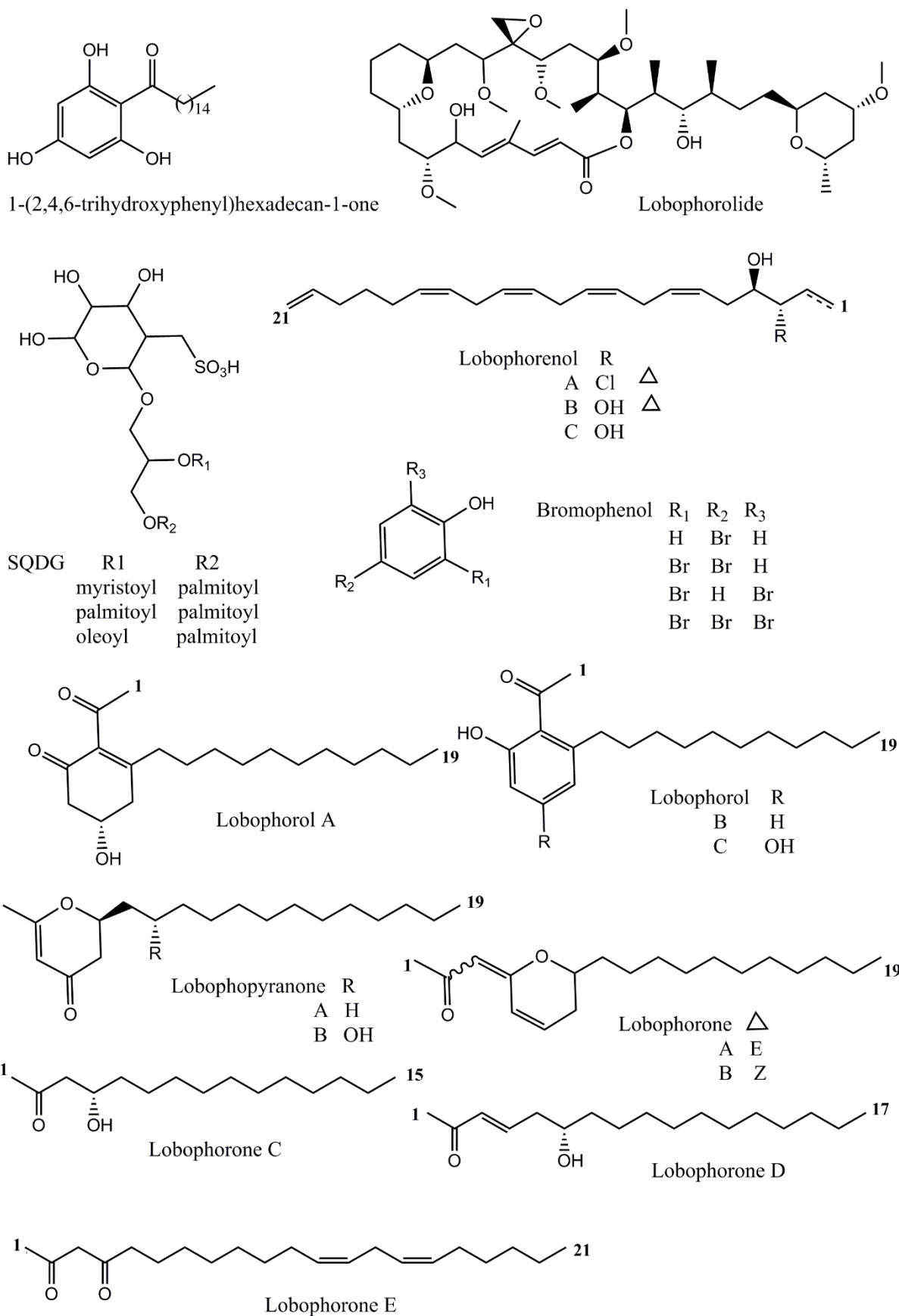


Figure 3. Composés identifiés chez *Lobophora* (adapté de Vieira *et al.* 2015).

3.4. Quatre espèces choisies pour notre étude

Parmi la trentaine d'espèces de *Lobophora* recensées en Nouvelle-Calédonie (Vieira *et al.* 2014), quatre ont été sélectionnées pour notre étude et sont communément rencontrées dans le lagon de Nouvelle-Calédonie. Il s'agit de *L. rosacea*, *L. sonderii*, *L. obscura* et *L. monticola*. Une brève description de chacune d'elle est donnée ci-dessous.

- *Lobophora monticola* (C.W.Vieira, Payri & De Clerck)

Lobophora monticola présente des thalles en forme d'éventail à surface rugueuse, d'une couleur brune-orangée. Cette espèce vit sur les coraux branchus du genre *Acropora* ou *Montipora* : les thalles peuvent se développer en total contact avec le corail ou présenter des parties libres (seule la base de la fronde est fixée au corail, Figure 4). *Lobophora monticola* peut former des connections entre les branches du corail par anastomose des parties distales de plusieurs frondes (Vieira 2015). Elle se retrouve classiquement dans les lagons et sur la pente interne des récifs, dans des sites abrités.

En Nouvelle-Calédonie, cette espèce de *Lobophora* a été répertoriée dans la partie Sud-Est, Sud-Ouest et centre-Est du lagon de la Grande Terre ainsi qu'aux îles Loyauté.



Figure 4. *Lobophora monticola* en contact avec un corail branchu (© G. Boussarie).

- *Lobophora rosacea* (C.W.Vieira, Payri & De Clerck)

Cette espèce peut présenter deux morphologies différentes ou morphotypes dont les thalles sont très fins (80-130 μm pour la première et 110-170 μm pour la seconde (Vieira 2015)). La première morphologie présente des lames une forme d'éventail de couleur orangée. La

seconde présente un arrangement des thalles en rosette de couleur brune aux reflets légèrement verts.

Lobophora rosacea peut être retrouvée nichée au sein des coraux branchus (ex : *Acropora*, Figure 5) ou en épiphytes d'une autre espèce de *Lobophora*: *L. sonderii*, notamment dans les champs de *Sargassum*. Lorsqu'elle vit en association avec les coraux, les frondes sont fixées sur les branches des coraux par la partie basale alors que les parties distales restent libres.

En Nouvelle-Calédonie, on a observé cette espèce dans les lagons Sud-Ouest et Sud-Est de la Grande Terre ainsi qu'aux îles Chesterfield.



Figure 5. *Lobophora rosacea* nichée à la base d'un corail branchu. La disposition en rosette des lames est bien visible (© G. Boussarie).

- *Lobophora sonderii* (C.W.Vieira, De Clerck & Payri) (anciennement *L. nigrescens* J.Agardh)

Cette espèce forme un thalle de couleur brun foncé et dense, caractérisé par la présence d'un stipe basal épais. Les frondes en lame ont une épaisseur en moyenne 2 à 2,5 fois supérieure à celle de *L. rosacea* (168-252 μm). On la retrouve généralement dans les algueraies à grandes algues dominées par *Sargassum*, sur les récifs frangeants peu profonds du littoral ou des îlots (Figure 6). Elle est fixée sur des substrats durs des fonds de dalle et sable.

En Nouvelle-Calédonie, cette espèce a une large distribution autour de la Grande-Terre jusqu'au Sud-Ouest de l'île des Pins.



Figure 6. *Lobophora sonderii*, classiquement retrouvée dans les algueraies à grandes algues brunes comme *Sargassum* sp (© J. Gaubert et C. Vieira).

- *Lobophora obscura* (C.W. Vieira, De Clerck & Payri) (anciennement *L. crassa* Z.Sun, P.-E.Lim & H.Kawai)

Cette espèce est principalement encroûtante, avec des thalles épais (184-328 μm) et rugueux d'aspect cuirassé, qui adhèrent fortement aux substrats (Figure 7). De couleur brun foncé, elle présente des iridescences grises caractéristiques. *Lobophora obscura* se retrouve sur les coraux morts, les débris coralliens ("bedrock"), dans les eaux peu profondes (-5 m).

Elle se retrouve en Nouvelle-Calédonie dans tout l'archipel..



Figure 7. *Lobophora obscura* sous sa forme encroûtante, adhérant fortement à un débris de corail mort. L'iridescence grise est bien visible (© G. Boussarie).

4. La métabolomique, un outil intéressant au service de l'écologie chimique des algues

4.1. Le métabolome: brève présentation

Le métabolome est l'ensemble des petites molécules organiques (50-1500 Da), appelées métabolites, contenues dans un organisme, au sein des cellules, des tissus ou des fluides corporels tels que le plasma ou l'urine. Ce terme de métabolome a été introduit dans la littérature scientifique par Oliver *et al* (1998). Ces petites molécules organiques sont les produits intermédiaires des réactions métaboliques catalysées par différentes enzymes et qui se produisent naturellement dans les cellules (Lankadurai *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2016). Ainsi, suivant l'état physiologique et le stade de vie de l'organisme étudié, le pool de métabolites observé pourra varier ; le métabolisme étant un système dynamique et complexe, les molécules synthétisées par un système biologique sont en perpétuel mouvement entre différents compartiments cellulaires, dégradées, modifiées, relarguées, etc.

4.2. La métabolomique, la dernière branche des techniques « omiques »

La métabolomique permet d'étudier l'ensemble des métabolites (c'est-à-dire le métabolome) d'un organisme ou d'une partie de celui-ci, à un instant donné. C'est un domaine d'étude « omique » plutôt récent comparé à la génomique et la transcriptomique. L'intérêt d'étudier le métabolome est qu'il donne une image plus "réelle" de l'état physiologique à un instant donné de l'organisme ou du compartiment biologique étudié, en comparaison au génome ou transcriptome. On parle de « snapshot » puisqu'on obtient une image du contenu métabolomique à un moment précis, le métabolisme étant un système dynamique.

En effet, les métabolites spécialisés représentent le phénotype final de l'expression cellulaire (Kooke & Keurentjes 2011) : les gènes sont transcrits en ARNm qui codent pour des protéines qui intervenant dans différentes voies métaboliques, aboutissant ainsi à la production d'une grande variété de métabolites. Ainsi, sous l'influence de perturbations environnementales, d'autres organismes ou de mutations génétiques, la transcription des gènes pourra s'en trouver affectée et les protéines produites seront modifiées, aboutissant en

la production de métabolites différents (Figure 8). Ces caractéristiques font de la métabolomique un outil de plus en plus utilisé, notamment dans les études environnementales. Le métabolome est ainsi souvent considéré comme un meilleur proxy du phénotype en comparaison aux gènes, ARNm ou protéines.

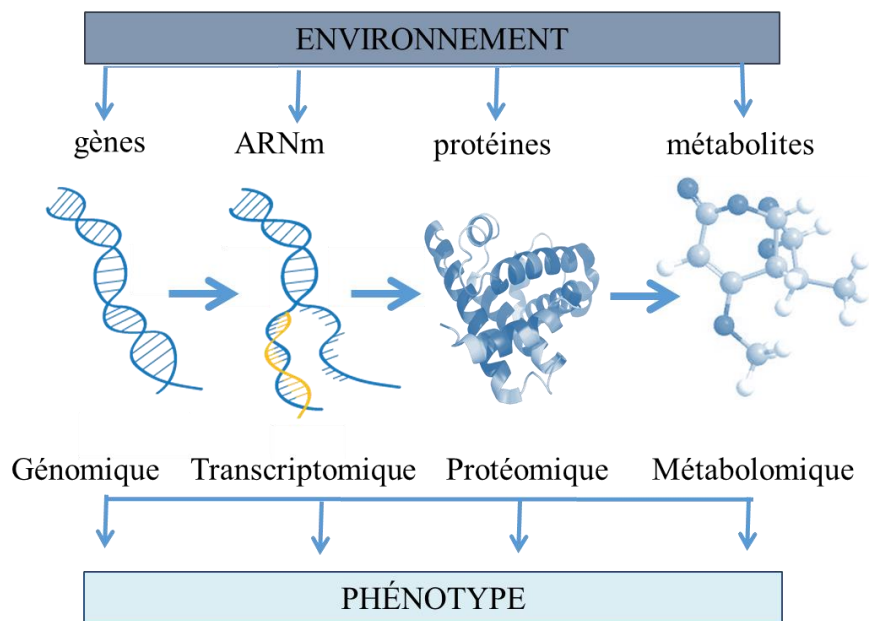


Figure 8. En aval du génome et soumis aux facteurs environnementaux, le métabolome permet une mesure directe du phénotype cellulaire à l'échelle moléculaire.

La métabolomique, couplée à la transcriptomique et la protéomique ou l'étude de l'activité d'enzymes spécifiques peut être un outil puissant pour comprendre comment un ou plusieurs métabolites donnés sont contrôlés en cas de stress ("up-regulation" ou "down-regulation").

4.3. Un peu de technique...

Il existe plusieurs approches en métabolomique (cf paragraphe suivant) mais le schéma expérimental général reste le même. La première phase consiste à mettre en place un protocole expérimental adapté à la question scientifique. S'en suit la collecte des échantillons puis leur traitement (extractions chimiques, fractionnements...) avant leur analyse. Le jeu de données complexe ainsi obtenu doit ensuite être traité grâce à des outils spécifiques (ex :

XCMS) avant de pouvoir réaliser les analyses statistiques et interpréter biologiquement les résultats. Le schéma global des différentes étapes d'une étude métabolomique est présenté à la Figure 9.

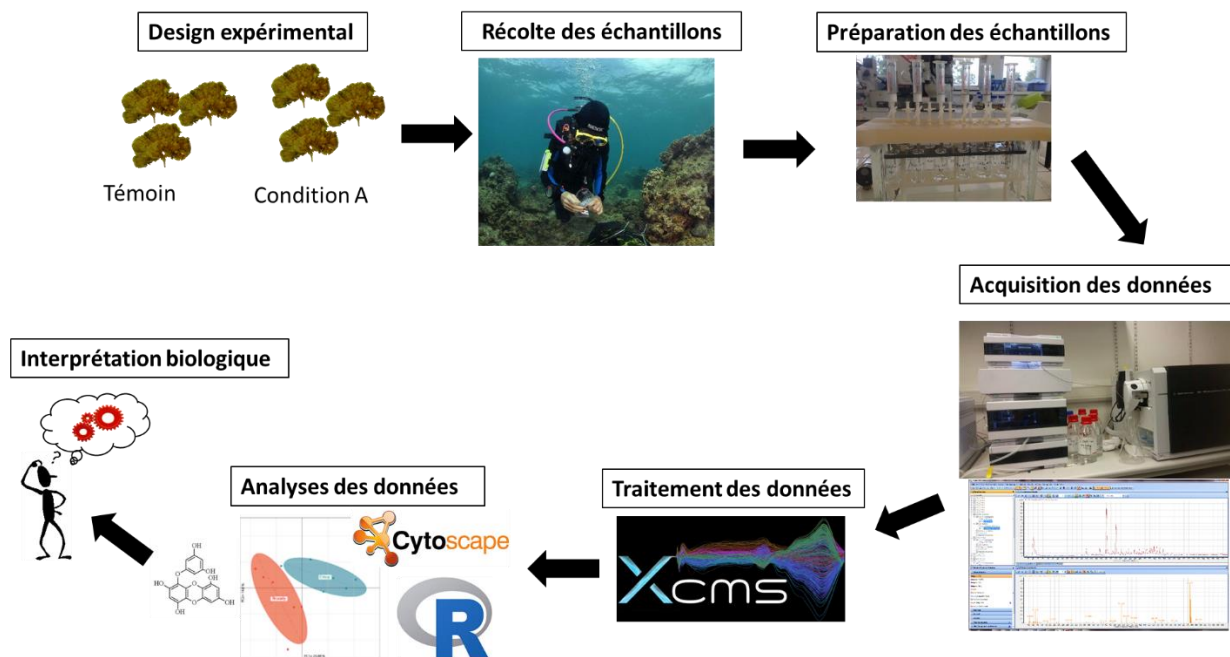


Figure 9. Schéma général d'une étude de métabolomique (© G. Boussarie & J. Gaubert).

Il existe trois principales approches pour étudier le métabolome (Hall 2006; Kumar *et al.* 2016) :

- le profilage métabolique ou "metabolite profiling,"
- l'empreinte métabolique ou "metabolic fingerprinting,"
- l'analyse ciblée.

Le profilage métabolomique est semi-quantitatif et permet l'identification de métabolites connus ou inconnus dans un organisme. La nature des moyens analytiques disponibles permet en général par ce profilage d'analyser une partie seulement des composés présents dans un échantillon, en fonction de leur polarité, de leur propriété d'ionisation, de leur localisation, etc.

L'empreinte métabolique permet d'obtenir une image qualitative de la composition en métabolites d'un organisme ou d'un échantillon à un moment donné. Grâce à des analyses non spécifiques et rapides des échantillons, l'empreinte métabolomique permet des analyses de comparaison et discrimination entre individus. Le but premier de ces analyses n'est généralement pas d'identifier les métabolites présents, à l'inverse des analyses ciblées, mais d'avoir une image globale du métabolome des organismes étudiés pour différentes questions scientifiques. Cette technique est notamment utile pour étudier la réponse métabolomique d'un organisme à un stress, tel que l'exposition à un polluant, à une pression d'herbivorie ou tout autre stress biotique ou abiotique. L'analyse non ciblée est souvent un précurseur du profilage métabolomique.

Enfin, les analyses ciblées visent un métabolite particulier ou un groupe de métabolites en utilisant des protocoles d'extraction spécifiques et optimisés, ainsi que des techniques de détection et séparation spécialisées. Ce type d'analyse présuppose une connaissance préalable de la chimie de l'organisme étudié, ce qui n'est pas toujours le cas.

Puisque le métabolome nous donne une image du phénotype de l'organisme étudié à un instant donné, il est important que les conditions d'étude soient le plus reproductibles possible depuis la récolte des échantillons, y compris leur conditionnement, en passant par l'extraction et jusqu'à l'analyse. Il est également important de manipuler ces échantillons le moins possible pour ne pas induire de stress et donc altérer l'analyse du métabolome qui ne sera plus le reflet de ce qu'il était *in situ*. L'autre difficulté de la métabolomique réside dans le fait que les métabolites sont très diversifiés, notamment chez les macroalgues. Il n'existe pas de procédure unique permettant d'analyser tous les composés chimiques en une seule méthode, mais les différentes techniques analytiques actuelles, avec leurs avantages et leurs limites, nous permettent dans une certaine mesure d'enrichir nos analyses et de parer à ces difficultés.

Ainsi, plusieurs techniques d'analyses peuvent être utilisées en fonction du type de métabolites étudiés (notamment de leur polarité), et peuvent être couplées pour enrichir l'analyse du set de métabolites. Parmi ces techniques, nous retrouvons:

- la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse: GC-MS
- la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse: LC-MS
- la résonance magnétique nucléaire: RMN
- l'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse: CE-MS
- la spectrométrie de masse à transformée de Fourier: FT-ICR-MS
- la désorption-ionisation laser assistée par matrice couplée à la spectrométrie de masse: MALDI

Dans la présente étude, nous avons retenu la LC-MS, la GC-MS et la RMN, trois techniques largement utilisées en métabolomique et dont la description est donnée ci-après:

- *LC-MS* (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse)

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse combine le pouvoir de séparation de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec celui de détection de la spectrométrie de masse. En pratique, la chromatographie permet la séparation ou la purification de composés dans un mélange, dans un but d'identification. Les molécules à séparer sont solubilisées puis entraînées par un solvant approprié, appelé phase mobile, grâce à une pompe sous haute pression. Suivant les propriétés physico-chimiques des molécules, leur affinité avec la phase stationnaire (colonne) sera plus ou moins forte et les molécules seront éluées plus ou moins rapidement. Lorsque l'HPLC est couplée à un spectromètre de masse, la masse moléculaire des composés analysés pourra être obtenue. En effet, la spectrométrie de masse est une technique analytique destructive permettant d'obtenir à la fois la masse moléculaire d'un composé et des informations sur sa structure et sa quantité. Cette méthode est fondée sur la séparation et la détection d'ions formés dans une source d'ionisation ou dans une chambre de collision, ces ions provenant de la molécule à analyser (Menet 2011). La séparation des ions se fait en fonction de leur ratio masse sur charge (m/z).

La LC-MS est très sensible. Cependant, elle repose sur la capacité des molécules à s'ioniser, rendant donc difficile l'analyse des composés qui ne s'ionisent pas ou très peu.

- GC-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse)

La chromatographie en phase gazeuse est une des méthodes les plus utilisées pour séparer des composés de faible poids moléculaire (généralement < 500 Da) qui sont soit volatils, soit facilement convertibles en composés volatils thermiquement stables *via* un processus de dérivation. Les composés sont alors séparés en fonction de leur interaction avec la phase mobile (gaz vecteur) ou stationnaire. Cette séparation se fait dans un four dont la température est un paramètre important pour l'analyse. En effet, l'agitation brownienne apportée par la montée en température du four libère les composés de leur interaction avec la phase mobile, ceux-ci sont donc entraînés par le gaz vecteur vers le détecteur.

Le type de composés classiquement analysés grâce à la GC sont des acides aminés, des amines, des sucres, des acides organiques ou gras, des alcools à longues chaînes carbonées et des stérols (Kumar *et al.* 2016). Couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (TOF-MS), la GC donne une masse précise des composés analysés, de manière rapide et sensible. L'avantage notable de la GC repose sur son ancienneté qui explique la richesse des bases de données en composés identifiés, comparées à des techniques plus récentes comme la LC-MS.

- RMN (résonance magnétique nucléaire)

La résonance magnétique nucléaire est une technique puissante et non destructive permettant de déterminer la structure de molécules biologiques. La RMN se base sur les propriétés magnétiques de certains atomes (ou noyaux). Sous l'action d'un champ de radio-fréquence (RF) approprié, les atomes considérés vont être perturbés et vont absorber une certaine quantité d'énergie : c'est le phénomène de résonance. Il se traduit par le passage des noyaux d'un état énergétique favorable à un état énergétique défavorable (Maes 2009). Cette transition d'énergie, se traduisant également par l'émission d'un micro-champ magnétique par les noyaux, va être captée par une bobine réceptrice: il s'agit du signal RMN. Ce signal est ensuite transformé en spectre RMN par la transformation de Fourier.

La fréquence de résonance des noyaux dépend aussi de leur environnement. Le champ magnétique appliqué sur le noyau étudié va être modifié par le mouvement des électrons et des noyaux voisins magnétiquement actifs. Cette variation représente le déplacement

chimique d'un noyau dans un environnement donné et s'exprime en partie par million (ppm). Ce déplacement chimique nous donne des informations précieuses, notamment sur la nature et le nombre de voisins des noyaux étudiés ainsi que sur les liaisons chimiques.

Cette technique est moins sensible que la LC-MS et GC-MS, mais la préparation des échantillons pour la RMN est simple et elle permet d'avoir une image plus « réelle » du contenu chimique de l'échantillon puisqu'elle ne dépend pas de leur capacité d'ionisation. Tous les composés présents en quantité détectable dans la limite de l'appareil pourront être visualisés.

4.4. Les applications de la métabolomique

La métabolomique trouve des applications dans de nombreux domaines (Roessner & Bowne 2009; Aliferis *et al.* 2013) tels que :

- La détection de maladies
- La réponse à un médicament ou un polluant
- Des questions environnementales
- Le suivi de réponse suite à un stress biotique ou abiotique
- La recherche de nouveaux composés actifs
- En nutrition

4.5. La métabolomique du côté des algues

Bien que la chimie « traditionnelle » soit une étape essentielle dans l'identification de nouvelles molécules, cette méthode est généralement ciblée sur des composés originaux et non minoritaires de l'algue, écartant de l'analyse une partie du pool de molécules qui peuvent pourtant jouer un rôle essentiel dans l'algue.

De plus, peu d'éléments sont connus sur la manière dont les changements dans la transcription des gènes se traduisent sur les métabolites, d'où l'intérêt de réaliser un profilage global de métabolites afin de comprendre les différentes voies métaboliques qui maintiennent l'homéostasie cellulaire lors de perturbations extrêmes (Goulitquer *et al.* 2012; Kumar *et al.* 2016).

Comme leur nom l'indique, les métabolites spécialisés font partie du métabolisme spécialisé, c'est-à-dire la partie non essentielle à la croissance ou la survie des cellules, mais participent aux interactions de l'organisme avec d'autres individus et son environnement. En ce sens, les métabolites spécialisés peuvent être spécifiques à certaines familles, genres ou espèces d'algues, leur conférant un caractère de chimio-taxonomie ou chimio-systématique. L'étude de la richesse en métabolites est également une source d'inspiration pour la valorisation de molécules actives.

Encore peu d'études métabolomiques globales (non ciblées) sur des macroalgues exposées à différents stress biotiques ou abiotiques ont été réalisées. Comme évoqué précédemment, la plupart des études disponibles sur les métabolites algaux ciblent des composés particuliers ou familles de composés. Mais la métabolomique environnementale est un outil en expansion dont l'utilisation se généralise peu à peu aux organismes marins (*e.g.* Schock *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2011; Lankadurai *et al.* 2013b; Farag *et al.* 2017). Une synthèse des travaux utilisant des techniques de métabolomique pour étudier l'impact de différents stress biotiques ou abiotiques ou des différences de compositions chimiques chez les macroalgues et plantes marines est présentée au Tableau 2.

Tableau 2. Etudes chez les macroalgues et plantes marines utilisant des techniques de métabolomiques pour étudier l'impact de stress biotiques ou abiotiques.

Espèces	Stress biotiques/abiotiques	Auteurs
Stress abiotiques		
<i>Ectocarpus siliculosus</i>	différents cycles jours/ nuits et différentes concentrations en CO ₂ et O ₂ .	Gravot <i>et al.</i> 2010
<i>Ectocarpus siliculosus</i>	stress hypo/hypersalins et oxydatifs sur le court terme.	Dittami <i>et al.</i> 2011
<i>Portieria hornemannii</i>	variation du métabolome entre espèces cryptiques, stade de vie, géographie et saisons	Payo <i>et al.</i> 2011
<i>Zostera marina</i> & <i>Zostera noltii</i>	stress thermique	Gu <i>et al.</i> 2012

Souches de <i>Porphyra haitanensis</i>	tolérance aux températures élevées	Ye <i>et al.</i> 2013
<i>Pyropia haitanensis</i>	dessiccation	Qian <i>et al.</i> 2014
<i>Ectocarpus siliculosus</i>	acclimatation sur le court terme à un stress cuivrique.	Ritter <i>et al.</i> 2014
<i>Sargassum fusiforme</i>	stress aigu et chronique d'une exposition au cuivre	Zou <i>et al.</i> 2014
<i>Zostera marina</i>	anoxie de la colonne d'eau	Hasler-Sheetal <i>et al.</i> 2015
<i>Gracilaria dura</i>	stress oxydatif	Kumari <i>et al.</i> 2015
<i>Sargassum cymosum</i>	stress salin et UV	Polo <i>et al.</i> 2015
<i>Sargassum muticum</i>	composition biochimique le long d'un gradient latitudinal (côte Atlantique)	Tanniou <i>et al.</i> 2015
<i>Asparagopsis taxiformis</i>	variation spatio-temporelle du métabolome	Greff <i>et al.</i> 2017
<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	capacité d'acclimatation	Surget <i>et al.</i> 2017
Stress biotiques		
<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	mécanismes de défense induits et activés contre les herbivores	Nylund <i>et al.</i> 2011
<i>Gracilaria vermiculophylla</i> et <i>G. chilensis</i>	mécanismes de défense contre les herbivores	Rempt <i>et al.</i> 2012
<i>Porphyra haitanensis</i>	mécanismes de défense via la voie métabolique des lipides	Wang <i>et al.</i> 2013
<i>Asparagopsis taxiformis</i>	contact avec un corail	Greff <i>et al.</i> 2017a
Autres		
<i>Pelvetia canaliculata</i> , <i>Fucus spiralis</i> , <i>F.</i>	étude des phlorotannins	Steevensz <i>et al.</i> 2012

<i>vesiculosus</i> , <i>Ascophyllum</i> <i>nodosum</i> & <i>Sacchari</i> <i>na longicruris</i>		
21 espèces d'algues brunes, rouges et vertes	différence métabolique entre les trois grands groupes d'algues	Belghit <i>et al.</i> 2017

Les études de métabolomique globale sur les plantes terrestres sont beaucoup plus nombreuses, avec notamment des travaux sur les réponses à des stress abiotiques tels qu'un stress thermique ou hydrique, un stress lumineux, un stress ionique, un stress oxydatif, une limitation en nutriments ou une combinaison de plusieurs de ces facteurs (Obata & Fernie 2012).

De nombreuses bases de données métabolomiques sont disponibles pour les plantes terrestres, avec par exemple 500 000 métabolites de plantes disponibles dans la base KNApSack tandis que seulement 500 métabolites d'algues sont répertoriés dans l'unique base de données métabolomique pour les macroalgues (SWMD), la plupart provenant de l'algue rouge du genre *Laurencia* (Kumar *et al.* 2016). Ces chiffres traduisent les lacunes à combler dans la connaissance des métabolites dans le monde des macroalgues, et *in fine*, la compréhension de leur rôle chez les algues.

4.6. La métabolomique pour étudier le métabolome de *Lobophora*

Etant donné la grande diversité spécifique mise au jour récemment au sein du genre *Lobophora*, avec des espèces aux morphologies variées, colonisant divers habitats et ayant des effets différents sur les coraux (blanchissement dans certains cas), s'est posée la question du lien entre la diversité du métabolome, la diversité spécifique et l'environnement de l'algue. L'impact de l'environnement sur le cortège de métabolites spécialisés produits par une espèce prend tout son sens dans le contexte des changements climatiques auxquels font face les océans et les organismes marins.

Les écosystèmes marins sont affectés par des pressions humaines de plus en plus fortes incluant le changement climatique. L'augmentation du CO₂ atmosphérique est un des problèmes les plus critiques, avec pour effets directs une acidification des océans et une augmentation de la température (Doney *et al.* 2012). Les changements de la température et de la chimie des océans peuvent altérer les fonctions physiologiques, le comportement et la dynamique des populations des organismes marins, entraînant des changements notables dans les écosystèmes (taille, dispersion spatiale, abondance des espèces...) (Doney *et al.* 2012; Johnson *et al.* 2014). Ces changements peuvent entraîner des modifications dans les interactions entre organismes ainsi que des déséquilibres dans les écosystèmes, dans tous les maillons de la chaîne trophique. Les algues marines, à la base de ce réseau, ne sont pas épargnées par les changements climatiques. Du fait de leur diversité, les généralisations sur l'impact du changement global sur les algues sont hasardeuses et spéculatives. D'autres études sont donc nécessaires afin de comprendre le devenir de ces organismes clés dans les océans (Harley *et al.* 2012; Koch *et al.* 2013).

C'est dans ce contexte, où les réponses globales des algues à différentes variations de facteurs sont encore mal connues, que nous proposons la présente étude avec une approche de métabolomique non ciblée.

Sites d'étude

L'étude s'est déroulée en Nouvelle-Calédonie, un archipel du Pacifique située à environ 1500 km de la côte Est australienne (Figure 10). Elle comprend la Grande-Terre, entourée d'une barrière de corail continue, longue de 1600 km, formant le plus grand lagon du Monde (20 000 km²). Outre la Grande-Terre, l'archipel est constitué de plusieurs îles : au Sud l'île des Pins, à l'Est les îles Loyauté, au Nord les Belep et deux grands ensembles coralliens isolés, le plateau des Chesterfield-Bellona à l'Ouest à mi-chemin de l'Australie (500 km) et les récifs d'Entrecasteaux au Nord à 350 km de la Grande-Terre. L'écosystème récifal s'étend sur près de 40 000 km². Près de 15 000 km² de ce patrimoine naturel exceptionnel sont inscrits au patrimoine mondial de l'UNESCO depuis 2008. La Nouvelle-Calédonie jouit d'un climat tropical tempéré avec une période chaude et humide de novembre à mars et une période plus fraîche de mai à août.

Plusieurs sites ont été sélectionnés pour l'étude (voir Figure 10 et Tableau 3) :

- Ricaudy, proche de la côte et du centre de Recherche (IRD), présente trois des quatre espèces étudiées (*L. rosacea*, *L. sonderii* et *L. obscura*). On retrouve à la fois un platier corallien et une alguaie sur fond sableux dominé par *Sargassum*.
- Sainte-Marie, à environ 1 km de Ricaudy, est un site à fond vaseux présentant des coraux branchus sur lesquels est retrouvée *L. monticola*.
- l'île aux Canards, l'îlot Larégnère, le récif Crouy et Banc du Nord, situés entre la côte de Nouméa et la grande barrière corallienne dans le lagon Sud-Ouest.
- Bouraké, au Nord de Nouméa, qui a la particularité d'être dans une mangrove et subit notamment des épisodes journaliers de forte diminution du pH.

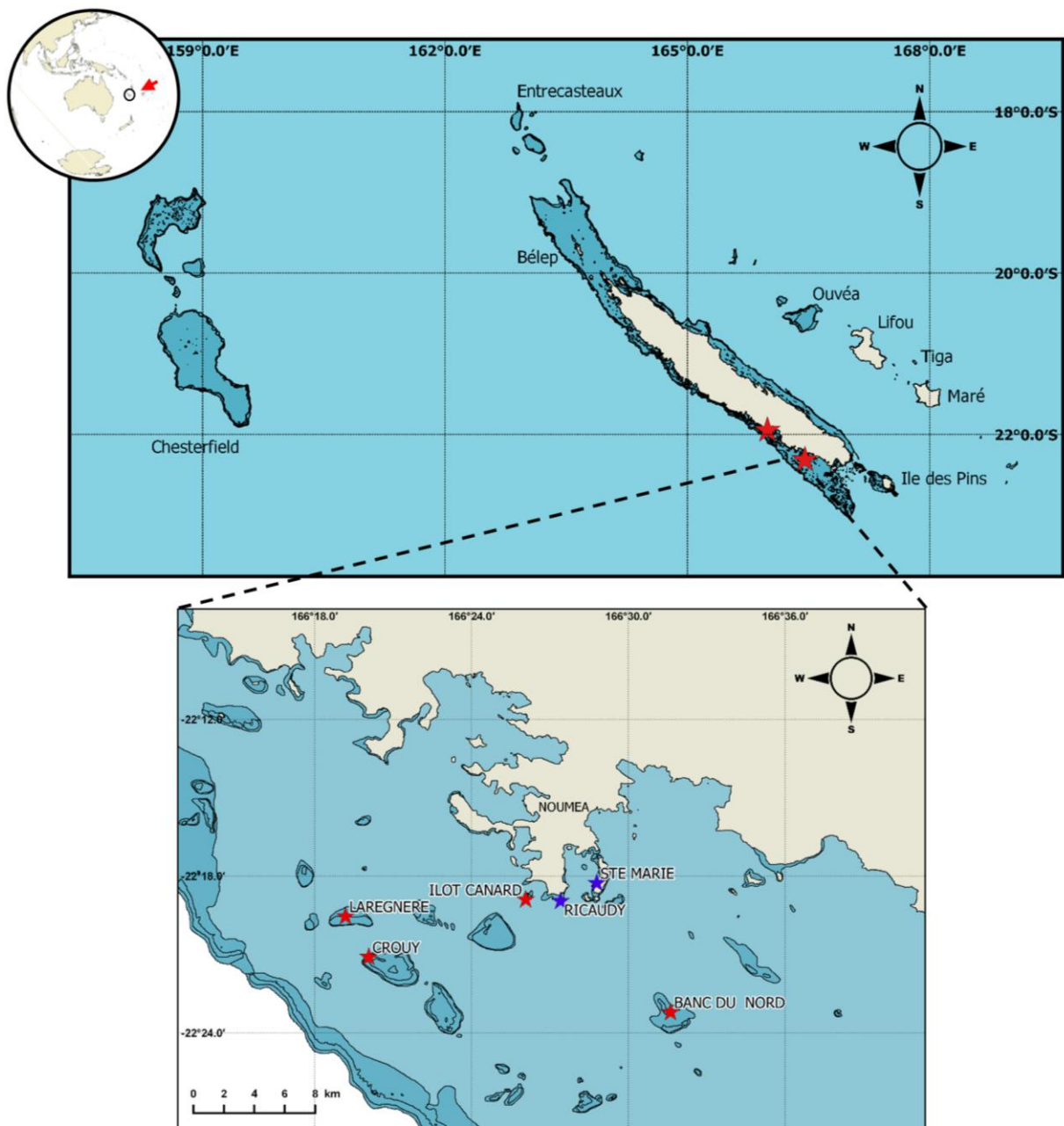


Figure 10. Carte des sites de collectes en Nouvelle-Calédonie et plus particulièrement dans le lagon Sud-Ouest, utilisés au cours de la thèse.

Tableau 3. Coordonnées GPS des sites de collectes utilisés durant l'étude.

sites	Points GPS
Ricaudy (platier)	22°18.956'S; 166°27.405'E
Ricaudy (algueraie)	22°18.956'S; 166°27.405'E
Sainte-Marie	22°18.269'S; 166°28.791'E
Ile aux Canard	22°18.904'S; 166°26.147'E
Récif Crouy	22°21.600'S; 166°20.402'E
Ilôt Larégnère	22°19.326'S; 166°19.106'E
Banc du Nord	22°23.128'S; 166°31.369'E
Bouraké	21°56.570'S; 165°59.310'E

Objectifs

Les métabolites spécialisés jouent des rôles écologiques majeurs chez les macroalgues. Ils peuvent être perçus comme des traits adaptatifs ayant évolués sous le phénomène de sélection naturelle. Leur production/concentration peut varier en fonction de différents paramètres biotiques ou abiotiques. Cependant, la plupart des études qui se sont intéressées aux sources de variations des métabolites des algues se sont focalisées sur des composés ou des familles de composés. Or, du fait de leur environnement dynamique et compétitif, une étude des réponses globales des métabolites (c'est-à-dire le métabolome) à des changements physico-chimiques ou biotiques apparaît plus appropriée que celle centrée sur les composés majoritaires de l'algue. Ce type d'approche peut également aider à la compréhension des voies métaboliques impliquées chez les macroalgues en réponse à différents facteurs de l'environnement et ainsi à mieux appréhender les composantes structurant la biodiversité marine.

Bien que le genre *Lobophora* soit commun dans les écosystèmes tropicaux, sa composante chimique a été moins étudiée que celle d'autres genres appartenant à l'ordre des Dictyotales, notamment *Dictyota* et *Dictyopteris* (Durán *et al.* 1997; Amsler 2008; Vieira *et al.* 2015). Les travaux de Vieira *et al.* (2016) sur les interactions entre *Lobophora rosacea* et les coraux sur lesquels l'algue se développe ont permis d'identifier parmi les composés majoritaires de l'algue trois nouvelles molécules, lobophorénol A, B et C, qui ont montré par ailleurs des activités pouvant entraîner le blanchissement des coraux. Outre *L. rosacea*, les trois autres espèces sélectionnées pour notre étude (*L. sonderii*, *L. monticola* et *L. obscura*) sont toutes bien distinctes aux plans taxonomique et phylogénétique mais n'ont pas été explorées d'un point de vue chimique. Il était donc intéressant de rechercher si les métabolites spécialisés lobophorénols étaient également présents chez ces espèces ou s'ils étaient spécifiques de l'espèce *L. rosacea* et si d'autres nouveaux métabolites pouvaient être caractérisés.

Les études de chimie traditionnelles, en plus de renseigner sur la composition chimique de l'organisme étudié, peuvent également déboucher sur des voies de valorisation de molécules identifiées, aussi nous avons également recherché quelques activités biologiques d'intérêt pour la Nouvelle-Calédonie.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude doctorale, centrée sur les composés naturels de *Lobophora* et leur potentiel de valorisation ainsi que les sources de variation du métabolome chez cette algue brune, composante importante de la flore benthique des récifs coralliens en général et de l'écosystème corallien de Nouvelle-Calédonie en particulier.

Il s'agit notamment de répondre aux questions suivantes :

- (a) Les lobophorénols sont-ils des marqueurs spécifiques de l'espèce *Lobophora rosacea* ou sont-ils observés dans d'autres espèces de ce genre ? Outre ces lobophorénols, peut-on caractériser d'autres molécules chez les espèces explorées ?
- (b) Peut-on valoriser la composante chimique de ces espèces communes en Nouvelle-Calédonie ?
- (c) La répartition des métabolites est-elle homogène au sein d'un thalle ?
- (d) Peut-on distinguer les espèces sur la base de leur métabolome ? Si tel est le cas, quelle méthode est la mieux adaptée pour discriminer les espèces ? Peut-on identifier des marqueurs chimiques spécifiques autres que les lobophorénols ?
- (e) Le métabolome varie-t-il dans l'espace en fonction des habitats et dans le temps en fonction des conditions environnementales au sein du lagon néo-calédonien ? En particulier l'environnement proche de l'algue et le substrat influencent-ils le métabolome de l'algue ?
- (f) Comment évolue le métabolome dans le contexte de changement climatique ?

Plan de thèse

Ce travail de thèse est articulé en deux parties détaillées plus loin. Dans la première partie, il s'agit d'analyser et de caractériser la composante chimique de *Lobophora* et de rechercher les potentiels intérêts en termes de valorisation (chapitres 1 et 2). La deuxième partie est centrée sur l'étude du métabolome de *Lobophora* et ses sources de variations. Après la mise en place des méthodes et des procédures d'étude (chapitre 3), les variations du métabolome sont explorées à plusieurs échelles (chapitres 4 à 6). Enfin, une synthèse générale sur les deux parties est réalisée, suivie d'une conclusion générale ouvrant vers quelques perspectives. Les

résultats majeurs ont fait l'objet de publications qui sont présentées au fil du document et aux chapitres correspondants.

La première partie se décline en deux objectifs qui ont pour but de répondre aux questions a et b énoncées en amont. Le premier objectif (chapitre 1, question a) vise à analyser et caractériser la composante chimique de *Lobophora*. Cet objectif fait suite aux travaux de recherche de 2014 ayant conduit à l'identification de trois nouvelles molécules chez *L. rosacea* : les lobophorénols A, B et C (Vieira *et al.* 2016). Nous avons recherché si ces lobophorénols étaient également présents dans deux des trois autres espèces explorées (*L. sonderii* et *L. monticola*) ou s'ils étaient caractéristiques et exclusifs de *L. rosacea*. Cet objectif a également pour but de rechercher d'autres composés chez *L. rosacea*, *L. sonderii* et *L. monticola*. La diversité chimique des espèces sélectionnées a été explorée par plusieurs techniques qui sont développées ; de même les fractions de polarité décroissante étudiées sont détaillées. Dans le second objectif, nous avons recherché l'intérêt potentiel des composantes chimiques en termes de bioactivité (chapitre 2, question b). Pour cela, différents tests sur des cibles biologiques ont été réalisés en Nouvelle-Calédonie en partenariat avec l'Institut Agronomique Néo-Calédonien (IAC) et l'Université de Nouvelle-Calédonie (UNC). En appui à ces tests de bioactivité, nous avons également estimé la biomasse disponible de deux espèces (*L. sonderii* et *L. rosacea*) à l'aide de transects sous-marins suivis sur plusieurs mois.

La deuxième partie de la thèse se concentre sur les sources de variation du métabolome de *Lobophora* et a pour objectifs de répondre aux questions c à f. Du fait de sa richesse en espèces, avec des habitats et morphologies variés, le genre *Lobophora* est un bon candidat pour entreprendre des études métabolomiques afin d'explorer la diversité chimique parmi les différentes espèces. Le premier objectif de cette seconde partie est de mettre au point la méthode à appliquer pour étudier le métabolome de *Lobophora* (chapitre 3). Le deuxième objectif est d'étudier la variation intra- et inter-spécifique du métabolome de l'algue. La variation intra-thalle du métabolome (question c) a été étudiée chez *L. monticola* et *L. rosacea* et présentée (chapitre 4). La variation inter-spécifique du métabolome (question d) a été réalisée sur les quatre espèces sélectionnées (*L. rosacea*, *L. monticola*, *L. obscura* et *L. sonderii*) par trois techniques de métabolomique: uHPLC-MS-qToF, GC-MS et RMN (chapitre 4). Ce

volet de l'étude vise à voir si les espèces peuvent être distinguées sur la base de leur métabolome, si des marqueurs spécifiques peuvent être mis en avant et quelle méthode est la mieux adaptée pour discriminer les espèces.

Le troisième objectif (chapitre 5, question e) a pour but d'explorer les variations du métabolome de *Lobophora* dans le temps et dans l'espace en s'appuyant sur la méthode la mieux adaptée et testée au chapitre 4 (étude inter-spécifique). Pour cela, la variation du métabolome à l'échelle temporelle a été étudiée sur une période de 13 mois. Des paramètres environnementaux ont été relevés afin de mettre en lumière les principaux facteurs potentiellement corrélés avec les variations du métabolome. La variation du métabolome à l'échelle spatiale a été appréhendée à la fois dans les habitats naturels des algues mais également à l'appui d'expériences de transplantations croisées dans de nouveaux habitats. Ces dernières permettent d'explorer l'effet du substrat et de l'environnement proche de l'algue sur son métabolome.

Le quatrième et dernier objectif de cette seconde partie a pour but d'étudier la variation du métabolome dans le contexte du changement climatique, en explorant l'impact de l'acidification de l'eau de mer sur le contenu chimique de l'algue (chapitre 6, question f). Cet objectif a été réalisé sur *L. rosacea*, en milieu naturel au site de Bouraké présentant un faible pH (approche *in situ*) et en milieu contrôlé via des expériences en aquarium (approche *ex situ*).

Pour chaque partie une synthèse des principaux résultats et une conclusion partielle sont présentées.

Enfin, nous proposons une conclusion générale ouvrant vers quelques perspectives.

Introduction générale & objectifs

PARTIE 1

Diversité chimique de *Lobophora* et potentiel de valorisation

Chap 1. Caractérisation de la diversité chimique de trois espèces de *Lobophora*

Chap 2. Mise au point des tests de bioactivités sur les fractions algales

Synthèse

PARTIE 2

Etude des sources de variation du métabolome de *Lobophora*

Chap 3. Etude de la variation du métabolome de *Lobophora* : mise au point de la méthode

Chap 4. Etude de la variation intra et inter-spécifique du métabolome de *Lobophora*

Chap 5. Variation spatio-temporelle du métabolome de *Lobophora*: impact de l'environnement et de l'habitat

Chap 6. Impact de l'acidification sur le métabolome de *Lobophora roasace* : approches *in* et *ex situ*

Synthèse

Conclusion & perspectives Annexes & bibliographie

Références

- Abdo, D.A., Motti, C.A., Battershill, C.N. & Harvey, E.S. (2007). Temperature and spatiotemporal variability of salicylhalamide A in the sponge *Haliclona* sp. *J. Chem. Ecol.*, 33, 1635–1645.
- Akula, R. & Ravishankar, G.A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.*, 6, 1720–1731.
- Aliferis, K.A., Cubeta, M.A. & Jabaji, S. (2013). Chemotaxonomy of fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex performing GC/MS metabolite profiling. *Metabolomics*, 9, 159–169.
- Amsler, C.D., Baker, B.J., Camacho, F.A., da Gama, B., Honkanen, T., Jormalainen, V., *et al.* (2008). *Algal chemical ecology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Aquilino, K.M. & Stachowicz, J.J. (2012). Seaweed richness and herbivory increase rate of community recovery from disturbance. *Ecology*, 93, 879–890.
- Baskett, M.L. & Salomon, A.K. (2010). Recruitment facilitation can drive alternative states on temperate reefs. *Ecology*, 91, 1763–1773.
- Belghit, I., Rasinger, J.D., Heesch, S., Biancarosa, I., Liland, N., Torstensen, B., *et al.* (2017). In-depth metabolic profiling of marine macroalgae confirms strong biochemical differences between brown, red and green algae. *Algal Res.*, 26, 240–249.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G. & Prinsep, M.R. (2013). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 30, 237–323.
- Box, S.J. & Mumby, P.J. (2007). Effect of macroalgal competition on growth and survival of juvenile Caribbean corals, 342, 139–149.
- Campos De Paula, J., Bomeny Bueno, L., Christina De Palmer Paix??o Frugulhetti, I., Yoneshigue-Valentin, Y. & Laneuville Teixeira, V. (2007). *Dictyota dolabellana* sp. nov. (Dictyotaceae, Phaeophyceae) based on morphological and chemical data. *Bot. Mar.*, 50, 288–293.
- Cantillo-Ciau, Z., Moo-Puc, R., Quijano, L. & Freile-Pelegrín, Y. (2010). The tropical brown alga *Lobophora variegata*: a source of antiprotozoal compounds. *Mar. Drugs*, 8, 1292–304.
- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., *et al.* (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 146, 60–78.
- Castro, L.S.E.P.W., Pinheiro, T.S., Castro, A.J.G., Dore, C.M.P.G., da Silva, N.B., Faustino Alves, M.G. das C., *et al.* (2014). Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown macroalgae *Lobophora variegata* with antioxidant, anti-inflammatory, and antitumoral effects. *J. Appl. Phycol.*, 26, 1783–1790.
- Castro, L.S.E.P.W., de Sousa Pinheiro, T., Castro, A.J.G., da Silva Nascimento Santos, M., Soriano, E.M. & Leite, E.L. (2015). Potential anti-angiogenic, antiproliferative,

- antioxidant, and anticoagulant activity of anionic polysaccharides, fucans, extracted from brown algae *Lobophora variegata*. *J. Appl. Phycol.*, 27, 1315–1325.
- Chevolot, L., Cochard, J.C. & Yvin, J.C. (1991). Chemical induction of larval metamorphosis of *Pecten maximus* with a note on the nature of naturally occurring triggering substances. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 74, 83–89.
- Chkhikvishvili, I.D. & Ramazanov, Z.M. (2000). Phenolic substances of brown algae and their antioxidant activity. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 36, 289–291.
- Chung, H.Y., Ma, W.C.J., Ang, P.O., Kim, J.-S. & Chen, F. (2003). Seasonal variations of bromophenols in brown algae (*Padina arborescens*, *Sargassum siliquastrum*, and *Lobophora variegata*) collected in Hong Kong. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2619–24.
- Coen, L.D. & Tanner, C.E. (1989). Morphological variation and differential susceptibility to herbivory in the tropical brown alga *Lobophora variegata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 54, 287–298.
- Connan, S., Goulard, F., Stiger, V., Deslandes, E. & Gall, E.A. (2004). Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Bot. Mar.*, 47, 410–416.
- Cronin, G. & Hay, M.E. (1996). Induction of Seaweed Chemical Defenses by Amphipod Grazing. *Ecol. Soc. Am.*, 77, 2287–2301.
- da Gama, B. a. P., Carvalho, A.G.V., Weidner, K., Soares, A.R., Coutinho, R., Fleury, B.G., *et al.* (2008). Antifouling activity of natural products from Brazilian seaweeds. *Bot. Mar.*, 51, 191–201.
- da Gama, B.A.P., Plouguerné, E. & Pereira, R.C. (2014). The antifouling defence mechanisms of marine macroalgae. *Adv. Bot. Res.*, 71, 413–440.
- Daume, S., Brand-Gardner, S. & Woelkerling, W.J. (1999). Preferential settlement of abalone larvae: Diatom films vs. non-geniculate coralline red algae. *Aquaculture*, 174, 243–254.
- De Ruyter van Steveninck, E. (1987). Deep water vegetations of *Lobophora variegata* (Phaeophyceae) in the coral reef of Curacao: population dynamics in relation to mass mortality of the sea urchin *Diadema antillarum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 36, 81–90.
- De Ruyter Van Steveninck, E.D., Mulekom, L.L. Van & Breeman, A.M. (1988). Growth inhibition of *Lobophora variegata* (Lamouroux) Womersley by scleractinian corals, 115, 169–178.
- Diaz-Pulido, G., McCook, L.J., Dove, S., Berkelmans, R., Roff, G., Kline, D.I., *et al.* (2009). Doom and Boom on a Resilient Reef: Climate Change, Algal Overgrowth and Coral Recovery. *PLoS One*, 4.
- Dittami, S.M., Gravot, A., Renault, D., Goulitquer, S., Eggert, A., Bouchereau, A., *et al.* (2011). Integrative analysis of metabolite and transcript abundance during the short-term response to saline and oxidative stress in the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Plant, Cell Environ.*, 34, 629–642.
- Doney, S.C., Ruckelshaus, M., Emmett Duffy, J., Barry, J.P., Chan, F., English, C.A., *et al.*

- (2012). Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Ann. Rev. Mar. Sci.*, 4, 11–37.
- Egan, S., Harder, T., Burke, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S. & Thomas, T. (2013). The seaweed holobiont: Understanding seaweed-bacteria interactions. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37, 462–476.
- Farag, M.A., Al-Mahdy, D.A., Meyer, A., Westphal, H. & Wessjohann, L.A. (2017). Metabolomics reveals biotic and abiotic elicitor effects on the soft coral *Sarcophyton ehrenbergi* terpenoid content. *Sci. Rep.*, 7, 648.
- Gerwick, W. & Fenical, W. (1982). Phenolic lipids from related marine algae of the order dictyotales. *Phytochemistry*, 21, 633–637.
- Goulitquer, S., Potin, P. & Tonon, T. (2012). Mass spectrometry-based metabolomics to elucidate functions in marine organisms and ecosystems. *Mar. Drugs*, 10, 849–880.
- Gravot, A., Dittami, S.M., Rousvoal, S., Lugan, R., Eggert, A., Collén, J., *et al.* (2010). Diurnal oscillations of metabolite abundances and gene analysis provide new insights into central metabolic processes of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *New Phytol.*, 188, 98–110.
- Greff, S., Aires, T., Serrão, E.A., Engelen, A.H., Thomas, O.P. & Pérez, T. (2017a). The interaction between the proliferating macroalga *Asparagopsis taxiformis* and the coral *Astroides calycularis* induces changes in microbiome and metabolomic fingerprints. *Sci. Rep.*, 7, 42625.
- Greff, S., Zubia, M., Payri, C., Thomas, O.P. & Perez, T. (2017b). Chemogeography of the red macroalgae *Asparagopsis*: metabolomics, bioactivity, and relation to invasiveness. *Metabolomics*, 13, 0.
- Gu, J., Weber, K., Klemp, E., Winters, G., Franssen, S.U., Wienpahl, I., *et al.* (2012). Identifying core features of adaptive metabolic mechanisms for chronic heat stress attenuation contributing to systems robustness. *Integr. Biol.*, 4, 480.
- Gutiérrez-Cepeda, A., Fernández, J.J., Norte, M., Montalvão, S., Tammela, P. & Souto, M.L. (2015). Acetate-Derived Metabolites from the Brown Alga *Lobophora variegata*. *J. Nat. Prod.*, 78, 1716–1722.
- Hall, R.D. (2006). Plant metabolomics: From holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytol.*, 169, 453–468.
- Harley, C.D.G., Anderson, K.M., Demes, K.W., Jorve, J.P., Kordas, R.L., Coyle, T.A., *et al.* (2012). Effects Of Climate Change On Global Seaweed Communities. *J. Phycol.*, 48, 1064–1078.
- Hasler-Sheetal, H., Fagner, L., Holmer, M. & Weckwerth, W. (2015). Diurnal effects of anoxia on the metabolome of the seagrass *Zostera marina*. *Metabolomics*, 11, 1208–1218.
- Hay, M.E. (1996). Marine chemical ecology: what' s known and what' s next ? *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 200, 103–134.
- Hay, M.E. (2009). Marine Chemical Ecology: Chemical Signals and Cues Structure Marine Populations, Communities, and Ecosystems. *Ann*, 1, 193–212.

- Hay, M.E. & Fenical, W. (1988). MARINE PLAN-HERBIVORE INTERACTIONS: The Ecology of Chemical Defense. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 19, 111–145.
- Hegazi, M.M.I. (2002). Separation, identification and quantification of photosynthetic pigments from three Red Sea seaweeds using reversed-phase high-performance liquid chromatography Muhammad M. I. Hegazi. *Egypt. J. Biol.*, 4, 1–6.
- Johnson, M.D., Price, N.N. & Smith, J.E. (2014). Contrasting effects of ocean acidification on tropical fleshy and calcareous algae. *PeerJ*, 2, e411.
- Jompa, J. & Mccook, L.J. (2002). Effects of competition and herbivory on interactions between a hard coral and a brown alga, 271, 25–39.
- Koch, M., Bowes, G., Ross, C. & Zhang, X.-H. (2013). Climate change and ocean acidification effects on seagrasses and marine macroalgae. *Glob. Chang. Biol.*, 19, 103–32.
- Kooke, R. & Keurentjes, J.J.B. (2011). Multi-dimensional regulation of metabolic networks shaping plant development and performance. *J. Exp. Bot.*, 63, 3353–3365.
- Kremb, S., Helfer, M., Kraus, B., Wolff, H., Wild, C., Schneider, M., *et al.* (2014). Aqueous extracts of the marine brown alga *Lobophora variegata* inhibit HIV-1 infection at the level of virus entry into cells. *PLoS One*, 9, e103895.
- Kubaneck, J., Jensen, P.R., Keifer, P. a, Sullards, M.C., Collins, D.O. & Fenical, W. (2003). Seaweed resistance to microbial attack: a targeted chemical defense against marine fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 6916–21.
- Kumar, M., Kuzhiumparambil, U., Pernice, M., Jiang, Z. & Ralph, P.J. (2016). Metabolomics: An emerging frontier of systems biology in marine macrophytes. *Algal Res.*, 16, 76–92.
- Kumari, P., Reddy, C.R.K. & Jha, B. (2015). Methyl jasmonate-induced lipidomic and biochemical alterations in the intertidal macroalga *gracilaria dura* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Plant Cell Physiol.*, 56, 1877–1889.
- Lankadurai, B.P., Nagato, E.G. & Simpson, M.J. (2013). Environmental Metabolomics: an emerging approach to study organisms responses to environmental stressors. *Environ. Rev.*, 21, 180–205.
- Maes, E. (2009). *La resonance magnetique nucleaire*.
- Manilal, A., Selvin, J., Thajuddin, N., Sujith, S., Panikkar, M.V.N., Idhayadhulla, A., *et al.* (2012). BIOPOTENTIALS OF MARINE ALGA , *Lobophora variegata* COLLECTED FROM THE SOUTH INDIAN LITTORAL. *Thalassas*, 28, 47–54.
- Markager, S. & Sand-Jensen, K. (1992). Light requirement and depth zonation of marine macroalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 88, 83–92.
- Medeiros, V.P., Queiroz, K.C.S., Cardoso, M.L., Monteiro, G.R.G., Oliveira, F.W., Chavante, S.F., *et al.* (2008). Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: anticoagulant and anti-inflammatory properties. *Biochem. Biokhimii*, 73, 1018–24.
- Menet, M.C. (2011). Principes de la spectrom??trie de masse. *Rev. Francoph. des Lab.*, 2011, 41–53.

- Meyer, K.D. & Paul, V.J. (1992). Intraplant variation in secondary metabolite concentration in three species of *Caulerpa* (Chlorophyta: Caulerpales) and its effects on herbivorous fishes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 82, 249–257.
- Mota, V., Cristina, M., Sousa, E.T., Santos, G.V., Accioly, M.C., Pereira, P.A.D.P., *et al.* (2006). Determination of 11 Low-Molecular-Weight Carbonyl Compounds in Marine Algae by High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 44, 233–238.
- Nugues, M.M. & Bak, R.P.M. (2006). Differential competitive abilities between Caribbean coral species and a brown alga: a year of experiments and a long-term perspective. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 315, 75–86.
- Nylund, G.M., Weinberger, F., Rempt, M. & Pohnert, G. (2011). Metabolomic assessment of induced and activated chemical defence in the invasive red alga *Gracilaria vermiculophylla*. *PLoS One*, 6.
- Obata, T. & Fernie, A.R. (2012). The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cell. Mol. Life Sci.*, 69, 3225–3243.
- Oliveira, A.S., Sudatti, D.B., Fujii, M.T., Rodrigues, S.V. & Pereira, R.C. (2013). Inter- and intrapopulation variation in the defensive chemistry of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia*, 52, 130–136.
- Oren, A. & Gunde-Cimerman, N. (2007). Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiol. Lett.*, 269, 1–10.
- Page, M., West, L., Northcote, P., Battershill, C. & Kelly, M. (2005). Spatial and temporal variability of cytotoxic metabolites in populations of the New Zealand sponge *Mycale hentscheli*. *J. Chem. Ecol.*, 31, 1161–1174.
- Paiva, A.A.D.O., Castro, A.J.G., Nascimento, M.S., Will, L.S.E.P., Santos, N.D., Araújo, R.M., *et al.* (2011). Antioxidant and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Lobophora variegata* on zymosan-induced arthritis in rats. *Int. Immunopharmacol.*, 11, 1241–50.
- Paul, V.J. & Van Alstyne, K.L. (1988). Chemical defense and chemical variation in some tropical Pacific species of *Halimeda* (Halimedaceae; Chlorophyta). *Coral Reefs*, 6, 263–269.
- Payo, D.A., Colo, J., Calumpong, H. & De Clerck, O. (2011). Variability of non-polar secondary metabolites in the red alga *Portieria*. *Mar. Drugs*, 9, 2438–2468.
- Payri C, Lagourgue L, Mattio L, Gaubert J, Vieira C. Histoire d'algues (2018). In : Payri C (ed.), *Nouvelle-Calédonie : archipel de corail*. IRD, Marseille IRD, pp. 71-84.
- Pereira, R.C., da Gama, B.A.P. & Sudatti, D.B. (2016). The role of chemically defended seaweeds as biodiversity sources. In: *Marine Macrophytes as Foundation Species* (ed. Olafsson, E.). CRC Press, pp. 26–42.
- Pohnert, G. & Boland, W. (2002). The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms. *Nat. Prod. Rep.*, 19, 108–122.
- Polo, L.K., Felix, M.R.L., Kreusch, M., Pereira, D.T., Costa, G.B., Simioni, C., *et al.* (2015).

- Metabolic profile of the brown macroalga *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales) under laboratory UV radiation and salinity conditions. *J. Appl. Phycol.*, 27, 887–899.
- Qian, F., Luo, Q., Yang, R., Zhu, Z., Chen, H. & Yan, X. (2014). The littoral red alga *Pyropia haitanensis* uses rapid accumulation of floridoside as the desiccation acclimation strategy. *J. Appl. Phycol.*, 27, 621–632.
- Queiroz, K.C.S., Medeiros, V.P., Queiroz, L.S., Abreu, L.R.D., Rocha, H. a O., Ferreira, C. V, *et al.* (2008). Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. *Biomed. Pharmacother.*, 62, 303–7.
- Rao, C.K. & Untawale, A.G. (1991). Polyphenols content of indian seaweeds. *Mahasagar*, 24, 99–102.
- Rasher, D.B. & Hay, M.E. (2010). Chemically rich seaweeds poison corals when not controlled by herbivores. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107, 9683–9688.
- Rempt, M., Weinberger, F., Grosser, K. & Pohnert, G. (2012). Conserved and species-specific oxylipin pathways in the wound-activated chemical defense of the noninvasive red alga *Gracilaria chilensis* and the invasive *Gracilaria vermiculophylla*. *Beilstein J. Org. Chem.*, 8, 283–289.
- Ritter, A., Dittami, S.M., Goulitquer, S., Correa, J.A., Boyen, C., Potin, P., *et al.* (2014). Transcriptomic and metabolomic analysis of copper stress acclimation in *Ectocarpus siliculosus* highlights signaling and tolerance mechanisms in brown algae. *BMC Plant Biol.*, 14, 116.
- Roessner, U. & Bowne, J. (2009). What is metabolomics all about? *Biotechniques*, 46, 363–365.
- Rohde, S., Gochfeld, D.J., Ankisetty, S., Avula, B., Schupp, P.J. & Slattery, M. (2012). Spatial Variability in Secondary Metabolites of the Indo-Pacific Sponge *Stylissa massa*. *J. Chem. Ecol.*, 38, 463–475.
- Schock, T.B., Stancyk, D.A., Thibodeaux, L., Burnett, K.G., Burnett, L.E., Boroujerdi, A.F.B., *et al.* (2010). Metabolomic analysis of Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*, hemolymph following oxidative stress. *Metabolomics*, 6, 250–262.
- Siqueira, R.C.L., da Silva, M.S.J., de Alencar, D.B., Pires, A.D.F., de Alencar, N.M.N., Pereira, M.G., *et al.* (2011). In vivo anti-inflammatory effect of a sulfated polysaccharide isolated from the marine brown algae *Lobophora variegata*. *Pharm. Biol.*, 49, 167–74.
- Slattery, M. & Lesser, M.P. (2014). Allelopathy in the tropical alga *Lobophora variegata* (phaeophyceae): Mechanistic basis for a phase shift on mesophotic coral reefs? *J. Phycol.*, 505, 493–505.
- Steevensz, A.J., MacKinnon, S.L., Hankinson, R., Craft, C., Connan, S., Stengel, D.B., *et al.* (2012). Profiling phlorotannins in brown macroalgae by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Phytochem. Anal.*, 23, 547–553.
- Surget, G., Le Lann, K., Delebecq, G., Kervarec, N., Donval, A., Poullaouec, M.A., *et al.* (2017). Seasonal phenology and metabolomics of the introduced red macroalga *Gracilaria vermiculophylla*, monitored in the Bay of Brest (France). *J. Appl. Phycol.*, 29, 2651–2666.

- Tanniou, A., Vandanjon, L., Gonçalves, O., Kervarec, N. & Stiger-Pouvreau, V. (2015). Rapid geographical differentiation of the European spread brown macroalga *Sargassum muticum* using HRMAS NMR and Fourier-Transform Infrared spectroscopy. *Talanta*, 132, 451–456.
- Tebben, J., Motti, C.A., Siboni, N., Tapiolas, D.M., Negri, A.P., Schupp, P.J., *et al.* (2015). Chemical mediation of coral larval settlement by crustose coralline algae. *Sci. Rep.*, 5, 1–11.
- Thennarasan, S. (2015). Biochemical composition of marine brown alga *Lobophora variegata* from Mandapam in the South East Coast of Tamil Nadu, 5, 25–29.
- Viant, M.R. (2007). Introducing genomics , proteomics and metabolomics in marine ecology Introduction. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 332, 247–248.
- Vieira, C. (2015). *Lobophora* : biotic interactions and diversification.
- Vieira, C., Camacho, O., Sun, Z., Fredericq, S., Leliaert, F., Payri, C., *et al.* (2017). Historical biogeography of the highly diverse brown seaweed *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 110, 81–92.
- Vieira, C., D'hondt, S., De Clerck, O. & Payri, C.E. (2014). Toward an inordinate fondness for stars, beetles and *Lobophora*? Species diversity of the genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) in New Caledonia. *J. Phycol.*, 50, 1101–1119.
- Vieira, C., Payri, C. & De Clerck, O. (2015). Overgrowth and killing of corals by the brown alga *Lobophora hederacea* (Dictyotales, Phaeophyceae) on healthy reefs in New Caledonia: A new case of the epizoism syndrome. *Phycol. Res.*, 63, 152–153.
- Vieira, C., Thomas, O.P., Culioli, G., Genta-Jouve, G., Houlbreque, F., Gaubert, J., *et al.* (2016). Allelopathic interactions between the brown algal genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) and scleractinian corals. *Sci. Rep.*, 6, 18637.
- Wang, X., Chen, H., Chen, J., Luo, Q., Xu, J. & Yan, X. (2013). Response of *Pyropia haitanensis* to agaro-oligosaccharides evidenced mainly by the activation of the eicosanoid pathway. *J. Appl. Phycol.*, 25, 1895–1902.
- Webster, N.S., Uthicke, S., Botté, E.S., Flores, F. & Negri, A.P. (2013). Ocean acidification reduces induction of coral settlement by crustose coralline algae. *Glob. Chang. Biol.*, 19, 303–315.
- Xue, L., Zhang, Y., Zhang, T., An, L. & Wang, X. (2005). Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on algae and cyanobacteria. *Crit. Rev. Microbiol.*, 31, 79–89.
- Yates, J. L. and Peckol, P. (1993). Effects of Nutrient Availability and Herbivory on Polyphenolics in the Seaweed *Fucus Versiculosus* Author (s): J . L . Yates and P . Peckol Published by : Ecological Society of America EFFECTS OF NUTRIENT AVAILABILITY AND HERBIVORY ON POLYPHENOLICS IN TH. *Ecology*, 74, 1757–1766.
- Ye, Y., Zhang, L., Yang, R., Luo, Q., Chen, H., Yan, X., *et al.* (2013). Metabolic phenotypes associated with high-temperature tolerance of *porphyra haitanensis* strains. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 8356–8363.

- Zhang, L., Liu, X., You, L., Zhou, D., Wu, H., Li, L., *et al.* (2011). Metabolic responses in gills of Manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to copper using NMR-based metabolomics. *Mar. Environ. Res.*, 72, 33–39.
- Zou, H.X., Pang, Q.Y., Lin, L.D., Zhang, A.Q., Li, N., Lin, Y.Q., *et al.* (2014). Behavior of the edible seaweed *Sargassum fusiforme* to copper pollution: Short-term acclimation and long-term adaptation. *PLoS One*, 9.

PARTIE 1

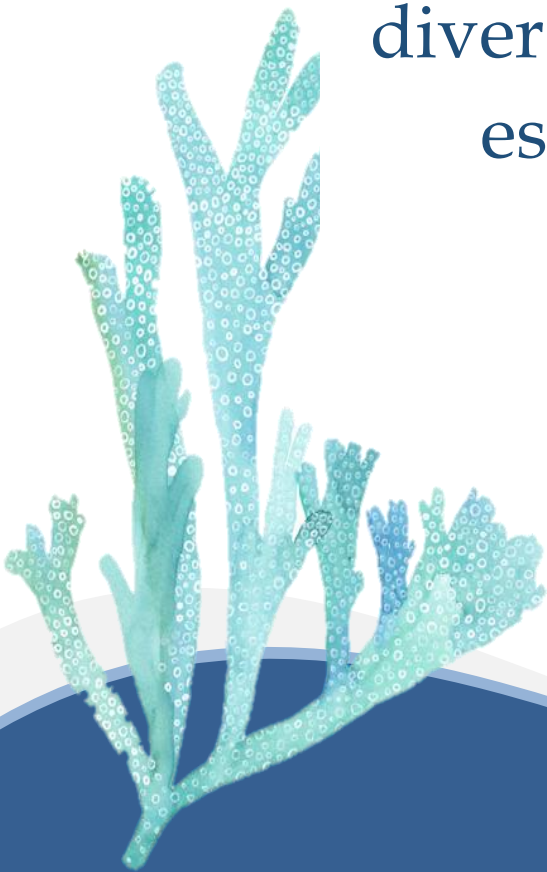
Diversité chimique de *Lobophora* et potentiel de valorisation

Cette première partie est divisée en deux chapitres. Le premier a pour but d'analyser la diversité chimique de *Lobophora* présente dans plusieurs espèces de ce genre en Nouvelle-Calédonie. Le deuxième chapitre s'intéresse au potentiel de valorisation des métabolites de *Lobophora* et rend compte des résultats des tests de bioactivités mis au point. Un suivi de la biomasse des deux espèces entrepris sur plusieurs mois de l'année durant la période d'étude est également présenté pour documenter l'abondance des populations dans un but de valorisation possible.

Ce volet de l'étude fait suite aux travaux de 2014 réalisés par notre groupe et au cours desquels trois nouvelles molécules ont été caractérisées chez *Lobophora rosacea* : les lobophorénols A, B et C (Vieira *et al.* 2016). Il s'agit donc de réaliser une étude approfondie et de l'étendre à d'autres espèces de ce genre pour trouver et caractériser de façon plus exhaustive le métabolome de *Lobophora rosacea* mais aussi d'autres espèces ciblées. Ainsi nous pourrions répondre aux questions suivantes : les lobophorénols sont-ils des marqueurs spécifiques d'une seule espèce ou au contraire du genre ? Quelles sont les autres molécules présentes chez les trois espèces de *Lobophora* ciblées ? Peut-on valoriser les molécules de *Lobophora* ? Ces questions revêtent un intérêt particulier au regard de la diversité en espèces du genre *Lobophora* récemment mise en évidence (Vieira *et al.* 2017).

Chapitre 1

Caractérisation de la
diversité chimique de trois
espèces de *Lobophora*



1. Contexte de l'étude

Les algues marines contiennent un arsenal de molécules qui font l'objet de nombreuses recherches depuis des années et pour différents domaines d'applications : alimentaire, nutraceutique, cosmétique, pharmaceutique, etc... Comparativement au genre *Dictyota* dont les substances naturelles ont été très étudiées, les substances naturelles du genre *Lobophora* sont bien moins documentées. Les composés identifiés chez ce genre ont été présentés au paragraphe 3.3 de l'introduction générale. Comme évoqué précédemment, une étude préliminaire lancée il y a quatre ans avait conduit à l'isolement et la caractérisation de trois nouvelles molécules: les lobophorénols A, B et C, des alcools à longues chaînes carbonées polyinsaturées (voir Figure 11). Ces métabolites secondaires originaux relativement apolaires avaient été isolés chez *L. rosacea* dans la fraction 100% méthanol. Cette étude semblait très prometteuse et les autres fractions n'ayant pas été étudiées, il était intéressant d'y rechercher d'autres molécules.

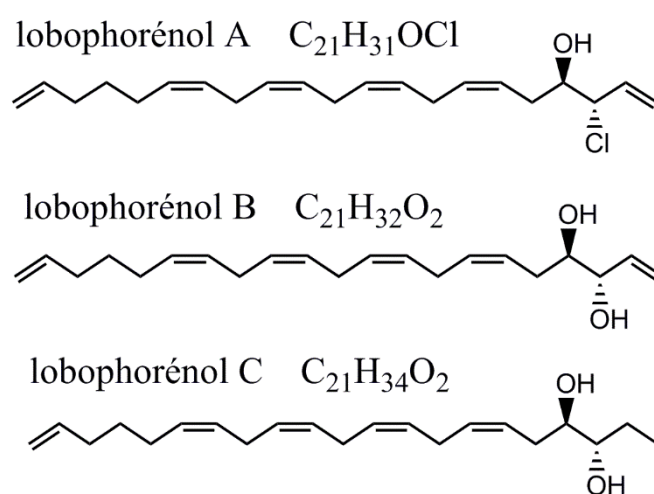


Figure 11. Structures chimiques des lobophorénols (A, B et C) isolés chez *L. rosacea* (Vieira *et al.* 2016).

De même, ces précédents travaux n'ayant concerné que *L. rosacea*, nous avons étendu l'étude de la diversité chimique à deux autres espèces, *Lobophora sonderii* et *Lobophora monticola*, présentes dans le lagon Sud-Est de Nouméa, faciles d'accès et abondantes. Dans cette partie de l'étude, nous cherchions également à isoler de nouveau les lobophorénols afin de tester la bioactivité de ces composés. En effet, hormis l'activité testée sur le corail *Acropora muricata* du lagon calédonien, aucune autre bioactivité n'avait été recherchée sur les trois

lobophorénols isolés (Vieira *et al.* 2016). Ce chapitre a donc pour but d'isoler des métabolites chez les trois espèces de *Lobophora* dans un but de valorisation mais également pour aider à l'identification de marqueurs dans les études métabolomiques entreprises dans la partie 2 de cette thèse.

L'étude de la diversité chimique de *Lobophora* et l'isolement des molécules a été réalisée à la National University of Ireland à Galway (NUIG).

2. Matériel & méthodes

2.1. Récoltes de *Lobophora*

Trois espèces de *Lobophora* ont été collectées en grandes quantités en plongée sous-marine en mars 2016. *Lobophora rosacea* (146 g de poudre algale sèche) et *L. sonderii* (196 g de poudre algale sèche) ont été récoltées au site de Ricaudy (respectivement 22°18 846 S; 166°27 531 E et 22°18 956 S; 166°27 405 E) et *L. monticola* (96 g de poudre algale sèche) à la baie Sainte Marie (22°18 269 S; 166°28 791 E). *Lobophora obscura* n'a pas été retenue car la forme encroûtante de l'espèce ne permettait pas d'obtenir les masses nécessaires à l'étude chimique. Une fois collectées dans des sacs plastiques, les algues ont été immédiatement conservées dans une glacière contenant de la glace pilée jusqu'au retour au laboratoire pour stopper le métabolisme. Au laboratoire, elles sont congelées et stockées à -20 °C. Les algues sont ensuite débarrassées manuellement des épiphytes visibles.

2.2. Extraction brute

Avant extraction, les algues congelées sont lyophilisées afin de conserver les spécimens sans les altérer, puis broyées sous forme de poudre.

L'extraction brute des composés a été réalisée sur la totalité de la poudre algale obtenue pour les trois espèces de *Lobophora* récoltées (196 g de poudre pour *L. sonderii*, 146 g pour *L. rosacea* et 96 g pour *L. monticola*). Cette extraction s'est faite à l'aide d'un mélange de solvants MeOH/CH₂Cl₂ (1:1). Après ajout d'un volume de solvant correspondant à 10 fois la masse de poudre algale à extraire (100 mL/ 10 g de poudre), le mélange a été plongé 10 min au bain

à ultrasons puis filtré sur papier plissé. Ces étapes ont été répétées trois fois puis le filtrat issu des trois extractions successives a été évaporé au rotavapor.

2.3. Chromatographie liquide sous vide (VLC *Vacuum Liquid Chromatography*)

La VLC a été appliquée sur *L. rosacea*, *L. sonderii* et *L. monticola*. La technique de VLC a pour but de réaliser un premier fractionnement grossier de l'extrait brut algal en fonction de la polarité des molécules qui le composent.

Les extraits bruts sont dissous dans du MeOH en présence de la poudre silice C18 (Polygoprep® 60-50, Machery-Nagel) à raison d'une masse de silice C18 équivalente à celle de l'extrait algal, puis l'ensemble est évaporé au rotavapor pour conduire à un dépôt solide. Le montage de la VLC (Figure 12) a ensuite été préparé en utilisant la silice C18 comme phase solide à raison de 10 fois la masse d'extrait algal, après lavage (au MeOH) et conditionnement (avec H₂O) de celle-ci. Le dépôt solide a ensuite été déposé puis fractionné à l'aide de différents solvants de polarité décroissante.

Pour *L. monticola*, cinq solvants ont été utilisés comme phase mobile: H₂O (F1), H₂O/méthanol (1:1) (F2), H₂O/méthanol (1:3) (F3), méthanol (100%) (F4) et méthanol/dichlorométhane (1:1) (F5), permettant d'obtenir cinq fractions (F1 à F5 respectivement). Pour *L. sonderii* et *L. rosacea*, sept solvants ont été utilisés comme phase mobile: H₂O (F1), H₂O/méthanol (1:1) (F2), H₂O/méthanol (1:3) (F3), méthanol (100%) (F4), méthanol/ CH₂Cl₂ (1:1) (F5), méthanol/ CH₂Cl₂ (1:3) (F6) et CH₂Cl₂ (100%) (F7) donnant accès à sept fractions (F1 à F7 respectivement). Les éluants obtenus pour chaque fraction ont ensuite été évaporés à l'évaporateur rotatif. Après filtration sur membrane de nylon 0,22 µm (filtres PTFE, Agilent Technologies), les fractions ont été analysées sur chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC, Diode Array Detector) et chromatographie liquide haute performance (HPLC, détecteur UV). La fraction F7 permet de s'assurer que mêmes les composés les plus apolaires de l'extrait algal ont bien été collectés à l'aide des différents solvants utilisés.

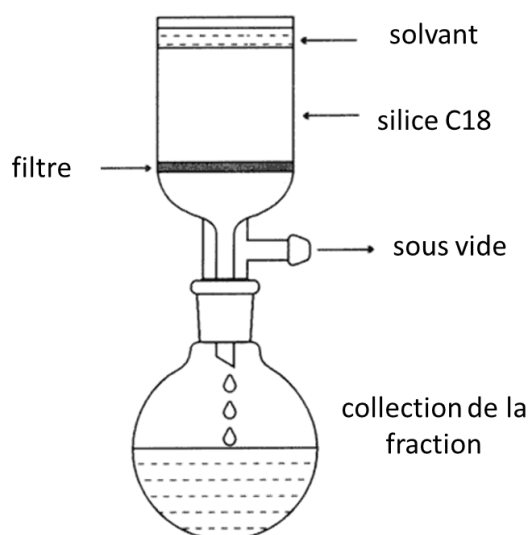


Figure 12. Montage de la VLC (adapté de silicageldesiccant.wordpress.com).

2.4. Purification de la fraction F4 (100% MeOH) de *L. rosacea*

La fraction F4 (100% MeOH ; 273 mg) issue de la VLC de *L. rosacea* a été purifiée sur HPLC Waters 2695 couplée au détecteur UV Waters 2487 dual λ Absorbance Detector. Cette purification s'est effectuée en phase inverse sur colonne XSELECT CSH™ Prep Phenyl-Hexyl (5 μ m, 10 x 250 mm, Waters) en isocratique à 65% d'acétonitrile-35% d'eau (solvants CHROMASOLV® for HPLC, Honeywell Riedel-de Haen®). Le volume d'injection a été programmé à 100 μ L et le débit à 4,5 mL/min sur un run total de 42 min. La fraction à purifier a été préparée à une concentration de 100 mg/mL et les pics à collecter ont été visualisés en UV à 210 nm. Ainsi, neuf pics ont initialement pu être collectés: LRF4-P1 (42 mg), -P2 (8,7 mg), -P2B (7,1 mg), -P3 (13,6 mg), -P4 (13,2 mg), -P5 (11,9 mg), -P6 (18,1 mg), -P7 (15,2 mg) et -P8 (10,8 mg).

Les neuf sous-fractions obtenues ont ensuite été analysées en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN ^1H , dans le CDCl_3) et les sous-fractions d'intérêt ont été repurifiées.

Ainsi, LRF4-P5 a été repurifiée sur colonne X-SELECT CSH™ phenyl-hexyl (5 μ m, 4,6 x 250 mm, Waters) en isocratique à 61% d'acétonitrile-39% d' H_2O , à 1,2 mL/min. Deux sous-fractions ont été collectées: LRF4-P5a et LRF4-P5b. LRF4-P2 a été repurifiée sur colonne Symmetry® C18 (5 μ m, 4,6 x 250 mm, Waters) étant donnée la perte importante de composés observée lors de la purification de LRF4-P5 (< 1 mg collecté). Cette deuxième purification s'est faite en isocratique à 65% d'acétonitrile-35% d' H_2O , à 1,3 mL/min. Les purifications

de LRF4-P2B et LRF4-P7 ont été arrêtées car le changement de colonne n'a pas permis d'obtenir des quantités suffisantes de métabolites.

2.5. Purification de la fraction F4 (100% MeOH) de *L. sonderii*

La fraction F4 (100 % MeOH ; 461 mg) issue de la VLC de *L. sonderii* a été purifiée sur HPLC préparative Jasco, couplée au détecteur UV Jasco 2075 et aux pompes Jasco PU-2087. Cette purification s'est effectuée en phase inverse sur colonne XSELECT CSH™ Prep Phenyl-Hexyl (5 μ m, 19 x 250 mm, Waters), avec les solvants suivant comme phase mobile: H₂O + 0,1% TFA (A) et acétonitrile + 0,1% TFA (B) (solvants CHROMASOLV® for HPLC, Honeywell Riedel-de Haen®). Le gradient utilisé est décrit dans le Tableau 4:

Tableau 4. Gradient utilisé pour la purification de la fraction F4 de *L. sonderii*.

temps (min)	A (%)	B (%)
0	25	75
2	25	75
15	0	100
18	0	100
19	25	75

Le débit était de 12 mL/min pour un run total de 19 min.

Ainsi, sept pics ont initialement pu être collectés: LRF4-P1 (11,5 mg), -P2 (11,9 mg), -P3 (28,7 mg), -P4 (61,8 mg), -P5 (21,9 mg), -P6 (39,8 mg) et -P7 (34,6 mg) et analysées en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN ¹H, dans le CDCl₃).

2.6. Purification des fractions F3 et F4 *L. monticola*

Les fractions F3 (H₂O /MeOH 1:3 ; 25,9 mg) et F4 (100% MeOH ; 215 mg) issues de la VLC de *L. monticola* ont été purifiées sur HPLC semi-préparative Waters 2695 couplée au détecteur UV Waters 2487. La fraction F3 a été purifiée en phase inverse sur colonne XSELECT CSH™ Prep Phenyl-Hexyl (5 μ m, 10 x 250 mm, Waters) en isocratique à 55% d'acétonitrile + 0,1% TFA (solvant CHROMASOLV® for HPLC, Honeywell Riedel-de Haen®).

La fraction F4 a été purifiée sur la même colonne avec le gradient décrit dans le tableau suivant et les solvants H₂O + 0,1% TFA (A) et acétonitrile + 0,1% TFA (B) comme phase mobile. Le débit était de 3 mL/min, le volume d'injection de 70 µL et la durée du run de 45 min (**Tableau 5**). Ainsi, 11 pics ont été collectés dans la fraction F3 : LMF3-P1 (1,36 mg), -P2 (1,76 mg), -P3 (1,62 mg), -P4 (1,22 mg), -P5 (1,53 mg), -P6 (0,48 mg), -P7 (1,62 mg), -P8 (-1,68 mg), -P9 (1,42 mg), -P10 (0,9 mg), -P11a (1,4 mg) et -P11b (1,31 mg). Hormis le pic 11, les autres étaient des pics mineurs. 17 pics ont été collectés dans la fraction F4. Les pics collectés ont été analysés en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN ¹H).

Tableau 5. Gradient utilisé pour la purification de la fraction F4 de *L. monticola*

temps (min)	A (%)	B (%)
0	27	73
20	15	85
30	2	98
40	0	100
43	0	100
45	27	73

2.7. SPE en phase normale des fractions F5 issues de la VLC (§ 2.3) de *L. rosacea*, *L. monticola* et *L. sonderii*.

Les fractions F5 (MeOH/ CH₂Cl₂, 1:1) issues de la VLC de *L. rosacea* (291 mg), *L. monticola* (169 mg) et *L. sonderii* (446 mg) ont été fractionnées sur colonne ouverte à l'aide de cartouches SPE Bond Elut Si (10 g de silice, 60 mL, 120 µm, Agilent Technologies) sur une chambre à vide (voir Figure 13). Les fractions sèches ont été reprises dans un mélange de MeOH/ CH₂Cl₂ (1:3) puis la poudre LiChroprep ® DIOL (40-63 µm, Merck KGaA) a été ajoutée à chaque extrait à raison de 1,5 fois la masse de chaque fraction. Les fractions conditionnées avec la poudre diol ont ensuite été évaporées à l'évaporateur rotatif avant d'être déposées sur les cartouches conditionnées par 80 mL d'acétate d'éthyle puis 80 mL d'hexane.



Figure 13. Montage du fractionnement SPE en phase normale (© J. Gaubert).

Le fractionnement a été réalisé à l'aide de sept mélanges de solvants de polarité croissante: 100% hexane (f1), hexane/acétate d'éthyle 80:20 (f2), hexane/acétate d'éthyle 60:40 (f3), hexane/acétate d'éthyle 40:60 (f4), hexane/acétate d'éthyle 20:80 (f5), acétate d'éthyle 100% (f6) et acétate d'éthyle/MeOH 50:50 (f7). Pour chaque mélange de solvants, 80 mL ont été ajoutés et élués sur chaque colonne. Les fractions ont ensuite été évaporées à l'évaporateur rotatif.

2.7.1 Analyses en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les analyses ont été réalisées sur une RMN 600 MHz Agilent. Une masse de 5 à 10 mg de chaque fraction issue de la SPE en phase normale (cf. paragraphe précédent) a été reprise dans 0,5 mL de chloroforme deutéré (CDCl_3) puis transférée dans des tubes RMN pour analyse ^1H . Les fractions intéressantes ont été ciblées pour les purifications sur HPLC en phase normale.

2.7.2 Purifications des fractions issues de la SPE en phase normale

Après bio-guidage grâce aux analyses RMN ^1H des 21 fractions algales issues de la SPE en phase normale de *L. sonderii* (LS), *L. rosacea* (LR) et *L. monticola* (LM), les fractions présentant des profils intéressants ont été purifiées sur HPLC en phase normale. Ainsi, LR-F5-f2 (49,9 mg), LR-F5-f4 (22 mg), LS-F5-f2 (109,8 mg) et LS-F5-f4 (36 mg) ont été sélectionnées. Toutes

les purifications ont été réalisées sur HPLC Waters 2695 couplée au détecteur UV Waters 2487. La colonne Sunfire™ Prep silica (5 µm 250 x 4,6 mm, Waters) a été utilisée et le Tableau 6 résume les conditions de purification ayant servi pour chaque fraction algale préalablement préparée à 10 mg/mL dans du CH₂Cl₂.

Tableau 6. Paramètres utilisés pour la purification des fractions LR-F5-f4, LS-F5-f4, LR-F5-f2 et LS-F5-f2 sur HPLC en isocratique.

fractions	% hexane	% acétate d'éthyle	débit (mL/min)	durée (min)
LR-F5-f4	65	35	3	45
LS- F5-f4	67	33	3	45
LR- F5-f2	91	9	3	45
LS- F5-f2	93	7	3	45

La Figure 14 résume les étapes de traitements chimiques réalisés depuis la collecte jusqu'aux purifications des fractions issues de la SPE sur colonne ouverte de silice.

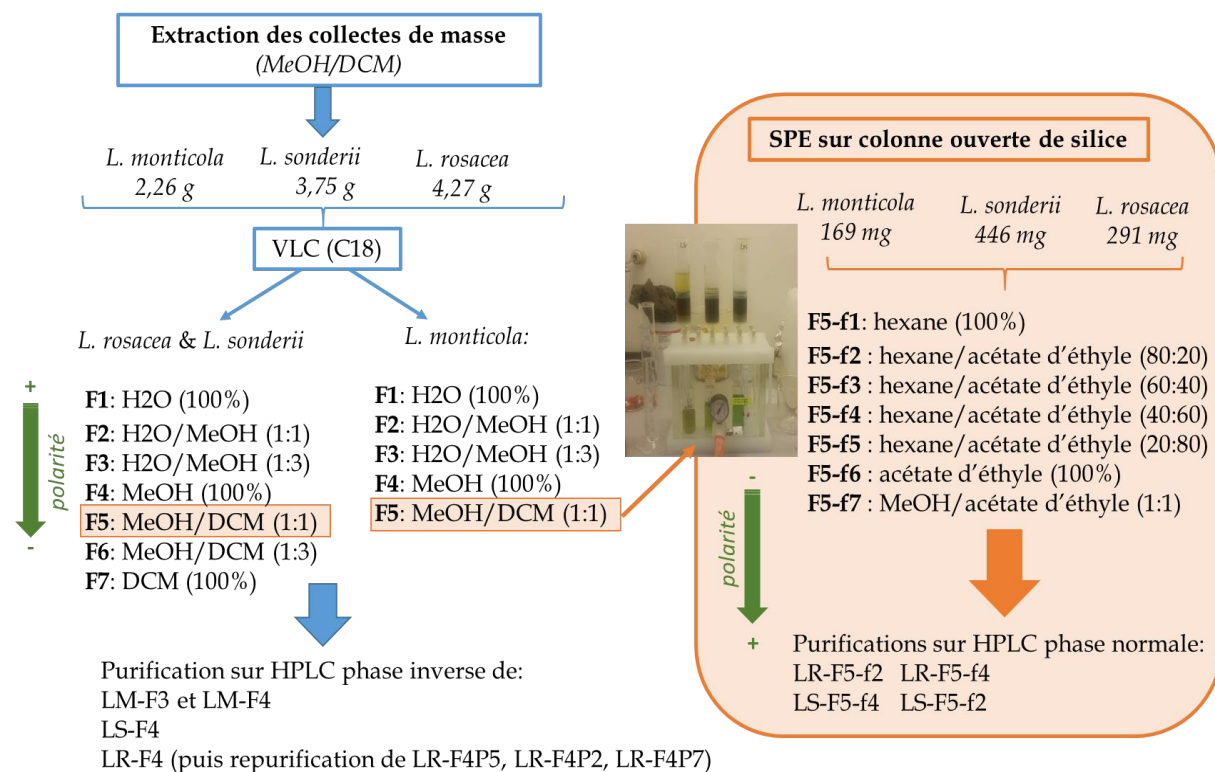


Figure 14. Schéma récapitulatif du traitement de la matière algale à partir de la collecte de masse.

2.8. Fractionnement sur colonne de silice ouverte des nouvelles collectes de masse

De nouvelles collectes de masse de *L. rosacea*, *L. sonderii* et *L. monticola* ont été réalisées en juillet 2017 suite aux difficultés rencontrées lors des premières purifications de composés en phase inverse et normale, réalisées à partir des premières collectes de masse (perte de matière importante, notamment lors de la purification des lobophorénols).

Après lyophilisation et broyage, la poudre algale obtenue (172 g pour *L. rosacea*, 177 g pour *L. sonderii* et 146 g pour *L. monticola*) a été extraite avec un mélange de solvants plus apolaires constitués de MeOH/ CH₂Cl₂ (1:9). De la silice Supelco® Analytical (75-200 µm) a ensuite été ajoutée à l'extrait brut (1,93 g d'extrait brut pour *L. monticola*, 0,769 g pour *L. rosacea* et 1,15 g pour *L. sonderii*) afin de former une pâte. La colonne ouverte a été préparée avec de la silice 60 (0,040-0,063 mm, MERCK) en suspension dans du cyclohexane. Une fois la colonne tassée, le sable de Fontainebleau a été ajouté afin d'aplanir la surface. La pâte d'extrait brut à fractionner a ensuite été déposée sur la colonne puis des solvants de polarité décroissante ont été élués sur la colonne: cyclohexane/acétate d'éthyle (2:98), cyclohexane/acétate d'éthyle (5:95), cyclohexane/acétate d'éthyle (10:90), cyclohexane/acétate d'éthyle (25:75), cyclohexane/acétate d'éthyle (50:50) et acétate d'éthyle. Les éluants sont collectés dans des tubes collecteurs présentés dans la Figure 15. La colonne est ensuite rincée avec un mélange MeOH/acétate d'éthyle (10:90) puis MeOH/AcOEt (20:80). Afin de regrouper les fractions suivant leur polarité, des chromatographies sur couche mince (CCM) de silice sont réalisées dans une cuve saturée en solvants cyclohexane/acétate d'éthyle (7:3). La Figure 16 résume les étapes réalisées au paragraphe 2.8.

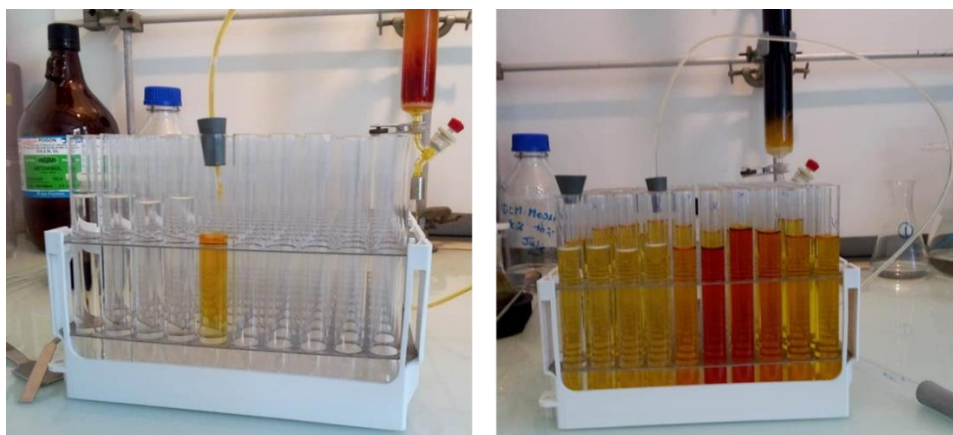


Figure 15. Tubes collecteurs utilisés pour le fractionnement sur colonne de silice ouverte (© J. Gaubert).

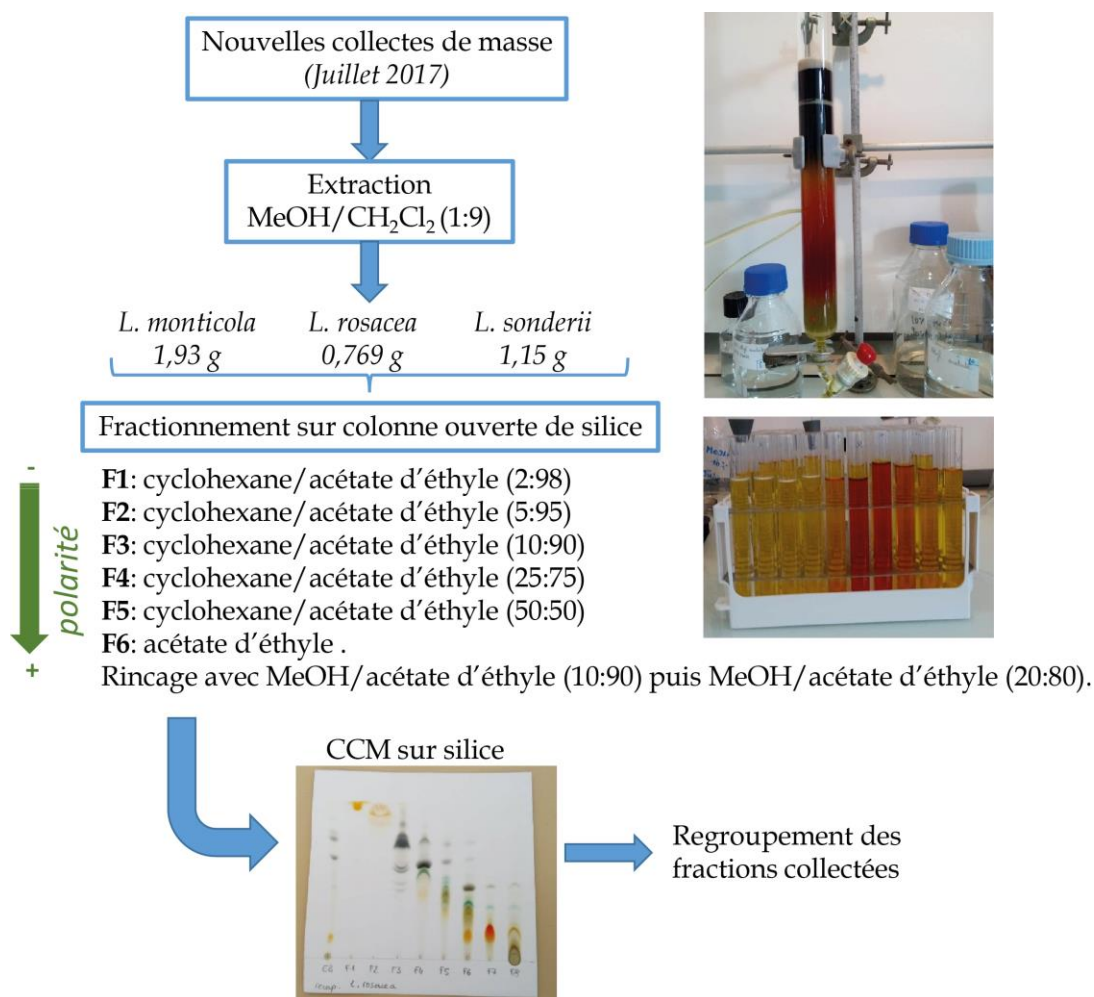


Figure 16. Fractionnement sur colonne ouverte de silice des nouvelles collectes de masse de *L. monticola*, *L. rosacea* et *L. sonderii* (© J. Gaubert)

3. Résultats & discussion

3.1. Purification des premières collectes de masse de *L. sonderii*, *L. rosacea* et *L. monticola* fractionnées en phase inverse

Après lyophilisation et broyage des récoltes, les masses suivantes de poudre algale ont été obtenues : 196 g pour *L. sonderii*, 146 g pour *L. rosacea* et 96 g pour *L. monticola*. Après extraction au MeOH/CH₂Cl₂ (1 :1), les extraits bruts de masses suivantes ont été récoltés : 3,75 g pour *L. sonderii*, 4,27 g pour *L. rosacea* et 2,26 g pour *L. monticola*. Ces poudres algales ont ensuite été soumises à un fractionnement par VLC en phase inverse avec des solvants de polarité décroissante. Ainsi, cinq fractions chimiques ont été obtenues pour *L. monticola* et sept fractions pour *L. rosacea* et *L. sonderii*. Les schémas de la Figure 17 résument les fractions obtenues ainsi que leur masse à la suite du fractionnement par VLC.

Les fractions F4 éluées avec 100 % de MeOH ont été ciblées pour les purifications car elles présentaient les profils chimiques les plus intéressants en uHPLC et RMN. C'est également cette fraction dans laquelle les lobophorénols avaient été isolés chez *L. rosacea* en 2014. Les fractions F3 et F4 de *L. monticola* ont été purifiées mais aucun composé nouveau n'a été détecté, ni les lobophorénols. La fraction F4 de *L. sonderii* a également été purifiée sur HPLC mais seulement des mélanges d'acides gras et pigments ont été observés, comme pour *L. monticola*, sans signal des lobophorénols.

L'étude et la purification de la fraction F4 de *L. rosacea* a été la plus poussée car les signaux des lobophorénols, précédemment identifiés chez cette espèce ont été retrouvés (analyses ¹H-RMN, voir Figures S1-S3). Neuf sous-fractions ont été collectées (voir profil chromatographique Figure 18).

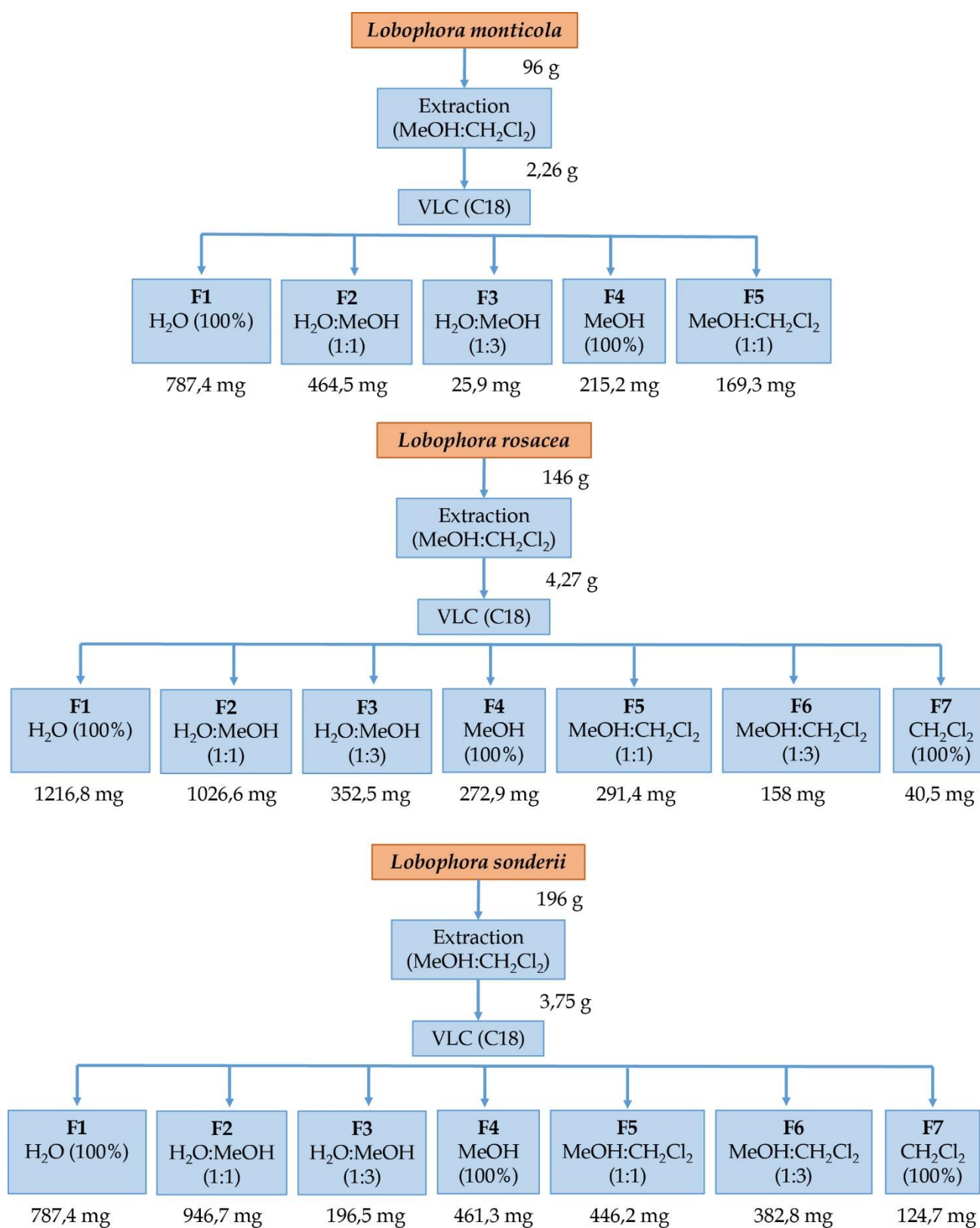


Figure 17. Schémas résumant le fractionnement de *Lobophora monticola*, *Lobophora rosacea* et *Lobophora sonderii*.

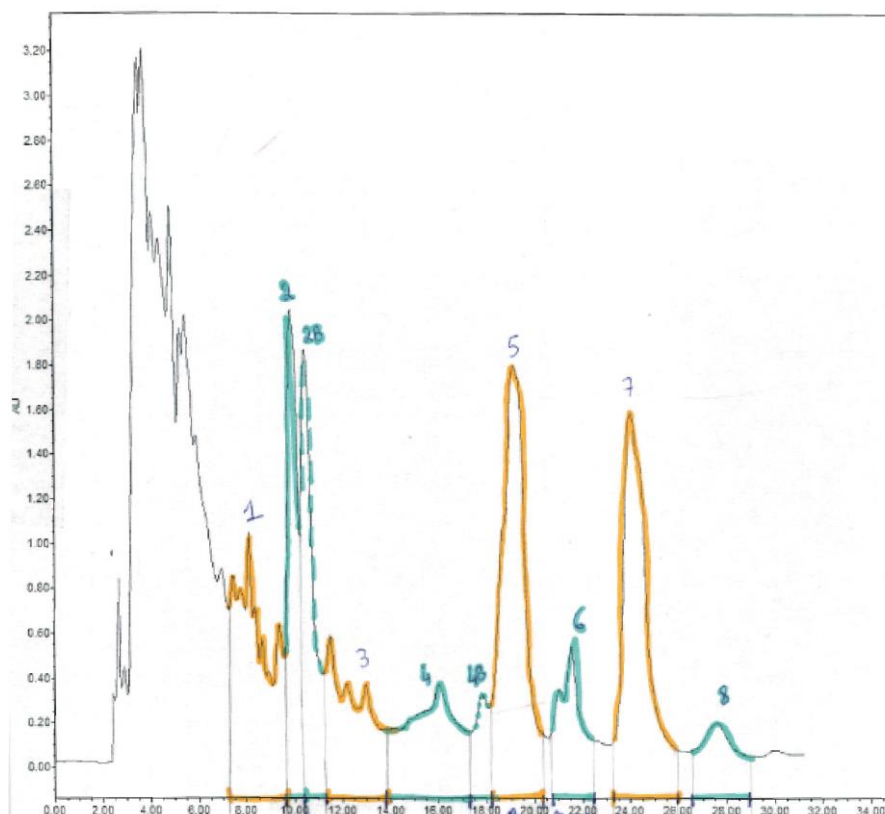


Figure 18. Profil chromatographique de la purification de LR-F4 (issue de la VLC) en phase inverse (UV à 210 nm).

De manière inattendue, toutes les sous-fractions et molécules correspondantes aux lobophorénols A, B et C ont été collectées en masse inférieure à 1 mg, ce qui est trop faible pour effectuer les tests de bioactivité. Cette perte importante de composés pourrait s'expliquer par les moyens de purification utilisés : la longue chaîne carbonée avec ses doubles liaisons s'adsorberait facilement à la phase solide phényl-héxyl (interaction pi-pi) et serait de ce fait retenue lors de l'élution. La purification des fractions contenant les signaux des lobophorénols a d'abord été effectuée sur colonne phényl-héxyl puis sur colonne C18, mais la perte de composés a été importante dans les deux cas. La phase inverse n'est probablement pas la meilleure méthode pour les purifier.

Il faut également noter que le fractionnement de l'extrait brut par VLC n'a pas été effectué exactement dans les mêmes conditions qu'en 2014. En effet, dans le précédent fractionnement de l'extrait brut de *L. rosacea*, six solvants ont été utilisés contre sept dans le présent travail.

La Figure 19 ci-dessous indique les différences notées entre la VLC de 2014 et celle de 2017. Ces différences de fractionnement ont peut-être entraîné des variations dans les rendements d'extractions des lobophorénols.

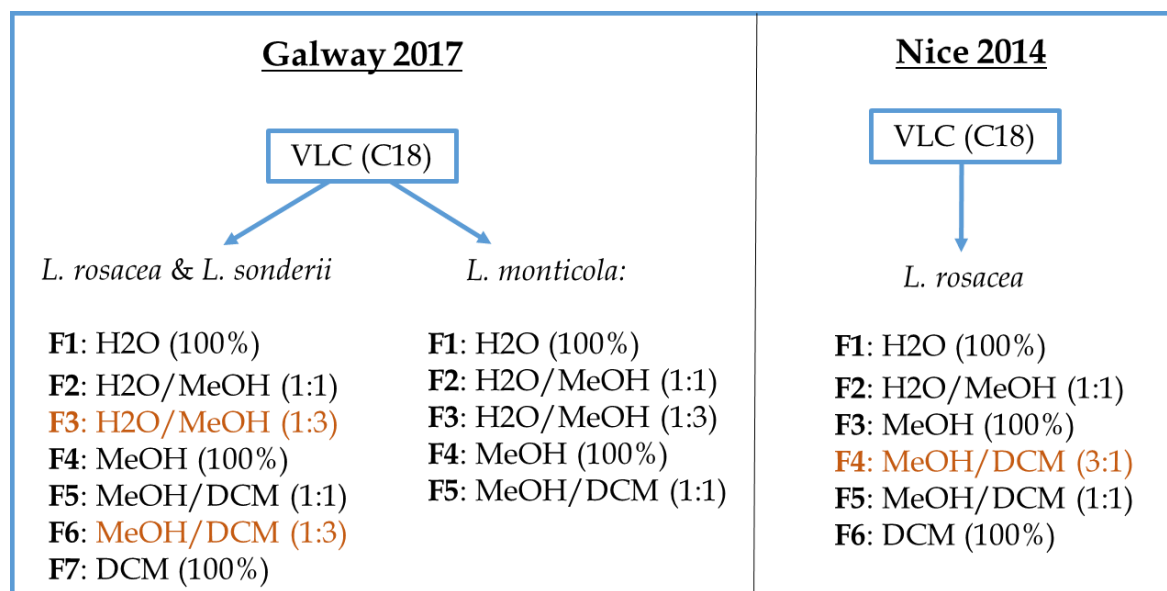


Figure 19. Schémas du fractionnement par VLC de *Lobophora rosacea* effectué à Galway (2017) et à Nice (2014).

Outre ces lobophorénols, nous n'avons pas observé d'autres nouvelles molécules dans la fraction MeOH de *L. rosacea* et avons également constaté la présence d'acides gras et pigments (notamment chlorophylle). Au vue des difficultés rencontrées pour isoler en quantité nécessaire les lobophorénols et de la forte teneur en graisses et pigments présente chez les trois espèces, un travail sur les fractions plus apolaires a été décidé.

3.2. SPE en phase normale des fractions F5 issues de la VLC de *L. rosacea*, *L. monticola* et *L. sonderii*

Afin de réaliser un travail sur les fractions plus apolaires de *Lobophora*, des SPE (Extraction en Phase Solide) en phase normale sur silice ont été réalisées sur les fractions F5 (éluées au MeOH/CH₂Cl₂ 1 :1 lors de la VLC) de *L. sonderii*, *L. rosacea* et *L. monticola*. Sept solvants de polarité croissante ont été élués sur l'extrait F5, permettant ainsi de récolter sept fractions pour chacune des espèces (cf. Figure 14). Les masses des fractions obtenues sont présentées dans le Tableau 7.

Tableau 7. Masses des fractions (mg) issues du fractionnement sur colonne ouverte de silice en phase normale de *L. rosacea*, *L. sonderii* et *L. monticola*.

fractions	<i>L. monticola</i>	<i>L. rosacea</i>	<i>L. sonderii</i>
F5-f1	3,39	7,03	15,35
F5-f 2	17,28	49,92	109,81
F5-f 3	42,18	51,7	54,37
F5-f 4	16,08	22,03	36,03
F5-f 5	5,09	8,21	9,18
F5-f 6	3,39	-	19,31
F5-f 7	43,57	111,92	162,25

Des analyses ¹H-RMN ont été réalisées sur les 21 fractions (sept fractions pour chaque algue) obtenues afin d'identifier les potentielles fractions d'intérêt et guider la suite des purifications.

Les fractions F5-f1 de *L. rosacea* et *L. sonderii*, éluées avec 100 % de cyclohexane, semblent présenter des signaux des lobophorénols B et C, notamment entre δ_H 4,9 (dd), 5,1 (dd) et 5,8 (ddt) ppm correspondant aux protons vinyliques terminaux (voir Figure 20, Figure 21 et Figure 22). Par contre, l'absence de signal dans la région δ_H 3.2-4.5 ppm pourrait traduire l'absence de groupement -OH. On aurait donc des molécules très proches des lobophorénols mais sans les groupements -OH. Ces molécules pourraient être des polyoléfinés dérivées des lobophorénols, avec une structure proche de celle proposée à la Figure 20, de longueurs de chaînes inconnues. Une séparation de ces composés très apolaires n'a pas été possible. Des analyses en GC-MS auraient permis une analyse plus poussée. Néanmoins, dans un souci de

valorisation, ces identifications présentaient peu d'intérêt sur des composés en mélange. La fraction F5-f1 de *L. monticola* présente également les signaux caractéristiques entre δ_H 4,9 (dd), 5,1 (dd) et 5,8 (ddt) ppm mais en intensité très faible (Figure 23). Comme *L. sonderii* et *L. rosacea*, *L. monticola* posséderait des composés polyoléfiniques mais en quantité inférieure.

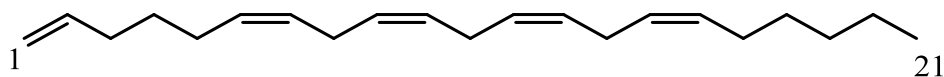


Figure 20. Structure d'un composé polyoléfine proche des lobophorénols (la longueur de la chaîne étant inconnue). On peut voir la partie vinylique terminale caractéristique, marque de métabolite spécialisé.

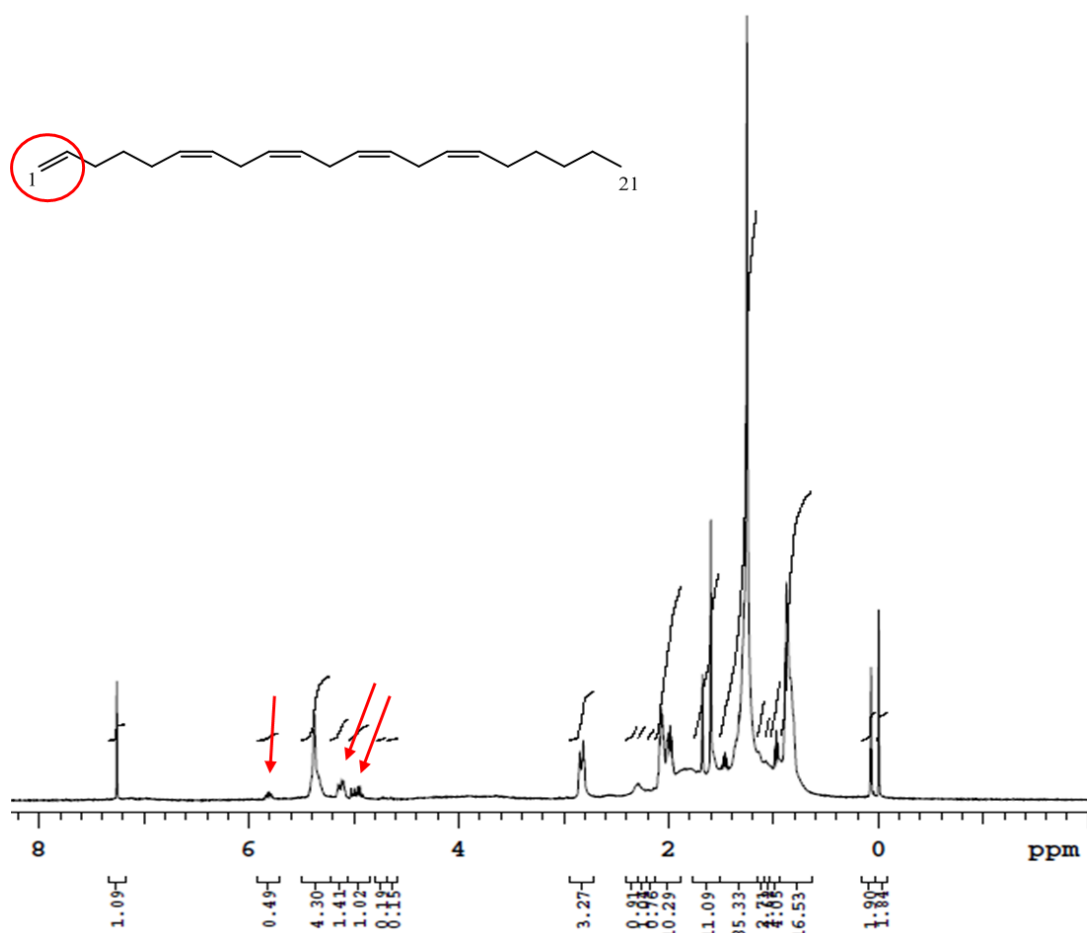


Figure 21. Spectre ¹H-RMN de LR-F5-f1 après SPE en phase normale. Les signaux caractéristiques des protons vinyliques terminaux sont indiqués par les flèches rouges.

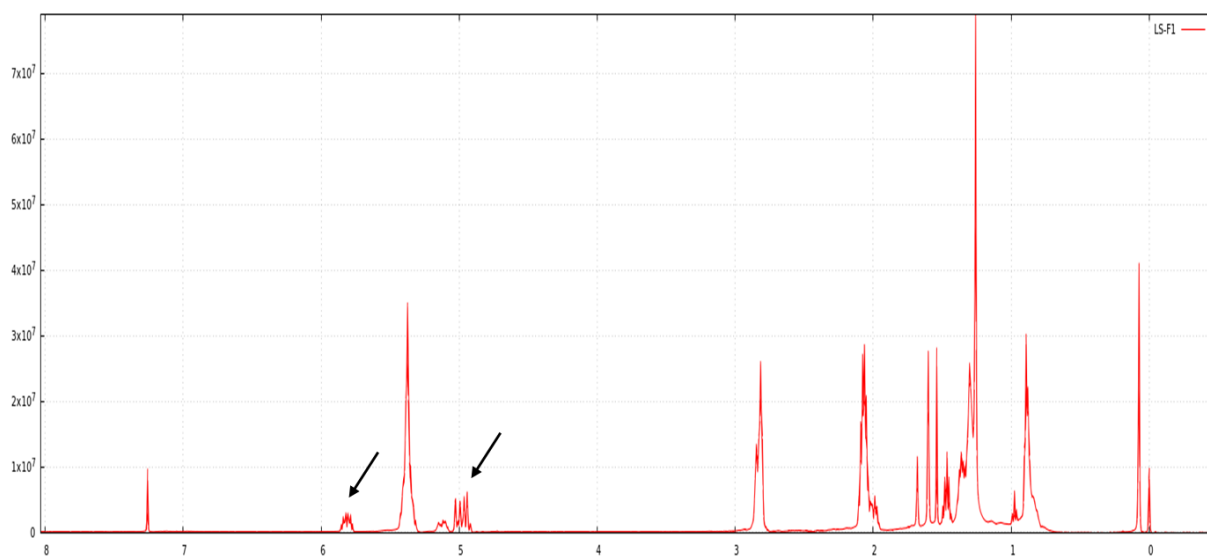


Figure 22. Spectre ^1H -RMN de LS-F5-f1 après SPE en phase normale. Les signaux caractéristiques des protons vinyliques terminaux sont indiqués par les flèches.

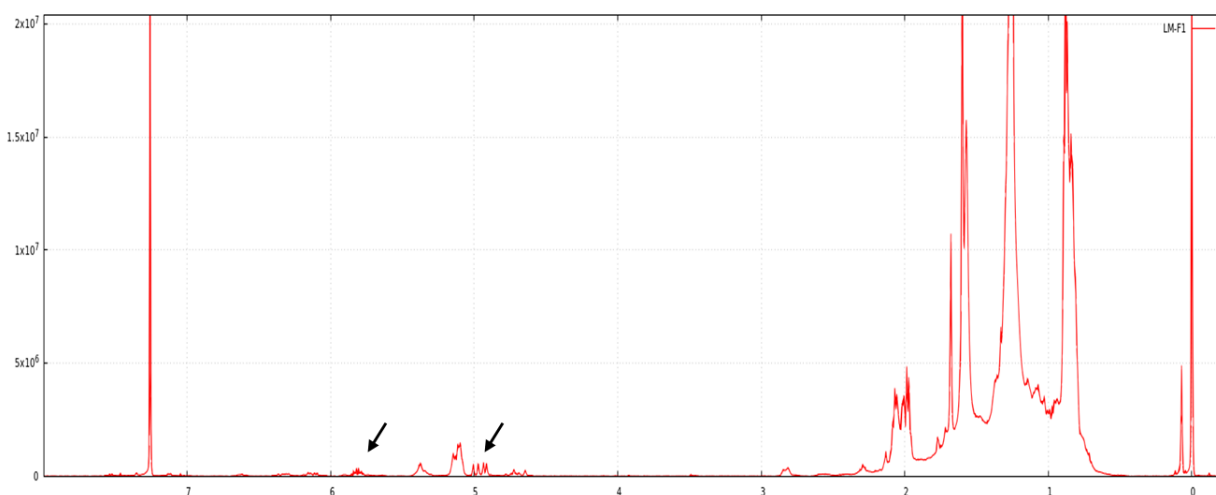


Figure 23. Spectre ^1H -RMN de LM-F5-f1 après SPE en phase normale. Les signaux caractéristiques des protons vinyliques terminaux sont indiqués par les flèches.

Les fractions F5-f2 et F5-f4 de *L. rosacea* et *L. sonderii* contiennent aussi potentiellement des molécules proches des lobophorénols (voir Figure 24). Toutes les fractions contiennent des pigments, notamment de la chlorophylle et sont riches en graisses.

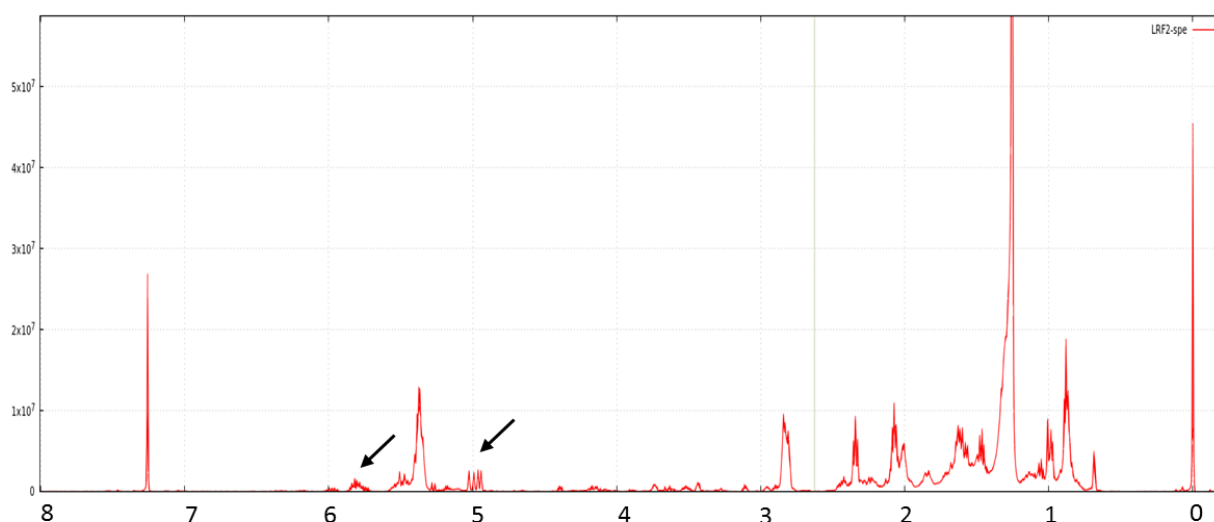


Figure 24. Spectre ^1H -RMN de LR-F5-f2 après SPE en phase normale. Les flèches noires indiquent notamment des régions caractéristiques des protons vinyliques terminaux.

Les fractions F5-f1 intéressantes n'ont pas été purifiées puisque très apolaires. En effet, celles-ci ont été éluées avec 100 % de cyclohexane et sont donc compliquées à purifier sur un système d'HPLC en phase normale classique.

La fraction F5-f2 de *L. rosacea* a été purifiée sur HPLC en phase normale. Nous avons là encore constaté une perte de composés, les pics isolés avaient tous une masse < 1 mg. La poubelle à solvants issue de la purification de LR-F5-f2 a été évaporée puis analysée en RMN : les signaux vinyliques étaient présents, mais sans $-\text{OH}$ ni $-\text{Cl}$. Les composés ont donc été élués dans le volume mort. La fraction F5-f2 de *L. sonderii* (LS-F5-f2) a également été purifiée sur HPLC en phase normale. Sept pics ont pu être isolés et contiennent majoritairement des mélanges de graisses et de chlorophylle. Les composés polyoléfiniques n'ont pas pu être isolés.

Les fractions F5-f4 de *L. rosacea* et *L. sonderii* ont également été purifiées sur HPLC. Trois pics majeurs ont été collectés dans LR-F5-f4, sans profil intéressant après analyses RMN. Concernant la fraction F5-f4 de *L. sonderii*, quatre pics ont été collectés. Le pic 1 a été collecté en masse assez importante comparés aux autres pics (< 1 mg) : environ 5 mg. L'analyse RMN de ce pic a montré qu'il s'agissait en fait de fucoxanthine, un pigment caractéristique des algues brunes.

Ce nouveau travail sur les fractions plus apolaires issues de la VLC n'a donc pas permis d'isoler de nouveaux composés chez *L. rosacea*, *L. monticola* et *L. sonderii* mais des signaux RMN de molécules de type polyoléfiniques ont été vus chez les trois espèces.

3.3. Fractionnement en phase normale de secondes collectes de masse

Au vu des difficultés rencontrées pour isoler les métabolites en quantité suffisante par l'utilisation d'un fractionnement en phase inverse pour des tests de bioactivités et la forte teneur en graisses et pigments, nous avons décidé de refaire de nouvelles collectes de masse et de travailler sur la partie apolaire, en utilisant un fractionnement plus approprié en phase normale que la VLC. Les collectes de *L. rosacea*, *L. monticola* et *L. sonderii* ont été réalisées en juillet 2017 au même site que la première collecte (Ricaudy). Après lyophilisation et broyage, les masses suivantes de poudre algale ont été obtenues : 146 g pour *L. monticola*, 172 g pour *L. rosacea* et 177 g pour *L. sonderii*. Après extraction au MeOH/CH₂Cl₂ (1:9), les masses suivantes d'extraits bruts ont été récoltées : 1,93 g pour *L. monticola*, 0,769 g pour *L. rosacea* et 1,15 g pour *L. sonderii*.

Les extraits bruts ont été fractionnés avec des solvants de polarité croissante puis des chromatographies sur couches minces de silice (CCM) ont permis de guider le rassemblement des tubes collecteurs en fractions suivant leur polarité, la dernière fraction correspondant au rinçage de la colonne pour chacune des algues. Ainsi, neuf fractions ont été obtenues pour *L. monticola*, huit pour *L. rosacea* et 10 pour *L. sonderii*. Le Tableau 8 résume les masses de chacune des fractions collectées.

Le rendement du fractionnement (depuis l'extrait brut) en phase normale de ces secondes collectes de masse a été de 47,6% pour *L. monticola*, 82,7% pour *L. rosacea* et 77,6% pour *L. sonderii*. Le rendement du fractionnement par VLC était de 73,6% pour *L. monticola*, 78,7% pour *L. rosacea* et 89,2% pour *L. sonderii*. Ainsi, les rendements de fractionnement sont assez similaires entre les deux techniques pour *L. rosacea* et *L. sonderii* (bien que 10% supérieur avec la VLC pour cette dernière) mais le rendement était moins bon pour *L. monticola* (-26%) avec la phase normale.

Tableau 8. Masses des fractions (mg) issues du fractionnement sur colonne ouverte de silice en phase normale de *L. rosacea*, *L. sonderii* et *L. monticola*.

fractions	<i>L. monticola</i>	<i>L. rosacea</i>	<i>L. sonderii</i>
F1	101,8	69	24,9
F2	21,6	37,4	11,2
F3	128,3	131,2	47,7
F4	185,6	78,9	20,1
F5	75,6	18	6,3
F6	57,7	19,3	46,9
F7	31,7	42,6	205,4
F8	102	239,7	56,1
F9	213,7	-	121,2
F10	-	-	352,7

Ces fractions ont été utilisées pour des tests antimicrobiens à l'Université de Nouvelle-Calédonie, développés au chapitre suivant (chapitre 2). Elles n'ont pas encore pu être analysées par RMN ni purifiées.

3.4. Bilan sur les études chimiques entreprises sur les trois espèces de *Lobophora*

A travers ces différentes études chimiques et les nombreuses étapes de fractionnements et purifications, nous avons pu voir que les trois espèces de *Lobophora* étudiées étaient riches en graisses et pigments. Bien que les lobophorénols n'aient pu être isolés en quantité nécessaire pour des tests de bioactivité, leurs signaux caractéristiques ont été observés en RMN chez *L. rosacea*. Après un fractionnement en phase normale des fractions F5 de chaque espèce, des signaux RMN de composés proches des lobophorénols mais sans -OH ont été observés chez *L. rosacea* et *L. sonderii*, et chez *L. monticola* en quantité moindre. Il s'agirait de composés de type polyoléfines, avec une partie terminale vinylique, de longueur de chaîne inconnue. A l'inverse des lobophorénols qui sont majoritaires chez *L. rosacea*, ces composés semblent être des marqueurs des trois espèces étudiées.

De manière surprenante, il est intéressant de noter que nous n'avons pas détecté de composés phénoliques alors que le genre *Lobophora* est connu pour en contenir (Stern *et al.* 1996; Amsler & Fairhead 2005) et que ce groupe chimique est caractéristique des algues brunes. Ces composés sont peut-être minoritaires chez les trois espèces étudiées ce qui expliquerait pourquoi nous ne les avons pas détectés par RMN ou isolés lors des purifications. De même, aucun terpène n'a été identifié. Ce groupe de composés semble absent de *Lobophora*, une hypothèse déjà avancée dans de précédents travaux (Vieira *et al.* 2016). Ce résultat est également surprenant puisque l'ordre des Dictyotales est connu pour synthétiser ces produits naturels. Le genre *Zonaria* n'est pas non plus documenté comme producteur de terpène. A l'inverse, des composés terpéniques ont déjà été isolés chez d'autres genres de cet ordre, comme *Dictyota*, *Dictyopteris*, *Padina*, *Canistrocarpus*, *Dictyopteris*, *Taonia*, *Styopodium*, *Spatoglossum*, *Rugulopteryx* ou *Stoechospermum* (e.g. de Paula *et al.* 2011; Shoubaky & Salem, 2014).

4. Conclusion

Ce 1^{er} chapitre, qui avait pour but d'analyser et caractériser la diversité chimique de *Lobophora*, a été plus poussé au vue des difficultés rencontrées dans l'isolement des composés en quantité suffisante.

En effet, nous avons bien retrouvé les signaux des lobophorénols caractérisés dans le précédent travail chez *L. rosacea*, mais des pertes importantes de matière ont été observées lors des purifications. Ces composés ont été isolés en quantité inférieure à 1 mg, une masse trop faible pour conduire des tests de bioactivité. Le choix de la première colonne sélectionnée (phényl-héxyl) pour isoler les lobophorénols dans la fraction 100 % MeOH issue de la VLC de *L. rosacea* a tout d'abord été remis en question. Mais le passage à une colonne C18 n'a pas permis d'isoler les composés en quantité plus importante. La perte importante de composés pourrait raisonnablement être liée à la longue chaîne carbonée des lobophorénols qui s'adsorberait facilement avec ses doubles liaisons. Les différences de protocoles dans la VLC effectuée en 2017 par rapport à celle des travaux de 2014 pourraient également expliquer en partie le faible rendement de purification. De plus, les lobophorénols

n'ont pas été détectés lors des purifications des fractions 100 % méthanol de *L. monticola* et *L. sonderii*. Les lobophorénols seraient donc des composés majoritaires de *L. rosacea*. Les différentes étapes de purifications et d'analyses ont également montré la richesse en graisses chez les trois espèces de *Lobophora*.

Un travail sur les fractions fraction F5 (fractions MeOH/CH₂Cl₂ 1 :1 issues de la VLC), plus apolaires, a ensuite été entrepris sur les trois algues. Celui-ci a montré la présence de lipides vinyliques, des métabolites spécialisés qui semblent assez similaires aux lobophorénols mais sans les groupements OH, avec une structure raisonnablement proche du (6Z,9Z,12Z,15Z)-henicosa-1,6,9,12,15-pentaène, identifié chez l'algue brune *Fucus vesiculosus* (ordre des Fucales) en 1972 (Hallsall & Hills 1972). Ce type de composé polyoléfine a également été retrouvé chez d'autres algues brunes de l'ordre des Desmarestiales, Ectocarpales et Laminariales (Youngblood & Blumer 1973). Ces composés vinyliques, très apolaires, sont difficiles à purifier et nous n'avons pas pu les isoler avec nos moyens analytiques. Seule la fucoxanthine, un pigment caractéristique des algues brunes, a pu être isolée en quantité suffisante dans la fraction F5 (5 mg).

Au vue de la richesse en pigments et graisses constituant cette fraction F5, de nouvelles collectes de masse ont été entreprises afin de travailler sur la partie apolaire uniquement. Plusieurs fractions ont résulté de ce traitement chimique mais la purification de ces dernières n'a malheureusement pas été entreprise et resterait donc un travail à envisager afin de tenter de caractériser cette composante riche en composés apolaires, lipides et pigments. Notamment, il serait intéressant de voir si nous retrouvons des composés apolaires identifiés chez *L. variagata* des îles Canaries par Gutiérrez-Cepeda *et al.* en 2015.

Il est également intéressant de rappeler qu'aucun composé phénolique ou terpène n'a été identifié lors des purifications. Ce résultat est étonnant, notamment dans le cas des terpènes qui sont des produits naturels synthétisés par de nombreux genres chez les Dictyotales (ex : *Dictyota*, *Dictyopteris*, *Padina*).

Figures complémentaires

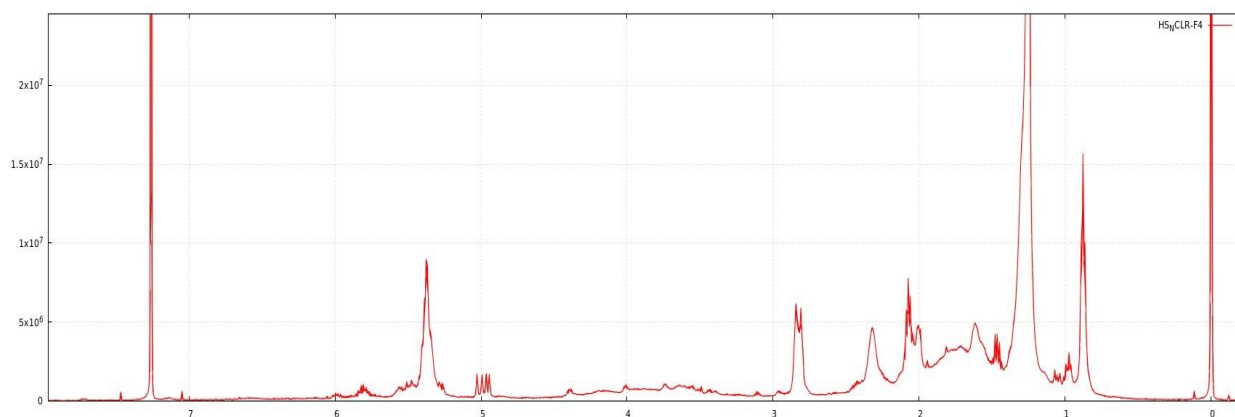


Figure S1. Spectre ¹H-RMN entre 0-8 ppm de la fraction F4 (issue de la VLC) de *Lobophora rosacea*.

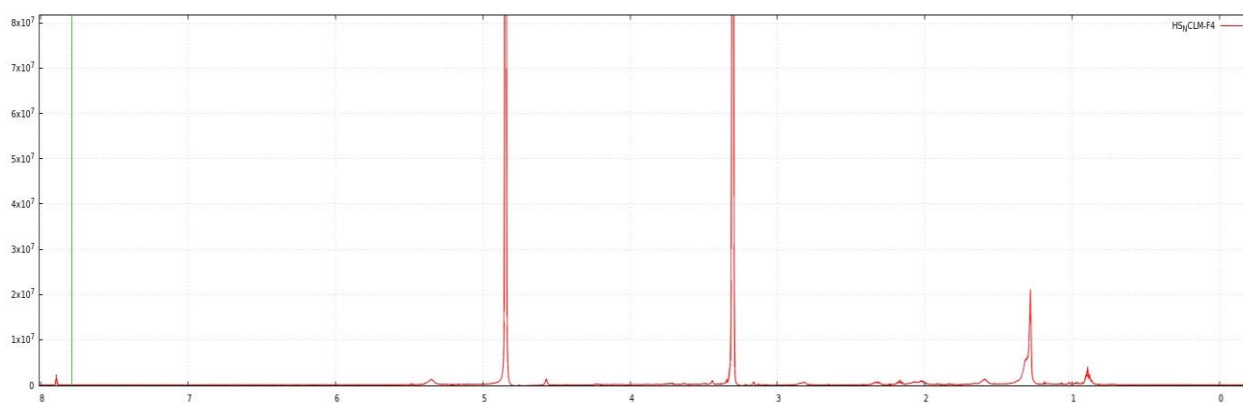


Figure S2. Spectre ¹H-RMN entre 0-8 ppm de la fraction F4 (issue de la VLC) de *Lobophora monticola*.

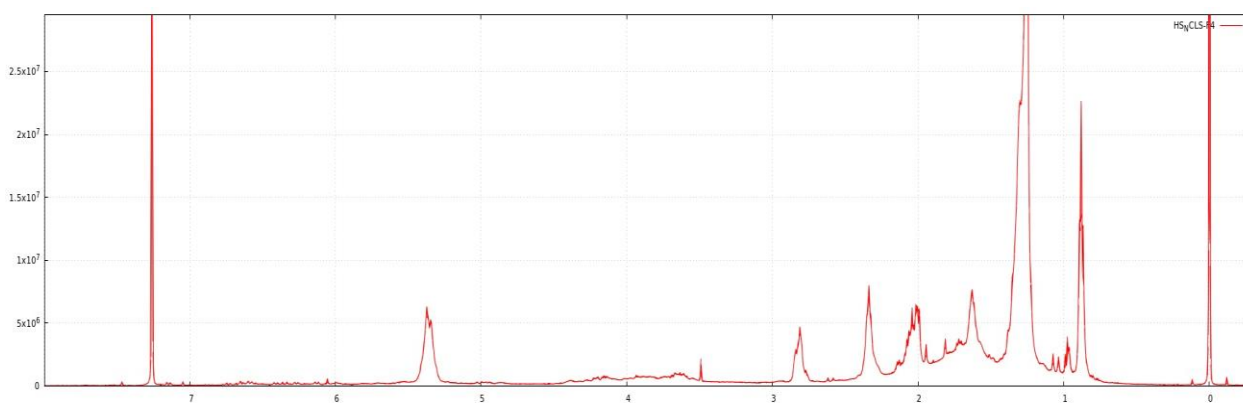


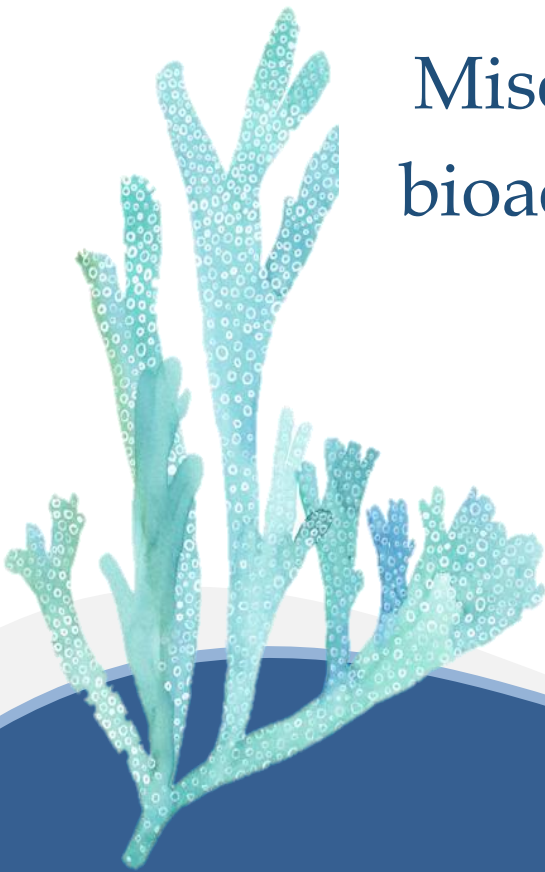
Figure S3. Spectre ¹H-RMN entre 0-8 ppm de la fraction F4 (issue de la VLC) de *Lobophora sonderii*.

Références

- Amsler, C.D. & Fairhead, V.A. (2005). Defensive and Sensory Chemical Ecology of Brown Algae. *Adv. Bot. Res.*, 43, 1–91.
- de Paula, J.C., Vallim, M.A. & Teixeira, V.L. (2011). What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae). *Brazilian J. Pharmacogn.*, 21, 216–228.
- Halsall, T.G. & Hills, I.. (1972). Isolation of Heneicosa- 1,6,9,12,15,18-hexaene and -1,6,9,12,15-pentaene from the Alga *Fucus vesiculosus*. *Chem. Commun.*, 5, 533–539.
- Shoubaky, G.A. El & Salem, E.A. (2014). Terpenes and Sterols Composition of Marine Brown Algae *Padina*. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.*, 6, 894–900.
- Stern, J.L., Hagerman, A.E., Steinberg, P.D. & Mason, P.K. (1996). Phlorotannins-protein interactions. *J. Chem. Ecol.*, 22, 1877–1899.
- Vieira, C., Camacho, O., Sun, Z., Fredericq, S., Leliaert, F., Payri, C., *et al.* (2017). Historical biogeography of the highly diverse brown seaweed *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 110, 81–92.
- Vieira, C., Thomas, O.P., Culioli, G., Genta-Jouve, G., Houlbrequé, F., Gaubert, J., *et al.* (2016). Allelopathic interactions between the brown algal genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) and scleractinian corals. *Sci. Rep.*, 6, 18637.
- Youngblood, W.W. & Blumer, M. (1973). Alkanes and alkenes in marine benthic algae. *Mar. Biol.*, 21, 163–172.

Chapitre 2

Mise au point des tests de
bioactivité sur les fractions
algales



Ce chapitre s'intéresse au potentiel de valorisation des fractions algales de *Lobophora* et rend compte des résultats des tests de bioactivités mis au point (I). Un suivi de la biomasse de *L. sonderii* et *L. rosacea* entrepris sur plusieurs mois de l'année durant la période d'étude est également présenté pour documenter l'abondance des populations dans un but de valorisation possible (II).

Les tests de criblage de bioactivité ont été réalisés sur trois espèces de *Lobophora* : *L. rosacea*, *L. monticola* et *L. sonderii*, facilement récoltables dans le lagon de Nouvelle-Calédonie. La première voie de valorisation retenue concerne des problèmes agricoles et économiques locaux touchant la Nouvelle-Calédonie. Parmi ceux-ci, on retrouve les champignons phytopathogènes qui infectent les fruits et légumes, la mouche des fruits qui entraînent des pertes dans les récoltes et la tique des bovins qui affaiblie voire conduit à la mort des bovins. L'Institut Agronomique Néo-Calédonien (IAC) est un organisme local participant au développement rural et à l'agriculture calédonienne. Cet institut est axé sur la recherche de moyen de lutte respectueux de l'environnement contre des organismes posant des dommages pour les agriculteurs et éleveurs, et donc l'économie du pays. Les axes de recherche prioritaires sont notamment centrés sur les trois cibles énumérées précédemment. Les tests de criblages sur ces cibles biologiques ont été effectués à la Station de Recherche Agronomique (SRA) de Pocquereux de l'IAC sur des extraits bruts de *L. sonderii* et *L. monticola*.

Dans un deuxième temps, nous avons considéré des cibles biologiques posant problème en santé humaine à plus large échelle. Il s'agit de bactéries ou levures ubiquitaires, fréquemment responsables de maladies nosocomiales et dont certaines souches présentent des résistances aux antibiotiques actuels et deviennent donc difficile à lutter. La recherche de nouveaux antibiotiques naturels pour lutter contre ces souches est donc un enjeu majeur. Les tests antimicrobiens ont été réalisés au laboratoire de microbiologie de l'Université de la Nouvelle-Calédonie (UNC) sur des fractions de *L. sonderii*, *L. monticola* et *L. rosacea*.

I- Recherche de bioactivités des extraits et fractions de *L. sonderii*, *L. rosacea* et *L. monticola*

A. Recherche d'activités pesticides à partir d'extraits bruts issus de *L. sonderii* et *L. monticola*

1. Contexte de l'étude

Des tests d'activités insecticides, attractives et répulsives sont effectués sur la mouche des fruits *Bactrocera tryoni*, aussi appelée mouche du Queensland du fait de son origine. Les mouches des fruits font partie de la famille des Tephritidae, pour laquelle 30 espèces sont répertoriées en Nouvelle-Calédonie. Les mouches des fruits sont parmi les ravageurs de cultures fruitières et légumières les plus importants dans le Monde. Les espèces de la sous-famille des Dacinae sont les seules à attaquer les fruits cultivés. Les Dacinae comprennent deux genres en Nouvelle-Calédonie : *Bactrocera* et *Dacus* (Mille 2010). Parmi les *Bactrocera*, trois espèces sont d'importance économique : *Bactrocera curvipennis* et *B. psidii*, deux espèces endémiques aux origines ancestrales australiennes et du Pacifique respectivement, et *B. tryoni*, la mouche du Queensland introduite accidentellement à la fin des années 60 en Nouvelle-Calédonie (Mille, 2010). Cette dernière est l'une des espèces les plus menaçantes dans le Monde sur le plan économique, avec plus de 240 hôtes répertoriées en Australie (Hancock *et al.* 2000). Elle fait donc tout naturellement l'objet de nombreuses études.

Les Mouches des fruits de la Famille des Tephritidae ont la particularité d'avoir un cycle de reproduction impliquant la ponte des œufs dans les fruits et légumes au cours de leur maturation (Mille 2010) d'où leur importance sur le plan économique. Des bactéries sont également transmises dans les fruits et légumes lors de la ponte des femelles, nuisant à leur bon développement. Les récoltes sont alors endommagées et impropres à la consommation et à la vente. Des moyens de luttés sont donc nécessaires pour protéger les cultures et la recherche d'insecticides respectueux de l'environnement s'impose. A l'heure actuelle, il existe une façon de piéger les mâles des trois espèces de *Bactrocera* (*B. curvipennis*, *B. psidii* et *B. tryoni*) grâce à des paraphéromones, le « cue-lure », combiné à un insecticide de contact. On parle de la méthode de Male Annihilation Technique (MAT) (Steiner & Lee, 1955). Les

paraphéromones sont des molécules non produites dans la nature pouvant induire des comportements comparables aux phéromones et autres substances chimiques. Cependant, cette technique de MAT ne fonctionne pas pour les mouches femelles qui sont les premières ravageuses de cultures. La recherche d'un insecticide efficace envers les femelles et respectueux de l'environnement est donc la priorité.

Des tests d'activités insecticides, attractives et répulsives sur la mouche des fruits *Bactrocera tryoni* ont ainsi été mis en place à la Station de Recherche Agronomique de Pocquereux depuis quelques années.

2. Activité insecticide sur la mouche des fruits

2.1. Matériel & méthodes

Ce biotest a été réalisé sur des extraits bruts de *L. sonderii* (484,5 mg) et *L. monticola* (485,1 mg) obtenus à l'aide d'un mélange méthanol/dichlorométhane (1 :1) après collectes en grandes quantités de ces deux algues au site de Ricaudy. Le test est effectué sur les extraits bruts car il nécessite une quantité importante de matériel biologique (100 mg).

Pour ce biotest, des mouches femelles accouplées *Bactrocera tryoni* sont réparties dans des cages (30 x 30 x 30 cm) à raison de 50 mouches par cage (voir Figure 25a). Ces mouches sont préalablement mises à jeûner durant 24 h avant le début du test avec une éponge imbibée d'eau dans chaque cage. Après 24 h de jeûne, l'éponge est retirée et les mouches mortes sont remplacées pour obtenir un total de 50 mouches vivantes par cage avant le début du test.

Chaque extrait algal est testé en triplicata à la concentration de criblage de 5 % et incorporé dans un mélange d'hydrolysate de protéines (attractif alimentaire couramment utilisé pour la lutte au champ), de sucre et d'eau (1,6 g de sucre, 400 mg d'hydrolysate et 100 mg d'extrait) (Figure 25b). La masse d'extrait brut algal utilisée est de 100 mg pour *L. sonderii* et *L. monticola* (soit environ 33 mg par réplique).

Chaque témoin est réalisé en duplicata. Le témoin positif se compose d'un appât associé à l'insecticide Sucess 4 ®. La substance active de cet insecticide, le spinosad, provient d'une bactérie du sol *Saccharopolyspora spinosa*. Il n'y a pas encore de résistance avérée sur cet

insecticide mais il y a un risque car les préconisations dans son utilisation se limitent à deux applications par saison. Cette préconisation peut être considérée comme un désavantage car en milieu tropical les besoins en traitements sont supérieurs à deux traitements par an (ou saison) ce qui oblige à utiliser d'autres molécules, d'où la nécessité de rechercher d'autres molécules d'origine naturelle (C. Mille, pers. com.).

Le témoin négatif est composé uniquement de l'appât (mélange de protéines, sucre et eau).

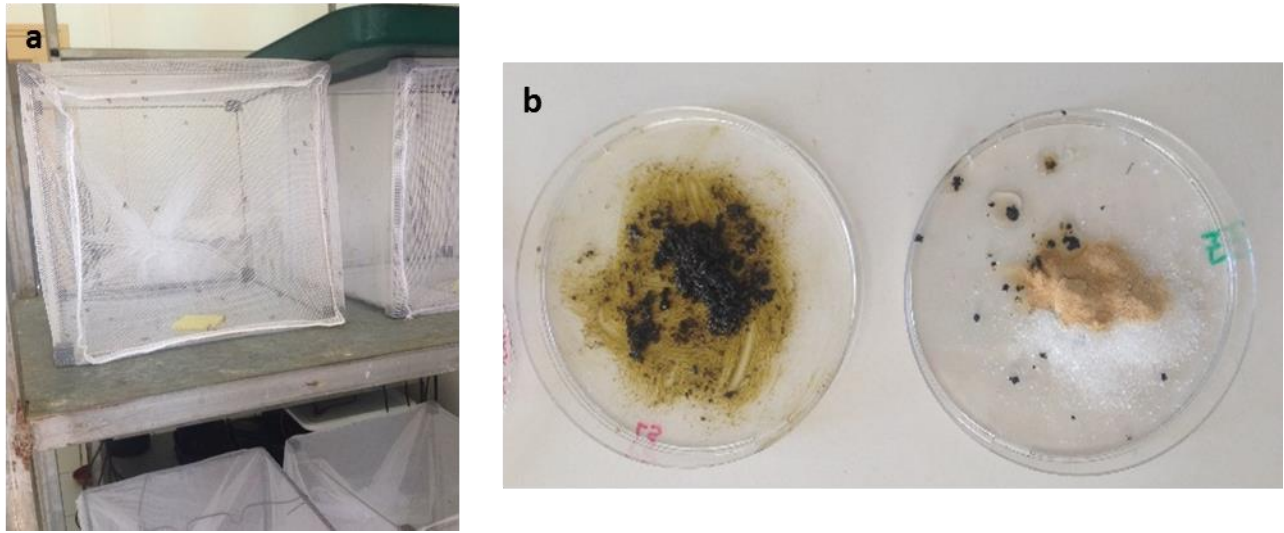


Figure 25. (a) cages utilisées pour les expériences et (b) préparation de la mixture contenant les extraits à tester dans les boîtes de pétri (© J. Gaubert).

La mortalité des mouches est estimée par comptage après 24h d'expérience. Les résultats sont ensuite standardisés par rapport aux témoins grâce à l'équation suivante :

$$\frac{M_{\text{extrait}} - M_{t-}}{M_{t+} - M_{t-}}$$

$$M_{t+} - M_{t-}$$

Avec M : la mortalité, $t+$: le témoin positif et $t-$: le témoin négatif.

Cette équation permet d'enlever la mortalité naturelle et de comparer les résultats obtenus à un insecticide connu.

2.2. Résultats et discussion

Après 24 h de test, les mouches mortes sont comptées dans chaque cage. Les résultats sont présentés dans le Tableau 9 et Figure 26.

Tableau 9. Nombres moyens de mouches mortes après 24 h en fonction de l'appât et mortalité standardisée par rapport aux témoins.

Appât	nombre moyen de mouches mortes	écart type	résultat standardisé
Extrait de <i>L. sonderii</i>	12,33	2,08	-0,076
Extrait de <i>L. monticola</i>	14,67	2,08	-0,010
Témoin -	15	2,83	-
Témoin +	50 (100%)	0	-

Quels que soient les extraits testés, le nombre moyen de mouches mortes par cage était du même ordre de grandeur ($12,33 \pm 2,08$ pour *L. sonderii* et $14,67 \pm 2,08$ pour *L. monticola*) que le contrôle (témoin négatif, mélange de protéines, sucre et eau ; $15 \pm 2,83$). De plus, les valeurs pour les résultats standardisés (-7.6% pour *L. sonderii* et -1 % pour *L. monticola*) sont négatives, il n'y a donc pas de mortalité des mouches induite par les deux extraits d'algues testés. A l'inverse, l'insecticide Success 4 ® (témoin positif) a entraîné la mort de toutes les mouches de la cage.

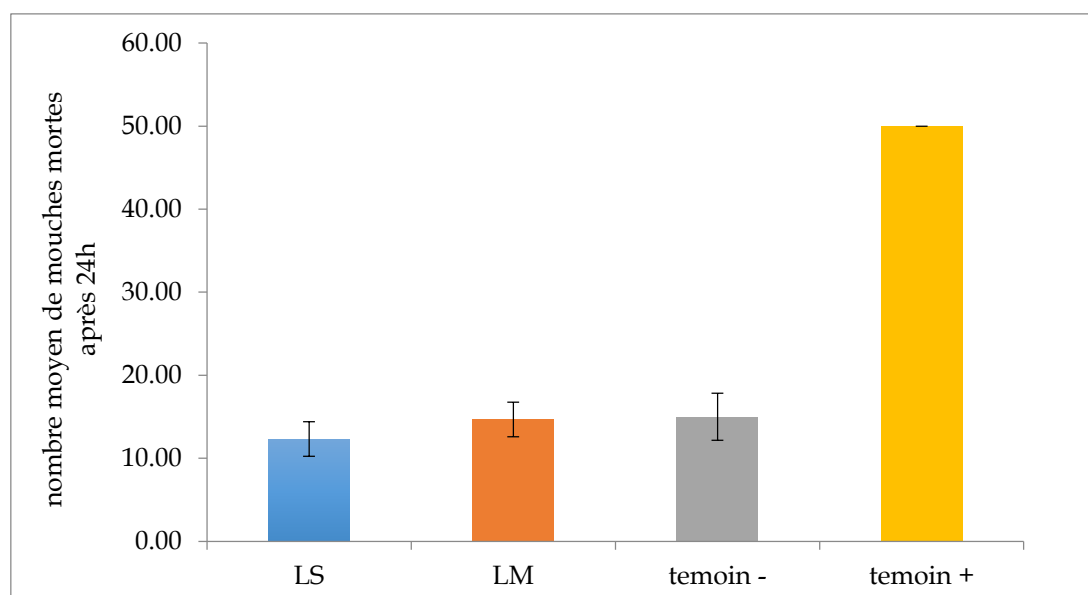


Figure 26. Nombre moyen de mouches mortes après 24 h en fonction de l'appât proposé dans les cages (LS : *L. sonderii*, LM : *L. monticola*). Témoin - : mélange de protéines, sucre et eau ; témoin + : insecticide Success 4 ®.

3. Activités attractives et répulsives

Comme pour le test insecticide, les tests de bioactivité attractives et répulsives sont réalisés sur 50 mouches femelles accouplées par cage avec les extraits bruts de *L. sonderii* et *L. monticola*. Cependant, celles-ci ne sont pas affamées durant 24 h avant l'expérience. De plus, une éponge imbibée d'eau reste dans les cages au cours de l'expérience.

3.1. Matériel & méthodes

3.1.1. Test d'attraction

Ce test s'effectue en triplicata pour les extraits étudiés et en duplicata pour les témoins. Pour cela, un coton dentaire est déposé dans chaque boîte de Pétri, puis l'ensemble est recouvert de colle (SOVEURODE® Aérosol de Sovilo, Reims AE84001, France) sur laquelle les mouches seront piégées si elles sont attirées par l'appât. Après quelques minutes de repos afin de limiter les odeurs de colle, 5 μ L des solutions d'extraits bruts à 30 mg/mL sont déposés sur chaque coton dentaire. Pour le témoin négatif, 5 μ L d'eau distillée sont déposés sur les cotons tandis que pour le témoin positif, 0,5 g d'un mélange d'hydrolysate de protéines et de sucre ont été déposés directement dans les boîtes de Pétri.

Les mouches attirées par les extraits ou l'hydrolysate de protéines vont donc se poser sur la boîte de Pétri ou le coton dentaire et y rester piégées dans la colle (voir Figure 27). Ces dernières sont comptées au bout de 7 min, puis toutes les heures durant les quatre premières heures, et à la fin de l'expérience, au bout de 8 heures.



Figure 27. (a) Aperçu de la cage : les mouches attirées par la substance sur le coton dentaire restent collées dans la boîte de Pétri. (b) Boîte de Pétri recouverte de colle et contenant le coton dentaire sur lequel l'extrait à tester est déposé (© J. Gaubert).

3.1.2. Test de répulsion

Ce test s'effectue en triplicata pour les extraits étudiés et en duplicata pour les témoins, toujours en boîte de Pétri. Pour tester l'effet répulsif des extraits bruts des deux algues (*L. sonderii* et *L. monticola*), 5 µL d'une solution d'extrait brut à 30 mg/mL de *L. sonderii* ou *L. monticola* ont été déposés sur un appât alimentaire à base d'hydrolysate de protéines et de sucre, auquel est ajouté un insecticide naturel : le Success 4®. Le témoin positif est constitué de l'appât et du Success 4®. Le témoin négatif contient uniquement l'appât. Les boîtes de Pétri sont rapidement disposées dans chaque cage.

L'expérience se déroule sur 24 h, puis le nombre de mouches mortes par cage est compté. Si les mouches se sont nourries de l'appât, il n'y a donc pas d'effet répulsif de l'extrait déposé sur l'appât, ce qui engendre une forte mortalité. Dans le cas contraire, la mortalité est faible et témoigne d'une activité répulsive de l'extrait concerné.

3.2. Résultats et discussion

3.2.1. Test d'attraction

Le Tableau 10 et la Figure 28 donnent le nombre moyen et les écarts types (ET) de mouches collées par cage en fonction du temps, pour les extraits algaux testés (*L. sonderii* et *L. monticola*) et les témoins.

Tableau 10. Nombre moyen (moy) de mouches piégées (et écarts types) dans les boîtes de Pétri contenant les extraits à tester ou les conditions témoins en fonction du temps.

éch/ temps (min)	7	60	120	180	240	480
	moy ET	moy ET	moy ET	moy ET	moy ET	moy ET
<i>L. sonderii</i>	14,33 4,04	19,33 0,58	22,00 1,73	23,33 0,58	25,00 2,65	27,00 3,61
<i>L. monticola</i>	9,67 2,31	15,67 2,52	18,33 1,15	19,67 3,51	21,00 4,58	27,00 4,58
témoin -	2,50 2,12	5,00 2,83	8,50 6,36	14,50 9,19	19,00 9,90	29,50 9,19
témoin +	6,50 0,71	10,50 0,71	14,50 0,71	18,00 2,83	19,00 2,83	27,50 4,95

Etant donné le faible nombre de réplicas des tests préliminaires réalisés sur les extraits bruts algaux, nous ne pouvons effectuer de tests statistiques et resterons donc dans une approche descriptive des résultats.

Au début de l'expérience (entre $t = 7$ et $t = 120$ min), les extraits algaux de *L. sonderii* et *L. monticola* semblaient attractifs par rapport au témoin, avec une attractivité plus forte de *L. sonderii* (entre 14,33 et 22 mouches piégées) par rapport à *L. monticola* (entre 9,67 et 18,33 mouches piégées). L'attraction du témoin positif varie de 6,5 à 14,5 mouches piégées par cage durant les 120 premières minutes. Cependant, à partir de 180 min, l'attraction due aux extraits algaux ne semble plus être différente de celle des témoins.

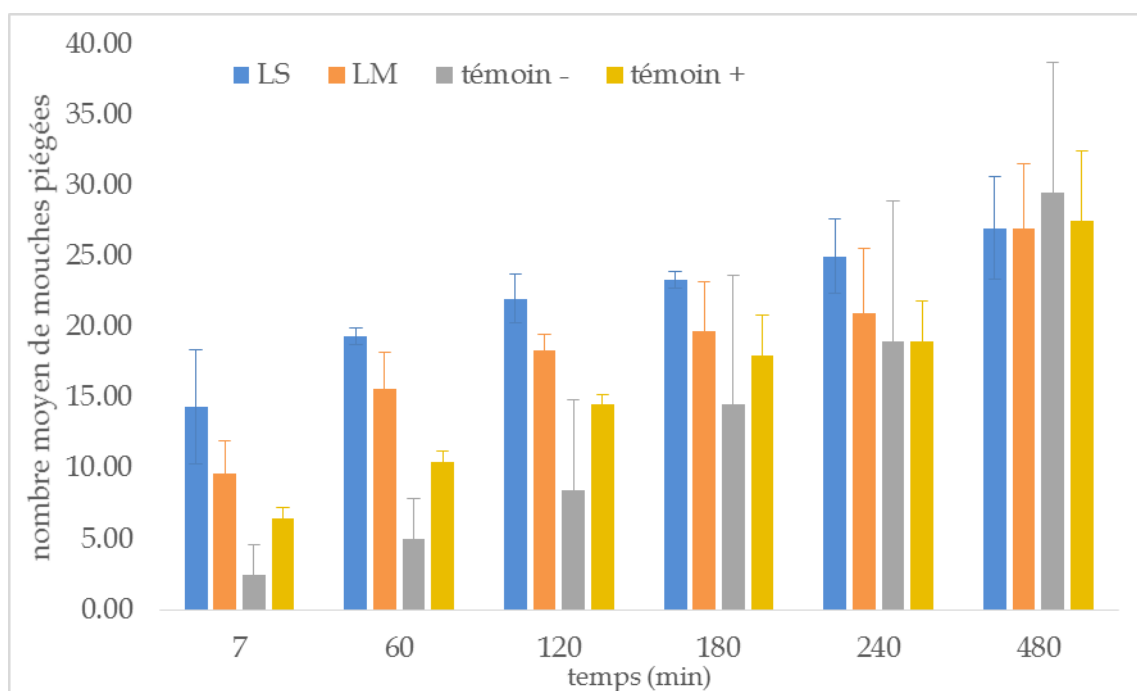


Figure 28. Nombre moyen de mouches piégées dans les boîtes de Pétri contenant les extraits à tester et les conditions témoins en fonction du temps (LS : *L. sonderii*, LM : *L. monticola*). Témoin - : eau distillée ; témoin + : hydrolysate de protéines et de sucre.

A la fin de l'expérience, autant de mouches piégées sont dénombrées pour les extraits algaux (27 mouches en moyenne) que les témoins, aussi bien positifs (27,5) que négatifs (29,5). Nous aurions dû avoir beaucoup moins de mouches collées pour le témoin négatif, constitué simplement d'eau. Il est possible que les mouches aient été attirées par le coton dentaire.

L'expérience a en effet été réalisée sur des mouches femelles accouplées et il a été observé que celles-ci étaient animées par l'envie de pondre et étaient donc plus actives, ce qui augmente la probabilité qu'elles se collent sur l'appât. Il aurait fallu réaliser une autre expérience sur des mouches non accouplées pour comparer les résultats. De plus, les écarts types sont élevés entre les deux duplicatas des témoins négatifs, ce qui aurait nécessité la présence d'un triplicata de témoins *a minima*.

3.2.2. Test de répulsion

Les résultats des comptages du nombre de mouches piégées sur l'appât après 24 h de contact sont présentés dans la Figure 29.

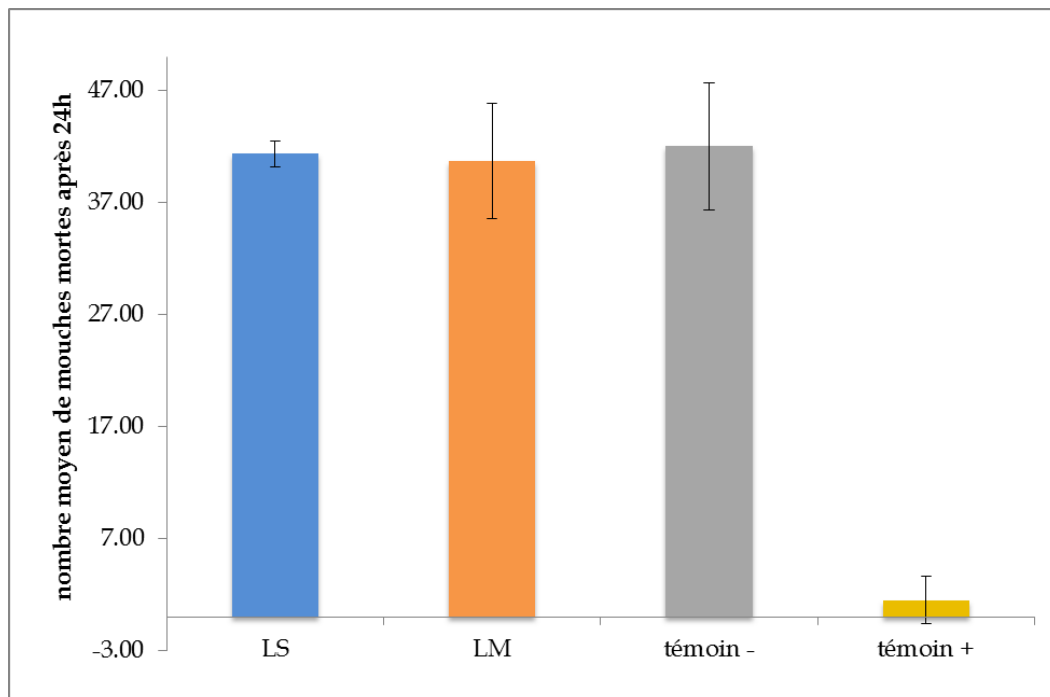


Figure 29. Nombre moyen de mouches mortes après 24 h d'exposition et en fonction de l'appât testé (LS : *L. sonderii*, LM : *L. monticola*). Témoin - : hydrolysate de protéines et de sucre; témoin + : hydrolysate de protéines et de sucre mélangé à l'insecticide Success 4®.

Aucun effet de répulsion n'est observé pour les deux extraits algaux testés, ce qui soutient l'hypothèse d'un effet attractif des extraits dans les premières heures de mise en contact avec les mouches (voir résultats de la section 3.2.1 précédente). En effet, le nombre de mouches mortes obtenu par cage après 24 h d'exposition ne varie pas de manière significative entre le

contrôle (témoin- ; appât constitué d'hydrolysate de protéines et de sucre) et les extraits bruts de *L. sonderii* et de *L. monticola* ($42 \pm 5,66$; $41,33 \pm 1,15$ et $40,67 \pm 5,13$ respectivement).

4. Discussion générale

Au cours de ces différents tests sur la mouche des fruits *Bactrocera tryoni*, nous n'avons observé ni activité insecticide ni effet de répulsion des extraits bruts de *L. monticola* et *L. sonderii*. Seul un effet attractif a été observé pour ces deux extraits bruts durant les 120 premières minutes d'exposition. Cependant, ces tests sont préliminaires et trop peu de réplicas ont été réalisés pour tirer des conclusions robustes. Ces tests d'activité, notamment celui de répulsion, mériteraient d'être réitérés avec un plus grand nombre de réplicas pour mettre en évidence une potentielle bioactivité des extraits bruts des deux espèces de *Lobophora*. Des tests sur des fractions seraient également nécessaires pour compléter ceux sur les extraits bruts. En effet, les activités des fractions ou composés purs peuvent être différentes de celles des extraits bruts.

Depuis les années 1980, de nombreuses études ont montré des effets insecticides, nématocides et larvicides d'extraits de macroalgues appartenant aux trois grands groupes (Phaeophyceae, Chlorophyceae et Rhodophyceae). A notre connaissance une seule étude concerne les mouches et notamment la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster*, espèce toutefois bien différente de la mouche des fruits (Pegoraro Zemolin *et al.* 2014).

La majorité des études ont été réalisées sur les moustiques *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus* et *Aedes aegypti*, notamment sur leurs larves (*e.g.* Crews *et al.* 1984; Watanabe *et al.* 1989b, 1990).

Des travaux ont également montré des effets insecticides à partir d'extraits de *Lobophora variegata* collectés au Brésil et au Sud-Ouest de l'Inde (l'identité de l'espèce restant toutefois à vérifier puisque ces études datent d'avant la mise à jour de la richesse en espèces du genre *Lobophora*). Une activité larvicide de l'extrait dichlorométhane/méthanol de *L. variegata* a été mise en évidence sur *A. aegypti* (Bianco *et al.* 2013) et des activités pupicides et nématocides ont été trouvées sur les extraits méthanoliques (Manilal *et al.* 2012).

De nombreuses autres recherches ont mis en évidence des activités larvicides de fractions d'algues brunes, rouges et vertes chez les moustiques. La revue de Yu *et al.* (2014) répertorie les composés bioactifs majeurs issus d'algues et leur potentiel anti-moustique. Des activités insecticides et acaricides sur d'autres cibles (blattes, tiques, brassicaires...) ont été trouvées chez des algues marines et sont résumées dans le Tableau 11.

Tableau 11. Activités insecticides, nématocides et acaricides reportées chez les macroalgues marines (C : Chlorophyceae, P : Phaeophyceae, R : Rhodophyceae).

Algues	Cibles biologiques	Molécule/types d'extraits	Références
<i>Lobophora variegata</i> (P)	Moustiques <i>Culex quinquefasciatus</i> et nématode <i>Meloidogyne javanica</i>	extrait MeOH	Manilal <i>et al.</i> 2012
<i>Lobophora variegata</i> (P)	Larves de moustiques <i>Aedes aegypti</i>	Extrait CH ₂ Cl ₂ /MeOH	Bianco <i>et al.</i> 2013
<i>Laurencia obtuse</i> (R), <i>Padina vickerisiae</i> (P), <i>Liagora farinosa</i> (R), <i>Liagora elongata</i> and <i>Stypopodium lobatum</i> (P)	<i>Boophilus microplus</i> (tique)	Extraits bruts EtOH	Williams 1991
<i>Plocamium cartilagineum</i> (R)	Chrysomèle des racines du maïs: <i>Diabrotica Undecimpunctata</i> ; Cicadelle: <i>Macrostoteles pacifrons</i> ; puceron noir de la fève: <i>Aphis fabae</i>	Violacène (Monoterpène)	San-Martin <i>et al.</i> 1991
<i>Chondria armata</i> (R)	Blatte américaine <i>Periplaneta Americana</i> , mouches domestiques	Acides isodomoïques	Maeda <i>et al.</i> 1984
<i>Plocamium telfairiae</i> (R)	Larves de moustiques : <i>Culex pipiens pallens</i> et blatte germanique : <i>Blatella germanica</i>	Apysiatérpénoïde A et telfairine (monoterpènes polyhalogéné)	Watanabe <i>et al.</i> 1989a, 1990

23 espèces d'algues rouges (R)	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> , <i>T. cruzi</i> , <i>Leishmania donovani</i> et <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Extraits bruts	Allmendinger <i>et al.</i> 2010
<i>Prasiola crispa</i> (C)	<i>Drosophila melanogaster</i> et <i>Nauphoeta cinerea</i>	Méthanol, éthanol, éthyl acétate	Pegoraro Zemolin <i>et al.</i> 2014
<i>Dictyota dichotoma</i> (P) et <i>Hypnea pannosa</i> (R)	Meloidogyne (nématode) <i>Meloidogyne javanica</i>	Dichlorométhane: méthanol (1:1)	Manilal <i>et al.</i> 2009
<i>Laurencia pinnata</i> (R)	Lépidoptères du chou : <i>Mamestra brassicae</i>	Laurepinnacine et isolaurepinnacine (éthers cycliques)	Fukuzawa & Masamune 1981
<i>Laurencia papillosa</i> (R)	Larves de <i>Tribolium confusum</i> et larves de moustiques <i>Culex pipiens</i>	cyclique enyne (12E)-cis-maneonene-E (acétogénine)	Abou-Elnaga <i>et al.</i> 2011
<i>Plocamium cartilagineum</i> (R)	Sphinx de la tomate : <i>Tuta absoluta</i> (Povolny) et aphide des céréales <i>Schizaphis graminum</i>	monoterpènes halogénés, (mertensène et violacène), et deux dérivés dibromomertensène et dihydromertensène	Argandoña <i>et al.</i> 2000
<i>Plocamium cartilagineum</i> (R) or <i>P. violaceum</i> (R)	Sphinx du tabac : <i>Manduca sexta</i> ; larves de moustiques <i>Aedes</i>	Extraits bruts, monoterpènes	Crews <i>et al.</i> 1984

B. Recherche d'activité antifongique d'extraits bruts issus de *L. sonderii* et *L. monticola*

1. Contexte et motivation de l'étude

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) est un champignon ascomycète pathogène décrit pour la première fois par Penzing en 1882. Ce champignon fait partie des principaux pathogènes de plantes dans le monde entier. Ce phytopathogène affecte notamment les fruits tropicaux comme la papaye et la mangue, mais également les tomates, les olives et bien d'autres, posant des problèmes agricoles et économiques (Crimp *et al.* 2016). *Colletotrichum gloeosporioides* provoque ce que l'on appelle l'antracnose, qui peut être assimilée à une mycose : les fruits ou légumes infectés présentent des taches brunes et les nécroses peuvent s'étendre jusqu'à la pourriture du fruit, diminuant de ce fait les rendements de récolte. La dissémination du champignon se fait via la dispersion des spores par le vent, les eaux de ruissellement ou la pluie (Nelson 2008). Des travaux menés par Chakraborty & Datta (2003) ont montré que la fécondité de *C. gloeosporioides* augmentait avec une élévation de CO₂. Ces résultats appuient la nécessité de trouver des antifongiques efficaces contre ce phytopathogène notamment dans le contexte de changement climatique et l'augmentation de CO₂ d'origine anthropique.

2. Matériel & méthodes

Des tests de bioactivité antifongiques contre *C. gloeosporioides* ont été mis en place à la Station de Recherche Agronomique (SRA) de Pocquereux. Comme pour les tests sur la mouche des fruits, les tests antifongiques nécessitent au moins 100 mg de matériel biologique. Ils ont été réalisés sur les extraits bruts de *L. sonderii* (484,5 mg) et *L. monticola* (485,1 mg) obtenus à l'aide d'un mélange méthanol/dichlorométhane (1 :1) après collectes en grandes quantités de ces deux algues au site de Ricaudy.

2.1. Biotests antifongiques par disque de diffusion

Une souche mère de conidies de *C. gloeosporioides* à 10^7 conidies/mL a été préparée.

Tout d'abord, plusieurs dilutions des extraits bruts de *L. sonderii* (LS) et *L. monticola* (LM) à tester ont été réalisées dans l'éthanol à 95 % : 150 mg/mL (LSb & LMb), 100 mg/mL (LSa et c & LMa & c), 50 mg/mL (LSd & LMd) et 30 mg/mL (LSe & LMe) (voir Tableau 12 récapitulatif).

Des disques de diffusion ont été imbibés avec 10 μ L de chacune de ces dilutions pour les deux algues à tester. Les manipulations se faisant en triplicata, trois disques par extrait ont été imbibés. Les témoins négatifs sont constitués de disques imbibés avec 10 μ L d'éthanol à 95 % et les témoins positifs sont imprégnés de 10 μ L de triazol 0,1% (= propiconazol = Tilt), un antifongique à large spectre agissant sur les parois cellulaires.

Durant le séchage des disques sous hotte (1 h), les boîtes de Pétri contenant un milieu de culture PDA (Potatoe Dextrose Agar) sont inoculées avec 200 μ L d'une suspension de conidies à 10^5 /mL. Après séchage, les disques de diffusion préparés précédemment sont déposés sur chaque boîte selon le schéma de la Figure 30. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à l'étuve à 25°C, à l'obscurité, pendant 4 à 7 jours. Le diamètre d'inhibition autour de chaque disque est ensuite mesuré pour évaluer l'activité antifongique des extraits algaux testés.

Tableau 12. Récapitulatif des concentrations ou masses de chaque échantillon utilisées pour les tests.

échantillons	Concentration (mg/mL)	Quantité d'extrait / disque (μ g)	Quantité d'extrait / puits (μ g)	Concentration finale de conidies / puits
LS /LM a & c	100	1000	200	10^5 /mL
LS/LM b	150	1500	300	10^5 /mL
LS/LM d	50	500	100	10^5 /mL
LS/LM e	30	300	60	10^5 /mL

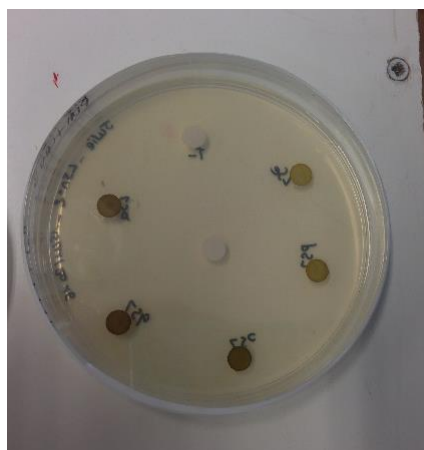


Figure 30. Disques de diffusion imprégnés des substances à tester, milieu de culture PDA sur Boite de Pétri (témoin positif : au centre et témoin négatif en haut) (© J. Gaubert).

2.2. Biotest antifongique en microplaque 96 puits

Ce biotest a été réalisé en microplaque 96 puits suivant le protocole en cours d'essai par la SRA à Pocquereux.

Une solution de conidies à 10^6 /mL a été préparée. La plaque a ensuite été réalisée selon le schéma à la Figure 31.

	T-	T+	LSa	LSb	LSc	LSd	LSe	LMa	LMb	LMc	LMd	LMe
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Témoin milieu 200 μ L de NB	+ 180 μ L de NB 20 μ L de suspension de conidies à 10^6 /mL	198 μ L de NB + 2 μ L échantillons : témoins pour la couleur des échantillons									
B			178 μ L de NB	178 μ L de NB	178 μ L de NB	178 μ L de NB	178 μ L de NB	178 μ L de NB	178 μ L de NB	178 μ L de NB	178 μ L de NB	178 μ L de NB
C			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D			20 μ L de conidies*	20 μ L de conidies*	20 μ L de conidies*	20 μ L de conidies*	20 μ L de conidies*	20 μ L de conidies*	20 μ L de conidies*	20 μ L de conidies*	20 μ L de conidies*	20 μ L de conidies*
E			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F			2 μ L d'extrait à tester E1	2 μ L d'extrait à tester E2	2 μ L d'extrait à tester E3	2 μ L d'extrait à tester E4	2 μ L d'extrait à tester E5	2 μ L d'extrait à tester E6	2 μ L d'extrait à tester E7	2 μ L d'extrait à tester E8	2 μ L d'extrait à tester E9	2 μ L d'extrait à tester E10
G												
H												

Figure 31. Schéma de préparation de la microplaque 96 puits pour le test antifongique (* suspension de conidies à 10^6 /mL)

Les échantillons d'algues à tester sont donc dilués au 100^{ème} dans les puits par rapport aux concentrations testées sur les disques de diffusion en gélose. Les concentrations d'extraits bruts suivantes ont été testées pour *L. sonderii* et *L. monticola* : 1,5 mg/mL (LSb & LMb), 1 mg/mL (LSa et c & LMa & c), 0,5 mg/mL (LSd & LMd) et 0,3 mg/mL (LSe & LMe) (voir Tableau 12).

3. Résultats & discussion

Après 48 h d'incubation, le champignon avait totalement envahi les boîtes de Pétri et n'a donc pas été inhibé par les extraits algaux. Concernant les tests en microplaques, des difficultés ont été rencontrées. Dans la préparation de la 1^{ère} plaque, les extraits ont été déposés en premier, puis le milieu de culture et enfin les conidies, afin d'éviter que les conidies ne commencent à germer durant la manipulation. Cependant, les extraits ne se sont pas correctement mélangés dans les puits et ont formé des dépôts non homogènes, altérant complètement les mesures de DO, malgré une agitation prolongée (voir Figure 32).

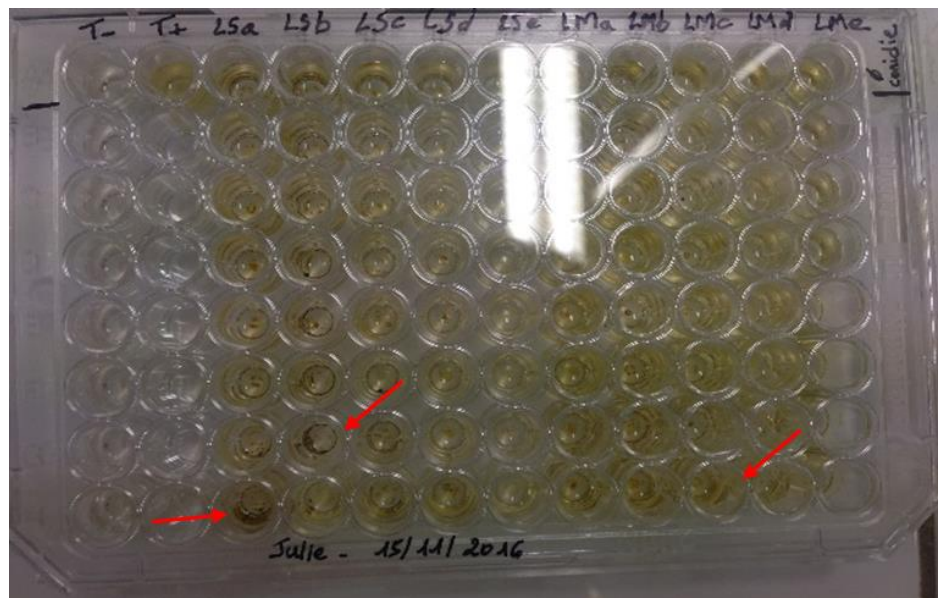


Figure 32. Plaque 96 puits contenant les extraits à tester et les témoins positifs et négatifs. Nous pouvons observer la présence de dépôt dans les puits correspondant aux extraits algaux les plus concentrés (© J. Gaubert).

Une autre plaque avec seulement deux échantillons à tester de *L. sonderii* (les moins concentrés, c'est-à-dire LSd et LSe) a été refaite, en prenant soin de déposer les extraits à tester en dernier. Les puits étaient alors plus homogènes que la première plaque, cependant de légers précipités d'extraits étaient visibles. Les mesures de DO étaient également altérées : trois mesures consécutives ont été effectuées et montraient des résultats totalement différents, avec d'importantes variations entre réplica. Le champignon se développant en formant des agrégats altère complètement les mesures de DO. Les tests en microplaques ont été abandonnés à ce stade. La culture en microplaque ne semble pas adaptée au test sur les champignons, qui à l'inverse des bactéries, se développent mal en suspension liquide.

Bien qu'aucun effet antifongique n'ait été observé à la suite de ce premier screening, plusieurs études ont mis en évidence des activités antifongiques issues d'extraits d'algues brunes, vertes et rouges dans d'autres travaux. Le Tableau 13 répertorie ces études.

Contrairement aux résultats obtenus dans la présente étude, plusieurs travaux ont montré une activité antifongique des fractions MeOH ou CH₂Cl₂/MeOH du genre *Lobophora* sur des espèces de champignons différentes de celle étudiée ici (champignons marins, champignons pathogènes chez l'humain et les animaux, et levures responsables d'infections humaines) (Val *et al.* 2001; Kubanek *et al.* 2003; Engel *et al.* 2006). Il faudrait cependant compléter la présente étude en analysant les fractions algales (eau, MeOH et CH₂Cl₂) des deux espèces (*L. sonderii* et *L. monticola*). En effet, il peut ne pas y avoir d'activité observée (ou très peu) sur les extraits bruts mais une activité sur une ou plusieurs sous-fractions. Ceci peut s'expliquer par le fait que dans un mélange (ou un extrait brut), une synergie ou cohésion entre molécules est possible alors qu'en fractionnant ce mélange, nous réalisons une séparation de certaines molécules et des composés particuliers peuvent alors présenter une activité.

Bien que plusieurs études sur l'effet antifongique des macroalgues aient été réalisées, notamment chez les algues brunes, aucune publication sur la cible fongique *Colletotrichum gloeosporioides* n'a été trouvée.

Dans plusieurs des travaux menés sur un lot d'espèces d'algues différentes, les algues brunes se sont avérées les plus actives contre les champignons testés. C'est notamment le cas dans les expériences menées par Stirk *et al.* (2007), où les algues du genre *Dictyota* étaient les

plus actives contre *Candida albicans*. Sur 31 espèces d'algues analysées, les Phaeophyceae étaient les plus actives contre un champignon pathogène des plantes et une levure (Pesando & Caram, 1984). De même, sur 18 espèces d'algues, trois algues brunes se sont révélées actives contre la moisissure du cuir (Khaleafa *et al.* 1975). Enfin, Caccamese & Azzolina (1979) ont mis en évidence une activité plus forte contre un champignon et une levure chez les Dictyotales, les Fucales (Phaeophyceae) et les Ceramiales (Rhodophyceae).

Tableau 13. Activités antifongiques reportées chez les macroalgues marines (C : Chlorophyceae, P : Phaeophyceae, R : Rhodophyceae).

Algues	Cibles biologiques	Molécules/types d'extraits	Références
<i>L. variegata</i> (P)	<i>Dendryphiella salina</i> , <i>Halophytosphora spinosa</i>	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (divisé entre partie lipophile (EtOAc) et hydrophile (H ₂ O))	Engel <i>et al.</i> 2006
<i>L. variegata</i> (P)	<i>Dendryphiella salina</i> , <i>Lindra thalassiae</i> , <i>Candida albicans</i>	Lobophorolide	Kubanek <i>et al.</i> 2003
<i>L. variegata</i> (P)	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MeOH	Val <i>et al.</i> 2001
Dictyotales (P)	Champignons pathogènes de l'Homme & phytopathogènes (plantes & arbres)	hexane	Moreau <i>et al.</i> 1988
3 Chlorophyta (<i>Ulvothrix</i> , <i>Enteromorpha intestinalis</i> , <i>Ulva lactuca</i> , <i>Cladophora rupestris</i>); 3 Heterokontophyta (<i>Phaeophyceae</i> , <i>Ascomycota</i> <i>nodosum</i> , <i>Sargassum muticum</i> , <i>Ectocarpus siliculosus</i>); et 3 Rhodophyta, (<i>Florideo- phyceae</i> , <i>Chondrus crispus</i> , <i>Laurencia pinnatifida</i> , <i>Polysiphonia lanosa</i>).	3 champignons marins: <i>Corollospora maritima</i> , <i>Lulworthia sp.</i> , and <i>Dendryphiella salina</i> ,	Aqueux, EtOH, CH ₂ Cl ₂	Hellio <i>et al.</i> 2004
<i>Caulerpa racemosa</i> var. <i>laetevirens</i> (C), <i>Codium capitatum</i> (C), <i>Halimeda</i>	<i>Candida albicans</i>	MeOH	Stirk <i>et al.</i> 2007

<i>cuneata</i> (C), <i>Ulva fasciata</i> (C), <i>Amphiroa bowerbankii</i> (R), <i>Amphiroa ephedraea</i> , et <i>Dictyota humifusa</i> (P)			
31 espèces (<i>Chlorophyta</i> , <i>Heterokontophyta</i> and <i>Rhodophyta</i>)	Champignons pathogènes (dermatophytes, levures et moisissures)	EtOH	Pesando & Caram 1984
18 espèces (<i>Chlorophyta</i> , <i>Heterokontophyta</i> and <i>Rhodophyta</i>)	Moisissures du cuir: <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>Penicillium glaucum</i> et <i>P. olivaceum</i>	H ₂ O, alcool, ether	Khaleafa <i>et al.</i> 1975
63 espèces (<i>Chlorophyta</i> , <i>Heterokontophyta</i> et <i>Rhodophyta</i>)	Une levure et un champignon		Caccamese & Azzolina, 1979
13 espèces (<i>Chlorophyta</i> , <i>Heterokontophyta</i> et <i>Rhodophyta</i>)	Champignon pathogène de plantes: <i>Phoma tracheiphila</i>	lipides	Caccamese <i>et al.</i> 1981
44 espèces (<i>Chlorophyta</i> , <i>Heterokontophyta</i> et <i>Rhodophyta</i>)	2 levures: <i>Candida albicans</i> & <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et un champignon filamenteux: <i>Aspergillus fumigatus</i>	MeOH	Val <i>et al.</i> 2001
<i>Cystoseira tamariscifolia</i> (P)	Champignons pathogènes de plantes: <i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Fusarium oxysporum</i> ; <i>Verticillium albo-atrum</i>	Hexane, éthyl, éther et CH ₂ Cl ₂	Abourriche <i>et al.</i> 1999
<i>Cystoseira tamariscifolia</i> (P)	Champignon pathogène de la tomate: <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>mycopersici</i> et <i>Verticillium albo-atrum</i> .	méroditerpénoïde	Bennamara <i>et al.</i> 1999
<i>Odonthalia corymbifera</i> (R)	<i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , et <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .	bromophénols	Oh <i>et al.</i> 2008
<i>Cystoseira compressa</i> (P), <i>Cystoseira crinita</i> , <i>Cystoseira sedoides</i> , <i>Gelidium latifolium</i> (R), <i>Dictyopteris membranacea</i> (P) et <i>Halurus equisetifolius</i> (R)	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida dubliniensis</i> et <i>Candida kefyr</i>	Ether de pétrole, chloroforme, éthyl acétate et méthanol	Mhadhebi <i>et al.</i> 2012

1. Contexte de l'étude

Les tiques sont des arthropodes appartenant à la classe des Arachnides et à l'ordre des Acarina. Parmi les Acarina se distinguent les tiques et les acariens. Le sous-ordre des Ixodina comprend les tiques à cuticule au moins en partie dure (dite chitinisée), qui ont pour la plupart une importance vétérinaire. Le sous-ordre des Argasina comprend quant à lui les tiques à cuticule molle.

Les tiques sont des parasites hématophages : elles vivent au dépend d'animaux supérieurs vertébrés en se nourrissant de leur sang (Barré & Delathière, 2010).

En Nouvelle-Calédonie, on répertorie trois espèces de tiques natives :

- *Amblyomma laticaudae* retrouvée sur le tricot-rayé (serpent marin) ; cette espèce de tique a la particularité de pouvoir supporter des immersions prolongées en milieu marin.

- *Alectorobius capensis* et *Amblyomma loculosum* retrouvées sur des oiseaux marins (Barré & Delathière, 2010). Ces espèces de tiques colonisent habituellement les nids des oiseaux et prennent leur repas de sang lorsque ces derniers rentrent au nid.

Les tiques posant des problèmes vétérinaires actuels en Nouvelle-Calédonie ont été introduites par l'homme en même temps que l'introduction des mammifères terrestres, notamment domestiques. Une introduction importante de tiques date notamment de la dernière guerre mondiale, avec l'importation de chevaux et de bétail par l'armée américaine.

Trois espèces de tiques ont ainsi été introduites en Nouvelle-Calédonie :

- *Rhipicephalus sanguineus*, tique cosmopolite, plutôt inféodée aux chiens et chats domestiques.

- *Haemaphysalis longicornis*, tique introduite avec ses hôtes (chiens, herbivores) en provenance d'Australie et de Nouvelle-Zélande. Bien que peu pathogène, elle se retrouve parfois en quantité sur le bétail à certaines saisons.

- *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ou « tique du bétail », originaire d'Asie, fut introduite en 1942 durant la dernière guerre mondiale par les Américains via des chevaux, des mules ou des litières d'animaux en provenance d'Australie (Barré & Delathière, 2010). C'est actuellement l'espèce qui pose le plus de problèmes vétérinaires sur le territoire calédonien puisqu'elle affecte les élevages de bétail et entraîne donc des problèmes économiques pour les éleveurs. Elle peut également se retrouver sur les chevaux et les cerfs sauvages. Cette espèce de tique fait l'objet de la présente étude. Les pertes de productivité associées à cette tique sont estimées à 2 millions de US\$ par an (Morais-Urano *et al.* 2012).

Boophilus microplus provoque des effets directs sur le bétail (inflammations localisées, intoxications...) mais peut également entraîner des symptômes plus critiques en cas de forte infestation prolongée : perte de poids (jusqu'à l'anorexie), nécroses, anémies pouvant conduire à la mort de l'animal.

Un point exceptionnel à noter est l'absence de maladies infectieuses transmises par les tiques du bétail en Nouvelle-Calédonie. En effet, les tiques du bétail des pays infestés transmettent classiquement plusieurs maladies via l'inoculation d'agents infectieux par leur salive (virus, hémoparasites). Les principales maladies sont la babésiose tropicale, la piroplasmose et l'anaplasmose (Barré & Delathière, 2010). L'absence de ces maladies infectieuses du territoire calédonien met en exergue l'importance de la vigilance et du suivi des espèces de tiques infectant le bétail et l'enjeu de la recherche de nouveaux acaricides.

Des acaricides chimiques sont classiquement utilisés dans le contrôle des tiques. Il est estimé qu'un acaricide est efficace pour une période d'environ 10 ans, les résistances des tiques aux acaricides commercialisés augmentant au fil du temps (T. Hue, conversation orale ; Morais-Urano *et al.* 2012). L'enjeu essentiel est donc la formulation d'acaricides efficaces alternatifs à partir de substances naturelles, moins nocives pour l'environnement et la chaîne alimentaire.

2. Matériel & méthodes

Les tests d'activité sur les larves ont également été réalisés sur les extraits bruts de *L. sonderii* (484,5 mg) et *L. monticola* (485,1 mg) obtenus à l'aide d'un mélange méthanol/dichlorométhane (1 :1) après collectes en grandes quantités de ces deux algues au site de Ricaudy.

2.1. Sélection des larves

Les tiques ayant servi aux tests de criblage proviennent d'un élevage bovin nommé Sodebab. Elles ont été prélevées sur des vaches adultes. Seules les femelles sont collectées : elles sont facilement reconnaissables puisque ce sont les seules à se fixer sur le bétail pour se nourrir de sang. Une fois prélevées, les tiques femelles sont placées au laboratoire en condition de ponte en chambre d'incubation (27°C, 85% d'humidité relative) (voir Figure 33).



Figure 33. Pontes de femelles tiques adultes (© J. Gaubert).

Au bout de 10 jours, les œufs sont récoltés puis placés dans des tubes à hémolyse à raison de 200 mg d'œufs par tube (Figure 34). Les bouchons sont percés puis couverts de coton pour l'oxygénation des tubes. Les œufs donnent naissance à des larves au bout de trois semaines. Celles-ci font ensuite l'objet de tests de résistances aux acaricides classiques. Seules les larves issues de souches caractérisées comme sensibles à la deltaméthrine (pyréthrinoïde) et à l'amtiaz (formamidine) sont utilisées pour les biotests.

Les tests sont réalisés lorsque les larves sont âgées de 15 jours.



Figure 34. Larves de tiques âgées de 15 jours mises en tubes à hémolyse (© J. Gaubert).

2.2. Tests d'activités sur les larves

Les tests réalisés sur les larves suivent un protocole dit LPT : « Larval Packet Test », adapté en partant d'un protocole type décrit par la FAO (Stone & Haydock 1962). Ces tests permettent ici d'évaluer l'activité acaricide des extraits bruts de deux algues brunes : *L. sonderii* et *L. monticola*. Une gamme de dilutions des extraits bruts a tout d'abord été préparée dans de l'éthanol à 100 %, à partir d'une solution mère à 40 mg/mL (200 mg d'extrait brut dans 5 mL d'éthanol 100%). Cinq dilutions successives au demi ont permis d'obtenir les solutions suivantes : 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL et 1,25 mg/mL (voir Tableau 14).

Tableau 14. Récapitulatif des concentrations de chaque échantillon utilisées pour les tests.

Echantillons	Concentration (mg/mL)
LS /LM a	40
LS/LM b	20
LS/LM c	10
LS/LM d	5
LS/LM e	2.5
LS/LM f	1.25

Les tests sont réalisés en duplicata pour chaque dilution des extraits. Pour cela, des papiers buvards en nylon (laboratoire Anowo) de 7,5 x 8,5 cm ont été imprégnés avec 1 mL de solution puis mis à sécher sous hotte durant 1 h (Figure 35a). Les témoins négatifs contiennent uniquement le solvant (éthanol 100 %) et les témoins positifs sont constitués d'une solution à 1 % d'Amitraz® (principe actif du produit commercial Tactic®). Ces papiers ont ensuite été repliés pour former une enveloppe (Figure 35b) et une centaine de larves de tiques ont été déposées à l'aide d'un pinceau. Les enveloppes sont ensuite fermées puis replacées dans la chambre d'incubation (27°C, 85 % d'humidité) durant 24 h. Passé ce délai, les larves de tiques mortes et vivantes sont dénombrées afin d'estimer le pourcentage de mortalité (NB : Lorsque toutes les larves sont vivantes, le comptage n'est pas réalisé et l'on estime qu'il y a 100 larves vivantes sur le buvard).

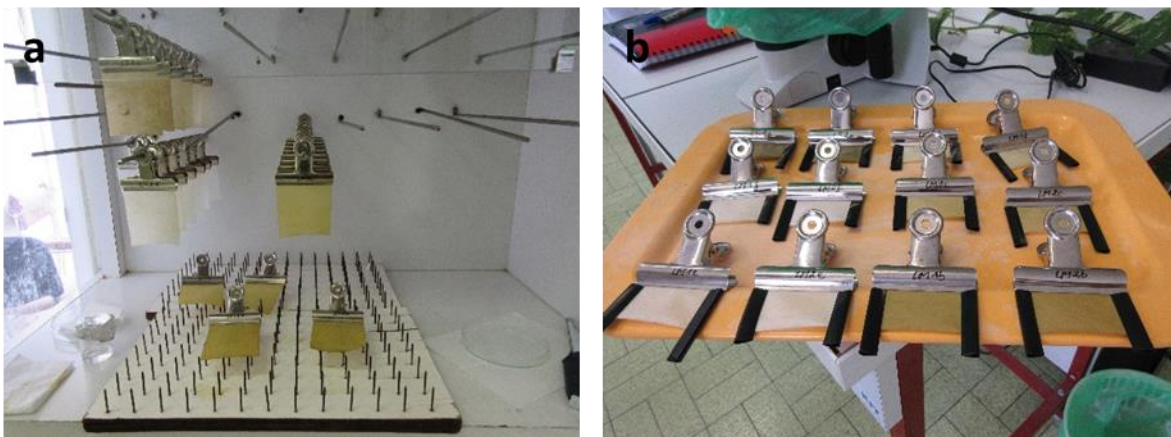


Figure 35. (a) Séchage sous hotte des buvards imprégnés des extraits à tester. (b) Enveloppes formées avec les buvards et renfermant les larves de tiques (© J. Gaubert).

3. Résultats & discussion

Les résultats des tests de criblages sur les larves de tiques des deux extraits bruts de *L. sonderii* et *L. monticola* sont présentés dans la Figure 36. Les larves mortes et vivantes ont été dénombrées dans chaque buvard après 24 h de mise en contact avec les différentes concentrations d'extraits à tester.

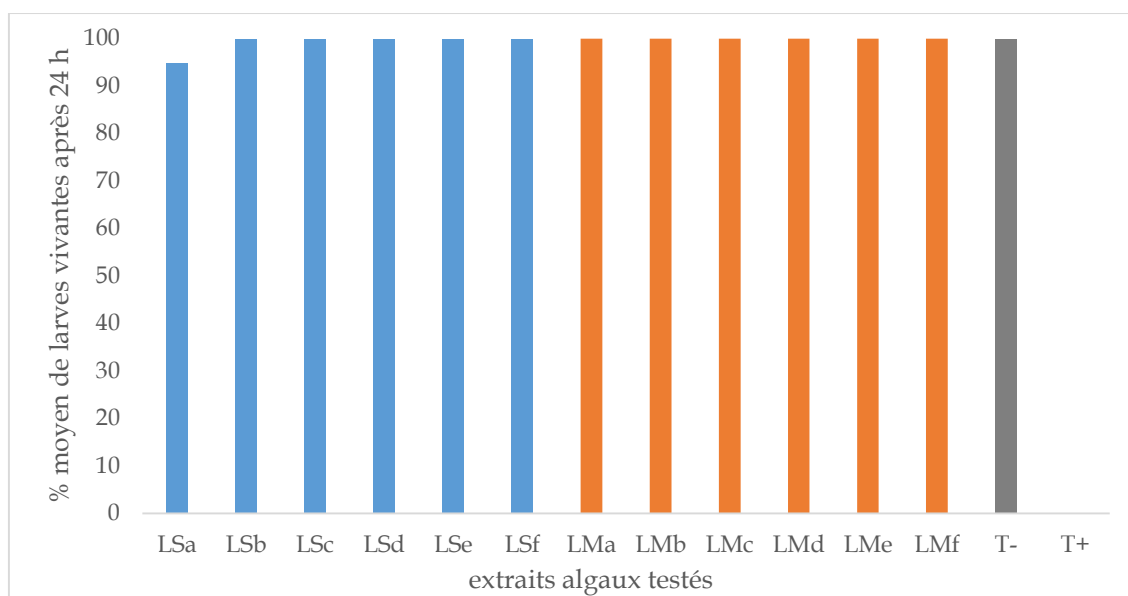


Figure 36. Pourcentage moyen de larves vivantes dans les buvards après 24 h de contact avec les extraits algaux (T- : témoin négatif, éthanol 100 % ; T+ : témoin positif, solution à 1 % d'Amitraz®).

Le témoin négatif, constitué simplement d'éthanol, n'a entraîné aucune mortalité larvaire et le témoin positif, une solution à 1 % d'Amitraz®, a provoqué une mortalité totale des larves. Excepté un très faible pourcentage (5,22 %) de mortalité des larves en contact avec l'extrait le plus concentré de *L. sonderii* (40 mg/mL), aucun effet larvicide n'a été détecté avec les autres concentrations de *L. sonderii* ni avec l'extrait de *L. monticola*. Ces deux espèces de *Lobophora* ne possèdent donc pas d'effet larvicide sur *Rhipicephalus microplus*, tout du moins pas au niveau de l'extrait brut.

Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant les activités acaricides d'algues marines. Nous pouvons citer les travaux de Williams (1991) qui ont mis en évidence une activité acaricide contre *Boophilus microplus* d'extraits bruts éthanoliques de cinq espèces de macroalgues rouges (*Laurencia obtusa*, *Liagora farinosa*, *Liagora elongata*) et brunes (*Padina vickerisiae*, *Stypopodium lobatum*). Les extraits algaux testés affectaient la survie des femelles adultes engorgées et inhibaient l'oviposition et l'embryogenèse des tiques. Des activités d'une lectine isolée chez l'algue rouge *Gracilaria cornea* envers des femelles engorgées *Boophilus microplus* ont été montrées (Lima *et al.* 2005). Une réduction du poids des femelles après oviposition et des œufs, ainsi qu'une réduction du temps de survie moyen des larves ont été observées.

Des sources marines autres que les macroalgues ont révélé des propriétés acaricides. Par exemple, le composé 5-(2,4-diméthylbenzyl) pyrrolidin-2-one (DMBPO, C₁₃H₁₇NO) isolé de la bactérie marine *Streptomyces* VITSVK5 sp. entraîne une mortalité des larves de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Saurav *et al.* 2013). Des destruxines isolées chez un champignon marin trouvé dans l'algue *Caulerpa* sp. possèdent également une action acaricide envers le tique du bovin *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Morais-Urano *et al.* 2013).

4. Conclusion générale

Cette section sur les tests de bioactivité réalisés en partenariat avec l'IAC et visant trois cibles biologiques, s'intègre dans la recherche et la valorisation de nouveaux composés actifs d'origine naturelle et plus respectueux de l'environnement. Ces tests avaient pour but de réaliser un premier criblage d'activité sur deux espèces du genre *Lobophora* : *L. sonderii* et *L. monticola*. Les criblages effectués sur les extraits bruts de ces espèces n'ont pas mis en évidence de bioactivité marquée, aussi bien en tant qu'antifongique sur *Colletotrichum gloeosporioides* ou acaricide sur la tique des bovins. Hormis un potentiel effet attractif sur la mouche des fruits durant les 120 premières minutes de mise en contact mais qui reste à renforcer, aucun effet insecticide n'a été enregistré.

Les tests sur la mouche des fruits, le champignon phytopathogène et la tique des bovins étaient demandeurs en matériel biologique (au moins 100 mg par test) et ont donc été réalisés sur des extraits bruts à la suite de grosses collectes des algues. Bien que les extraits bruts de ces deux algues ne paraissent pas actifs, il peut être envisageable que des fractions chimiques ou des composés purs présentent une activité contre les cibles testées. Afin de vérifier cette hypothèse, la présente étude pourrait être complétée par des tests sur des fractions, sous-fractions algales ou composés purs avec des protocoles plus adaptées pour des petites quantités de matériel biologique.

D. Tests antibactériens sur les fractions apolaires de *L. rosacea*, *L. sonderii* et *L. monticola*

1. Contexte

Cette partie consiste à rechercher des antibiotiques naturels pour lutter contre des bactéries posant problème en santé humaine. Les antibiotiques sont par définition des molécules, synthétiques ou naturelles, qui permettent de lutter contre des bactéries (plus ou moins ciblées) en les tuant ou en ralentissant leur croissance. Il existe différentes familles d'antibiotiques utilisées aussi bien chez l'homme que l'animal. Les antibiotiques peuvent agir au niveau de la paroi des bactéries en perturbant une protéine impliquée dans le maintien de la cohésion de celle-ci. D'autres antibiotiques peuvent agir sur la synthèse de protéines vitales chez les bactéries ou encore inhiber la synthèse d'acides nucléiques.

L'histoire des antibiotiques à proprement parlé a vu le jour en 1928 avec la découverte de la pénicilline par Sir Alexander Fleming. L'émergence de la recherche sur les antibiotiques et leur industrialisation à grande échelle prendra son essor entre les deux grandes guerres mondiales et permettra grandement de faire reculer le taux de mortalité associé aux maladies infectieuses au 20ème siècle. Mais depuis plus de 20 ans, la résistance aux antibiotiques a augmenté graduellement, aussi bien chez l'homme que l'animal. D'après les données de l'OMS, au moins 50 % des antibiotiques produits dans le monde sont en effet destinés aux animaux. Son utilisation massive en santé humaine et vétérinaire, ainsi que les rejets d'antibiotiques dans l'environnement ont grandement favorisé le développement de systèmes de résistance chez les bactéries. Certaines souches sont devenues multi-résistantes (résistantes à plusieurs antibiotiques), voir toto-résistantes (résistantes à tous les antibiotiques), entraînant de ce fait des situations préoccupantes en thérapeutiques puisqu'elles ne peuvent être combattues. La majorité des cas de résistances aux antibiotiques étant retrouvées dans les hôpitaux (Inserm.fr). Ces cas de résistances acquises par les bactéries peuvent survenir *via* différents mécanismes :

- une mutation génétique permettant de contourner l'effet nocif de l'antibiotique
- l'acquisition de plasmide porteur d'un ou plusieurs gènes de résistance.

De nouveaux antibiotiques sont donc nécessaires pour lutter contre ces bactéries multi-résistantes et ces molécules sont activement recherchées dans la nature et en particulier chez les organismes marins (El Shafay *et al.* 2016; Pérez *et al.* 2016).

Dans nos tests, trois souches ont été utilisées :

- 1- *Staphylococcus aureus*, communément appelé staphylocoque doré, est une bactérie Gram positive la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire (www.pasteur.fr). Les staphylocoques vivent naturellement dans l'homme et les animaux en colonisant la flore cutanée et les muqueuses externes. Ces bactéries se retrouvent également dans l'environnement (par exemple dans les eaux non traitées). Bien que 30 à 50 % de la population soit porteur sain de *S. aureus*, celui-ci peut devenir virulente en cas de plaie, maladie, acte chirurgical, etc. *Staphylococcus aureus* est un des premiers agents responsables d'infections nosocomiales et pose des problèmes en santé humaine du fait de son éradication difficile. En effet, de nombreuses souches sont multi-résistantes aux antibiotiques, d'où la nécessité de rechercher de nouveaux antibiotiques efficaces. En France, *S. aureus* est également une des premières bactéries responsables d'intoxications alimentaires (pasteur.fr, inserm.fr).
- 2- *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie Gram négatif ubiquitaire, majoritairement impliquées dans les infections nosocomiales (responsable de 10 à 15 % des infections nosocomiales) (Barbier & Wolff 2010). Cette bactérie pose de sérieux problèmes car certaines souches sont multi-résistantes, voire toto-résistantes chez les patients atteints de mucoviscidose notamment (inserm.fr).
- 3- *Candida albicans* est un champignon ou levure commensale pouvant coloniser plusieurs organes chez l'homme. Parmi le genre *Candida*, l'espèce *Candida albicans* est responsable d'environ la moitié des infections chez l'homme. Elle est fréquemment impliquée dans les infections des muqueuses ou de la peau mais également des infections plus graves au niveau des organes (Calderone & Fonzi 2001; pasteur.fr).

2. Matériel et méthodes

Des tests antibactériens ont été réalisés sur les fractions algales issues du fractionnement sur colonne ouverte de silice (chapitre 1, § 2.8). Ces tests réalisés en microplaques demandent moins de matière biologique que les tests précédemment décrits sur les mouches, champignons et tiques réalisés sur les extraits bruts. Il est donc possible de tester l'activité de fractions, sous-fractions ou composés purs. Les criblages ont été menés sur les trois souches sélectionnées posant problème en santé humaine et décrites plus haut. Ainsi, huit fractions ont été testées pour *L. monticola*, sept pour *L. rosacea* et neuf pour *L. sonderii*. Le criblage initial s'est fait à la concentration de 200 µg/mL (solvants : 1% de DMSO, 99% de milieu LB : bouillon lysogène). A une concentration finale de 1% de DMSO, celui-ci ne présente pas d'effet nocif sur la croissance bactérienne. Les tests se sont effectués en microplaques 96 puits, avec pour témoin positif l'antibiotique Gentamicine et pour témoin négatif les bactéries en culture dans le milieu LB. Les extraits algaux étant colorés, des témoins de couleurs ont été effectués pour chaque extrait afin d'ajuster la DO au cours du temps de mesure. Trois réplicas par extrait (trois puits) sont réalisés. Le schéma de la plaque est représenté dans la Figure 37.

La suspension de bactéries à tester a été préparée dans du milieu LB. Celle-ci est mise en culture la veille au soir à 37 °C sous agitation (120 rpm). La concentration de la culture est ensuite ajustée au début du test grâce à une mesure de DO à 600 nm (DO entre 0.1 et 0.2). Une fois la microplaque préparée, celle-ci est placée dans le lecteur de microplaque EPOCH 2 (BioTek) durant 24 h à 37 °C. La mesure de DO débute à t_0 puis une mesure toute les 30 min est effectuée. Les mesures sont ensuite collectées grâce au logiciel Gen5 version 3.02.

Les extraits algaux montrant une activité lors des tests de criblages ont été sélectionnés pour mesurer la concentration d'extrait nécessaire pour obtenir un taux de croissance bactérien diminué de 50 % (IC50). Pour cela, une gamme de dilution appropriée de l'extrait est réalisée puis la microplaque estensemencée selon le même protocole que pour le test de criblage.

Le taux de croissance bactérien μ s'obtient en modélisant une courbe exponentielle sur la courbe de croissance bactérienne. Cette courbe permet d'obtenir l'équation du type $N = N_0 \cdot e^{\mu t}$.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MILIEU LB SEUL (Témoïn milieu) 200 µL	180µL LB 20µL E1	180µL LB 20µL E2	180µL LB 20µL E3 E4	180µL LB 20µL E4	180µL LB 20µL E5	180µL LB 20µL E6	180µL LB 20µL E7	180µL LB 20µL E8	180µL LB 20µL E9	200µL LB	MILIEU LB SEUL (Témoïn milieu) 200 µL
B		160µL LB 20µL E1 20µL ∅	160µL LB 20µL E2 20µL ∅	160µL LB 20µL E3 20µL ∅	160µL LB 20µL E4 20µL ∅	160µL LB 20µL E5 20µL ∅	160µL LB 20µL E6 20µL ∅	160µL LB 20µL E7 20µL ∅	160µL LB 20µL E8 20µL ∅	160µL LB 20µL E9 20µL ∅	180µL LB 20µL ∅ (T neg)	
C												
D												
E		160µL LB 20µL E10 20µL ∅	160µL LB 20µL E11 20µL ∅	160µL LB 20µL E12 20µL ∅	160µL LB 20µL E13 20µL ∅	160µL LB 20µL E14 20µL ∅	160µL LB 20µL E15 20µL ∅	160µL LB 20µL E16 20µL ∅	160µL LB 20µL E17 20µL ∅	160µL LB T+ 20µL ∅		
F												
G												
H	180µL LB 20µL E10	180µL LB 20µL E11	180µL LB 20µL E12	180µL LB 20µL E13	180µL LB 20µL E14	180µL LB 20µL E15	180µL LB 20µL E16	180µL LB 20µL E17	180µL LB 20µL T+	200µL LB		

Figure 37. Schéma expérimental de préparation de la microplaque pour les tests antibactériens.

3. Résultats & discussion

Aucune activité n'a été détectée lors des tests de criblages sur les souches *Pseudomonas aeruginosa*, ni sur *Candida albicans*. Pour cette dernière, les tests ont été abandonnés rapidement car la souche ne poussait pas en suspension dans les puits de culture mais adhéraient aux puits, altérant ainsi les mesures de DO. Le test en microplaque ne semble pas approprié pour cette souche. Le criblage sur *Staphylococcus aureus* a mis en évidence une activité de quatre fractions algales : LMF5 et LMF6 de *L. monticola*, LRF4 de *L. rosacea* et LSF8 de *L. sonderii*. Des gammes de dilutions ont donc été réalisées sur ces quatre fractions afin de déterminer l'IC50.

3.1. Fractions algales actives sur *S. aureus* de *L. monticola*

Les dilutions suivantes ont été testées en microplaque pour LMF5 et LMF6 : 250 µg/mL, 200 µg/mL, 150 µg/mL, 100 µg/mL, 80 µg/mL, 60 µg/mL, 50 µg/mL, 40 µg/mL et 20 µg/mL.

Seules les bactéries en contact avec les trois plus fortes concentrations de LMF5 (250, 200 et 150 µg/mL) présentent un retard de croissance : un effet bactériostatique est observé. Les autres dilutions testées ne présentent pas d'activité sur *S. aureus*. Les courbes de croissances bactériennes correspondant à ces trois dilutions, ainsi que la courbe du témoin négatif (bactéries seules) sont présentées dans la Figure 38.

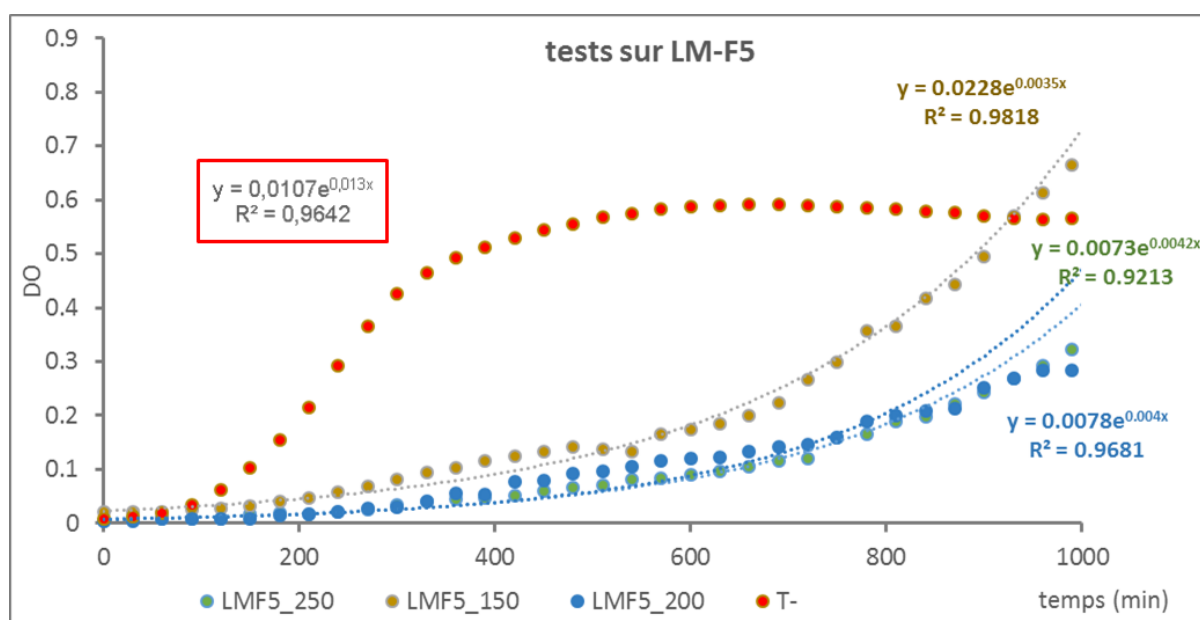


Figure 38. Courbes de croissance de *S. aureus* en présence de différentes concentrations de l'extrait LMF5 (250, 200 et 150 µg/mL) de *L. monticola*. La courbe de croissance du témoin négatif (T-) est en rouge.

Plusieurs dilutions testées de LMF6 ont entraîné un retard de croissance sur *S. aureus*. La valeur d'IC50 a pu être calculée grâce à la courbe reliant le log de la concentration en fonction du taux de croissance μ (Tableau 15). La courbe d'allure sigmoïde obtenue est modélisée par une courbe linéaire sur la partie linéaire de la sigmoïde.

Tableau 15. Taux de croissance μ obtenus en fonctions des concentrations de l'extrait LMF6 testé.

concentration	logC	μ	R ²
Témoin -	-	0,013	0,9642
250	-	0	-
200	2,3010	0,0065	0,6959
150	2,1761	0,0066	0,9897
100	2,0000	0,0102	0,9555
80	1,9031	0,0103	0,9576
60	1,7782	0,012	0,9542
50	1,6990	0,0132	0,9693
40	1,6021	0,0129	0,9731
20	1,3010	0,0127	0,9697

L'équation obtenue est $y = -0,0138x + 0,0365$ ($R^2 = 0.9997$), nous en déduisons la valeur d'IC50 qui est de 149,25 $\mu\text{g/mL}$.

3.2. Fractions algales actives sur *S. aureus* de *L. sonderii*

Plusieurs dilutions de l'extrait actif LSF8 ont été testées en microplaque sur *S. aureus*: 200 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ et 10 $\mu\text{g/mL}$.

Le graphique représentant les courbes de croissance des bactéries en présence des différentes concentrations d'extrait est présenté dans la Figure 39.

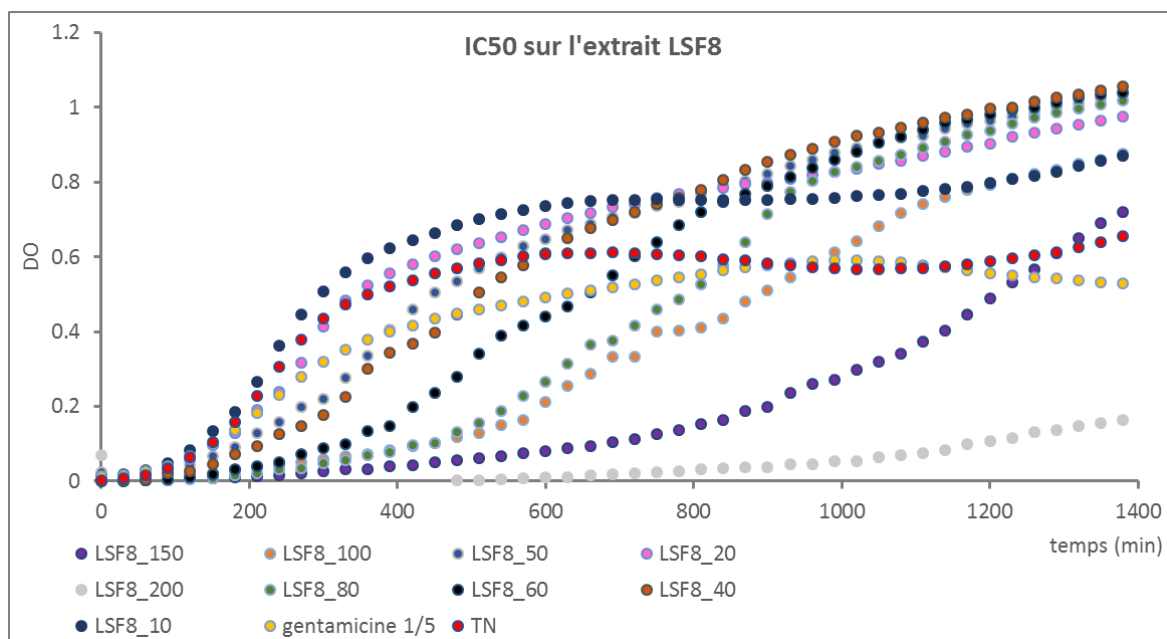


Figure 39. Courbes de croissance de *S. aureus* en présence de différentes concentrations de l'extrait LSF8 de *L. sonderii* (TN= témoin négatif).

Ces courbes montrent que des concentrations croissantes en LSF8 influent sur la croissance de *S. aureus*. A 200 $\mu\text{g/mL}$, un effet bactéricide est observé. Entre 40 et 100 $\mu\text{g/mL}$, un retard de croissance de *S. aureus* est noté (effet bactériostatique) : le temps de fin de phase exponentielle est atteint plus tard. Cependant, l'absorbance maximale atteinte est plus forte que celle du témoin. Ceci peut s'expliquer par différents phénomènes:

- une production de biofilm ou polymères par les bactéries, leur apportant une protection physique contre les molécules en présence.
- une dégradation physique des molécules testées avec la chaleur (37 °C durant 24 h)
- une dégradation des molécules par voie métabolique de la bactérie.

De la même façon que l'extrait LMF6, l'IC50 a été déterminée pour l'extrait LSF8 : 94,97 $\mu\text{g/mL}$.

3.3. Fractions algales actives sur *S. aureus* de *L. rosacea*

Les dilutions suivantes de l'extrait actif LRF4 ont été testées en microplaque sur *S. aureus*: 200 µg/mL, 150 µg/mL, 100 µg/mL, 80 µg/mL, 60 µg/mL, 50 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL et 10 µg/mL.

Le graphique représentant les courbes de croissance des bactéries en présence des différentes concentrations d'extrait est présenté dans la Figure 40.

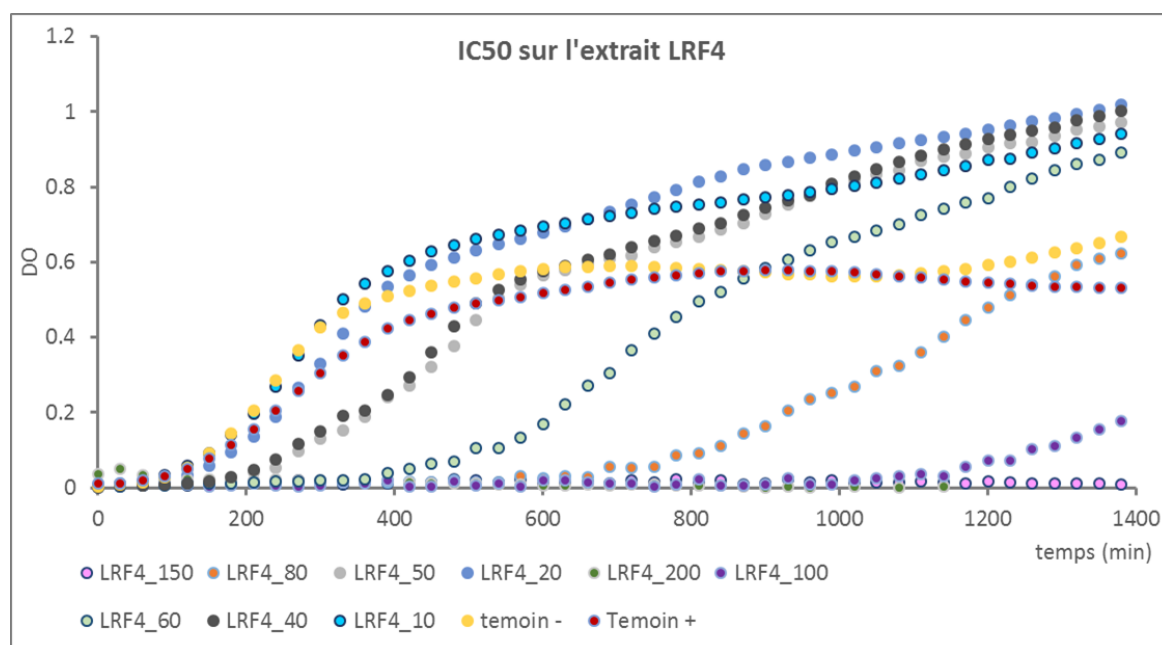


Figure 40. Courbes de croissance de *S. aureus* en présence de différentes concentrations de l'extrait LRF4 de *L. rosacea*.

L'IC₅₀ de cet extrait est de 57,10 µg/mL.

Aux plus fortes concentrations (200 et 150 µg/mL), on observe un effet bactéricide total. Aux concentrations intermédiaires testées (40 à 100 µg/mL), un retard de croissance est noté, il y a donc un effet bactériostatique sur *S. aureus* : le temps de fin de phase exponentielle est atteint plus tard. Les faibles concentrations de LRF4 (10 et 20 µg/mL) n'ont quant à elles pas d'effet sur la souche bactérienne.

Parmi les extraits algaux actifs détectés, deux présentent un effet bactériostatique (LMF5 et LMF6) tandis que les concentrations les plus élevées de LSF8 et LRF4 montrent un effet bactéricide sur *S. aureus*.

Dans la littérature, plusieurs travaux ont déjà montré des propriétés antibactériennes d'extraits ou de composés issus de *Lobophora*, aussi bien sur des bactéries à Gram positif que Gram négatif (Tableau 16). Des effets antibactériens sur *S. aureus* ont déjà été mis en avant, notamment sur trois composés relativement apolaires récemment identifiés chez *Lobophora variegata* d'Atlantique : le lobophorol A ($C_{19}H_{32}O_3$), B ($C_{19}H_{30}O_2$) et C ($C_{19}H_{30}O_3$) (Gutiérrez-Cepeda *et al.* 2015). Ces lobophorols sont assez similaires aux lobophorénols, des alcools à longues chaînes polyinsaturés identifiées chez *Lobophora rosacea* (Vieira *et al.* 2016). Parmi les composés de *L. variegata* testés, le lobophorol A s'est avéré le plus actif contre *S. aureus* avec une concentration minimum d'inhibition (MIC_{90} pour la concentration minimale montrant une inhibition bactérienne >90%) de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Gutiérrez-Cepeda *et al.* 2015). Dans la présente étude, seules des fractions ont été testées donc il est difficile de comparer ces valeurs avec celles obtenues pour des composés purs, mais les IC_{50} des fractions actives mises en avant se situent entre 150 et 57 $\mu\text{g/mL}$ pour la plus petite. Bien que la dernière valeur soit faible notamment, il se peut que l'activité antibactérienne observée soit due à un mélange de composés plutôt qu'à une molécule particulière. Pour investiguer ces hypothèses, il est essentiel de procéder à des étapes de séparations et purifications pour pouvoir tester des composés purs de la fraction et ainsi comparer les IC_{50} avec celle obtenue pour le mélange.

Bien que nos tests antibactériens aient été réalisés sur des fractions apolaires issues d'un fractionnement sur phase normale, des activités anti-microbiennes issues de fractions polaires ont déjà été trouvées chez *Lobophora* (Val *et al.* 2001; Engel *et al.* 2006; Manilal *et al.* 2010a, b, 2012; Morrow *et al.* 2011). Il est également intéressant de noter que bien que nous n'ayons pas détecté d'activité antibactérienne sur *Pseudomonas aeruginosa*, une activité contre cette bactérie à partir des extraits méthanoliques de *L. variegata* a déjà été mise en évidence (Manilal *et al.* 2010b). Le Tableau 16 répertorie les activités antimicrobiennes associées au genre *Lobophora* ainsi que les molécules ou fractions ciblées. Cependant, tous ces travaux utilisaient la technique plus ancienne pour évaluer l'effet antimicrobien d'une substance : la

méthode par disque de diffusion, plutôt que la technique de dilution en microplaque, plus couramment utilisée actuellement.

Pour compléter cette étude, il serait également intéressant de tester l'activité des fractions sur les polymères, visibles au bout de 24 h dans les puits de la microplaque. Au vu des activités antibactériennes enregistrées lors de ce premier criblage sur *S. aureus*, il serait intéressant de poursuivre les tests sur d'autres bactéries, notamment *E. coli*, mais également de tester des sous-fractions et composés purs des fractions actives. Des étapes de purifications des fractions d'intérêt devraient pour cela tout d'abord être entreprises.

Tableau 16. Activités antibactériennes associées au genre *Lobophora* retrouvées dans la littérature.

Espèces	Cibles biologiques	Molécules/ type d'extraits	Références
<i>L. variegata</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Lobophorols A–C, lobophopyranones A et B, lobophorones A–E	Gutiérrez- Cepeda <i>et al.</i> 2015
<i>L. variegata</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Vibrio cholera</i>	CHCl ₃ /MeOH	Sivakumar & Vignesh 2014
<i>L. variegata</i>	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Escherichia coli</i>	Mixture d'acides gras MeOH	Manilal <i>et al.</i> 2012
<i>L. variegata</i>	Marine bacteria isolated from Caribbean macroalgae and corals	EtOAc/MeOH et MeOH/H ₂ O	Morrow <i>et al.</i> 2011
<i>L. variegata</i>	Biofilm-forming bacteria –	MeOH	Manilal <i>et al.</i> 2010a
<i>L. variegata</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Vibrio</i> <i>harveyi</i> , <i>Vibrio</i> <i>alcaligenes</i> , <i>Vibrio</i> <i>alginoliticus</i> ,	MeOH	Manilal <i>et al.</i> 2010b

	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>		
<i>L. variegata</i>	<i>Pseudoalteromonas bacteriolytica</i>	CH ₂ Cl ₂ /MeOH [avec fractions lipophile EtOAc et hydrophile H ₂ O]	Engel <i>et al.</i> 2006
<i>L. variegata</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	MeOH	Val <i>et al.</i> 2001
<i>L. variegata</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i>	CHCl ₃ /MeOH	Ballantine <i>et al.</i> 1987
<i>L. papenfussii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Vibrio anguillarum</i>	2-(10-Oxohexadecyl)- 1,3,5- trihydroxybenzene	Gerwick & Fenical 1982

II- Suivi temporel de la biomasse de *Lobophora rosacea* et *Lobophora sonderii* au site de Ricaudy

Aucune donnée de biomasse de *Lobophora* et de sa variation spatio-temporelle dans le lagon néo-calédonien n'est disponible. Compte tenu du volet valorisation de cette algue dans notre étude, il était nécessaire d'acquérir des données sur les stocks disponibles et nous avons suivi dans le temps la densité de *L. sonderii* et *L. rosacea* au site de Ricaudy. Nous avons retenu ces deux espèces en raison de la facilité de récolte des thalles et c'est dans ce site que les études métabolomiques (décrites dans la partie 2) ont été réalisées.

Les données de suivi ont été acquises mensuellement entre mars 2016 et juin 2017 le long de transects et à l'aide de quadrats.

1. Matériel & méthodes

1.1. Méthode des photos-quadrats

Les données ont été acquises le long de deux transects permanents pour chaque espèce, qui ont été matérialisés en début d'expérience à l'aide de fers à béton espacés de 10 m fixés dans l'algueraie pour suivre *L. sonderii* (22°18.956'S, 166°27.405'E) et sur le platier pour suivre *L. rosacea* (22°18.833'S 166°27.531'E). Le quadrat utilisé est constitué d'un cadre PVC de 50 x 50 cm, sous-divisé en quatre carrés équivalents (25 x 25 cm). Sous l'eau, le quadrat est monté sur le câble de 10 m de long qui est fixé entre les fers à béton le temps de l'acquisition des données (Figure 41). Le quadrat est déplacé tous les 50 cm sur la longueur du transect.

Pour *L. sonderii* les données ont été acquises à l'aide de photos réalisées dans les quatre sous-quadrats, soit 80 photos par transect (160 photos sur les deux transects). Le suivi pour cette espèce a été effectué une fois par mois entre mars 2016 et juin 2017.

Pour *L. rosacea*, les thalles étant nichés entre les branches des coraux, il n'était pas possible de faire des photo-quadrats, nous avons donc noté l'absence ou présence de l'algue dans chaque quadrat et sur deux transects, soit 20*2 données de présence/absence. Le pourcentage de

quadrats où *L. rosacea* est présente a été calculé sur les deux transects. Ce suivi s'est fait mensuellement entre avril 2016 et janvier 2017.

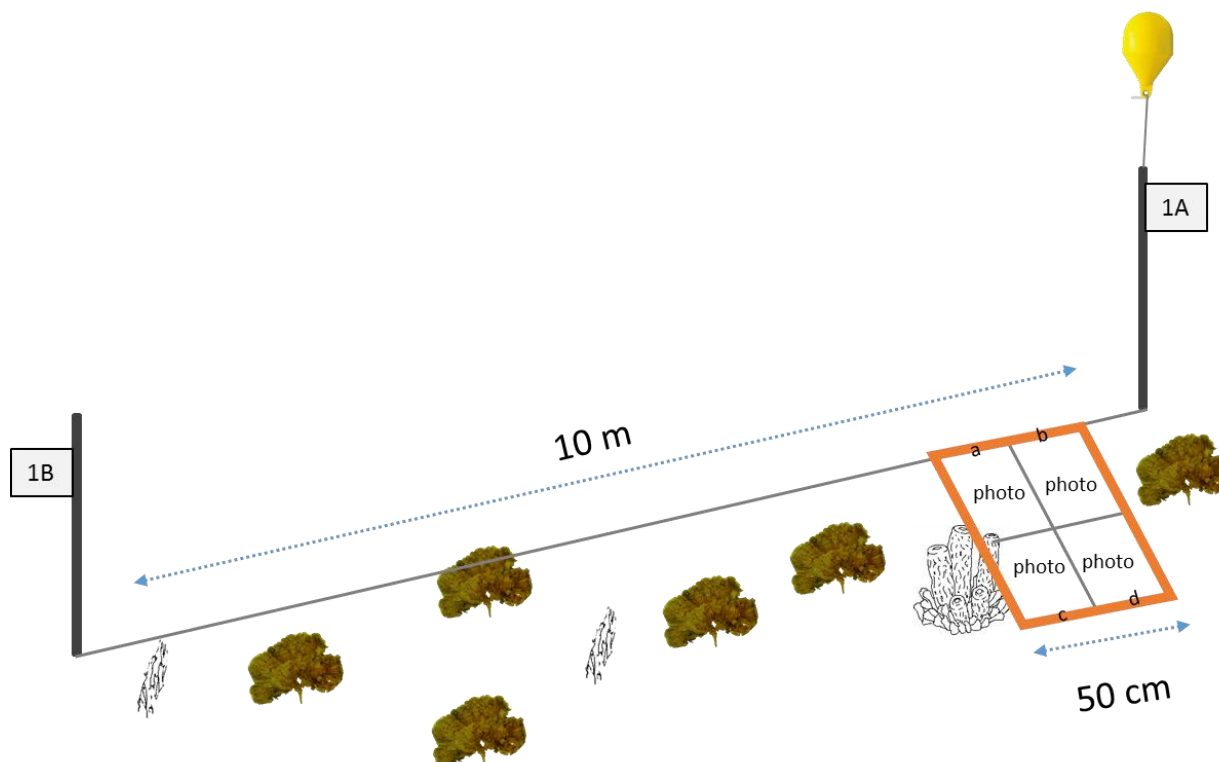


Figure 41. Schéma d'un transect fixe pour l'acquisition des photos-quadrats. Le quadrat coulisse le long du câble tendu entre les deux fers à béton fixés en permanence et le temps de l'étude.

1.2. Traitement des photos-quadrats

Les photos-quadrats obtenues pour *L. sonderii* ont été traitées à l'aide du logiciel CPCe (Coral Point Counting excel extension) (Kohler & Gill 2006). La première étape consiste à calibrer la photo en prenant une arrête du sous-quadrat (25 cm). Cette étape est importante car les photos peuvent présenter une distorsion ou un cadrage légèrement différent de l'une à l'autre. Il faut ensuite repérer les thalles de *L. sonderii* dans le photo-quadrat pour délimiter leur surface (cm²). Ainsi, pour chaque surface délimitée, une aire est calculée (voir Figure 42). On additionne ensuite ces aires de recouvrement en *L. sonderii* par sous-quadrat pour obtenir une aire de recouvrement totale en *L. sonderii* par sous-quadrat (par exemple dans la Figure 42, on additionne les quatre aires obtenues). On exprime alors cette aire de recouvrement en *L. sonderii* en pourcentage de recouvrement rapporté à la surface du sous-quadrat (625 cm²) : $\text{aire de recouvrement totale en } L. \text{ sonderii par sous-quadrat} / 625 * 100$. Ensuite, on calcule

un pourcentage moyen (sur les 160 photos) de recouvrement en *L. sonderii* par sous-quadrat pour les deux transects ainsi que les erreurs standards. Ces étapes sont effectuées pour chaque mois analysé.

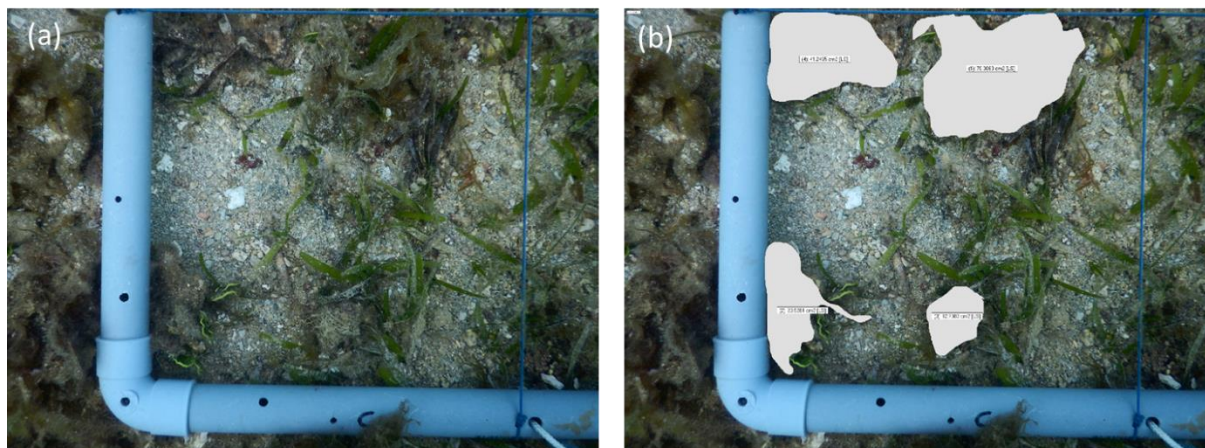


Figure 42. Exemple de photoquadrat de 25 cm² avant traitement (a) et après traitement (b) avec le logiciel CPCe (© J. Gaubert).

1.3. Relevé des températures

La température de surface de l’eau de mer moyenne provient des données acquises par les capteurs installés dans le cadre du réseau reeftemps (<http://www.observatoire-gops.org/>) au niveau de l’îlot Canard (22°18’43.98 S ; 166°26’1.979 E). Les moyennes de températures mensuelles de l’eau de mer ont été calculées entre les dates de chaque collecte.

2. Résultats et discussion

2.1. Suivi de *L. rosacea*

Les données de présence/absence sont reportées à la Figure 43. Les valeurs varient sensiblement au cours de la période. La présence de *L. rosacea* dans les quadrats montre un pic en juin-juillet (75-72,5 % des quadrats ; Figure 43). Les valeurs les plus basses sur la période 2016 correspondraient aux intersaisons (avril et septembre, 50 et 55 % des quadrats recensant *L. rosacea* respectivement).

Il serait hasardeux de tirer des conclusions à partir de ces observations qui n'ont pas pu être réalisées sur un cycle annuel complet et sans répliqua. On peut au plus émettre l'hypothèse d'une plus forte croissance avec la baisse de température de l'eau de mer en tout début d'hiver austral, période pour laquelle on observe une chute de la température moyenne mensuelle de 3°C, et a contrario une diminution des populations aux périodes les plus chaudes (notamment janvier, 26,2°C et avril, 27,3 °C).

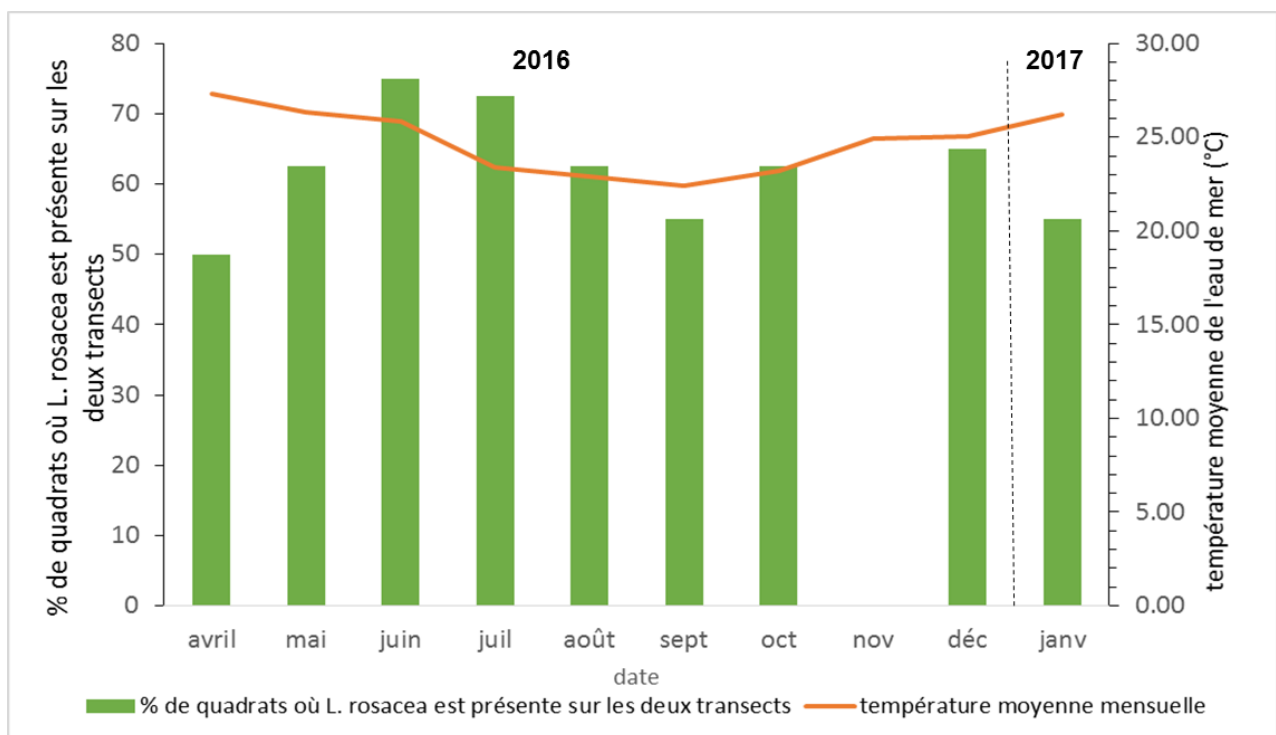


Figure 43. Pourcentage de quadrats où *L. rosacea* a été observée sur les deux transects.

Durant la période de suivi de *L. rosacea* (avril 2016 à janvier 2017), la température moyenne de surface de l'eau était de 24,8°C, avec un minimum de 22,4°C en septembre et un maximum de 27,3°C en avril 2017.

2.2. Suivi de *L. sonderii*

Sur la première année de suivi (entre mars 2016 et décembre 2016), le pourcentage de recouvrement moyen de l'algue par sous-quadrat sur les deux transects était supérieur durant les périodes d'inter-saisons : mai-juin 2016 (24,7 et 31,8% respectivement) et

septembre-octobre 2016 (27,3 et 32,7%) (Figure 44). Les périodes d'inter-saisons correspondent notamment à une diminution de la température (mai-juillet) ou à une augmentation progressive (septembre-octobre).

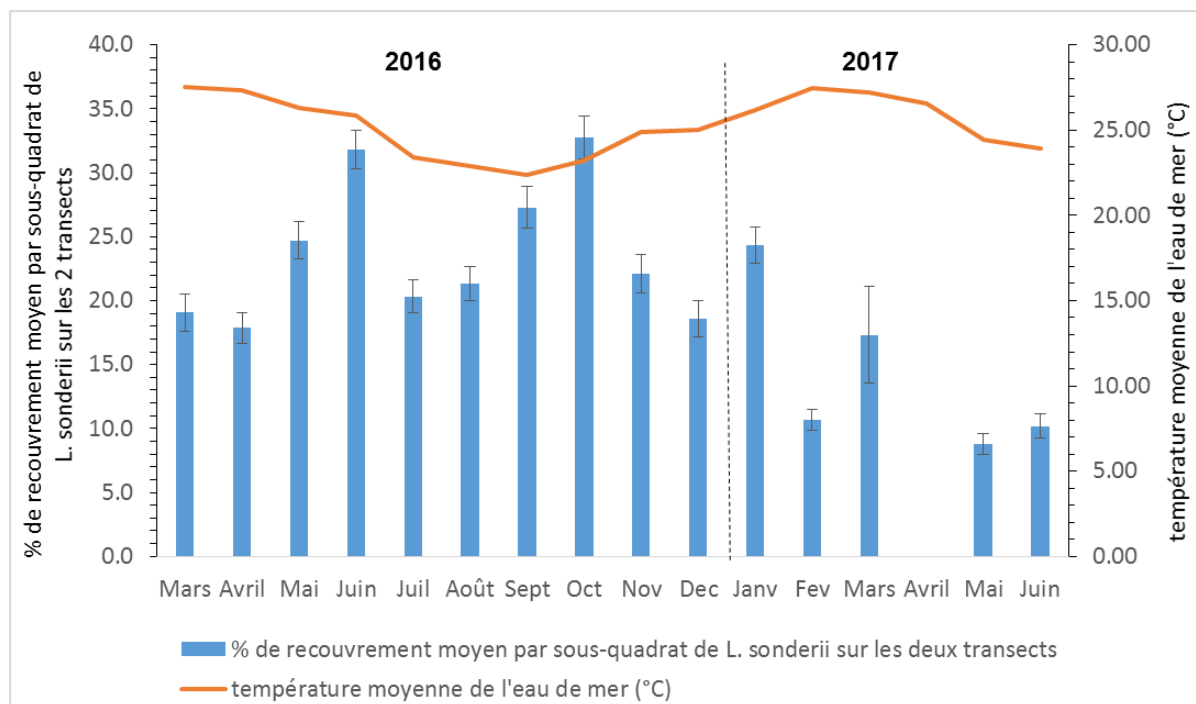


Figure 44. Pourcentage (%) de recouvrement moyen de *L. sonderii* par sous-quadrat sur les deux transects entre mars 2016 et juin 2017.

En 2017, seulement cinq mois ont été analysés par photo-quadrats. Le mois d'avril n'a pas pu être effectué en raison du cyclone Cook et des dépressions ayant eu lieu. Le transect du mois de Mai a été réalisé à la fin du mois car un deuxième cyclone (cyclone Donna) est survenu début Mai. Le transect de Juin a donc été décalé en fin de mois également. Bien qu'il soit difficile de tirer des conclusions sur la tendance annuelle du recouvrement en *L. sonderii* en 2017, on peut noter une tendance différente de l'année 2016. En 2016, comme pour *L. rosacea*, on semble observer des cycles sur 4-5 mois avec une augmentation graduelle de la densité par quadrat puis une diminution. On observe notamment un pic de densité en juin, comme pour *L. rosacea*. A l'inverse, en 2017, le pourcentage de recouvrement par quadrat est faible en mai-juin. Les perturbations entraînées par les cyclones et dépressions en Avril et Mai 2017 pourraient expliquer une partie de ces observations. Durant ces cinq mois analysés en 2017, le pourcentage de recouvrement était maximal en janvier (24,3%).

Durant la période de suivi de *L. sonderii*, la température moyenne de surface de l'eau de mer variait entre 22,6°C (septembre 2016) et 27,5 °C (mars 2017). La moyenne durant cette période était de 25,3 °C.

Bien qu'il soit difficile d'établir une tendance claire sur la variation du recouvrement en *L. sonderii*, les résultats des tests statistiques montrent qu'il existe une corrélation entre le pourcentage de recouvrement de l'algue et la température (permanova, pseudo-F = 29.95, p = 0.001)

Les fluctuations de densité de *Lobophora* peuvent être reliées à d'autres paramètres physiques de l'eau de mer mais également à la méthodologie en elle-même. En effet, des erreurs sur le calcul des aires de recouvrement en *L. sonderii* peuvent être induites par la distorsion des photos ainsi que la distance à laquelle elles ont été prises du quadrat. Pour parer à ce problème, il faudrait installer un système de support fixe pour prendre les photos sur le quadrat. De plus, les photos ont été prises par plusieurs équipes en 2017, ce qui peut entraîner un autre biais. Les thalles de *L. sonderii* ne sont pas statiques, ils bougent avec le courant, donc d'un mois à l'autre, la photo d'un thalle donné ne sera pas forcément prise de la même manière. La turbidité (et luminosité) de l'eau de mer influe également sur la qualité des photos et donc sur leur analyse.

La densité naturelle de *Lobophora* a été très peu étudiée. Nous pouvons notamment citer les travaux de de Ruyter van Steveninck (1987) qui n'ont pas observé d'effet saisonnier dans la couverture en *L. variegata* dans un récif des Antilles. La tendance semble être différente en zone tempérée, comme en Caroline du Nord où des fluctuations saisonnières d'abondance de *Lobophora* ont été observées, avec un pic d'abondance durant les périodes de températures plus chaudes (Peckol & Searles 1984; Nugues & Bak 2008). De plus, le cycle de vie de *Lobophora* est très peu connu. En Nouvelle-Calédonie, cette espèce est supposée être reproductrice tout au long de l'année. Des stades reproducteurs ont également été observés tout au long de l'année dans les Antilles (de Ruyter van Steveninck 1987).

Références

- Abou-Elnaga, Z.S., Alarif, W.M. & Al-lihaibi, S.S. (2011). New Larvicidal acetogenin from the red alga *Laurencia papillosa*. *Clean - Soil, Air, Water*, 39, 787–794.
- Abourriche, A., Charrouf, M., Berrada, M., Bennamara, A., Chaib, N. & Francisco, C. (1999). Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga. *Fitoterapia*, 70, 611–614.
- Allmendinger, A., Spavieri, J., Kaiser, M., Guiry, M., Blunden, G. & Tasdemir, D. (2010). Antiprotozoal and cytotoxic potential of British and Irish red algae, 76, 1296–1297.
- Ballantine, D.L., Gerwick, W.H., Velez, S.M., Alexander, E. & Guevara, P. (1987). Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiologia*, 151-152, 463–469.
- Barbier, F. & Wolff, M. (2010). Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*: Vers l'impasse thérapeutique? *Medecine/Sciences*, 26, 960–968.
- Bennamara, A., Abourriche, A., Berrada, M., Charrouf, M., Chaib, N., Boudouma, M., *et al.* (1999). Methoxybifurcarenone: An antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Phytochemistry*, 52, 37–40.
- Bianco, E.M., Pires, L., Santos, G.K.N., Dutra, K. a., Reis, T.N.V., Vasconcelos, E.R.T.P.P., *et al.* (2013). Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). *Ind. Crops Prod.*, 43, 270–275.
- Caccamese, S. & Azzolina, R. (1979). Screening for antimicrobial activities in marine algae from eastern Sicily. *Planta Med.*, 37, 333–339.
- Caccamese, S., Azzolina, R., Furnari, G., Cormaci, M. & Grasso, S. (1981). Antimicrobial and Antiviral Activities of Some Marine Algae from Eastern Sicily. *Bot. Mar.*, 24, 365–368.
- Calderone, R. & Fonzi, W. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.*, 9, 327–35.
- Chakraborty, S. & Datta, S. (2003). How will plant pathogens adapt to host plant resistance at elevated CO₂ under a changing climate? *New Phytol.*, 159, 733–742.
- Crews, P., Myers, B.L., Naylor, S., Clason, E.L., Jacobs, R.S. & Staal, G.B. (1984). Bio-active monoterpenes from red seaweeds. *Phytochemistry*, 23, 1449–1451.
- Crimp, S., Lough, J., M. & Howden, S., M. (2016). *climate change : management measures and Vulnerability of Pacific Island agriculture and forestry to climate change*.
- de Ruyter van Steveninck, E. (1987). Deep water vegetations of *Lobophora variegata* (Phaeophyceae) in the coral reef of Curagao: population dynamics in relation to mass mortality of the sea urchin *Diadema antillarum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 36, 81–90
- El Shafay, S.M., Ali, S.S. & El-Sheekh, M.M. (2016). Antimicrobial activity of some seaweeds species from Red sea, against multidrug resistant bacteria. *Egypt. J. Aquat. Res.*, 42, 65–

- Engel, S., Puglisi, M.P., Jensen, P.R. & Fenical, W. (2006). Antimicrobial activities of extracts from tropical Atlantic marine plants against marine pathogens and saprophytes. *Mar. Biol.*, 149, 991–1002.
- Fukuzawa, A. & Masamune, T. (1981). Laurepinnacin and isolaurepinnacin, new acetylenic cyclic ethers from the marine red alga *laurencia pinnata* yamada. *Tetrahedron Lett.*, 22, 4081–4084.
- Gerwick, W. & Fenical, W. (1982). Phenolic lipids from related marine algae of the order dictyotales. *Phytochemistry*, 21, 633–637.
- Gutiérrez-Cepeda, A., Fernández, J.J., Norte, M., Montalvão, S., Tammela, P. & Souto, M.L. (2015). Acetate-Derived Metabolites from the Brown Alga *Lobophora variegata*. *J. Nat. Prod.*, 78, 1716–1722.
- Hellio, C., Marechal, J.P., Véron, B., Bremer, G., Clare, A.S. & Le Gal, Y. (2004). Seasonal variation of antifouling activities of marine algae from the Brittany Coast (France). *Mar. Biotechnol.*, 6, 67–82.
- Khaleafa, A.F., Kharboush, M.A.M., Metwalli, A., Mohsen, A.F. & Serwi, A. (1975). Antibiotic (Fungicidal) Action from Extracts of Some Seaweeds. *Bot. Mar.*, 18, 163–166.
- Kohler, K.E. & Gill, S.M. (2006). Coral Point Count with Excel extensions (CPCe): A Visual Basic program for the determination of coral and substrate coverage using random point count methodology. *Comput. Geosci.*, 32, 1259–1269.
- Kubanek, J., Jensen, P.R., Keifer, P. a, Sullards, M.C., Collins, D.O. & Fenical, W. (2003). Seaweed resistance to microbial attack: a targeted chemical defense against marine fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 6916–21.
- Lima, M.E.P., Carneiro, M.E., Nascimento, A.E., Grangeiro, T.B., Holanda, M.L., Amorim, R.C.N., *et al.* (2005). Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Agric. Food Chem.*, 53, 6414–6419.
- Maeda, M., Kodama, T., Tanaka, T., Ohfune, Y., Nomoto, K., Nishimura, K., *et al.* (1984). Insecticidal and neuromuscular activities of domoic acid and its related compounds. *J. Pestic. Sci.*, 9, 27–32.
- Manilal *et al.* (2011). In vitro mosquito larvicidal activity of marine algae against the human vectors, *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). *Int. J. Zool. Res.*, 7, 272–278.
- Manilal, A., Selvin, J., Thajuddin, N., Sujith, S., Panikkar, M.V.N., Idhayadhulla, A., *et al.* (2012). BIOPOTENTIALS OF MARINE ALGA , *Lobophora variegata* COLLECTED FROM THE SOUTH INDIAN LITTORAL. *Thalassas*, 28, 47–54.
- Manilal, A., Sujith, S., Kiran, G.S., Selvin, J., Shakir, C., Gandhimathi, R., *et al.* (2009). Biopotentials of seaweeds collected from southwest coast of India. *J. Mar. Sci. Technol.*, 17, 67–73.

- Manilal, A., Sujith, S., Sabarathnam, B., Kiran, G.S., Selvin, J., Shakir, C., *et al.* (2010a). Antifouling Potentials of Seaweeds Collected from the Southwest Coast of India, 6, 243–248.
- Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J., Seghal Kiran, G., Shakir, C. & Premnath Lipton, A. (2010b). Antimicrobial potential of marine organisms collected from the southwest coast of India against multiresistant human and shrimp pathogens. *Sci. Mar.*, 74, 287–296.
- Mhadhebi, L., Chaieb, K. & Bouraoui, A. (2012). Evaluation of Antimicrobial Activity of Organic Fractions of Six Marine Algae. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.*, 4.
- Mille, C. (2010). Les mouches des fruits de NOUVELLE-CALEDONIE (Diptera, Tephritidae) : Systématique, Comportement, Dynamique et Gestion des Populations.
- Morais-Urano, R.P., Chagas, A.C.S. & Berlinck, R.G.S. (2012). Acaricidal action of destruxins produced by a marine-derived *Beauveria felina* on the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Exp. Parasitol.*, 132, 362–366.
- Moreau, J., Pesando, D., Bernard, P., Caram, B. & Pionnat, J.C. (1988). Seasonal variations in the production of antifungal substances by some dictyotales (brown algae) from the french mediterranean coast, 162, 157–162.
- Morrow, K.M., Paul, V.J., Liles, M.R. & Chadwick, N.E. (2011). Allelochemicals produced by Caribbean macroalgae and cyanobacteria have species-specific effects on reef coral microorganisms. *Coral Reefs*, 30, 309–320.
- Nelson, S. (2008). Mango anthracnose. *Plant Dis.*, 1–9.
- Nugues, M.M. & Bak, R.P.M. (2008). Long-term dynamics of the brown macroalga *Lobophora variegata* on deep reefs in Curaçao. *Coral Reefs*, 27, 389–393.
- Oh, K.B., Lee, J.H., Chung, S.C., Shin, J., Shin, H.J., Kim, H.K., *et al.* (2008). Antimicrobial activities of the bromophenols from the red alga *Odonthalia corymbifera* and some synthetic derivatives. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 18, 104–108.
- Peckol, P. & Searles, R.B. (1984). Temporal and spatial patterns of growth and survival of invertebrate and algal populations of a North Carolina continental shelf community. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 18, 133–143.
- Pegoraro Zemolin, A.P., Cruz, L.C., Paula, M.T., Pereira, B.K., Albuquerque, M.P., Victoria, F.C., *et al.* (2014). Toxicity Induced by *Prasiola crispa* to Fruit Fly *Drosophila melanogaster* and Cockroach *Nauphoeta cinerea* : Evidence for Bioinsecticide Action. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A*, 77, 115–124.
- Pérez, M.J., Falqué, E. & Domínguez, H. (2016). Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Mar. Drugs*, 14, 1–38.
- Pesando, D. & Caram, B. (1984). Screening of marine algae from the French Mediterranean coast for antibacterial and antifungal activity. *Bot. Mar.*, 27, 381–386.
- San-Martin, A., Negrete, R. & Roviroso, J. (1991). Insecticide and acaricide activities of polyhalogenated monoterpenes from chilean *Plocamium cartilagineum*. *Phytochemistry*, 30, 2165–2169.

- Saurav, K., Rajakumar, G., Kannabiran, K., Rahuman, A.A., Velayutham, K., Elango, G., *et al.* (2013). Larvicidal activity of isolated compound 5-(2,4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one from marine *Streptomyces* VITSVK5 sp. against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, *Anopheles stephensi*, and *Culex tritaeniorhynchus*. *Parasitol. Res.*, 112, 215–226.
- Sivakumar, S.R. & Vignesh, A. (2014). In vitro Activity of Seaweed Extracts Collected from Gulf of Mannar Coast Islands, Tamilnadu on Clinical Isolates. *IJPBA*, 5, 99–103.
- Stirk, W.A., Reinecke, D.L. & Van Staden, J. (2007). Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. *J. Appl. Phycol.*, 19, 271–276.
- Stone, B.F. & Haydock, K.P. (1962). A method for measuring the acaricidal-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (can.). *Bull. Entomol. Res.*, 53.
- Val, A.G. Del, Platas, G., Basilio, A., Cabello, A., Gorrochategui, J., Suay, I., *et al.* (2001). Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int. Microbiol.*, 4, 35–40.
- Vieira, C., Thomas, O.P., Culioli, G., Genta-Jouve, G., Houlbreque, F., Gaubert, J., *et al.* (2016). Allelopathic interactions between the brown algal genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) and scleractinian corals. *Sci. Rep.*, 6, 18637.
- Watanabe, K., Miyakado, M., Ohno, N., Okada, A., Yanagi, K. & Moriguchi, K. (1989a). A POLYHALOGENATED INSECTICIDAL RED ALGA, PLOCAMIMUM MONOTERPENE FROM THE 'Br. *Phytochemistry*, 28, 77–78.
- Watanabe, K., Umeda, K., Kurita, Y., Takayama, C. & Miyakado, M. (1990). Two insecticidal monoterpenes, telfairine and aplysiaterpenoid A, from the red alga *Plocamium telfairiae*: Structure elucidation, biological activity, and molecular topographical consideration by a semiempirical molecular orbital study. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 37, 275–286.
- Watanabe, K., Umeda, K. & Miyakado, M. (1989b). Isolation and identification of three insecticidal principles from the red alga *Laurencia nipponica* Yamada. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2513–2515.
- Williams, L.A.D. (1991). Acaricidal Activity of Five Marine Algae Extracts on Female *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae). *Florida Entomol.*, 74, 404–408.
- Yu, K.X., Jantan, I., Ahmad, R. & Wong, C.L. (2014). The major bioactive components of seaweeds and their mosquitocidal potential. *Parasitol. Res.*, 113, 3121–3141.

Synthèse sur la partie 1

La première partie de cette thèse a fait l'objet d'un long travail de fractionnements et d'analyses chimiques en vue d'isolements et de purifications de composés chez *Lobophora*, dans un but de valorisation mais également pour aider à l'identification de marqueurs chimiques pour les études métabolomiques. En dépit du travail consacré à ce volet dédié à la chimie des trois espèces de *Lobophora* investiguées (*L. rosacea*, *L. monticola* et *L. sonderii*), aucune nouvelle molécule n'a pu être isolée parmi les composés majoritaires avec nos moyens analytiques. Les lobophorénols identifiés en 2014 ont été observés de nouveau chez *L. rosacea* dans la fraction F4. Nous avons cependant été confrontés à des pertes importantes de ces molécules de lobophorénols lors des étapes de purifications et n'avons donc pas collecté de quantité suffisante pour réaliser des tests de bioactivité. L'analyse en phase normale de la fraction F5 de chaque espèce a révélé la présence de molécules proches des lobophorénols chez les trois espèces, mais sans groupement OH. La partie terminale vinylique caractéristique sur les spectres RMN indique qu'il s'agirait de polyoléfinés, de longueur de chaîne inconnue. Le travail sur les fractions à la fois relativement polaires et sur des fractions apolaires a mis en avant la richesse en lipides et en pigments chez les trois algues, ce qui peut rendre difficile l'isolement des composés de manière générale. Forts de ces observations, de nouvelles collectes de masse ont été réalisées en juillet 2017 pour travailler plus avant la composante chimique apolaire de *Lobophora* (via un fractionnement en phase normale), également repérée par Gutiérrez-Cepeda *et al.* (2015). Ces auteurs ont identifiés sept nouveaux composés relativement apolaires (nonadécaketides) chez *L. variegata* d'Atlantique: lobophorols A–C, lobophopyranones A et B, et lobophorones A et B. Les purifications et analyses RMN des sous-fractions générées par ce nouveau fractionnement en phase normale n'ayant pas pu être effectués dans le cadre de notre étude, nous ne pouvons savoir si des composés apolaires identifiés par ces auteurs sont présents. Les sous-fractions générées ont donné des résultats prometteurs lors du criblage antibactérien sur *Staphylococcus aureus*. En effet, une activité bactériostatique a été détectée pour deux sous-fractions de *L. monticola* et une activité bactéricide sur une sous-fraction de *L. sonderii* et *L. rosacea* respectivement. Il serait donc intéressant de poursuivre les travaux de purification et

d'identification de composés dans ces fractions actives pour caractériser cette composante bioactive.

D'autres tests de criblage ont été réalisés dans un but de valorisation sur plusieurs organismes impliqués dans des problèmes économiques et agricoles. Ces tests de criblage ont été réalisés dans un premier temps sur les extraits bruts de deux espèces facilement accessibles : *L. monticola* et *L. sonderii*. Hormis un potentiel effet attractif sur la mouche des fruits, aucune activité insecticide, répulsive, anti-fongique ou anti-tique n'a été détectée. N'ayant pu isoler les lobophorénols en quantité convenable et n'ayant pas détecté de nouveau composé chez *Lobophora*, ces tests de bioactivités n'ont été réalisés que sur les extraits bruts, aussi faudrait-il poursuivre les tests sur des fractions à minima et idéalement sur des molécules. En effet, des bioactivités potentielles peuvent être « masquées » lorsque les molécules sont en mélange. De nombreux composés peuvent agir de manière synergique ou additive.

Bien que cette partie de la thèse se soit avérée plus compliquée que prévue, notamment en ce qui concerne l'isolement des lobophorénols, les fractions apolaires obtenues après les nouvelles collectes de masse de *L. rosacea*, *L. sonderii* et *L. monticola* ont ouvert des perspectives en terme de bioactivités et mériteraient une caractérisation plus poussée.

Le suivi de la biomasse de *L. sonderii* et *L. rosacea* entrepris sur plusieurs mois de l'année à Ricaudy nécessiterait plus de répliques sur la durée et une optimisation de la méthode. Une hypothèse d'une plus forte croissance de *L. rosacea* en début d'hiver austral avec la chute de température et une diminution aux périodes les plus chaudes a toutefois été émise. Dans le cas de *L. sonderii*, on observe également un pic de densité au début de l'hiver austral (juin) en 2016 mais la tendance de 2017 est différente et pourrait en partie s'expliquer par les épisodes cycloniques d'Avril-Mai. Bien que la température semble expliquer en partie les fluctuations de recouvrement en *L. sonderii*, la technique des photos-quadrats présentent plusieurs biais techniques qui mériteraient d'être améliorés.

PARTIE 2

Etude des sources de
variation du métabolome
de *Lobophora*

Rappel sur les objectifs de cette 2^{ème} partie

Cette deuxième partie de la thèse a pour but d'étudier les sources de variations des métabolites spécialisés chez quatre espèces de *Lobophora*. Nous nous intéressons à des sources biotiques : la variation intra et inter-spécifique, le substrat d'accrochage mais également à des sources abiotiques : l'effet du site/habitat et du temps en lien avec les paramètres environnementaux (température de l'eau de mer, salinité, etc...) ainsi que l'effet de l'acidification de l'océan. Pour cela, nous avons dans un premier temps sélectionné les sites de récoltes au sein du lagon néo-calédonien et mis au point le plan d'échantillonnage. Nous avons ensuite optimisé les protocoles pour analyser le métabolome des algues. Ces étapes sont décrites dans le chapitre 3 suivant.

Chapitre 3

Etude de la variation du
métabolome de *Lobophora*:
mise au point de la méthode



I- Plan d'échantillonnage pour les études de la variation du métabolome

Les sites d'échantillonnage sélectionnés pour cette étude ont été décrits dans la section dédiée. Pour rappel, six sites ont été choisis : cinq dans le lagon Sud-Ouest de Nouméa (Ricaudy, Sainte-Marie, l'île aux Canards, Larégnère, Crouy et Banc du Nord) et un plus au Nord de la côte Ouest de la Grande-Terre (Bouraké) (voir Figure 45).

L'étude du métabolome à l'échelle intra-spécifique a été réalisée sur *L. monticola* (site de Sainte Marie) et *L. rosacea* (site de Ricaudy).

L'étude de la variation inter-spécifique du métabolome a été étudiée chez les quatre espèces, à Ricaudy pour *L. sonderii*, *L. rosacea* et *L. obscura* et Sainte-Marie pour *L. monticola* (cette espèce étant absente de Ricaudy).

La variation spatiale du métabolome a été réalisée sur cinq sites et trois espèces : Ricaudy et Crouy pour *L. sonderii* et *L. obscura* et Ricaudy, Crouy, Larégnère, île aux Canards et Banc du Nord pour *L. rosacea*.

La variation du métabolome à l'échelle temporelle a été effectuée sur 13 mois de collectes au site de Ricaudy pour *L. rosacea*, *L. sonderii* et *L. obscura* et à Sainte-Marie pour *L. monticola*.

Les expériences de transplantations croisées, qui avaient pour but d'étudier l'effet de l'habitat et de l'environnement proche de l'algue sur le métabolome, ont été effectuées sur *L. sonderii* et *L. obscura* à Ricaudy et sur *L. monticola* à Ricaudy et Sainte-Marie. Ces transplantations ont été réalisées en été et hiver australs.

Enfin, l'impact de l'acidification sur le métabolome a été étudié sur *L. rosacea* à Bouraké, où les valeurs de pH sont plus faibles, avec un site contrôle (pH actuel) à Ricaudy et par des expériences en aquariums.

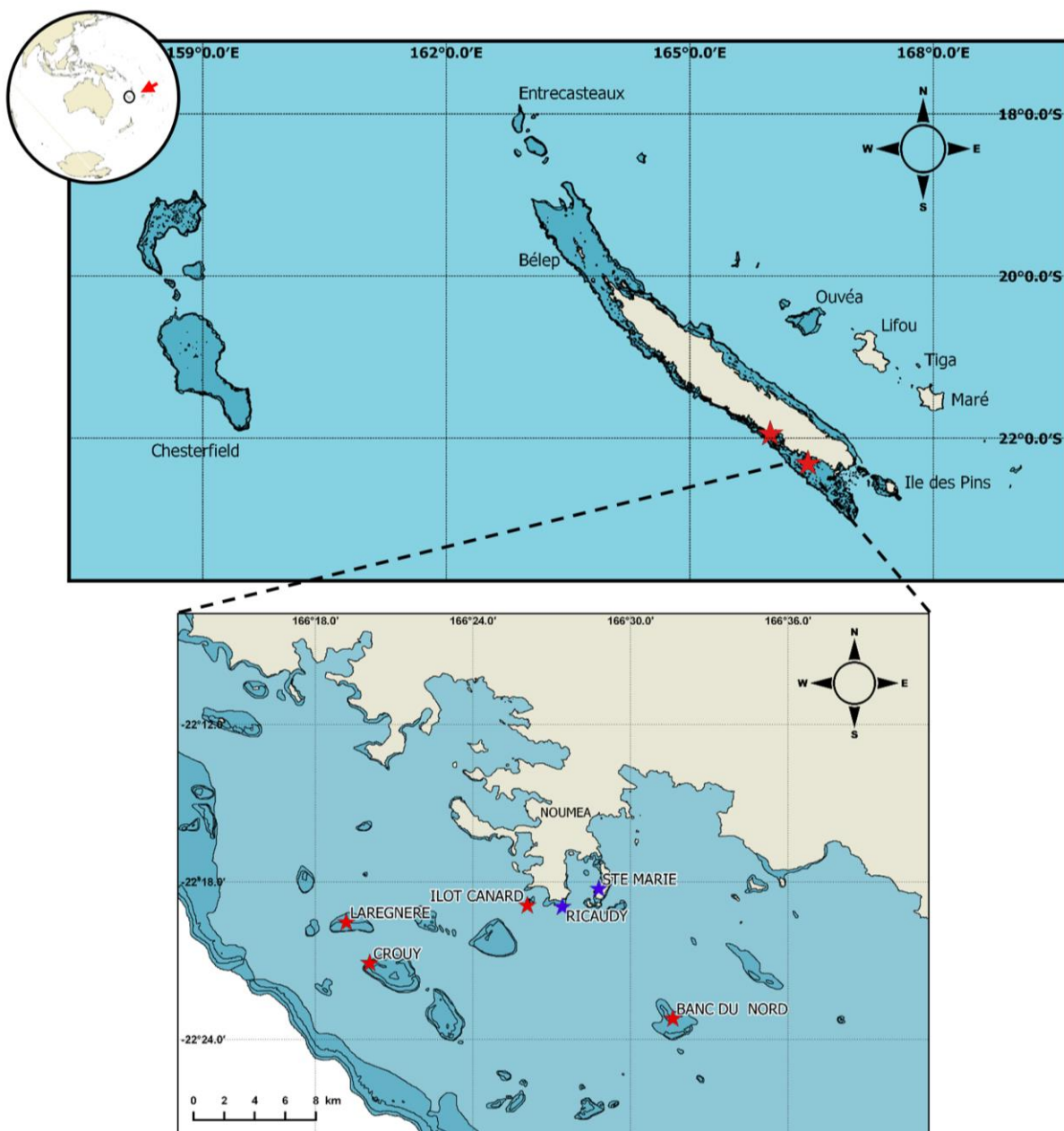


Figure 45. Carte des sites de collectes utilisées au cours de cette thèse dans le lagon Sud de Nouvelle-Calédonie.

Le plan d'échantillonnage a dû prendre en compte les contraintes logistiques : les contraintes économiques, temporelles et dans les méthodes utilisées. Le traitement d'un échantillon depuis la collecte subit plusieurs étapes chronophages. Nous avons donc, dans la mesure du possible, fixé le nombre de répliques à six pour chaque espèce et condition testée. Au total, 679 échantillons ont été traités pour les analyses métabolomiques au cours de cette thèse.

Le Tableau 17 renseigne sur l'effort d'échantillonnage pour chaque étude de la variation du métabolome de *Lobophora*.

Tableau 17. Plan d'échantillonnage pour l'étude des sources de variation du métabolome de *Lobophora*.

Sources de variation/Espèces		<i>L. rosacea</i>	<i>L. sonderii</i>	<i>L. obscura</i>	<i>L. monticola</i>
intra-spécifique	section distale du thalle	5	-	-	-
	section centrale du thalle	6	-	-	-
	section basale du thalle	6	-	-	-
	Partie du thalle en contact avec le corail	-	-	-	6
	Partie du thalle sans contact avec le corail	-	-	-	6
inter-spécifique		6	6	6	6
spatiale	Larégnère	5	-	-	-
	Crouy	4	6	6	-
	Canard	6	-	-	-
	Banc Nord	6	-	-	-
	Ricaudy	6	6	6	
temporelle	13 mois de collectes	77	74	77	72
transplantations : effet de l'habitat, en lien avec l'environnement proche de l'algue et le substrat	été	-	42	38	36
	hiver	-	39	42	33
acidification	<i>In situ</i> (Bouraké et Ricaudy)	16	-	-	-
	en milieu contrôlé	53	-	-	-
TOTAL échantillons					679

II- Mise au point des protocoles d'analyses métabolomiques par UHPLC-MS-QToF

Ci-dessous est présentée la procédure appliquée pour chaque étude métabolomique réalisée dans le cadre de la thèse. Pour certaines études, des paramètres techniques ont dû être adaptés et seront précisés le cas échéant. Les analyses par RMN et GC-MS n'ont été réalisées que pour l'étude de la variation du métabolome à l'échelle inter-spécifique.

1. Récolte des échantillons

La première étape consiste à demander les autorisations de récolte auprès des autorités compétentes (Direction de l'Environnement de la Province Sud). Les permis de récoltes délivrés, les échantillons ont été récoltés à la main en plongée sous-marine. Pour chaque étude réalisée, six spécimens (ou répliques), choisis si possible sans trop d'épiphytes, ont été collectés et placés individuellement dans des sacs zippés. Les échantillons ont été conservés dans la glace sur le bateau (pour ralentir voire stopper le métabolisme) jusqu'au retour au laboratoire où ils ont ensuite été stockés à -20°C jusqu'à leur traitement chimique.

2. Préparation des échantillons

Avant extraction, les échantillons congelés sont à nouveau contrôlés pour retirer le plus gros des éventuels épiphytes, ils sont alors lyophilisés puis réduits en poudre par broyage manuel dans l'azote liquide.

Nous avons décidé de n'enlever que le surplus des gros épiphytes sur les thalles collectés tout au long des travaux suite à une expérience préliminaire réalisée en début de thèse. Des thalles de *L. rosacea* et *L. sonderii* ont été coupés en deux : une partie a été laissée telle quelle en enlevant seulement le plus gros des épiphytes, et l'autre moitié des thalles a été soigneusement nettoyée de ses épiphytes avec une lame de rasoir. Les profils HPLC de ces deux espèces, avec ou sans épiphytes, ont été comparés. Les profils étant sensiblement similaires, nous avons décidé d'étudier les algues dans leur totum. De plus, le nettoyage soigneux des épiphytes est très chronophage et peu compatible avec le nombre d'échantillons à traiter. Enfin, les thalles de *L. rosacea* étant très fins, le grattage à la lame de rasoir peut également arracher la/les premières couches de surfaces cellulaires.

Pour chaque échantillon, 250 mg de poudre ont été extraits trois fois successives à l'aide de 5 mL de MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) dans un bain à ultrasons (5 min). Les filtrats (papier filtre, 4-12 µm, Macherey-Nagel) sont ensuite concentrés à l'aide de l'évaporateur rotatif après adsorption sur poudre de silice C18 (Polygoprep® Macherey-Nagel). Les extraits ont ensuite été fractionnés par extraction en phase solide (SPE pour « Solid Phase Extraction », Strata C18-E, 500 mg/6 mL, Phenomenex®) après lavages des cartouches (6 mL MeOH/CH₂Cl₂ 1:1) et conditionnement (6 mL H₂O), via trois éluions successives : 6 mL d'H₂O, 6 mL de MeOH et 6 mL de CH₂Cl₂. Les fractions aqueuses n'ont pas été conservées. Un volume d'un millilitre des fractions MeOH a été filtré (PTFE, 0,20 µm, Phenomenex®), séché et utilisé ultérieurement pour les analyses UHPLC-MS-qToF. Certaines fractions CH₂Cl₂ ont été séchées puis utilisées ultérieurement pour les analyses GC-MS réalisées à Marseille, à l'Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE), Service Commun d'écologie chimique et métabolomique

3. Analyses métabolomiques par UHPLC-MS-QToF

Les analyses métabolomiques par UHPLC-MS-QToF ont fait l'objet d'un long travail de mise au point et d'optimisation des protocoles à la National University of Ireland (NUI) à Galway. Plusieurs paramètres ont dû être optimisés pour l'analyse du grand nombre d'échantillons récoltés : la phase mobile, c'est-à-dire les solvants avec les adduits, la phase stationnaire (colonne), le gradient d'éluion, le flux, le volume d'injection, la dilution des échantillons ainsi que le mode d'ionisation. Nous aborderons chacun d'entre eux dans ce paragraphe.

Les analyses métabolomiques à Galway ont été réalisées sur UHPLC-QToF (6540 UHD Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight, Agilent Technologies) en mode Dual Agilent Jet Stream Electrospray Ionization.

Des échantillons ont également été analysés sur la plateforme Mallabar hébergée à la station Marine d'Endoume (OSU-PYTHEAS, Marseille) avec l'aide de Stéphane Greff, dans un but premier d'inter-comparaison. Ainsi, l'étude du métabolome à l'échelle inter-spécifique et celle sur l'impact de l'acidification ont été réalisées sur UHPLC (Dionex Ultimate 3000,

Thermo Scientific®) couplée à un spectromètre de masse (accurate mass spectrometer) équipé d'une source ESI (QqToF Impact II, Bruker Daltonics®).

3.1. Choix de la phase mobile

La première étape d'optimisation a concerné le gradient d'élution et son débit ainsi que les solvants et adduits à utiliser. Le gradient et le débit doivent être optimisés de telle sorte que les pics soient séparés au mieux et se situent dans le centre de la fenêtre d'acquisition. Les composés (pics) sortant au début du chromatogramme sont élués directement de la colonne et ne sont donc pas séparés.

Les adduits permettent de favoriser l'ionisation des molécules, processus essentiel pour leur détection en LC-MS, en tamponnant le milieu.

Le mélange de solvants suivant avec leurs adduits a ainsi été retenu pour nos analyses :

- Solvant A : H₂O + 0,1 % d'acide formique + 10 mM de formate d'ammonium

- Solvant B : H₂O/ acétonitrile (5/95) + 0,1 % d'acide formique + 10 mM de formate d'ammonium.

3.2. Optimisation du gradient

Le gradient d'élution suivant a été retenu pour les analyses, avec un run total de 17 min et un débit de 0,4 mL/min (0,5 mL/min dans le cas des expériences de transplantations croisées).

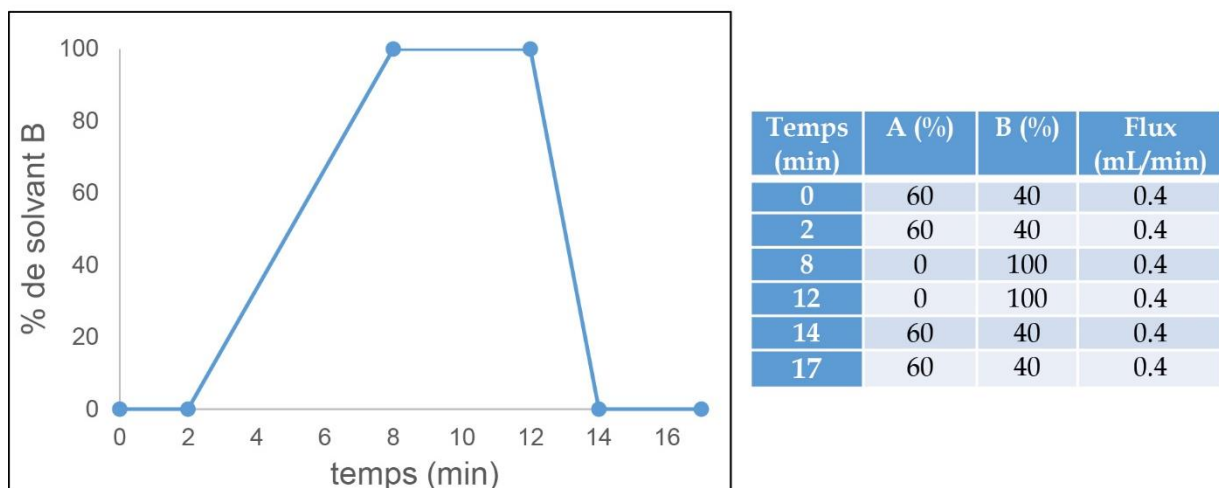


Figure 46. Gradient d'élution optimisé pour les analyses en LC-MS.

L'élution commence avec un mélange A:B (60 :40) durant 2 min, le solvant B augmente ensuite de manière linéaire pour atteindre 100 % à 8 min. Le gradient reste isocratique avec 100 % de B entre 8 et 12 min pour ensuite retourner à la condition initiale entre 12 et 14 min. S'en suit 3 min de post-run pour équilibrer la colonne (Figure 46).

3.3. Dilution des échantillons

Ces étapes d'optimisation ont été réalisées sur un pool d'échantillons, appelé Contrôle Qualité (*Quality Control QC*). Les tests sont tout d'abord réalisés sur le pool non dilué (contenant 25 µL de chaque échantillon). Nous avons ensuite testé deux dilutions du pool : 1/5^{ème} et 1/10^{ème}. Nous optimisons la dilution du pool de façon à ce que la ligne de base soit au même niveau entre les pics (voir Figure 47).

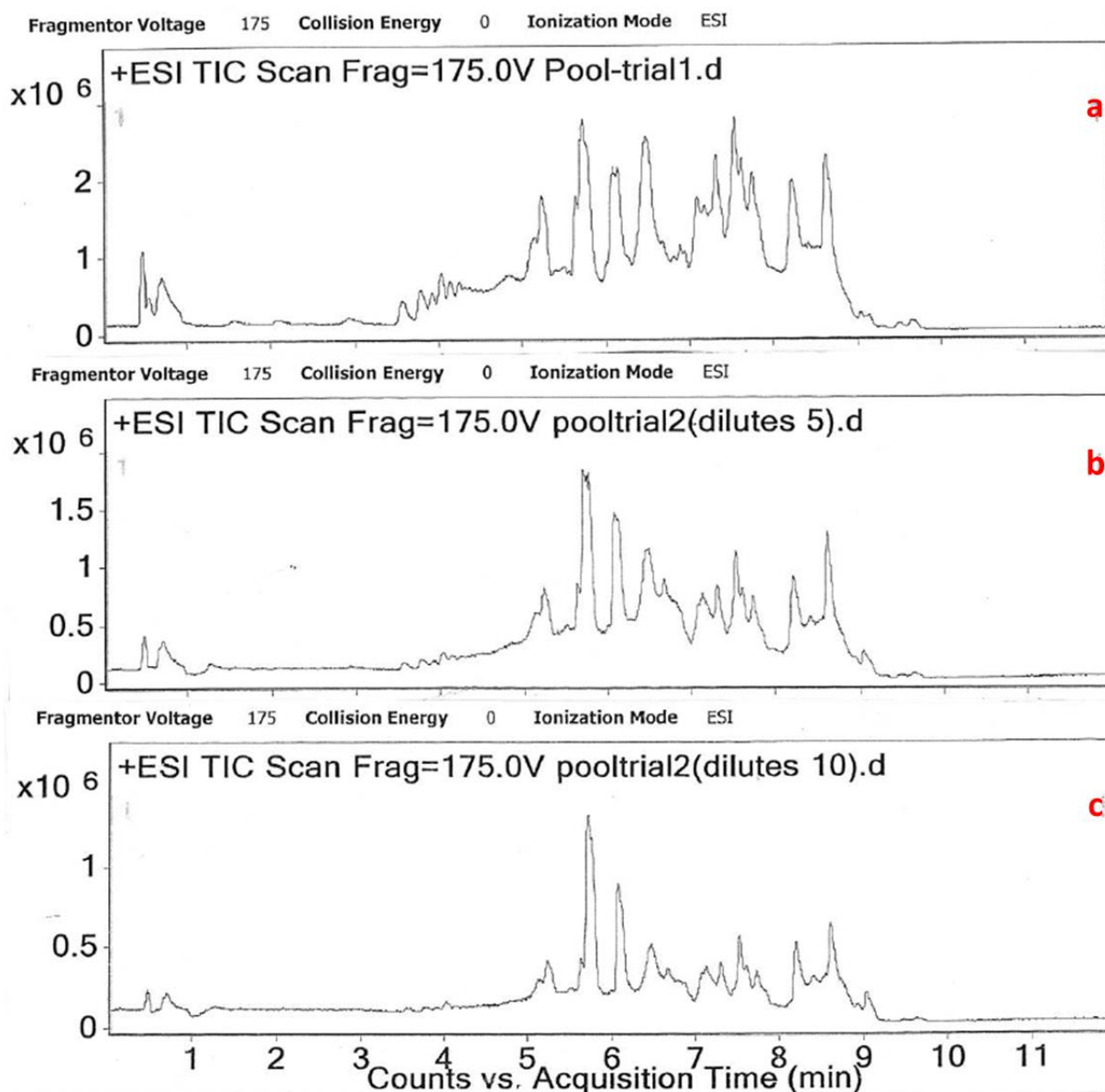


Figure 47. Chromatogramme du pool non dilué (a), dilué au 1/5^e (b) et dilué au 1/10^e (c).

La dilution du pool au 1/10^{ème} ayant été retenue, tous les échantillons ont été dilués au 1/10^{ème} dans du MeOH.

3.4. Volume d'injection

Le volume d'injection doit aussi être optimisé afin de ne pas saturer le signal. Dans notre cas, nous avons choisi un volume d'injection de 3 µL (5 µL dans le cas des expériences de transplantations croisées).

3.5. Mode d'ionisation

Il existe deux modes d'ionisation en LC-MS : l'ionisation positive et l'ionisation négative. Comme évoqué précédemment, la détection des ions dépend de leur mode d'ionisation. L'ionisation dépend elle-même des caractéristiques physico-chimiques des molécules ; ainsi suivant le protocole expérimental mis en place, certaines molécules seront ionisées et seront alors visualisées alors que les molécules non ionisées ne seront pas détectées.

Nous avons testé les modes d'ionisation positive et négative et l'ionisation positive a été retenue en raison du plus grand nombre de composés s'ionisant dans ce mode, ce qui répondait à l'objectif de l'analyse métabolomique globale non ciblée (« metabolomic fingerprinting »).

Un exemple de chromatogramme obtenu dans les deux modes est présenté à la Figure 48.

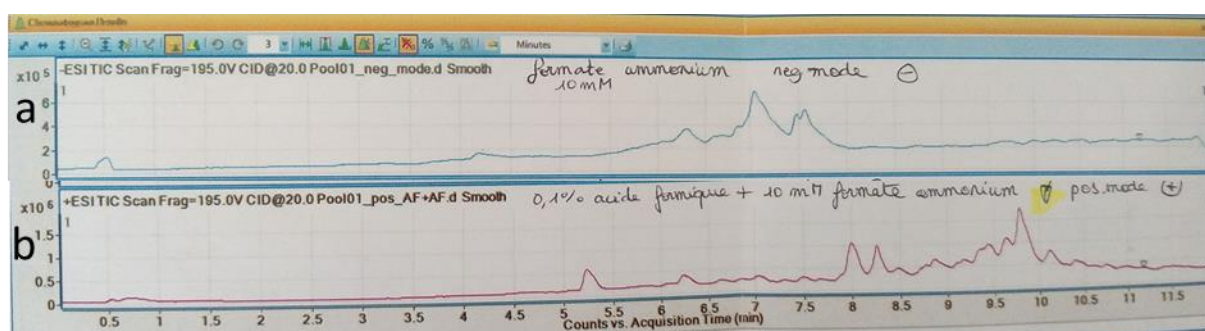


Figure 48. Exemple de chromatogramme obtenu en mode d'ionisation positive (a) et négative (b).

3.6. Choix de la phase stationnaire

Le choix de la colonne en fonction de la polarité des composés à analyser a également été pris en compte. Il n'existe pas de colonne pouvant détecter tous les composés d'un échantillon, il faut donc trouver le meilleur compromis pour essayer de détecter le plus grand nombre de molécules ou les molécules que l'on connaît potentiellement et qui sont intéressantes pour notre étude.

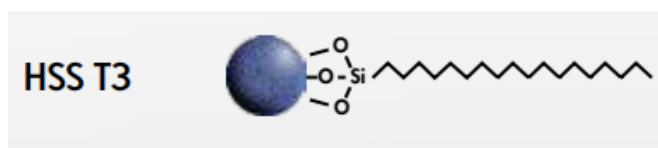
Dans notre cas, nous avons comme « référence » les lobophorénols isolés chez *L. rosacea* en 2014 (Vieira *et al.*, 2016). De par leur longue chaîne carbonée contenant plusieurs insaturations, les lobophorénols sont relativement non polaires. *Lobophora* est également riche en lipides et en pigments. Notre choix s'est porté sur une colonne phényl-héxyl (BEH-

phenyl) à Galway. Cette colonne est souvent utilisée pour des mélanges complexes, en particulier pour les molécules contenant des cycles aromatiques en raison des interactions pi-pi.



Nous n'avons pas pu utiliser les lobophorénols purs isolés en 2014 pour optimiser leur détection en raison de la dégradation des molécules.

Les analyses LC-MS des expériences de transplantations ont été réalisées sur une autre colonne que BEH-phenyl car nous avons observé des pics provenant de contaminations sur les chromatogrammes. Ce problème de contamination est abordé dans le paragraphe 6. Les analyses de transplantations ont été faites sur une colonne T3 (contenant des ligands C₁₈), une colonne également adaptée pour l'analyse de mélanges variés. Elle offre une rétention privilégiée pour les composés polaires et métabolites.



Sur le plateau technique Mallabar de la Station Marine d'Endoume (Marseille), les analyses ont été réalisées sur colonne C18 UHPLC (Acclaim™ RSLC 120 C18 150 x 2,1 mm, 2,2 µm, Thermo Scientific®).

Pour chacune des analyses, la température de la colonne a été programmée à 40°C.

3.7. Paramètres MS & Schéma d'injection

Sur l'UHPLC-QToF Agilent (à Galway), les paramètres MS ont été programmés comme suit : gaz de nébulisation « nebulizer gas » : N₂ à 30 psig, température du gaz « gas temperature » : 300 °C, gaz de séchage « drying gas » : N₂ à 7 mL.min⁻¹, fenêtre d'acquisition TOF « TOF spectra acquisition » : de *m/z* 100 to 1600, voltage du capillaire « capillary voltage » : 3500 V. Des spectres MS² ciblés ont été acquis dans les mêmes conditions.

Sur l'UHPLC Dionex Ultimate 3000 (plateau technique Mallabar), les paramètres MS ont été programmés comme suit : gaz de nébulisation « nebulizer gas » : N₂ à 40 psig, température du gaz « gas temperature » : 300 °C, gaz de séchage « drying gas » : N₂ débit 4 L.min⁻¹, voltage du capillaire « capillary voltage » : 3500 V, fenêtre d'acquisition TOF « TOF spectra acquisition » : de 50 à 1,200 amu à 2 Hz. Les spectres auto-MS² ont été acquis dans les mêmes conditions.

Pour chaque étude ou question scientifique abordée, un contrôle qualité a été préparé avec 25 µL de chaque échantillon. Les échantillons QC permettent de vérifier les décalages des spectres MS au cours des analyses et assurent ultérieurement la normalisation des données. Chaque étude a démarré avec une injection de blancs (MeOH), suivie par 10 injections de QC, puis les échantillons et un QC tous les 5 échantillons injectés de manière aléatoire le long du run. Un blanc final a été injecté pour vérifier l'effet mémoire sur la colonne.

3.8. Traitement des données LC-MS

Les fichiers de données LC-MS bruts ont été convertis en fichiers mzXML (netCDF en mode centroïde pour l'appareil de Marseille) avec MSconvert en utilisant le logiciel Python (version 2.7.11) (avec Bruker Compass DataAnalysis 4.3 pour l'appareil de Marseille). Les fichiers mzXML/netCDF ont ensuite été traités en utilisant le package XCMS pour le logiciel R (version 3.3.2, XCMS version 1.50.1). XCMS est un logiciel open source très populaire en métabolomique pour traiter les données de spectrométrie de masse. Ce logiciel comprend plusieurs algorithmes et des fonctions pour R qui vont permettre d'extraire, filtrer, aligner et intégrer les pics. Les paramètres optimisés pour XCMS ont été utilisés comme suit: (1) détection des pics « peak picking » (method = "centwave", peakwidth = c(2,20), ppm = 15, mzdifff = 0.05, prefilter = c(0,0)), (2) correction du temps de rétention « retention time correction » (method = "obiwarp"), (3) appariement des pics à travers les échantillons « matching peaks across samples » (bw = 30, mzwid = 0.015, minfrac = 0.3) et (4) corrections des pics manquants « filling in missing peaks ».

Ce traitement des données par XCMS génère une matrice de composés avec des intensités de pics, des valeurs de m/z et des temps de rétention. Chaque matrice a été filtrée en fonction

des blancs et des QC (scripts maison de Jean-Charles Martin pour R) pour supprimer la variabilité technique de la façon suivante :

1/ Filtration par rapport aux blancs avec un ratio signal/blanc > 10. On considère qu'un ion n'est pas du bruit de fond si son intensité moyenne dans les pools est au moins 10 fois supérieure à celle des blancs.

2/ Filtration des ions dans les pools dont le coefficient de variation est > 20 %. Cette étape permet de supprimer les mesures d'intensités d'ions qui ne sont pas fiables et peuvent être liées à la variabilité de l'appareil.

3/ Suppression des ions redondants dans les échantillons. Pour un même temps de rétention, des ions de masses différentes peuvent être identiques (adduits différents ou isotopes par exemple). Pour un temps de rétention donné, si deux ions ont un coefficient de corrélation > 80 %, on les considère comme redondants et celui d'intensité la plus faible est supprimé.

La matrice filtrée est ensuite normalisée par log-transformation avant les analyses statistiques. Des réseaux moléculaires basés sur les spectres MS² ont été construits avec GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking, Wang *et al.* 2016) et gérés sous Cytoscape 3.5.0 (Shannon *et al.* 2003) pour aider à l'annotation de composés. La recherche de composés à partir de la masse exacte obtenue (m/z) a été faite sur METLIN (metlin.scripps.edu). Le logiciel SIRIUS 4.0. (Böcker & Dührkop 2016) a également été utilisé sur les spectres MS² pour aider à l'annotation des marqueurs chimiques. Ce logiciel compare les données expérimentales obtenues avec des données théoriques (spectres de fragmentation *in silico*) sur toutes les molécules qu'il y a dans les bases de données.

4. Analyses métabolomiques par ¹H-RMN

Pour l'analyse du métabolome à l'échelle inter-spécifique, les fractions ont également été analysées par RMN. Les fractions sèches ont été dissoutes dans 0,5 mL de CDCl₃. Le solvant CDCl₃ a été choisi plutôt que CD₃OD car les signaux des lobophorénols étaient plus visibles dans le premier solvant et les spectres RMN présentaient une meilleure définition. Les

spectres ^1H -NMR ont été acquis sur un spectromètre Agilent 600 MHz équipé d'une cryoprobe. Les paramètres utilisés pour l'acquisition des données sont les suivants : fenêtre spectrale : 16 ppm, délai de relaxation : 1 s, nombre de scans : 32, temps d'acquisition : 1,7 s, nombre de points : 16 K, angle de basculement : 90° .

Les spectres ^1H -NMR ont ensuite été automatiquement transformés par la transformation de Fourier et traités sur MesReNova 11. Les lignes de bases des spectres ont été corrigées automatiquement, suivie par la correction « Whittaker smoother ». Un découpage égal du spectre en *bin* de 0,001 ppm a été appliqué entre 0- 8 ppm pour obtenir la matrice de données finale. Les données ont ensuite été normalisées par auto-scaling (centré sur la moyenne et divisé par la déviation standard de chaque variable) et log-transformées avant les analyses statistiques.

5. Analyses métabolomiques par GC-MS

Pour l'analyse du métabolome à l'échelle inter-spécifique, les fractions apolaires (CH_2Cl_2) issues de la SPE ont également été analysées par chromatographie gazeuse (7890B GC System - 7693 autosampler, Agilent Technologies®) couplée à un détecteur de masse sélectif (5977A MSD, Agilent Technologies®). La séparation des métabolites a été réalisée sur colonne HP-5MS 5% Phenyl-Methyl Silox (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm , Agilent Technologies®) avec l'hélium comme phase mobile. Le run a démarré à 40°C durant 5 min et augmenté de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ jusqu'à 350°C pour un run total de 31 min. Un débit constant à 1 mL min^{-1} a été programmé. Un volume de 1 μL de chaque échantillon a été injecté en mode splitless à 250°C . Une solution comprenant un mélange d'alcane C8-C20 et C21-C40 (Fluka Analytical) a également été injectée pour la détermination des index de rétention des composés.

Les fichiers de données Agilent résultant des analyses GC-MS ont été exportés en fichiers CDF avec MSD Chemstation (F.01.001903, Agilent Technologies®). Les fichiers CDF ont ensuite été traités avec le package eRah (version 1.0.5, Domingo-Almenara et al. 2016) sous R en réalisant les étapes suivantes: (1) prétraitement « preprocessing », (2) déconvolution des pics « peak deconvolution » (`min.peak.width = 2,5`, `min.peak.height = 2500`, `noise.threshold = 500`, `avoid.processing.mz = c(73,149,207)`), (3) alignement des pics « peak alignment »

(min.spectra.cor = 0,90, max.time.dist = 60, mz.range = 40:500) et (4) récupération des pics manquants « missing compound recovery » (with presence required in 3 samples at least). L'annotation des composés a été faite manuellement en comparant les spectres de masse et les indices de Kovàts calculés (van Den Dool & Kratz, 1963) avec la base de données NIST 2011. Pour finir, la matrice obtenue a été filtrée en fonction du blanc. Les données ont été log-transformées avant les analyses statistiques.

6. Problème rencontré en LC-MS : contamination de certains échantillons

Après le premier lot d'analyses, nous avons observé la présence de certains échantillons contaminés. Ceux-ci présentaient des pics anormaux à partir de la deuxième moitié du chromatogramme, avec une différence de masse (m/z) constante de 74 (Figure 49).

Plusieurs origines possibles de contamination ont été incriminées mais la ou les sources n'ont pas été clairement identifiées. La contamination pourrait venir des septa (membrane en silicone/ teflon (ou PTFE) à l'intérieur du bouchon, que l'aiguille d'HPLC va venir percer en prélevant l'échantillon) des bouchons des flacons HPLC. En utilisant des bouchons à septa pré-perçés, beaucoup moins de contaminations ont été détectées. Des contaminations possibles avec les septa ont déjà été montrées, notamment en analyse GC-MS (Ulanowska et al., 2012; www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/35726-How-Pierced-PTFE-Silicone-Septa-Affect-GC-MS-Experiments/). Les séries de contaminations par des groupes d'ions de $m/z = 74$ de différence ont été reportées comme provenant de polysiloxanes ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}$), de polymères et dérivés de caoutchouc de silicone, mais également d'adduits KCl (Tableau 18) (Keller *et al.* 2008; Trötz Müller *et al.* 2011). Les septa étant composés de silicone/PTFE, ils sont une source de contamination plausible. Une deuxième origine possible serait le silicone des tuyaux de l'HPLC. En effet cette contamination a déjà été constatée sur certains appareils lorsque le tube silicone opaque est branché sur le système de source API (atmospheric pressure ionization), dans ce cas des ions de m/z 536, 610 et 684 peuvent alors être observés (Mahn, 2005) comme dans notre cas (Figure 49). Les contaminations des échantillons auraient aussi pu être survenues lors d'étapes en amont des analyses LC-MS, lors de l'extraction ou du fractionnement par exemple (ex : caoutchouc des seringues).

Tableau 18. Groupes d'ions retrouvés dans des contaminations en mode d'analyse ESI+ (Electrospray ionization, mode positive) issu de Waters ®.

ESI+ Clusters		
m/z		Compound
72		Replacement of OH by OSi(CH ₃) ₃
74		KCl
74		Si(CH ₃) ₂ O (from rubber)
77		NH ₄ Ac salts
78		DMSO
82		NaAc
136		NaTFA
162		Polysaccharides

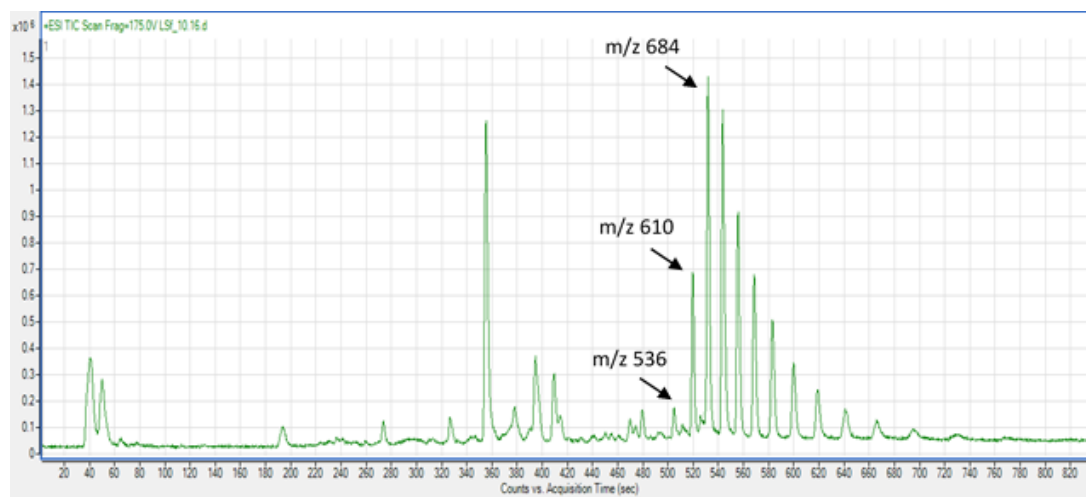


Figure 49. Chromatogramme d'un échantillon de *L. sonderii* présentant des pics indiquant une probable contamination par caoutchouc de silicone ou polysiloxanes.

Pour les runs d'analyses contenant de nombreux échantillons contaminés, les matrices finales ont dû être filtrées manuellement pour enlever les pics correspondant aux contaminants. Lorsque peu d'échantillons contaminés étaient présents, les étapes de filtrations par rapport aux blancs et aux pools après le traitement XCMS permettaient de les enlever automatiquement.

III- Tests statistiques

Les tests d'analyses descriptives et statistiques utilisés au cours des travaux sont décrits ci-après. Pour chaque test sont donnés une brève description et le package ou logiciel utilisé pour le réaliser.

- **ACP (Analyse en Composantes Principales)**

L'Analyse en Composantes Principales est une analyse non supervisée qui a pour objectif de synthétiser au mieux la variance totale du jeu de données. En traçant le graphe des individus (PCA loading plot), on peut observer la présence ou non d'une structuration dans le jeu de données, c'est-à-dire la formation de groupes (Fiehn *et al.* 2000). Si des groupes sont suspectés, on peut alors procéder à une analyse supervisée, comme la PLS-DA (Régression PLS discriminante ou régression des moindres carrés partiels discriminante).

➤ Packages RVAideMemoire et vegan sur R.

- **PLS-DA (Régression PLS discriminante ou régression des moindres carrés partiels discriminante)**

La régression PLS discriminante est une analyse supervisée qui permet de trouver le maximum de covariance entre le jeu de données et leur classe (ou groupe). Cette méthode est typiquement utilisée pour la classification et la sélection de marqueurs dans les études métabolomiques (Szymańska *et al.* 2012; Hervé 2016). La qualité de prédiction de cette analyse, c'est-à-dire sa capacité à classer un individu dans un groupe sans erreur, repose sur une méthode de double validation croisée (*cross model validation* ou 2CV) avec tests de permutations. On obtient une valeur du taux de mauvaise classification : NMC (nombre de mauvaises classifications avec des *p-value* après double validation croisée ou « number of misclassification with p-value after double cross model validation ») ou CER (taux d'erreur de classification avec des *p-value* après double validation croisée ou « classification error rate with p-value after double cross model validation »). Si le facteur testé a un effet significatif, on réalise alors des comparaisons multiples deux à deux pour identifier les groupes

significativement différents les uns des autres (test post-hoc ; MVA.test et pairwise.MVA.test). Le cercle de corrélation permet alors d'identifier les variables qui différencient ces groupes.

- Packages RVAideMemoire et pls sur R.

- **PERMANOVA (Analyse Multivariée de la Variance par Permutations)**

L'Analyse Multivariée de la Variance par Permutations permet des analyses de données multivariées en réponse à des facteurs, groupes ou traitements. Elle permet de voir la corrélation entre le jeu de données et les facteurs étudiés. La permanova se base sur des mesures de matrices de distance et utilise des permutations avec des ratios pseudo-F (Anderson 2017).

- Package vegan sur R.

- **CAH (Classification ascendante hiérarchique)**

La classification ascendante hiérarchique (ou Hierarchical Cluster Analysis HCA) est une analyse exploratoire permettant d'identifier des structures au sein du jeu de données, c'est-à-dire des groupes homogènes de cas sans a priori sur leur appartenance. Les résultats sous forme d'arbre permettent de mettre en évidence des liens hiérarchiques entre individus ou groupes d'individus et de détecter un nombre de classes au sein du jeu de données (Madala *et al.* 2014).

- Réalisé sur MetaboAnalyst 3.0

- **Diagramme de Venn**

Le diagramme de Venn permet d'identifier les variables communes entre plusieurs groupes. Il est classiquement utilisé en métabolomique pour identifier de potentiels marqueurs spécifiques ou communs à des groupes (Chen & Boutros 2011).

- Visualisé sur Venny 2.0 ou package Vennerable sur R.

- **Test de Mann-Whitney**

Le test de Mann-Whitney est un test non paramétrique. Il permet d'estimer si les variables de deux échantillons suivent la même loi de probabilité ou appartiennent à la même population.

- Réalisé sur R

- **Test de Kruskal-Wallis**

Le test de Kruskal-Wallis est un test non paramétrique. En présence de k échantillons indépendants, il permet de déterminer si ceux-ci proviennent d'un même groupe ou si au moins un échantillon provient d'un groupe différent des autres. Afin d'identifier quels échantillons sont significativement différents les uns des autres, il est possible d'utiliser une procédure de comparaisons multiples (test post hoc, cf ci-dessous).

- Package PMCMR sur R.

- **Test post-hoc de Conover**

En cas de résultats significatifs au test de Kruskal-Wallis, le test post-hoc de Conover peut être utilisé afin d'identifier les échantillons significativement différents les uns des autres. Ce test calcule des comparaisons multiples deux à deux.

- Package PMCMR sur R

- **AFM (Analyse Factorielle Multiple)**

L'Analyse Factorielle Multiple (*MFA* pour *Multiple Factor Analysis*) (Pagès 2002) est une méthode d'analyse de données multivariées permettant de résumer et de visualiser plusieurs jeux de données rassemblés en un tableau, dans lequel les individus sont décrits par plusieurs ensembles de variables (quantitatives et / ou qualitatives) structurés en groupes. Les variables doivent être pondérées avant l'analyse.

En métabolomique, cette méthode nous permet notamment de coupler des données obtenues avec deux techniques, par exemple LC-MS et RMN.

- Packages FactoMineR et factoextra.

Le Tableau 19 résume les tests utilisés en fonction des techniques d'analyses du métabolome (LC-MS, GC-MS ou RMN) et rappelle les packages R ou les logiciels qui leurs sont associés.

Tableau 19. Tests utilisés (avec leur package R ou logiciel) en fonction des techniques d'analyses du métabolome (LC-MS, GC-MS ou RMN).

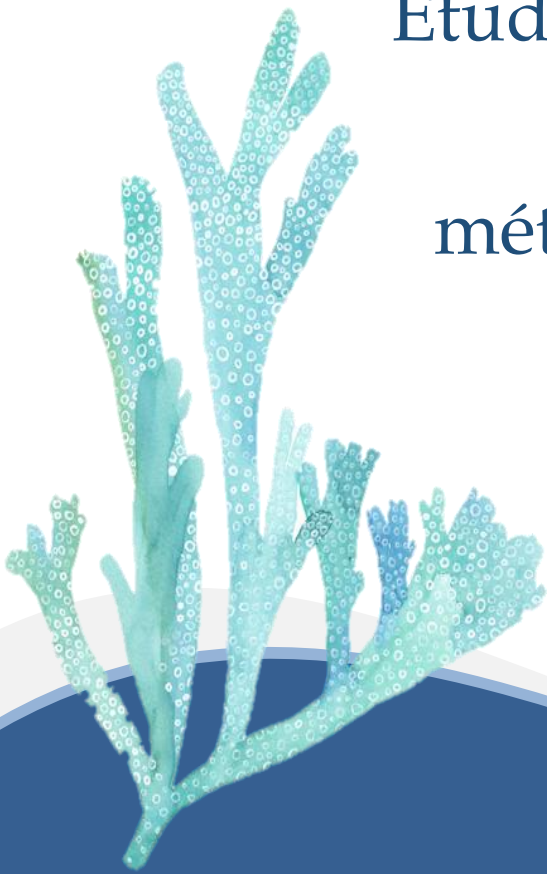
tests/ techniques	LC-MS	GC-MS	RMN	Packages / logiciels
ACP	X	X	X	RVAideMemoire & vegan
PPLS-DA	X	X	X	RVAideMemoire & pls
PERMANOVA	X			vegan
CAH	X			MetaboAnalyst 3.0
Diagramme de Venn	X			Vennerable ou Venny 2.0.
Test de Mann-Whitney	X			Fonction de base dans R
Test de Kruskal-Wallis	X	X		PMCMR
Test post-hoc de Conover	X	X		PMCMR
AFM	X		X	FactoMineR & factoextra

Références

- Böcker, S. & Dührkop, K. (2016). Fragmentation trees reloaded. *J. Cheminform.*, 8, 1–26.
- Chen, H. & Boutros, P.C. (2011). VennDiagram: A package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics*, 12.
- Fiehn, O., Kopka, J., Dormann, P., Altmann, T., Trethewey, R.N. & Willmitzer, L. (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.*, 18, 1157–1161.
- Hervé, M. (2016). Aide-mémoire de statistique appliquée à la biologie. pp. 129–145.
- Keller, B.O., Sui, J., Young, A.B. & Whittall, R.M. (2008). Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 627, 71–81.
- Madala, N.E., Piater, L.A., Steenkamp, P.A. & Dubery, I.A. (2014). Multivariate statistical models of metabolomic data reveals different metabolite distribution patterns in isonitrosoacetophenone-elicited *Nicotiana tabacum* and *Sorghum bicolor* cells. *Springerplus*, 3, 1–10.
- Mahn, bill. (2005). *Notes on troubleshooting LC/MS contamination*.
- Pagès, J. (2002). Evue de statistique appliquée. *Rev. Stat. appliquée*, 50, 5–37.
- Shannon, P., Markiel, A., Owen Ozier, 2, Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., *et al.* (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 13, 2498–2504.
- Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A.K. & Westerhuis, J.A. (2012). Double-check: Validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*, 8, 3–16.
- Trötz Müller, M., Guo, X., Fauland, A., Köfeler, H. & Lankmayr, E. (2011). Characteristics and origins of common chemical noise ions in negative ESI LC-MS. *J. Mass Spectrom.*, 46, 553–560.
- Ulanowska, A., Ligor, T., Amann, A. & Buszewski, B. (2012). Evaluation of septa quality for automatic SPME-GC-MS trace analysis. *J. Chromatogr. Sci.*, 50, 10–14.
- van Den Dool, H. & Dec. Kratz, P. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A*, 11, 463–471.
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V. V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., *et al.* (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.*, 34, 828–837.

Chapitre 4

Etude de la variation intra et
inter-spécifique du
métabolome de *Lobophora*



Ce chapitre a pour but d'étudier la variation intra- et inter- spécifique du métabolome chez plusieurs espèces de *Lobophora*, via des techniques de métabolomique non ciblées.

Nous nous intéressons dans un premier temps à la variation intra-thalle chez *L. rosacea*, qui présente des frondes dont les parties basales, centrales et distales sont facilement distinguables, et chez *L. monticola*, qui présente des frondes à la fois en contact avec des branches de coraux vivants *Acropora muricata* et des frondes sans contact avec les coraux. Nous avons pour cela utilisé une approche métabolomique par UHPLC-QToF. Cette étude nous permet de voir si la répartition des métabolites est homogène au sein des thalles et si les frondes en contact avec un corail ont une empreinte chimique différente de celles sans contact.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la variation inter-spécifique du métabolome chez quatre espèces bien éloignées phylogénétiquement, présentant des morphologies et des habitats variées : *L. rosacea*, *L. sonderii*, *L. monticola* et *L. obscura*. Ces espèces sont bien représentées au sein du lagon néo-calédonien et certaines d'entre elles sont en interaction proche avec les coraux. Trois techniques de métabolomiques ont été utilisées : la LC-MS, la GC-MS et la RMN. Cette étude nous permet de voir si (a) les espèces peuvent se distinguer sur la base de leur empreinte métabolomique, (b) si une technique ou une combinaison de techniques est plus adaptée pour discriminer ces espèces et si (c) des marqueurs chimiques spécifiques peuvent être mis en avant.

I- Etude de la variation intra-spécifique du métabolome

1. Contexte de l'étude

Comprendre l'intensité et la variation en métabolites secondaires dans les organismes marins est un élément essentiel pour la réalisation d'études d'écologie chimique. Cette variation intra-spécifique sur laquelle la sélection naturelle agit est importante pour comprendre les composantes génétiques versus phénotypiques modulant la biodiversité marine (Hay 1996). C'est donc à cette échelle intra-spécifique que nous commençons l'étude du métabolome de *Lobophora*, avant d'entreprendre son exploration à de plus larges échelles.

La variation intra-spécifique du contenu en métabolites secondaires chez les algues peut s'appréhender à différents niveaux (Meyer & Paul 1992):

- la variation entre différents habitats pour une même espèce
- la variation dans le stade de vie de l'algue (ex : jeune versus sénescence, stade reproducteur ou non reproducteur)
- la variation entre différents thalles appartenant à la même population
- la variation entre différentes parties d'un même thalle (par exemple la partie basale versus la partie distale).

C'est à cette échelle de variation intra-thalle que nous nous intéressons. Pour cela, deux espèces de *Lobophora* ont été choisies pour étudier la variabilité en métabolites secondaires : *L. monticola*, qui présente à la fois des frondes complètement en contact avec les branches du corail et d'autres « libres » et *L. rosacea*, qui forme des thalles en rosette dont les parties basale, distale et centrale se distinguent facilement.

Comprendre la distribution des métabolites secondaires au sein du thalle peut également permettre d'évaluer la fonction des métabolites secondaires et leur rôle écologique mais est également utile pour des aspects plus appliqués, notamment en valorisation de composés.

2. Matériel & methods

2.1. Récoltes des échantillons

Les collectes ont été réalisées en été austral 2016. Afin d'étudier la variabilité intra-spécifique de *L. monticola*, six répliques de frondes en contact avec le corail *Acropora muricata* et six répliques de frondes libres (voir Figure 50) ont été collectées au site de Sainte Marie (22°18.269'S; 166°28.791'E, Nouméa).

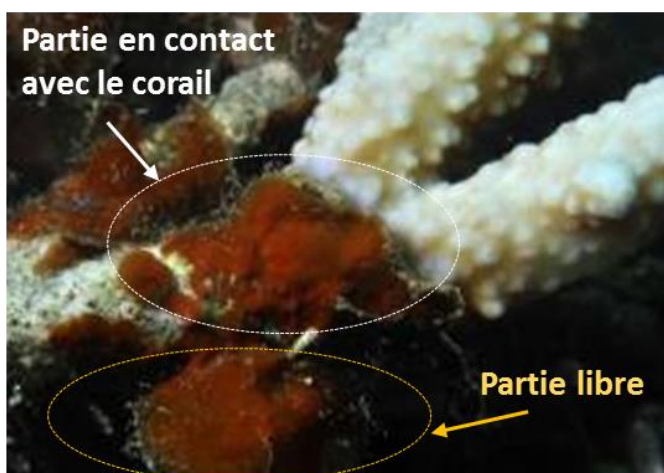


Figure 50. Frondes de *L. monticola* en contact avec le corail ou libre (sans contact avec le corail) (© G. Boussarie).

Dans le cas de *L. rosacea*, six thalles collectés au site de Ricaudy (22°18.956'S; 166°27.405'E, Nouméa) et après congélation à -20°C durant au moins 24 h (pour arrêter le métabolisme) ont été divisés en trois parties, comme indiqué à la Figure 51: la partie basale, la partie centrale et la partie distale. Les échantillons ont été stockés à -20 °C jusqu'aux extractions.

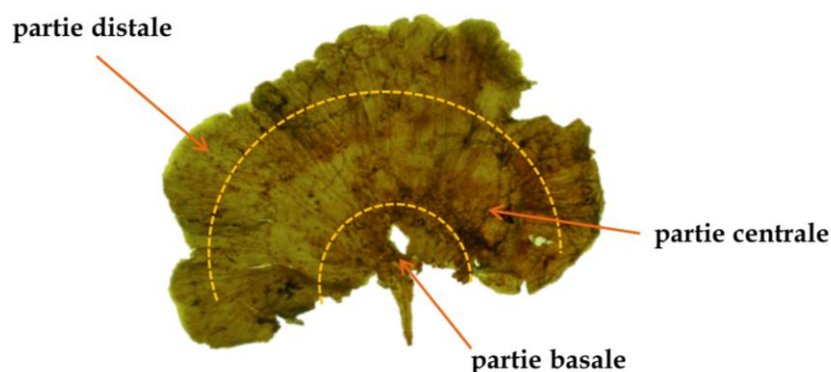


Figure 51. Subdivision en trois parties (basale, centrale et distale) de la fronde de *L. rosacea* (© J. Gaubert).

2.2. Extractions, analyses métabolomiques et traitement de données

Les extractions chimiques, l'analyse métabolomique par UHPLC-QToF des fractions méthanol ainsi que le traitement des données ont été réalisés selon les protocoles décrits au chapitre 3. Les analyses métabolomiques ont été réalisées à la National University of Ireland à Galway sur l'UHPLC-QToF 6540 UHD Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Agilent Technologies)

Des Analyses en Composantes Principales (ACP) ont été utilisées pour visualiser les variations du métabolome en fonction des parties de l'algue (ade4 package pour R). Des régressions des moindres carrés partiels discriminantes (Powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis PPLS-DA) ont été utilisées pour trouver le maximum de covariance entre le jeu de données et leur classe (RVAideMemoire package).

3. Résultats

3.1. Cas de *Lobophora monticola* : le métabolome des frondes en contact avec le corail est-il différent de celles sans contact ?

Après analyses LC-MS des fractions méthanol puis filtration des données, une matrice finale contenant 116 composés a été obtenue. Le nombre de composés détectés est relativement faible du fait d'un effet mémoire important des composés sur la colonne. Les pics de composés retenus sur la colonne au fil des runs qui ne peuvent être élués sont en effet présents dans les blancs et donc supprimés lors des étapes de filtrations.

Les données obtenues ont été soumises à une Analyse en Composantes Principales (ACP) et sont présentées dans la Figure 52. Bien que la variance sur les deux premiers axes soit de 41,5 %, tous les points, qui représentent les échantillons du métabolome de *L. monticola* en contact ou non avec le corail, sont mélangés. Les résultats de la PPLS-DA ne montrent pas de différence significative entre les deux parties de la fronde (NMC = 0,254, $p = 0,128$).

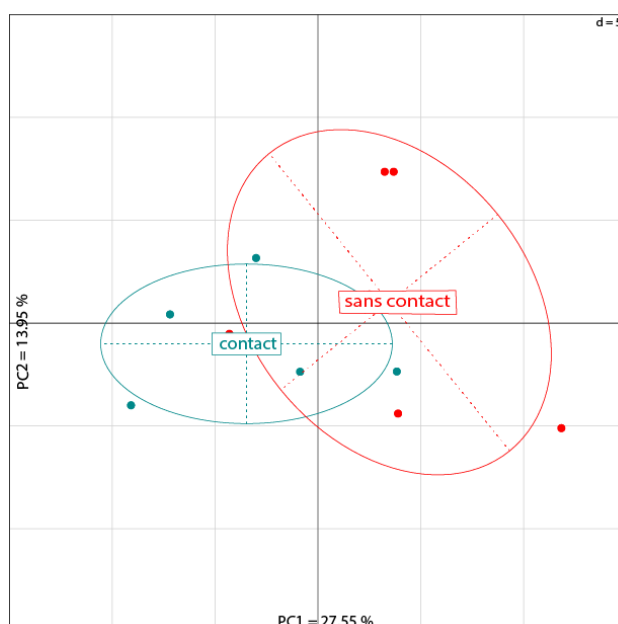


Figure 52. Analyse en composantes principales des fractions MeOH du métabolome de *Lobophora monticola* en fonction des parties de la fronde : en contact avec le corail (bleu) vs sans contact (rouge).

3.2. Cas de *Lobophora rosacea* : les différentes parties du thalle présentent-elles des métabolites différents ?

Après analyses et filtrations des données, une matrice de 117 métabolites a été générée, un nombre de composés équivalent à l'expérience précédente pour les mêmes raisons évoquées au paragraphe 3.1.

L'analyse en composantes principales du métabolome de la fraction MeOH des différentes parties du thalle de *L. rosacea* n'ont pas montré de différence chimique évidente entre les parties (voir Figure 53). La variance sur les deux premiers axes est de 39,82 %, du même ordre de grandeur que celle réalisée sur la variation intra-spécifique de *L. monticola*. Les résultats de la PPLS-DA ne montrent aucune différence significative entre les empreintes chimiques en uHPLC-MS-qTOF obtenues à partir des trois parties du thalle (NMC = 0,571, $p = 0,177$).

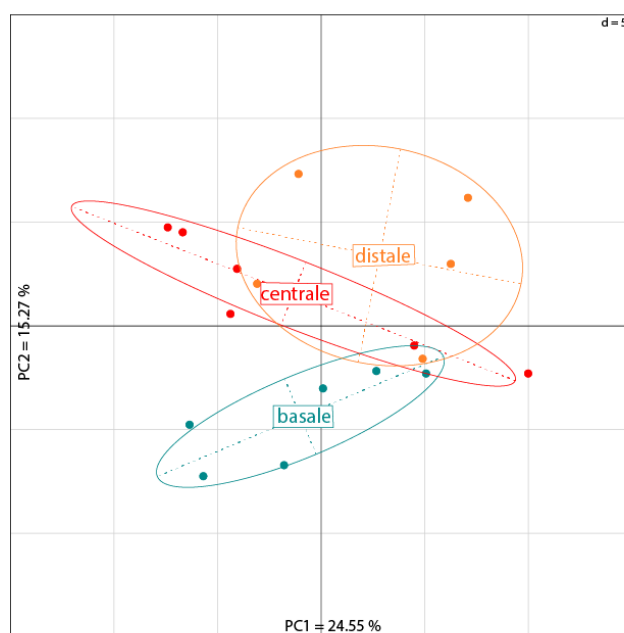


Figure 53: Analyse en Composantes Principales (ACP) des fractions méthanoliques du métabolome de *Lobophora rosacea* en fonction des parties du thalle : distale (orange), centrale (rouge) et basale (bleu).

4. Discussion sur l'étude intra-spécifique du métabolome

Les études intra-spécifiques chez deux espèces de *Lobophora* de lignées différentes, *L. monticola* et *L. rosacea*, n'ont pas mis en évidence de variabilité intra-plant du métabolome avec la technique d'analyse utilisée. Chez *L. monticola*, les frondes en contact avec le corail ou sans contact ne peuvent se différencier par leur empreinte métabolomique de la fraction MeOH. L'interaction avec le corail n'engendre donc pas de différence significative sur l'empreinte métabolomique de *L. monticola* observée en UHPLC-MS-qTOF. La composition chimique des thalles en contact ou non avec le corail n'avait, à notre connaissance, pas encore été étudiée. Nous pouvions toutefois supposer que l'interaction avec un autre organisme pouvait influencer une partie de la diversité chimique de l'algue. Ceci n'a pas été constaté dans notre cas d'étude. Chez *L. rosacea*, le métabotype de la fraction MeOH ne permet pas de distinguer les différentes parties du thalle de l'algue, ce qui suggère une distribution homogène des métabolites, tout du moins ceux observés en UHPLC-MS-qTOF et de faible polarité. En effet, si la méthode UHPLC-MS-qTOF présente un certain nombre d'avantages, un des inconvénients majeurs est la difficulté à observer les molécules qui ne s'ionisent pas ou très peu.

La variabilité chimique au sein d'un même individu, et notamment au niveau de différentes parties d'une même algue, a déjà fait l'objet de plusieurs travaux datant principalement des années 1990-2000 (voir Tableau 20). Ces travaux ne s'appuyaient pas sur la technique de UHPLC-MS-qToF, ni sur des approches métabolomiques, mais sur des dosages de composés ciblés ou de classes de composés, notamment les terpènes et polyphénols (phlorotannins). La théorie sous-jacente qui motivait les travaux sur la variabilité intra-thalle était la « théorie de défense optimale » (*Optimal defense theory* (ODT)) qui prédit que les plantes devraient avoir des niveaux de défense élevés dans les parties qui ont la plus forte valeur en terme de fitness (valeur sélective ou adaptative, succès reproducteur) (Pavia *et al.* 2003). Autrement dit, cette théorie prédit que les défenses chimiques vont se concentrer dans les tissus les plus à risque au broutage ou les plus importants pour l'algue (ex : parties reproductives).

Des études intra-spécifiques ont été réalisées sur les trois grandes divisions d'algues (rouges, brunes et vertes). Bien qu'aucune étude sur la variation en composés chimiques intra-individuelle n'ait été réalisée sur *Lobophora*, d'autres études sur des algues brunes, essentiellement de régions froides, sont disponibles.

Variations intra-spécifiques en phlorotannins

La variation intra-spécifique en composés phénoliques (phlorotannins) chez des algues brunes de l'ordre des Fucales, Laminariales et Desmarestiales, en lien avec leur rôle de défense contre le broutage, a fait l'objet de plusieurs études.

Pour les espèces telles que les Fucales *Ecklonia maxima*, *E. radiata* et les Laminariales *Laminaria pallida*, *L. digitata* et *L. hyperborea* et *Macrocystis angustifolia*, les études montrent une différence dans la distribution des composés phénoliques en fonction des tissus ou des stades de vie (Steinberg 1989; Tugwell & Branch 1989; Connan *et al.* 2006). Les concentrations de ces composés apparaissent plus élevées dans la couche externe du « méristème » et plus faibles dans les parties internes des tissus. De plus, les niveaux en composés phénoliques étaient plus importants dans la partie basale, le stipe et le méristème que dans les tissus végétatifs (Connan *et al.* 2006; Tugwell & Branch, 1989). Chez une autre Laminariales, *Alaria marginata*, les concentrations en composés phénoliques étaient également plus élevées dans les parties reproductives (sporophylles) que dans les parties végétatives (Steinberg, 1984). L'étude a également montré que la consommation des sporophylles par *Tegula funebris* (Mollusque herbivore) était plus lente que celle des parties végétatives, confortant le rôle des composés phénoliques dans la défense chimique des algues dans les parties à plus forte valeur en terme de fitness.

Outre la théorie de l'ODT, d'autres facteurs sont à prendre en compte pour mieux comprendre les variations intraplants en métabolites chez les algues, notamment les traits d'histoire de vie, les contraintes physiologiques ou la démographie, mais également les différentes fonctions des métabolites. L'importance de ces différents facteurs a notamment été illustrée dans les travaux de Pavia *et al.* (2002, 2003) sur l'algue brune d'Atlantique *Ascophyllum nodosum* où des variations intra-plants en phlorotannins ont été observées, avec

des niveaux plus faibles dans les juvéniles et les tissus reproducteurs par rapport aux adultes et tissus végétatifs, contrairement à ce que prédit l'ODT.

A l'inverse, chez les Desmarestiales, *Desmarestia anceps* et *D. menziesii*, aucune variation marquée à l'échelle de l'individu n'a été mise en évidence (Fairhead *et al.* 2005). Ces auteurs ont suggéré que des facteurs très localisés, comme les différences de pression d'herbivorie, n'avaient pas un impact aussi important que celui des facteurs environnementaux à large échelle (par exemple l'intensité de la lumière, les radiations UV...) sur la régulation de la production des phlorotannins. De même, aucune variation claire du contenu en phlorotannins n'a été observée chez la Laminariales *Cystophora subfarcinata* (Steinberg, 1989).

Variations intra-spécifiques en bromophénols

Des variations en bromophénols (notamment en lanosol), des métabolites possédant diverses fonctions comme antioxydantes, antibactériennes ou défense contre les prédateurs, ont été mises en évidence chez deux algues rouges *Rhodomela Larix* (Phillips & Towers 1982) et *Neorhodomela larix* (Carlson *et al.* 1989) en fonction des stades de vie et des stades reproducteurs. Des teneurs plus élevées dans les parties jeunes, dans les régions végétatives externes et certaines structures reproductives ont été notées.

Variations intra-spécifiques en diterpènes

D'autres composés, comme les diterpènes, peuvent également jouer un rôle de défense contre les herbivores. La concentration intra-thalle en diterpènes a été étudiée chez la Dictyotale *Dictyota ciliolata* en Caroline du Nord (Cronin & Hay, 1996). Des variations en trois métabolites secondaires diterpéniques (dictyol E et pachydictyol A et dictyodial) ont été remarquées, avec des concentrations plus élevées dans la partie basale des thalles.

Chez les algues vertes, une étude a montré que deux diterpènes impliqués dans la défense chimique d'algues du genre *Halimeda* (halimedatrial et halimedatetra acetate) se retrouvaient en concentrations plus élevées dans les jeunes plants et les nouveaux segments de l'algue, mais également dans les sites plus exposés à la pression d'herbivorie (Paul & Van Alstyne, 1988). La présence de légères variations de concentrations en composés bioactifs (majoritairement terpénoides) suivant les différentes parties de l'algue ont été mises en

évidence chez plusieurs espèces d'algues vertes de l'ordre Caulerpales, avec des concentrations plus élevées dans les extrémités en croissance et les structures reproductives que les parties matures des tissus (Paul & Fenical, 1986).

Variations intra-spécifiques en furanones halogénés

Les travaux sur *Delisea pulchra* ont révélé des variations intra-spécifiques dans le contenu en composés furanones halogénés, suivant le stade de vie de l'algue (Wright *et al.* 2000), avec des concentrations en métabolites plus élevées dans la partie distale des thalles (De Nys *et al.* 1996).

Variations intra-spécifiques en caulerpenyne

Des variations en métabolites à l'échelle individuelle ont été démontrées sur d'autres algues vertes du genre *Caulerpa* (Meyer & Paul 1992). Des concentrations plus élevées en caulerpenyne, le métabolite secondaire principal de ce genre, ont été observées dans les parties supérieures des algues par rapport aux parties basales.

Bien que plusieurs études aient mis en évidence, à l'aide de méthodes de dosages traditionnelles, des variations intra-thalles en composés chimiques en lien avec le stade de vie ou les phénomènes d'herbivorie, nos travaux *via* une approche métabolomique, n'ont pas montré de telles variations. Le métabolome de *L. monticola* reste identique avec ou sans contact avec le corail et la répartition des métabolites de *L. rosacea* est homogène dans les différentes parties du thalle. Ces résultats nous seront utiles pour aborder des études métabolomiques à de plus grandes échelles. En effet dans notre cas, la partie de fronde choisie pour l'étude du métabolome, aussi bien chez *L. rosacea* que *L. monticola*, ne devrait pas être une source supplémentaire de variation. De même, ces résultats sont également importants dans une visée de valorisation des algues. Si des composés intéressants sont révélés, l'algue peut être valorisée dans sa globalité.

Tableau 20. Etudes sur les variations en composés chimiques intra-thalle observées chez les trois grands divisions d'algues (B= brunes, V= vertes, R= rouges).

Algues	Composés chimiques	Auteurs
<i>Ecklonia maxima</i> , <i>Laminaria pallida</i> et <i>Macrocystis angustifolia</i> (B)	Phlorotannins	Tugwell & Branch, 1989
<i>Antarctic macroalgae</i> (<i>Desmarestia anceps</i> and <i>D. men- ziesii</i>) (B)	Phlorotannins	Fairhead <i>et al.</i> 2005
<i>Alaria marginata</i> (B)	Phlorotannins	Steinberg, 1984
<i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Sargassum muticum</i> , <i>Laminaria digitata</i> et <i>L. hyperborea</i> (B)	Phlorotannins	Connan <i>et al.</i> 2006
<i>Ecklonia radiata</i> (B)	Phlorotannins	Steinberg, 1989
<i>Ascophyllum nodosum</i> (B)	Bromophénols	Pavia <i>et al.</i> 2002, 2003
<i>Halimeda</i> (V)	Diterpènes : halimedatriol et halimedatetra acetate	Paul & Van Alstyne, 1988c
<i>Caulerpa</i> (V)	Composés bioactifs (majoritairement terpénoides)	Paul & Fenical, 1986
<i>Dictyota ciliolata</i> (B)	Diterpènes : Dictyol E, pachydictyol A, dictyodial,	Cronin & Hay 1996
<i>Rhodomela Larix</i> (R)	Lanosol	Phillips & Towers, 1982
<i>Neorhodomela larix</i> (R)	Lanosol	Carlson <i>et al.</i> 1989
<i>Delisea pulchra</i> (R)	Furanones halogénés	Wright <i>et al.</i> 2000
<i>Delisea pulchra</i> (R)	Furanones halogénés	De Nys <i>et al.</i> 1996
<i>Caulerpa</i> (V)	caulerpenyne	Meyer & Paul, 1992

II- Etude de la variation inter-spécifique du métabolome

Résumé

Parmi les études comparatives en métabolomique appliquées dans le domaine des sciences marines, seulement quelques-unes d'entre elles sont dédiées aux macroalgues malgré leur importance dans les écosystèmes marins. Aussi, il est nécessaire d'obtenir un plus grand nombre de données expérimentales pour estimer la portée et les limites des différentes techniques de métabolomiques appliquées pour des modèles de macroalgues.

Les espèces du genre *Lobophora* font partie des algues brunes (Dictyotaceae) et sont largement distribuées dans les régions tropicales et notamment dans les récifs coralliens, comme en Nouvelle-Calédonie. Les études récentes ont révélé une richesse spécifique du genre jusqu'à insoupçonnée et qui comprend des espèces aux morphologies et habitats divers, avec certaines espèces interagissant avec les coraux. Cette étude a pour double objectif (i) d'évaluer le potentiel de différentes approches par empreinte métabolomique dans la discrimination de quatre espèces de *Lobophora* taxonomiquement bien connues (*L. rosacea*, *L. sonderii*, *L. obscura* and *L. monticola*) qui présentent des morphologies distinctes et colonisent des habitats variés dans le lagon de Nouvelle-Calédonie (Sud-Ouest Pacifique) et (ii) de mettre en avant des différences métabolomiques entre ces espèces. Pour ce faire, nous avons comparé et combiné différentes techniques métabolomiques non ciblées : la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), la résonance magnétique nucléaire (^1H -NMR) et la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Des différenciations métabolomiques ont été observées entre chaque espèce de *Lobophora*, avec des différences significatives en fonction de la technique utilisée. La LC-MS a été la meilleure approche pour distinguer les métabotypes de chaque espèce mais une combinaison d'approches s'est aussi avérée pertinente et a permis d'identifier des marqueurs chimiques pour certaines espèces. Les analyses par LC-MS et RMN dans la fraction méthanol ont montré les lobophorénols comme marqueurs spécifiques, majoritaires dans *L. rosacea* et absents de *L. sonderii* et *L. obscura*. Les lobophorénols B et C ont également été détectés chez *L. monticola* mais en quantité plus variable. En ajoutant un jeu de données supplémentaires disponibles

pour *L. monticola* et *L. rosacea* (échantillons issus de l'étude intra-spécifique présentée dans la partie I), nous pouvons voir que la discrimination des espèces avec la LC-MS est d'autant meilleure (voir Figure S12) et que la variabilité observée chez *L. monticola* est due à seulement deux échantillons sur 18 qui présentent les lobophorénols B et C (Figure S13). L'identité de ces deux échantillons reste donc questionnable et un plus grand nombre d'échantillons de cette espèce serait nécessaire afin de vérifier si oui ou non cette algue synthétise les lobophorénols B et C. La technique de GC-MS, bien qu'avantageuse avec sa base de données plus fournie qu'en LC-MS, ne s'est pas avérée meilleure pour la discrimination des quatre espèces. Quatre marqueurs spécifiques ont pu être annotés (2-pentenoic acid ; maleimide, 2-methyl-3-vinyl ; methyl stearate et hexanoic acid, 2-ethyl-, hexadecyl ester) mais cette technique a aussi révélé la présence de polluants d'origine plastique chez toutes les espèces, qui semblent s'adsorber ou s'accumuler de façon différente suivant les algues. L'annotation des composés majoritaires détectés dans les échantillons algaux par GC-MS est présentée dans le tableau complémentaire S4 et la figure S14.

Ces approches métabolomiques de comparaisons multiples procurent des données importantes sur l'utilisation des techniques de métabolomique chez le genre *Lobophora*. Cette étude nous permettra notamment de guider les études suivantes sur les sources de variations du métabolome chez cette macroalgue d'importance écologique.

La présente étude a fait l'objet d'un article intitulé « Metabolomic variability of four macroalgal species of the genus *Lobophora* using diverse approaches » soumis à *Phytochemistry* le 1^{er} Juillet 2018.

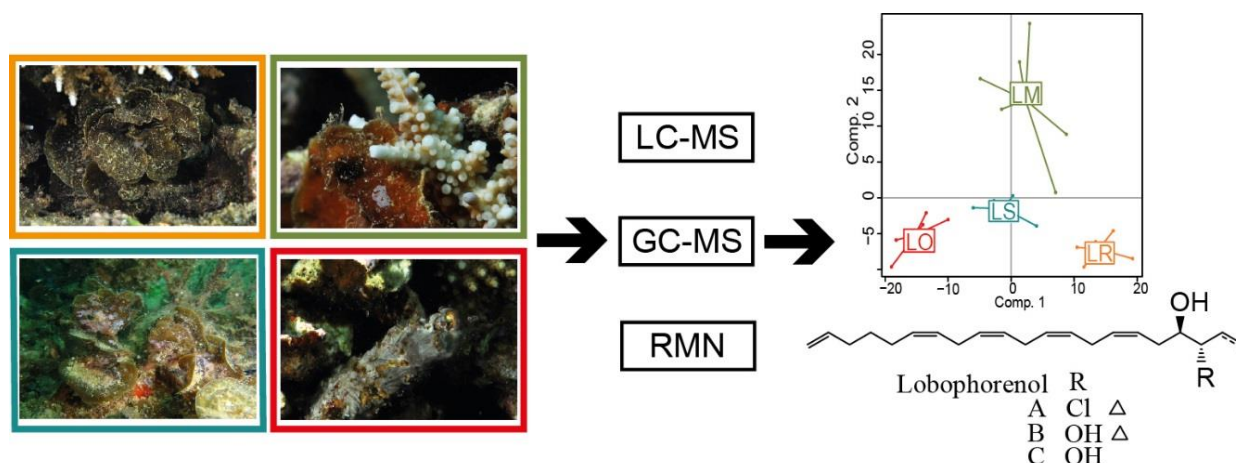


Figure 54. Graphique résumant l'étude

~~~~~

## Metabolomic variability of four macroalgal species of the genus *Lobophora* using diverse approaches

Julie GAUBERT<sup>1,2</sup>, Stéphane GREFF<sup>3</sup>, Olivier P. THOMAS<sup>4\*</sup>, Claude E. PAYRI<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Universités, Collège Doctoral, F-75005 Paris, France.

<sup>2</sup> UMR ENTROPIE (IRD, UR, CNRS), Institut de Recherche pour le Développement, B.P. A5, 98848 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie, France.

<sup>3</sup> Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale (IMBE), UMR 7263 CNRS, IRD, Aix Marseille Université, Avignon Université, Station Marine d'Endoume, rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France.

<sup>4</sup> Marine Biodiscovery, School of Chemistry and Ryan Institute, National University of Ireland Galway (NUI Galway), University Road, H91 TK33 Galway, Ireland.

Submitted as an original research article to *Phytochemistry* on the 1<sup>st</sup> July 2018

## Abstract

Among comparative metabolomic studies used in marine sciences, only few of them are dedicated to macroalgae despite their ecological importance in marine ecosystems. Therefore, experimental data are needed to assess the scopes and limitations of different metabolomic techniques applied to macroalgal models. Species of the genus *Lobophora* belong to marine brown algae (Family: Dictyotaceae) and are largely distributed, especially in tropical coral reefs. The species richness of this genus has only been unveiled recently and it includes species of diverse morphologies and habitats, with some species interacting with corals. This study aims to assess the potential of different metabolomic fingerprinting approaches in the discrimination of four well known *Lobophora* species (*L. rosacea*, *L. sonderii*, *L. obscura* and *L. monticola*) with distinct morphologies and found in various habitats in the New Caledonian lagoon (South-Western Pacific) and to highlight metabolomic differences between these species. For this purpose, we compared and combined different untargeted metabolomic techniques: liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$ -NMR) and gas chromatography (GC-MS). Metabolomic separations were observed between each *Lobophora* species, with significant differences according to the techniques used. LC-MS was the best approach for metabotype distinction but a combination of approaches was also relevant and allowed identification of chemomarkers for some species. These comparative multiple metabolomic approaches provide important data on the use of metabolomic approaches in the *Lobophora* genus and will pave the way for further studies on the sources of metabolomic variations for this ecologically important macroalgae.

## 1. Introduction

Specialized metabolites are often considered as low molecular weight molecules, end products of cellular regulatory processes, and final responses of biological systems to genetic and/or environmental changes (Fiehn 2002). They can be regarded as products of natural selection during evolution, shaping chemical diversity (Wink 2003). The set of metabolites present in the organisms can be highly complex and their biosynthesis can also be related to the associated microbiota (Roessner & Bowne 2009).

Traditionally, the chemical composition of an organism is explored through natural product chemistry which includes long and tedious steps of isolation and structure elucidation of metabolites. This approach is time consuming and incomplete as it focuses mostly on the major compounds produced. Recent advances in more global approaches called metabolomics allow the analysis of a wider part of the metabolome by the simultaneous detection of hundreds to thousands of the metabolites of a small sample in a short period of time. In environmental sciences, metabolomics has therefore appeared as a quick and relevant approach to cover the metabolite diversity of species and study their variations with time, geography, biotic interactions or other environmental factors (Bundy *et al.* 2009). Compared to the plant kingdom, only few environmental metabolomics studies have been reported on marine organisms. Taxonomy-based metabolomics has been applied for marine organisms like sponges (*e.g.* Ivanisevic *et al.* 2011; Pérez *et al.* 2011) or zoanthids (Costa-Lotufo *et al.* 2018; Jaramillo *et al.* 2018) but also microalgae (Mooney *et al.* 2007). Variability in the metabolomic profiles were explored in time and space for some sponges (Rohde *et al.* 2012), ascidians (López-Legentil *et al.* 2006), zoanthids (Cachet *et al.* 2015) and corals (Slattery *et al.* 2001) but also in response to environmental factors like temperature or salinity (Abdo *et al.* 2007; Bussell *et al.* 2008).

Among the chemical studies dedicated to macroalgae, only a few used metabolites as a taxonomic tool targeting specific compounds or families like phenolics (Connan *et al.* 2004) or diterpenes (Campos De Paula *et al.* 2007). While these studies traditionally focus on potentially active compounds with pharmaceutical interests, a more global approach using metabolomics can represent a useful tool to explore the metabolome of macroalgae and its fluctuations. For example, metabolomics was applied on the red alga *Asparagopsis taxiformis* to study the spatio-temporal variation of its metabolome (Greff *et al.* 2017). Another study on the red alga *Portieria hornemannii* explored different sources for the variation of non-polar metabolites between cryptic species and life stages (Payo *et al.* 2011). Metabolomics also appeared as a complementary tool to understand defense or tolerance mechanisms of macroalgae in an ecological context (*e.g.* Rempt *et al.* 2012; Ritter *et al.* 2014).

Marine brown macroalgae from the genus *Lobophora* (Family Dictyotaceae) have already been studied chemically. Gerwick & Fenical (1982) first described 1-(2,4,6-

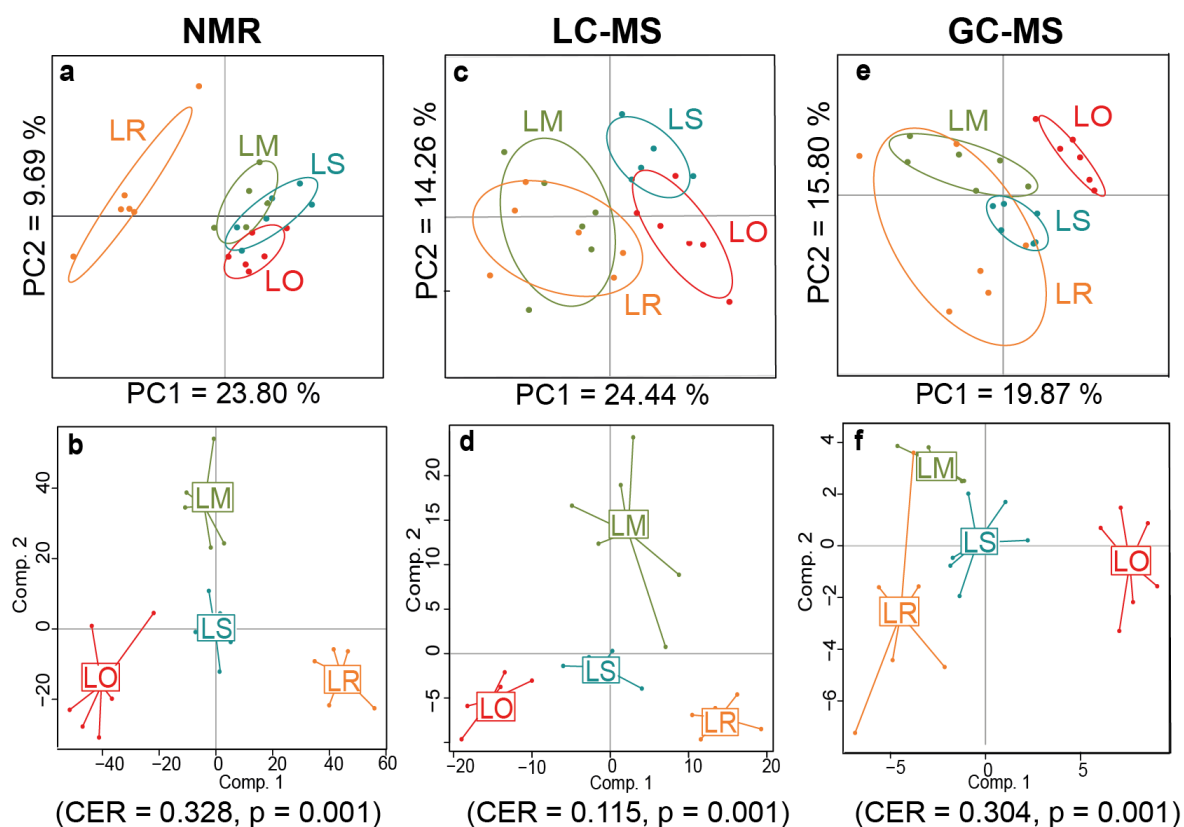
trihydroxyphenyl)hexadecan-1-one in *L. papenfussii*. Three sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDGs) and later lobophorolide were identified from *L. variegata* (Kubaneck *et al.* 2003; Cantillo-Ciau *et al.* 2010). Recently, seven nonadecaketides named lobophorols, lobophopyranones and lobophorones (Gutiérrez-Cepeda *et al.* 2015) were found in the Atlantic *L. variegata* while the polyunsaturated lobophorenols A, B and C were described in the tropical *L. rosacea* (Vieira *et al.* 2016). Abundant in tropical coral reef habitats, some *Lobophora* species are closely associated with corals and therefore strongly involved in coral-algal interactions (Rasher & Hay 2010), leading in some cases to negative impacts on corals. The high specific diversity of *Lobophora* genus has recently been unveiled (Vieira *et al.* 2014, 2017), with species exhibiting various morphologies and habitats, questioning the link between chemical diversity and species diversity. Due to this chemical diversity, species of this genus are therefore good candidates to undergo metabolomics-based study to explore the metabolomic variability among the different species.

We first decided to assess the potential of different approaches in metabolomic fingerprinting to separate four well-known *Lobophora* species (*L. rosacea*, *L. sonderii*, *L. obscura* and *L. monticola*), with distinct morphology and present in diverse habitats of the New Caledonian lagoon (South-Western Pacific). The systematics of these species being well described, we aimed at providing important insights on the relevance of these approaches to first discriminate species. The results of these preliminary data will then pave the way for deeper metabolomic studies on the presence of cryptic species, the influence of environmental parameters or biotic factors like the reproductive cycles. In terms of reproduction, little is known about *Lobophora* in New Caledonia and this genus is supposed to be reproductive all year round (Vieira, pers. com.). Our knowledge on the main specialized metabolites found in *L. rosacea* was a prerequisite to guide our study as they are presumed to have a taxonomic relevance. We used untargeted metabolomic approaches using three different techniques: UHPLC-MS-QToF, <sup>1</sup>H-NMR and GC-MS followed by unsupervised and supervised analyses to highlight chemical differences among species.

## 2. Results

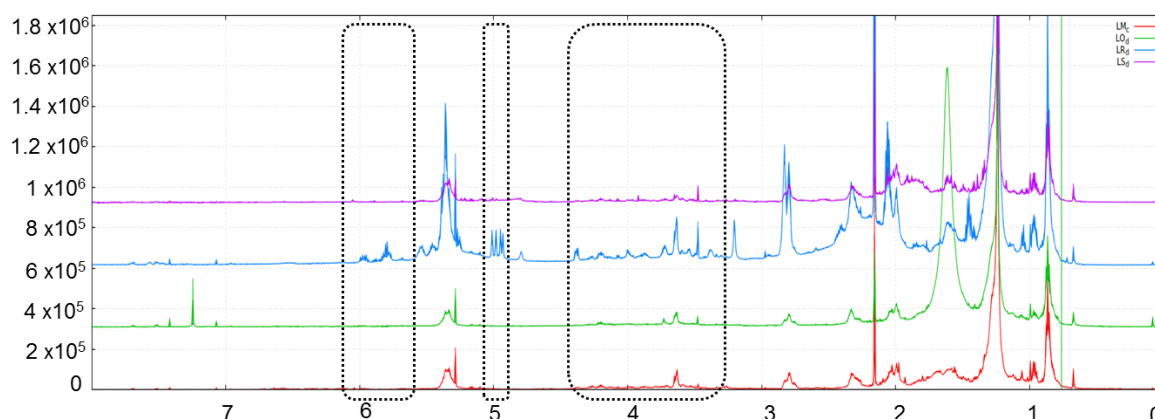
### 2.1. $^1\text{H}$ -NMR

The matrix obtained after data analyses was composed of 7,998 buckets. A value of 33.5% of variance was explained by the two first components of the PCA (Figure 55a) and mainly due to *L. rosacea* characterized by a different metabolomic fingerprint than the other three species (PPLS-DA, CER = 0.328,  $p = 0.001$ , post hoc  $p < 0.05$ , Figure 55b, Table S1). In the central cluster of the PCA that grouped the three other species, only *L. monticola* and *L. obscura* present significant different metabolomic fingerprints ( $p = 0.018$ ), whereas *L. sonderii* is not chemically different from the two others ( $p > 0.05$ ).



**Figure 55.** Discriminant power of the three chemical approaches via unsupervised (Principal Component Analysis, PCA, a, c, e) and supervised discriminant analyses (Powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis, PPLS-DA, b, d, f) of *Lobophora* species metabolome analyzed by (a, b) NMR and (c, d) LC-MS for MeOH fractions and (e, f) GC-MS for  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fractions (LO: *L. obscura*, LR: *L. rosacea*, LM: *L. monticola* and LS: *L. sonderii*). CER = classification error rate with  $p$ -value after double cross model validation.

The overlay of  $^1\text{H}$  NMR spectra (Figure 56), indicated that the major signals are shared by all *Lobophora* species : intense signals at  $\delta_{\text{H}}$  1-2 ppm due to the methylenes of long chain fatty acids, and signals at  $\delta_{\text{H}}$  2.8 and 5.3 ppm attributed to carbon-carbon unsaturations. More variable regions containing characteristic signals of the polyunsaturated lobophorenols A, B and C (Vieira *et al.* 2016) were observed between  $\delta_{\text{H}}$  3.2-4.5 (chlorinated and hydroxylated methines), 4.8-5.2 and 5.0-5.8 ppm (terminal olefinic protons).



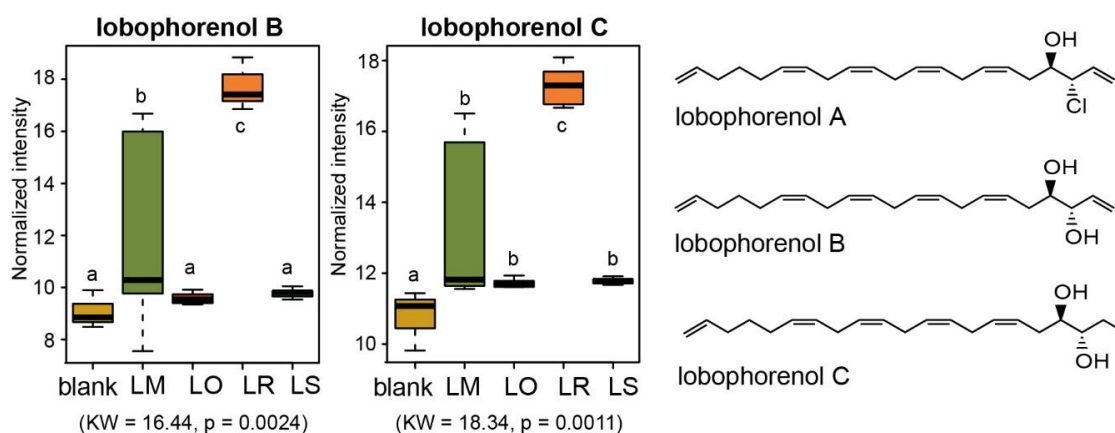
**Figure 56.** Overlay of  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz) spectra of the four *Lobophora* species (one representative sample per species was chosen, the full overlay spectra is available in Figure S5. *L. monticola* in red, *L. obscura* in green, *L. rosacea* in blue and *L. sonderii* in purple). Regions of discriminating signals are highlighted by black rectangles.

Due to the high number of generated bins, Kruskal-Wallis loading plot (Figure S4) was used to identify chemical markers which separate metabolic diversity of *Lobophora* species (with  $p < 0.05$ , Table S2). The regions corresponding to the signals of lobophorenols are the main markers of differences between species and are mostly present in *L. rosacea*.

## 2.2. UHPLC- QToF

After LC-MS data analyses and filtering, 600 metabolic features were finally considered. The variance on the two first components of the PCA was explained by 38.7% (Figure 55c), a value slightly higher than for NMR analysis. The LC-MS approach permitted a better separation of each species' metabolome than NMR (CER = 0.115,  $p = 0.001$ ,  $p < 0.05$  for each tested pair, Figure 55d, Table S1). The difference between chemical groups was mainly quantitative as shown in the Venn diagram (Figure S6).

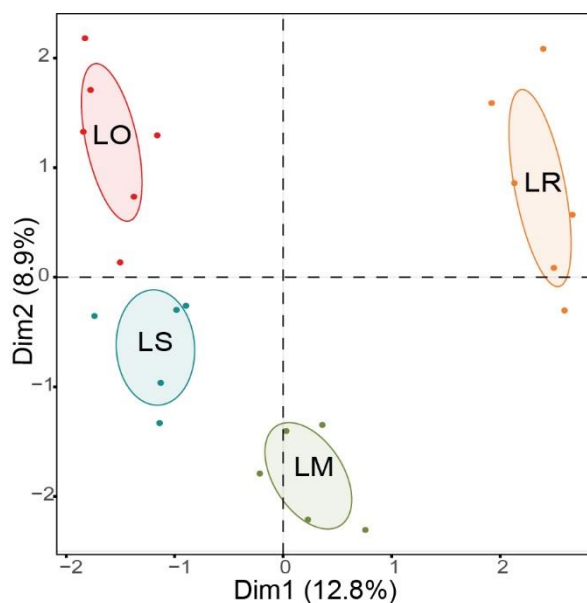
Among chemomarkers, two compounds, lobophorenol B ( $m/z$  334.272  $[M + NH_4]^+$ ,  $C_{21}H_{32}O_2$ ) and lobophorenol C ( $m/z$  336.287  $[M + NH_4]^+$ ,  $C_{21}H_{34}O_2$ ), previously isolated in *L. rosacea* (Vieira *et al.* 2016) were mainly detected in this species (Figure 57, Table S3). They were also detected in *L. monticola*, but with high variability, and not detected in *L. sonderii* and *L. obscura*.



**Figure 57.** Box plots of lobophorenols B and C (and chemical structure of lobophorenols A-C) among the four *Lobophora* species and blank (log-transformed data), detected by LC-MS, expressed as mean normalized intensities  $\pm$  SD ( $n = 3$  for blank,  $n = 6$  for LM, LO, LR and  $n = 5$  for LS) (LM: *L. monticola*, LO: *L. obscura*, LR: *L. rosacea*, and LS: *L. sonderii*). The statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis (KW) followed by post-hoc Conover's test. Letters indicate significant differences between groups based on post-hoc pairwise comparisons ( $p < 0.05$ ).

The other chemomarkers of each species were tentatively annotated based on the construction of a molecular network but no other match was found in the current database, with the majority of them appearing as minor intensity ions.

To combine data obtained by LC-MS with those by NMR, a multiple factor analysis (MFA) was performed (Figure 58). The four *Lobophora* species were well separated despite a lower variance of 21.7% on the two first dimensions.



**Figure 58.** Multiple Factor Analysis (MFA) obtained with LC-MS and NMR data from the MeOH fractions of *Lobophora* species (LM: *L. monticola*, LO: *L. obscura*, LR: *L. rosacea*, and LS: *L. sonderii*). Confidence level used to construct the ellipses = 0.95, variables scaled to unit variance.

### 2.3. GC-MS

The richness in non-polar specialized metabolites in *Lobophora* led us to analyze the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fractions by GC-MS while attempts to use NMR for those fractions were unfruitful due to intense lipidic peaks. The explained variance on axis 1-2 of the PCA was 35.7%, a value similar to the values obtained with the two other techniques (Figure 55e). All algal metabotypes were differentiated with this technique (CER = 0.304,  $p = 0.001$ , Figure 55f) except for *L. monticola* vs *L. rosacea* ( $p = 0.431$ , Table S1). Among the chemomarkers contributing to the discrimination of the species metabotypes, we identified a small carboxylic acid: 2-pentenoic acid (M5), an amide: maleimide, 2-methyl-3-vinyl (M18), and two esters: methyl stearate (M38) and hexanoic acid, 2-ethyl-, hexadecyl ester (M48) (Table 21). M5 and M48 are specific to *L. obscura* while this species contained lower amount of M38 compared to the three other species. *Lobophora sonderii* and *L. rosacea* exhibit higher levels of M18 (Figure S7).

**Table 21.** Chemomarkers detected by GC-MS in the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction of *Lobophora* species, annotated with NIST 2011 database (RI = Van Del Dool and Kratz Retention Index, exp. = experimental, lit. = literature).

| Comp. | molecular name                           | chemical family | CAS number | raw formula                                    | % match NIST 2011 | lit. RI | exp. RI |
|-------|------------------------------------------|-----------------|------------|------------------------------------------------|-------------------|---------|---------|
| M5    | 2-pentenoic acid                         | carboxylic acid | 626-98-2   | C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>   | 94                | 873     | 921     |
| M18   | maleimide, 2-methyl-3-vinyl              | amide           | 21494-57-5 | C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>  | 91                | 1261    | 1262    |
| M38   | methyl stearate                          | ester           | 112-61-8   | C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> | 98                | 2130    | 2129    |
| M48   | hexanoic acid, 2-ethyl-, hexadecyl ester | ester           | 59130-69-7 | C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub> | 64                | -       | 2468    |

Moreover, some compounds known as plastic pollutants were found in all species and contribute to differences in their chemical profiles (Phenol, 2,4-di-*tert*-butyl; tributyl acetylcitrate; *o*-xylene; naphthalene, 2,6-dimethyl-; *p*-cresol, 2,6-di-*tert*-butyl-; *N*-methyl-*N*-benzyltetradecanamine).

### 3. Discussion

Even though LC-MS is a key method largely employed in metabolomics studies due to its high sensitivity, it is not suitable for all metabolites and more appropriate for polar, weakly polar and neutral compounds (Wang *et al.* 2015). Moreover, it relies on ionization process, limiting the study of poorly-ionizable compounds. GC-MS is then more suitable when non-polar metabolites are found as the main major specialized metabolites. On the contrary and even if much less sensitive, NMR is more universal and does not rely on ionization processes nor the separation of analytes by HPLC, and solubilization of the metabolites is the only limitation. NMR spectra will provide a better snapshot of what are the major metabolites and their relative concentrations in the studied specimens. This information is highly relevant for major metabolites that may correspond to specialized metabolites providing useful information concerning species discrimination. NMR would therefore be less affected by environmental changes often linked to minor metabolites.

The four species of *Lobophora* are well morphologically described and their phylogeny performed in 2014 using mitochondrial gene Cox3 (Vieira *et al.* 2014). *Lobophora monticola*, *L. obscura*, *L. rosacea* and *L. sonderii* are distantly-related species. They are distributed evenly across the *Lobophora* evolutionary tree, with *L. rosacea* the most basal species of the four (Figure S8). These species have been tentatively separated based on their metabolomic fingerprints, with different levels of separation depending on the used technique. The LC-MS approach was the most efficient technique for the separation of the four species of this genus (PPLS-DA, CER = 0.115), but NMR and GC-MS (CER<sub>NMR</sub> = 0.328, CER<sub>GC/MS</sub> = 0.304) also provided interesting complementary results. While less sensitive than LC-MS or GC-MS, NMR also provides the highest reproducibility among metabolomic measuring platforms (Farag *et al.* 2012).

In our study, NMR analyses performed on the same methanolic fractions than LC-MS allowed a clear distinction of *L. rosacea* from the other three species, matching which the phylogenetic data were it appears the most basal species. Like LC-MS, NMR highlighted lobophorenols as discriminating metabolites in *L. rosacea*, with most of the signals responsible for the chemical divergence corresponding to characteristic signals of these molecules. Lobophorenol A was not detected by LC-MS while it was observed as marker in NMR because of some characteristic signals at  $\delta_H$  3.70 and 6.02 ppm. Lobophorenol A contains a chlorine atom less prone to ionization in our LC-MS experimental conditions. These lobophorenols have been shown to present allelopathic effect against the coral *Acropora muricata* (Vieira *et al.* 2016). Molecular networking based on MS<sup>2</sup> spectra analyses did not allow additional identification of chemomarkers. Annotation of compounds from marine organisms, especially macroalgae, is still challenging with the lack of specific databases. Regarding their own advantages and limitations, a coupling between LC-MS and NMR appeared to be a complementary approach to discriminate each *Lobophora* species, as supported by the MFA.

NMR analyses also showed the rich composition in lipidic derivatives of *Lobophora* species, which may be problematic because intense long-fatty-chain signals may mask other signals. However, this issue could be resolved using GC-MS, allowing the study of the non-polar part of the metabolome. Compared to the poor specialized LC-MS database, the

available GC-MS databases enabled the annotation of some chemomarkers. However, the discrimination between species metabotypes was partly explained by compounds presumably identified as pollutants from plastic origin and present in the coastal sites, which were likely differently accumulated at the surface or inside algae as seen in *Fucus vesiculosus* (Gutow *et al.* 2016). This result potentially highlights more different adhesion capacities of microplastics between species rather than metabolic differences. Other markers were annotated: 2-pentenoic acid is a small unsaturated fatty acid previously found in plants (Wu & Chen 1992). Pentenoic acid was found up-regulated under salinity stress in the halophyte *Aeluropus lagopoides* (Paidi *et al.* 2017). The maleimide may be a transformation product of chlorophylls and bacteriochlorophylls (Naeher *et al.* 2013). We may hypothesize that these compounds originate in part from micro-organisms associated to *Lobophora* species. Indeed, epiphytes often colonized the algal surface (Egan *et al.* 2013). Then, by extracting the algal metabolome, we may also extract compounds from bacteria or epiphytes and metabotypes observed in our study may arise, at least in part, from the algal-associated organisms. Even if we carefully removed epiphytes from their surface, microorganisms are still present and may contribute to the global metabolome of the specimens. For example, methyl stearate has been found in bacteria and plants but also microalgae, ascidians and macroalgae (*e.g.* De Rosa *et al.* 2001; Takeara *et al.* 2008; Terekhova *et al.* 2010; Sharmin *et al.* 2016) and is assumed to have antibacterial and cytotoxic activities (Takeara *et al.* 2008; Elshafie *et al.* 2017). The influence of species-specific microbial communities, which can produce minor compounds, may also explained the better result obtain by LC-MS in the discrimination of *Lobophora* species.

Even if less important than interspecific differences, intraspecific variability will be explained by their development stage, life history traits and evolution and may also result from their environment. *Lobophora* life cycle is not documented in New Caledonia lagoon and reproductive state has been seen all year round (Vieira, personal observation). Gametophytes and sporophytes are not easily dissociable but may potentially present different chemical profiles as seen in other macroalgae, like the red algae *Portieria hornemannii* in the Philippines (Payo *et al.* 2011). The close association of *L. rosacea* and *L. monticola* with corals could lead to chemical adaptation or specification in the algal chemistry, notably against coral associated microbiome. On the other hand, growing in algal beds, *L. sonderii* is more exposed to

herbivores and its chemistry probably evolved differently, notably to repulse predators. *Lobophora obscura* is also exposed to other organisms but its encrusting form with thick and coarse thalli, may deter predators. Less effort in metabolites production may be balanced by its protective morphology. Because very few chemomarkers were identified, these hypothesis should be further investigated and tested.

The choice of the technique to accurately distinguish species is pivotal and only few studies comparing these techniques have been published to date, most of them being applied to plants. For example, untargeted LC-MS was the most effective to discriminate several green tea (Kellogg *et al.* 2017). Other authors used multiple approaches to study the metabolomic fingerprint in zoanthids (Costa-Lotufo *et al.* 2018) or in the plant kingdom (*e.g.* Agnolet *et al.* 2010; Farag *et al.* 2012b). Multiple metabolomics approaches are rare on macroalgae. Notably, LC-MS and HR-MAS NMR were used to evaluate the relevance for taxonomical purpose in five species of the genus *Cystoseira* (Jégou *et al.* 2010). Due to the high diversity in metabolites, with diverse physico-chemical properties and different concentration ranges, the global analysis in metabolites is difficult and challenging. Using multiple metabolomics approaches allow a more exhaustive, broader and comprehensive analysis. It is a good tool to appreciate the chemical diversity among species and can bring complementary information to the phylogenetic data, the unavoidable base for classification. These approaches enabled a better exploration of the chemical speciation or evolution among genus or even at a broader scale, as realized by Belghit *et al.* (2017) on 21 species belonging to red, green and brown algae. With the increase of shared metabolomics platforms, metabolomic fingerprinting might be applied on other macroalgae and marine organisms, and when coupled to genomics or transcriptomics, it will greatly improve our understanding of adaptive mechanisms involved in multi-stressors environments. This coupling has been recently applied on macroalgae, like in the model *Ectocarpus siliculosus* where transcriptomic and genomic data available allowed to better understand the metabolic changes during saline and oxidative stress (Dittami *et al.* 2011) or under different CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations (Gravot *et al.* 2010). While *Lobophora* genus is not a typical model organism, the decrease cost and increased sequencing capabilities of Next Generation Sequencing make possible to examine species beyond traditional models (Konotchick *et al.* 2013; Unamba *et al.* 2015). In particular, it is an example of common brown alga widely distributed in tropical waters and

producing major non-polar metabolites and therefore can represent a model for other metabolomic studies applied to brown algae. A coupling between metabolomics and metagenomics could also help to appreciate the diversity of associated bacteria and better assess their contribution to the algal metabolome. Because associated microorganisms are commonly species-specific, this could partly explain the better results obtained with LC-MS. While a multiple metabolomic approach is promising for several applications in macroalgae, data interpretation remain the biggest challenge to date and more metabolomics studies on macroalgae are needed.

#### 4. Conclusion

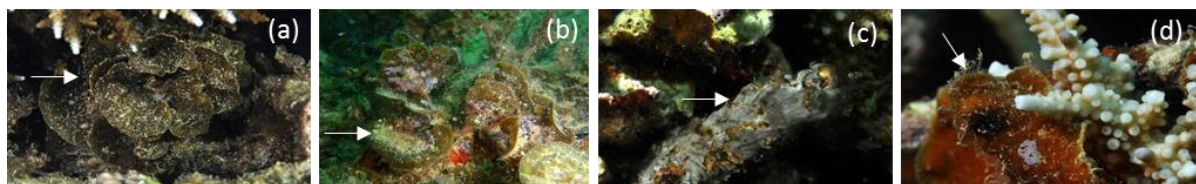
Metabolic fingerprinting with LC-MS was the most appropriate technique in the discrimination of different *Lobophora* species, but the coupling with NMR is also relevant as the main metabolites can be observed with these methods and identified as chemomarkers. Indeed, lobophorenols, previously identified specialized metabolites in *L. rosacea*, were detected as chemomarkers with both LC-MS and NMR while they were not detected by GC-MS, which appeared less relevant for *Lobophora* genus. In particular, LC-MS may be useful to discriminate crypticity in *Lobophora* species, as successfully applied for *Portieria dioli* (Payo *et al.* 2011). As main outcome of this study, untargeted metabolomic approach via LC-MS/NMR will be helpful for further ecological studies in *Lobophora*. Notably, this technique would be appropriate to explore the sources of metabolomic variations in this genus at the temporal and spatial scales, influenced by environmental factors, but also according to different biotic interactions.

#### 5. Experimental

##### 5.1. Sampling

*Lobophora rosacea*, *L. sonderii* and *L. obscura* were collected by SCUBA during summer 2016 at Ricaudy (22°18.956'S; 166°27.405'E, Nouméa, New Caledonia). *Lobophora monticola* was collected during summer 2016 at Sainte-Marie (22°18.269'S; 166°28.791'E, Nouméa, New Caledonia). Species identifications were performed by combining morphological and genetic

analysis following Vieira *et al.* (2014). Vouchers for each species are kept at IRD herbarium (IRD10213, IRD10195, IRD10187, IRD10199). *Lobophora rosacea* has a thin fan-shaped thallus, growing fixed by the basal part within coral branches like *Acropora* spp. *Lobophora monticola* is also found associated to branching corals, and thalli grows partially or completely in contact with them. *Lobophora sonderii* forms dense erected blades, mixed with other brown seaweeds in *Sargassum* beds. Conversely, *L. obscura* has encrusting and thick leather-like thalli, strongly attached to dead corals or coral rubbles (Figure 59). Specimens (six for *L. rosacea*, *L. monticola* and *L. obscura* and five for *L. sonderii*) were placed in separate ziplock plastic bags, immediately placed into ice and stored at -20 °C until sample grinding.



**Figure 59.** Pictures of *Lobophora* species: (a) *L. rosacea*, (b) *L. sonderii*, (c) *L. obscura* and (d) *L. monticola* (images by G. Boussarie).

## 5.2. Metabolite extractions

Algae were freeze-dried and manually ground with liquid nitrogen in a mortar. Samples were then stored in silica gel until chemical extractions. For each replicate, a mass of 250 mg was extracted 3 times with 5 mL of MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) during 5 min in an ultrasonic bath. Supernatants were pooled and filtered. The extracts were concentrated to dryness in the presence of C18 silica powder (100 mg, Polygoprep 60-50, Macherey-Nagel®) using a rotary evaporator, and the solid was then fractionated by Solid Phase Extraction (SPE, Strata C18-E 500 mg/6 mL, Phenomenex®) by the successive elution of H<sub>2</sub>O (6 mL), MeOH (6 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL) after cartridge cleaning (6 mL MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and conditioning (6 mL H<sub>2</sub>O). The MeOH fractions were then filtered on syringe filters (PTFE, 0.20 µm, Phenomenex®), dried in a speedvac and further used for UHPLC-QToF and NMR analyses. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fractions were only analyzed by GC/MS.

### 5.3. Metabolomic analyses

#### 5.3.1. NMR

Dry samples were dissolved in 0.5 mL  $\text{CDCl}_3$ .  $^1\text{H}$ -NMR spectra were recorded on a cryoprobe-equipped 600 MHz Agilent spectrometer. The following parameters were used for data acquisition: 16 ppm spectral width, 1 s relaxation delay with water pre-saturation (PS), number of scans 32, acquisition time 1.7 s, 16 K complex data points,  $90^\circ$  pulse angle.

#### 5.3.2 UHPLC- QToF

Metabolomic fingerprints were recorded on an UHPLC (Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific®) coupled to an accurate mass spectrometer equipped with an ESI source (QqToF Impact II, Bruker Daltonics®). Metabolite separation were performed on a C18 UHPLC column (Acclaim™ RSLC 120 C18 150 x 2.1 mm, 2.2  $\mu\text{m}$ , Thermo Scientific®) at 40 °C. The mobile phase consisted in a mix of  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.1 % formic acid + 10 mM ammonium formate (solvent A) and acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  (95:5) + 0.1 % formic acid + 10 mM ammonium formate (solvent B). Injection volume was set to 3  $\mu\text{L}$  and elution flow to 0.4  $\text{mL min}^{-1}$ . The elution gradient was programmed as follows: 40 % B during 2 min, increased up to 100 % B from 2 to 8 min, followed by an isocratic step of 100% B during 4 min. The initial conditions were gradually recovered from 12 to 14 min, and hold 3 min for column equilibration for a total runtime of 17 min. MS parameters were set as follows: nebulizer gas  $\text{N}_2$  at 40 psig, gas temperature 300 °C, drying gas  $\text{N}_2$  flow 4  $\text{L min}^{-1}$ , capillary voltage 3500 V. Mass spectra were acquired in positive ionization mode from 50 to 1,200 amu at 2 Hz. Auto-MS<sup>2</sup> spectra were acquired according to the same conditions then previously. A quality control sample (QC) was prepared with 25  $\mu\text{L}$  of each sample. It was used to check MS shift over time and to normalize data according to injection order. The run started with three blank injections, followed by 10 injections of the QC for mass spectrometer stabilization. Samples were then randomly injected, inserting one QC every five samples. A final blank was injected to check any memory effect of the compounds on the column.

#### 5.3.3 GC-MS

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fractions were analyzed on a gas chromatograph (7890B GC System - 7693 autosampler, Agilent Technologies®) coupled to a mass selective detector (5977A MSD,

Agilent Technologies®). Separation of metabolites was performed on a HP-5MS 5% Phenyl-Methyl Silox column (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm, Agilent Technologies®) with helium as mobile phase. The run started at 40 °C for 5 min and increased by 10 °C min<sup>-1</sup> up to 350 °C for a total runtime of 31 min. A constant flow rate was set to 1 mL min<sup>-1</sup>. A volume of 1 µL of each sample was injected in splitless mode at 250 °C. A solution with a mix of C8-C20 and C21-C40 alkanes (Fluka Analytical) was also injected for the determination of compound retention index.

#### 5.3.4 Data treatment

<sup>1</sup>H-NMR spectra were automatically Fourier-transformed and processed on MesReNova 11. Spectra baselines were automatically corrected followed by the Whittaker smoother correction. An equal width bucketing of 0.001 ppm was applied between 0- 8 ppm to finally obtain the data matrix. Data were auto-scaled and log-transformed before statistical analyses.

LC-MS raw data files were first calibrated before converting them to netCDF files (centroid mode) using Bruker Compass DataAnalysis 4.3. NetCDF files were processed using the package XCMS for R software (version 3.3.2, XCMS version 1.50.1). Optimized parameters for XCMS were used as follows: peak picking (method = "centwave", peakwidth = c(2,20), ppm = 15, mzdifff = 0.05, prefilter = c(0,0)), retention time correction (method = "obiwarp"), matching peaks across samples (bw = 30, mzwid = 0,015, minfrac = 0.3) and filling in missing peaks. The matrix was then cleaned according to blanks and pooled samples to remove analytical variability. Molecular network based on MS<sup>2</sup> spectra were constructed with GNPS (Wang *et al.* 2016) and managed under Cytoscape 3.5.0 (Shannon *et al.* 2003).

Agilent data files acquired from GC-MS analysis were exported into CDF files using MSD Chemstation (F.01.001903, Agilent Technologies®). CDF files were then processed using the package eRah (version 1.0.5, Domingo-Almenara *et al.* 2016) under R performing preprocessing, peak deconvolution (min.peak.width = 2.5, min.peak.height = 2500, noise.threshold = 500, avoid.processing.mz = c(73,149,207)), peak alignment (min.spectra.cor = 0.90, max.time.dist = 60, mz.range = 40:500) and missing compound recovery (with presence required in 3 samples at least). Compound annotation was performed manually by comparing mass spectra with NIST 2011 database completed with the calculation of Kovàts'

index (Van den Dool and Kratz 1963). The matrix obtained was finally filtered according to the blank. Data from LC-MS and GC-MS were normalized by log-transformation before statistical analyses.

#### 5.4. Statistical analyses

Principal component analysis (PCA) was used to visualize the metabolome variation according to species (ade4 package for R). Powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (PPLS-DA) allowed to find the maximum covariance between our data set and their class membership and permutational tests based on cross model validation (MVA.test and pairwise.MVA.test) to test differences between groups (RVAideMemoire package). In a second time, correlation circles were drawn to identify discriminating compounds (RVAideMemoire package). Multiple Factor Analysis (MFA, variables scaled to unit variance) was used to combine data obtained from LC-MS and NMR (FactoMineR and factoextra packages for R). Kruskal-Wallis tests were performed in MetaboAnalyst 3.0 and R (PMCMR package). Post-hoc Conover's test was done on R software (PMCMR package). Venn diagram was constructed with Venny 2.1 (Oliveros 2007-2015).

~~~~~

Acknowledgments: GC-MS fingerprints were acquired at IMBE Support Service on Chemical Ecology and Metabolomics (funded by the CNRS, the Provence Alpes Côte d'Azur Region, the TOTAL Foundation and ANR). We are grateful to J-C. Martin for in-house R scripts. R. Doohan is acknowledged for her help in the NMR analyses and H. Solanki for his support in UHPLC-QToF analyses. We are grateful to C. Vieira, G. Culioli and M. Zubia for their useful comments. The PhD of J. Gaubert is supported through a scholarship from Sorbonne University, Paris, France.

Conflict of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Supplementary information

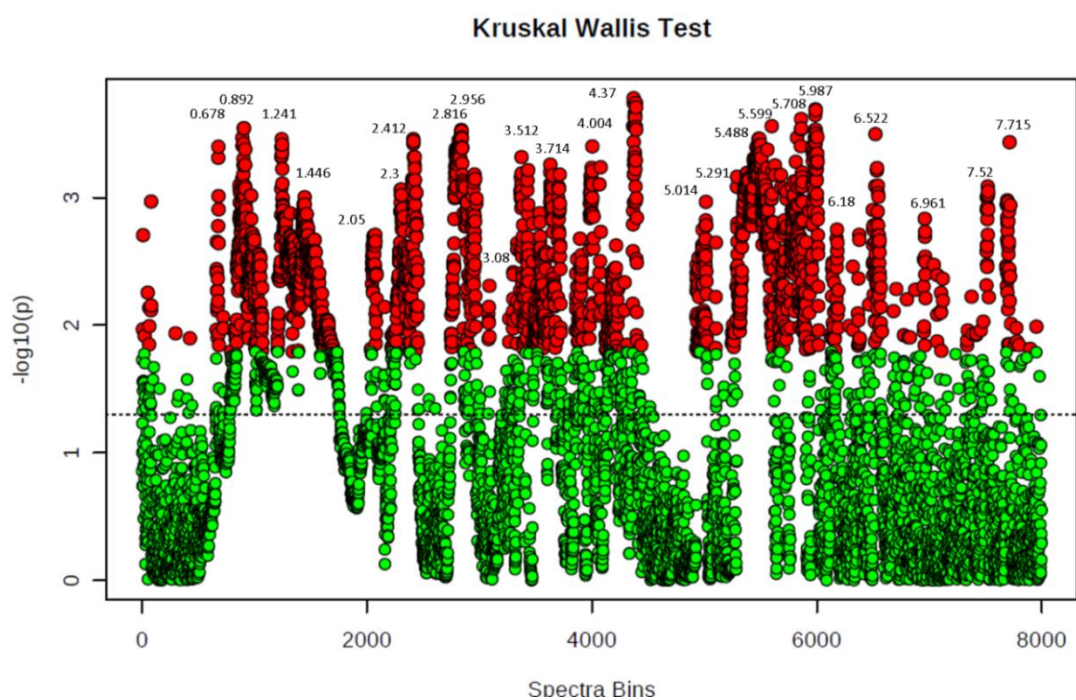


Figure S4. Kruskal-Wallis test loading plots with bins varying among species in red ($p < 0.05$).

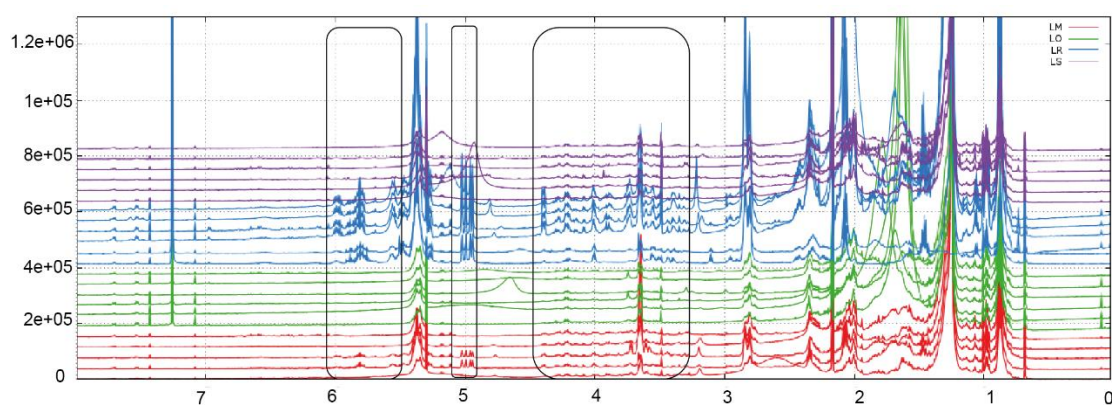


Figure S5. Overlay of ^1H -NMR (600 MHz) spectra of the four *Lobophora* species (*L. monticola* in red, *L. obscura* in green, *L. rosacea* in blue and *L. sonderii* in purple). Regions of discriminating signals are highlighted by black rectangles.

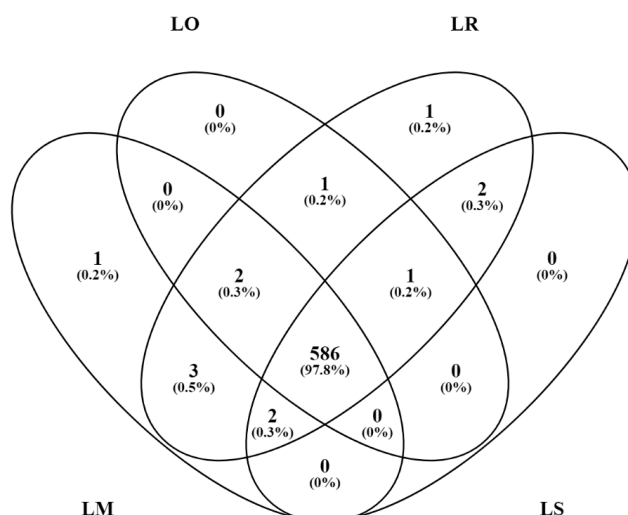


Figure S6. Venn diagram test on *Lobophora* MeOH fractions analyzed by LC-MS (LO: *L. obscura*, LR: *L. rosacea*, LM: *L. monticola* and LS: *L. sonderii*). Minimal threshold was selected for each species when the ion intensity detected by LC-MS becomes very low and closed to the noise.

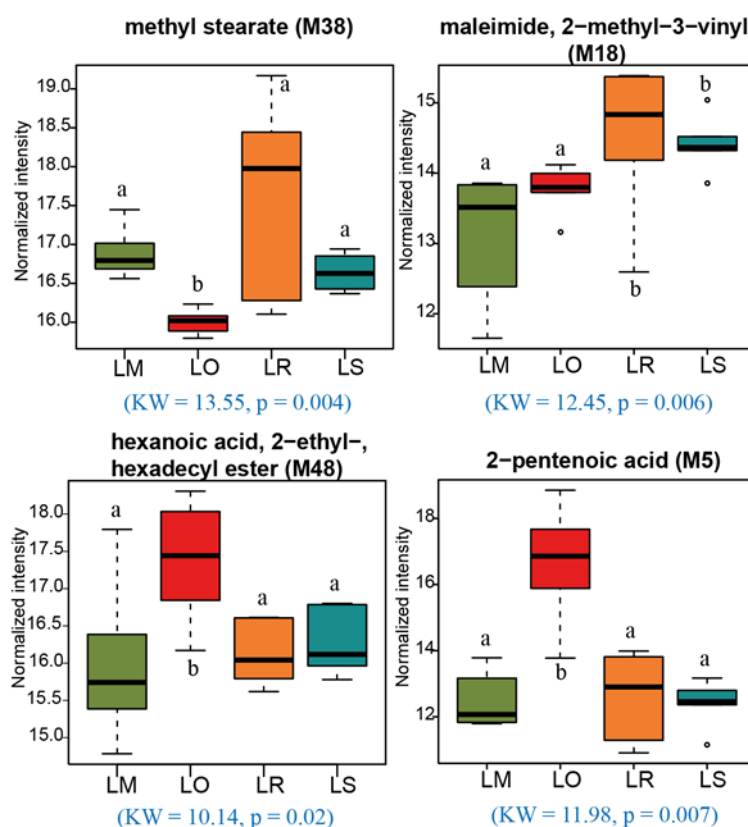


Figure S7. Box plots of the chemomarkers annotated with NIST 2011 among the four *Lobophora* species (log-transformed data), detected by GC-MS, expressed as mean normalized intensities $\pm$ SD ($n = 6$ for each species) (LM: *L. monticola*, LO: *L. obscura*, LR: *L. rosacea*, and LS: *L. sonderii*). The statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis (KW) followed by post-hoc Conover's test. Letters indicate distinct groupings based on post-hoc pairwise comparisons among groups for each compound ($p < 0.05$).

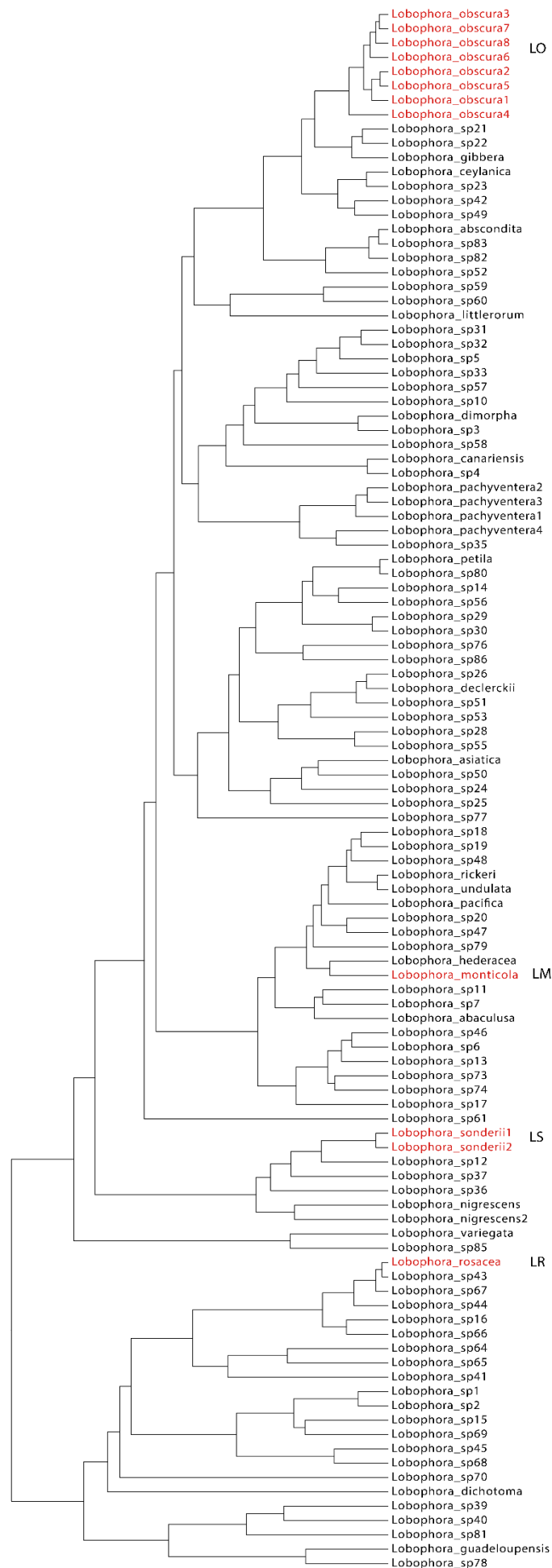


Figure S8. *Lobophora* species tree reconstructed with BEAST using the mitochondrial marker *cox3* and the chloroplast markers *psbA* and *rbcL* (adapted from Vieira *et al.* 2016, 2017) (LO: *L. obscura*, LR: *L. rosacea*, LM: *L. monticola* and LS: *L. sonderii*).

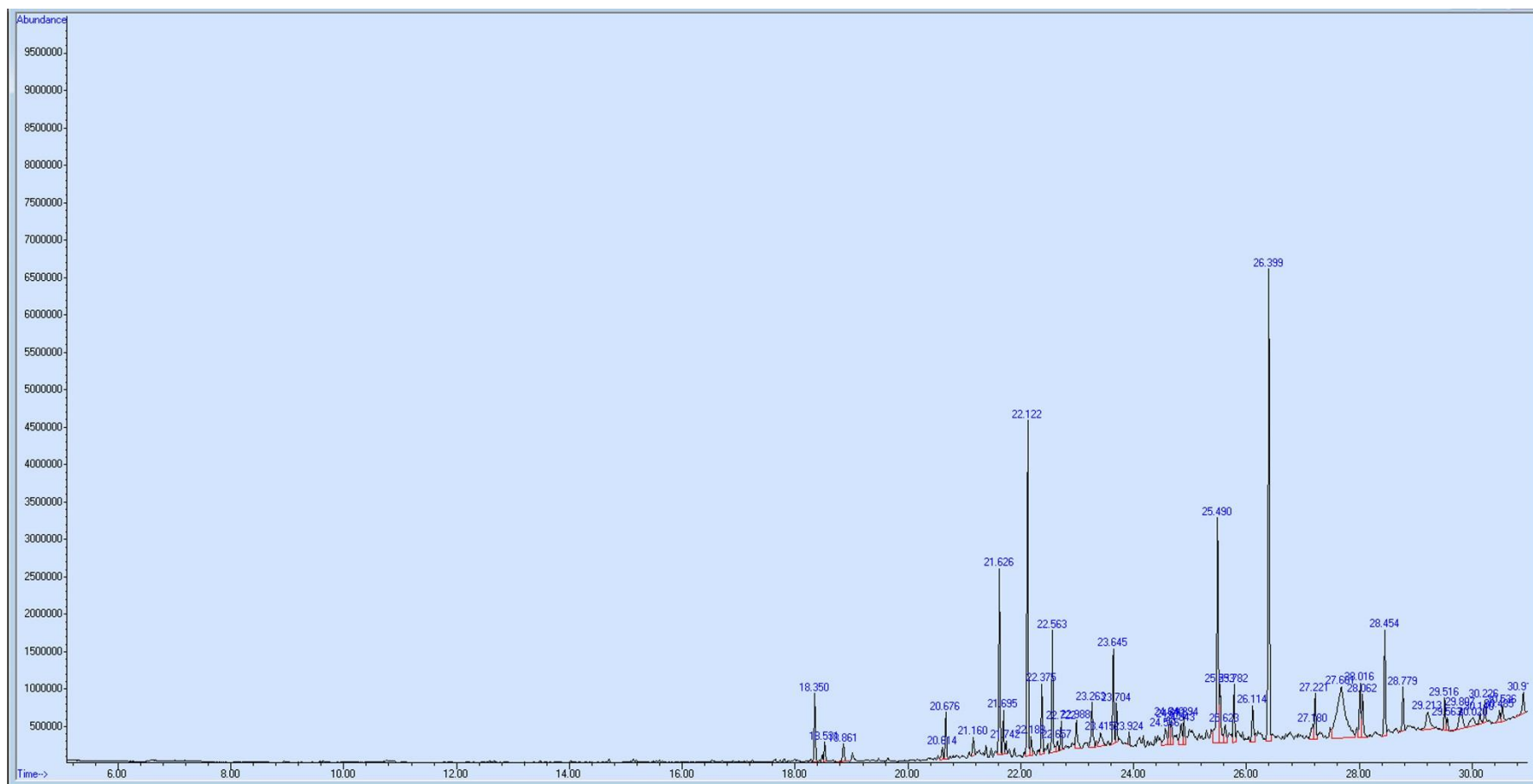


Figure S9. Example of chromatogram obtained by GC-MS on the CH_2Cl_2 fraction of *Lobophora rosacea*.

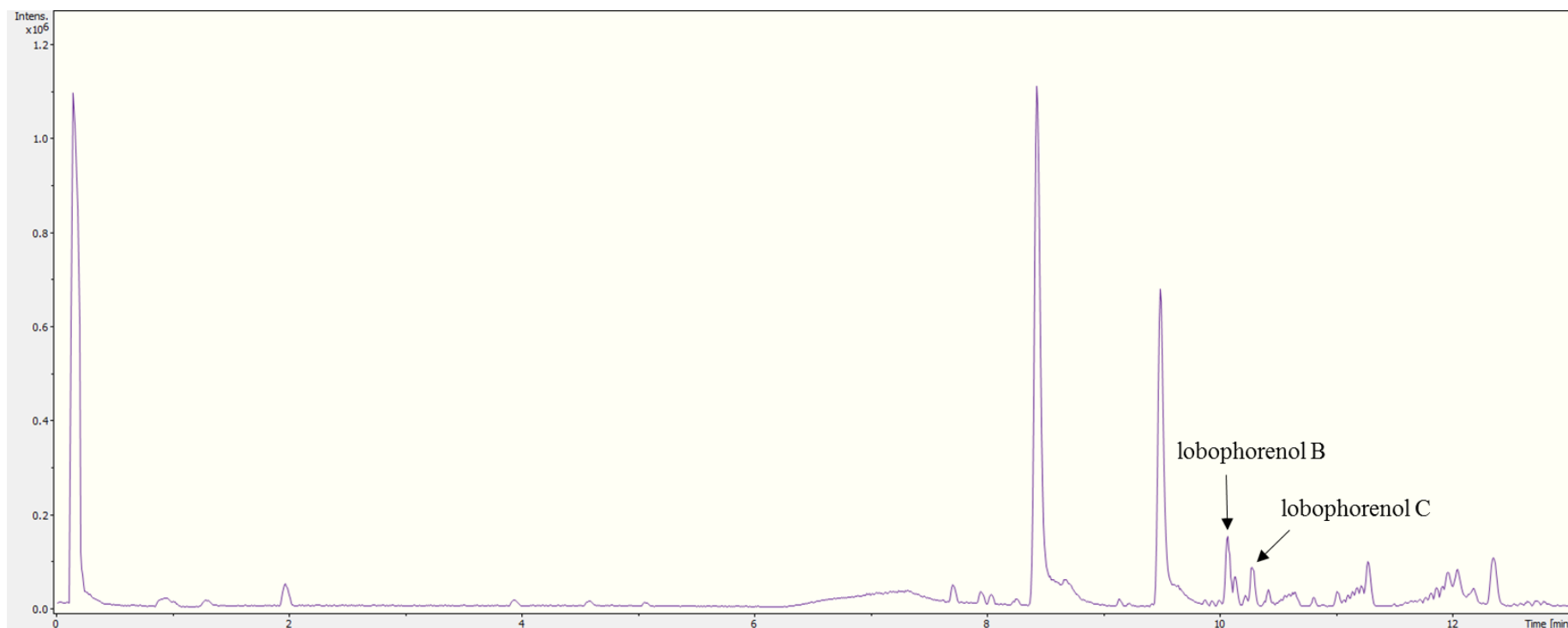


Figure S10. Example of chromatogram obtained by LC-MS on the MeOH fraction of *Lobophora rosacea* with the elution peaks corresponding to the lobophorenols B and C.

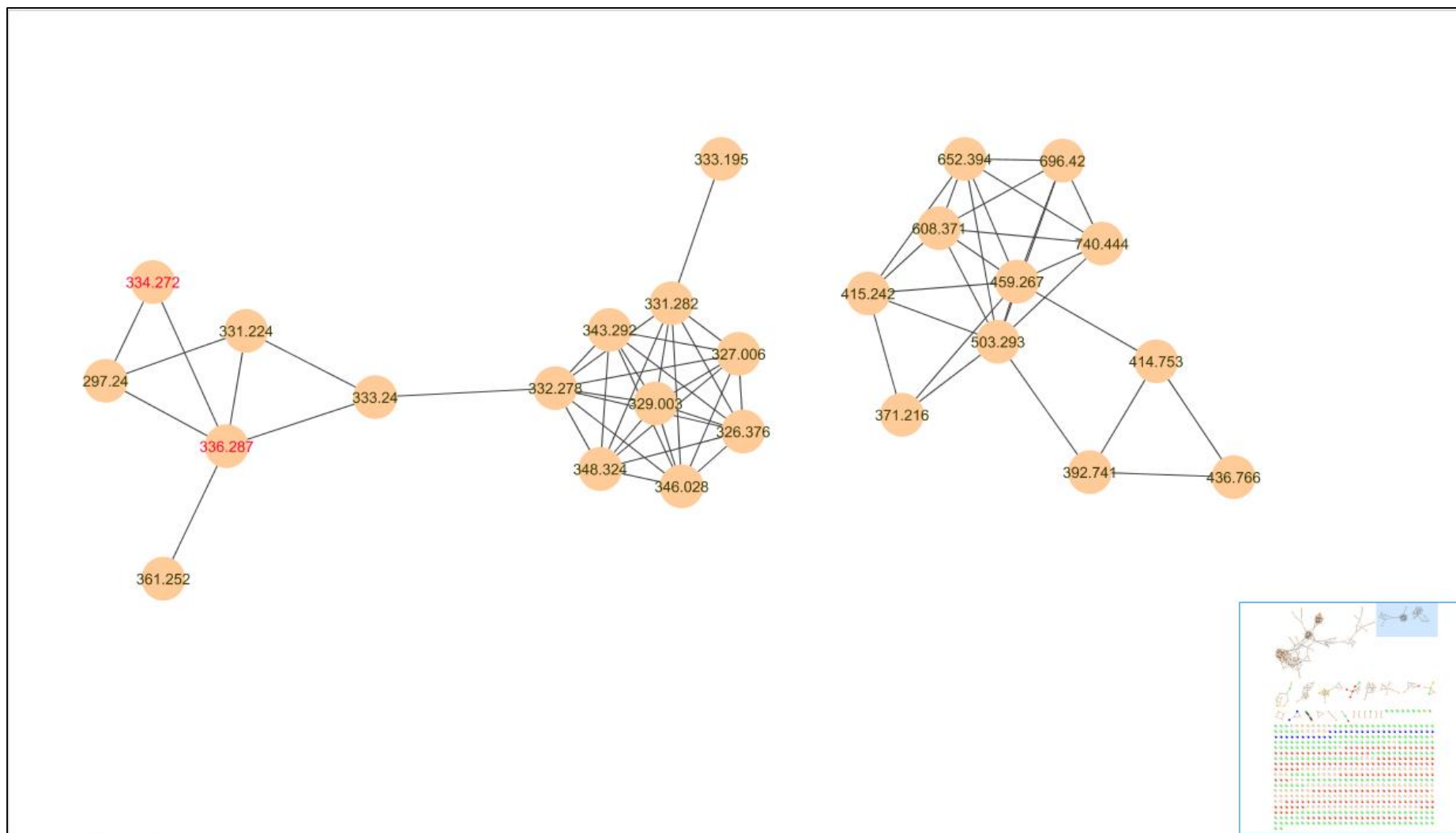


Figure S11. Molecular network on MS² spectra managed under Cytoscape 3.5.0, with parent mass label. Lobophorenol B (m/z 334.272) and lobophorenols C (m/z 336.287) are in red.

Table S1. Post-hoc permutational pairwise test based on crossed model validation for metabotype differentiation according to species by NMR, LC-MS or GC-MS (999 permutations, p-value adjustment method: fdr). Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold.

NMR				LC-MS				GC-MS			
	LM	LO	LR		LM	LO	LR		LM	LO	LR
LO	0.018	-	-	LO	0.006	-	-	LO	0.006	-	-
LR	0.022	0.006	-	LR	0.044	0.006	-	LR	0.431	0.008	-
LS	0.276	0.276	0.018	LS	0.006	0.018	0.006	LS	0.012	0.008	0.018

Table S2. Selection of the most significant regions in the spectra varying among *Lobophora* species (from Kruskal-Wallis test, with $p\text{-value} < 0.05$). Characteristic signals (ppm) of lobophorenols A, B and C are also assigned to the corresponding chemical shift range.

Max ppm area	Range ppm area	Characteristic signals (ppm)
0.678	0.662 - 0.68	-
0.892	0.823 - 0.997	Lobophorenol C: 0.97
1.214	1.237 - 1.253	-
1.446	1.407 - 1.501	Lobophorenol C: 1.47 Lobophorenol A, B & C: 1.46
2.05	2.035 - 2.077	Lobophorenol B: 2.06, A & C: 2.07
2.3	2.08 - 2.386	Lobophorenol A: 2.10/2.25, B: 2.14, C: 2.24
2.412	2.318 - 2.433	Lobophorenol B & C: 2.36
2.816	2.747 - 2.836	Lobophorenol A, B & C: 2.82
2.956	2.85 - 3.08	Lobophorenol A: 2.86/2.87
3.374	3.240 - 3.442	Lobophorenol C: 3.32
3.512	3.365 - 3.595	Lobophorenol B: 3.48, C : 3.46
3.714	3.536 - 3.721	Lobophorenol A: 3.70
4.004	3.854 - 4.302	Lobophorenol B: 3.94
4.37	4.103 - 4.398	Lobophorenol A: 4.38
5.014	4.927 - 5.102	Lobophorenol A, B & C: 4.94 and 5.00
5.291	5.244 - 5.397	Lobophorenol A: 5.34, A, B & C: 5.37 and 5.38
5.488	5.398 - 5.667	Lobophorenol A: 5.48/5.49, B & C: 5.45 and Lobophorenol B: 5.51, C: 5.52
5.599	5.399 - 5.74	-
5.708	5.589 - 5.860	Lobophorenol B & C: 5.82
5.987	5.837 - 6.013	Lobophorenol B: 5.92
6.18	6.009 - 6.377	Lobophorenol A: 6.02
6.522	6.365 - 6.534	-
6.961	6.682 - 7.12	-
7.52	7.376 - 7.529	-
7.715	7.684 - 7.779	-

Table S3. *Lobophora* ions responsible for the difference according to species after LC-MS analysis. The mSigma (mS) value is a measure for the goodness of fit between experimental mass and isotopic pattern with theoretical ones: lower is the mS, better is the annotation.

m/z	rt	Ion assignation	Ion formula	error (ppm)	mS
334.2741	606	[M + NH ₄ ⁺]	C ₂₁ H ₃₆ NO ₂	-2.5	9.4
336.2898	619	[M + NH ₄ ⁺]	C ₂₁ H ₃₈ NO ₂	-1.5	21.5

Figures complémentaires à l'article

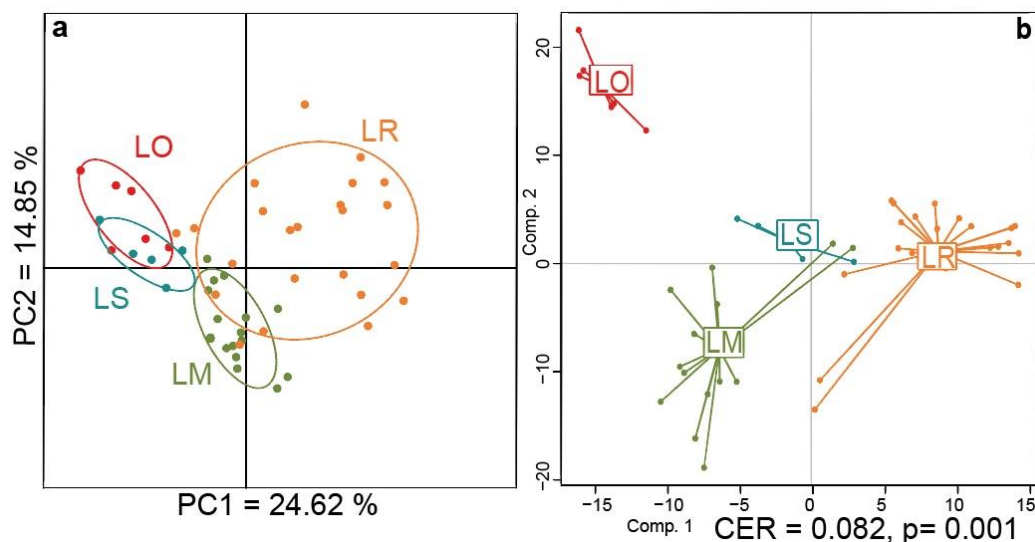


Figure S12. (a) PCA and (b) PPLS-DA of *Lobophora* species metabolome analyzed by LC-MS in MeOH fractions, including the additional samples available for *L. monticola* and *L. rosacea* (LO: *L. obscura*, LR: *L. rosacea*, LM: *L. monticola* and LS: *L. sonderii*). CER = classification error rate with p-value after double cross model validation SD ($n_{LM} = 18$, $n_{LO} = 6$, $n_{LR} = 23$ and $n_{LS} = 5$).

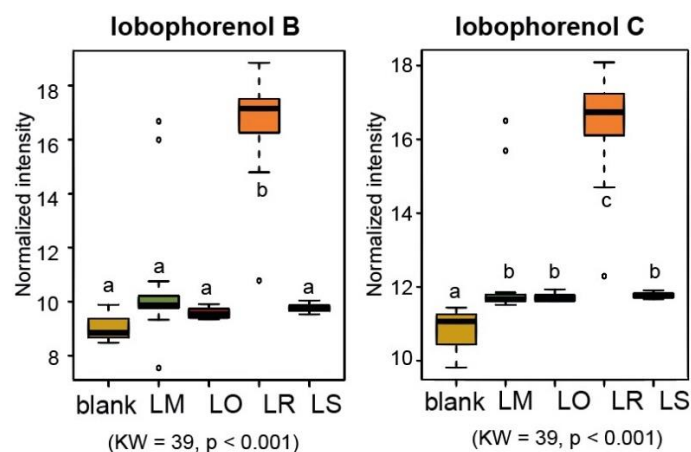


Figure S13. Box plots of lobophorenols B and C among the four *Lobophora* species and blank, including the additional samples available for *L. monticola* and *L. rosacea* (log-transformed data), detected by LC-MS, expressed as mean normalized intensities $\pm$ SD ($n_{blank} = 3$, $n_{LM} = 18$, $n_{LO} = 6$, $n_{LR} = 23$ and $n_{LS} = 5$) (LM: *L. monticola*, LO: *L. obscura*, LR: *L. rosacea*, and LS: *L. sonderii*). The statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis (KW) followed by post-hoc Conover's test. Letters indicate significant differences between groups based on post-hoc pairwise comparisons ($p < 0.05$).

Table S4: Annotated main compounds in the CH₂Cl₂ fraction of *Lobophora* species. Annotation was done with NIST 2011 and Wiley databases (RI= Van Del Dool and Kratz Retention Index).

Comp.	Molecular name	Chemical family	CAS Number	Raw formula	% match NIST 2011	RI literature	RI
M1	1-octadecene	alkene	112-88-9	C ₁₈ H ₃₆	99	1793	1793
M2	Octadecane	alkene	593-45-3	C ₁₈ H ₃₈	98	1800	1799
M3	3-Octadecene	alkene	7206-19-1	C ₁₈ H ₃₆	68	1795	1804
M4	Neophytadiene isomer 1	alkene	504-96-1	C ₂₀ H ₃₈	Wiley	1841	1841
M5	Phytene	alkene	14237-73-1	C ₂₀ H ₄₀	94	1835	1847
M6	Neophytadiene isomer 2	alkene	504-96-1	C ₂₀ H ₃₈	Wiley		1865
M7	Neophytadiene isomer 3	alkene	504-96-1	C ₂₀ H ₃₈	Wiley	1881	1884
M8	1-eicosene	alkene	3452-07-1	C ₂₀ H ₄₀	81	1993	1993
M9	1-heneicosene	alkene	27400-79-9	C ₂₁ H ₄₂	-	2090	2091
M10	Octadecanoic acid, 2-methoxy-1-(methoxymethyl) ethyl ester	ester	16500-98-4	C ₂₃ H ₄₆ O ₄	-	2625	2657
M11	1-tetracosene	alkene	10192-32-2	C ₂₄ H ₄₈	-	2394	2393
M12	Squalene	triterpene	111-02-4	C ₃₀ H ₅₀	99	2836	2837
M13	Hexadecanoic acid, methyl ester	ester	112-39-0	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	96	1926	1926
M14	9-Octadecenoic acid, methyl ester	ester	2462-84-2	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	95	2107	2102
M15	Phytol	alcohol	102608-53-7	C ₂₀ H ₄₀ O	64	2116	2121
M16	Methyl stearate	ester	112-61-8	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	99	2128	2127
M17	Unknown	-	-	-	-	-	2138
M18	Unknown	-	-	-	-	-	2226
M19	Unknown	-	-	-	-	-	2261
M20	Unknown	-	-	-	-	-	2042
M21	Unknown	-	-	-	-	-	2049
M22	Unknown	-	-	-	-	-	2456
M23	Unknown	-	-	-	-	-	2071
M24	Unknown	-	-	-	-	-	2505
M25	Unknown	-	-	-	-	-	2786
M26	Nonadecane	alkane	629-92-5	C ₁₉ H ₄₀	98	1900	1899
M27	Eicosane	alkane	112-95-8	C ₂₀ H ₄₂	96	2000	1999
M28	Heneicosane	alkane	629-94-7	C ₂₁ H ₄₄	98	2100	2099
M29	Docosane	alkane	629-97-0	C ₂₂ H ₄₆	96	2200	2199
M30	Tetracosane	alkane	646-31-1	C ₂₄ H ₅₀	98	2400	2399
M31	Pentacosane	alkane	629-99-2	C ₂₅ H ₅₂	90	2500	2499
M32	Hexacosane	alkane	630-01-3	C ₂₆ H ₅₄	87	2600	2556
M33	Heptacosane	alkane	593-49-7	C ₂₇ H ₅₆	83	2700	2699
M34	Octacosane	alkane	630-02-4	C ₂₈ H ₅₈	90	2800	2799
M35	Nonacosane	alkane	630-03-5	C ₂₉ H ₆₀	-	2900	2899

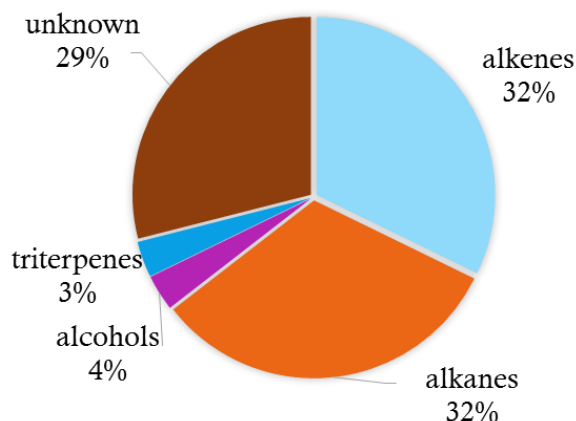


Figure S14. Pie chart showing the main chemical families found in CH₂Cl₂ fraction of *Lobophora* species.

Parmi les composés majoritaires identifiés par GC-MS dans la fraction CH₂Cl₂ de *Lobophora*, on retrouve majoritairement des alcènes et des alcanes en proportions équivalentes (32 %). On retrouve également des alcools (4 %) et des triterpènes (3 %) tandis que 29 % des composés restent non annotés.

Références

- Abdo, D.A., Motti, C.A., Battershill, C.N. & Harvey, E.S. (2007). Temperature and spatiotemporal variability of salicylhalamide A in the sponge *Haliclona* sp. *J. Chem. Ecol.*, 33, 1635–1645.
- Agnolet, S., Jaroszewski, J.W., Verpoorte, R. & Staerk, D. (2010). ¹H NMR-based metabolomics combined with HPLC-PDA-MSSPE- NMR for investigation of standardized *Ginkgo biloba* preparations. *Metabolomics*, 6, 292–302.
- Belghit, I., Rasinger, J.D., Heesch, S., Biancarosa, I., Liland, N., Torstensen, B., *et al.* (2017). In-depth metabolic profiling of marine macroalgae confirms strong biochemical differences between brown, red and green algae. *Algal Res.*, 26, 240–249.
- Bundy, J.G., Davey, M.P. & Viant, M.R. (2009). Environmental metabolomics: A critical review and future perspectives. *Metabolomics*, 5, 3–21.
- Bussell, J.A., Gidman, E.A., Causton, D.R., Gwynn-Jones, D., Malham, S.K., Jones, M.L.M., *et al.* (2008). Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 358, 78–85.

- Cachet, N., Genta-Jouve, G., Ivanisevic, J., Chevaldonné, P., Sinniger, F., Culioli, G., *et al.* (2015). Metabolomic profiling reveals deep chemical divergence between two morphotypes of the zoanthid *Parazoanthus axinellae*. *Sci. Rep.*, 5, 8282.
- Campos De Paula, J., Bomeny Bueno, L., Christina De Palmer Paix??o Frugulhetti, I., Yoneshigue-Valentin, Y. & Laneuville Teixeira, V. (2007). *Dictyota dolabellana* sp. nov. (Dictyotaceae, Phaeophyceae) based on morphological and chemical data. *Bot. Mar.*, 50, 288–293.
- Cantillo-Ciau, Z., Moo-Puc, R., Quijano, L. & Freile-Pelegrín, Y. (2010). The tropical brown alga *Lobophora variegata*: a source of antiprotozoal compounds. *Mar. Drugs*, 8, 1292–304.
- Carlson, D.J., Lubchenco, J., Sparrow, M.A. & Trowbridge, C.D. (1989). Fine-scale variability of lanosol and its disulfate ester in the temperate red alga *Neorhodomela larix*. *J. Chem. Ecol.*, 15, 1321–1333.
- Connan, S., Delisle, F., Deslandes, E. & Ar Gall, E. (2006). Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Bot. Mar.*, 49, 39–46.
- Connan, S., Goulard, F., Stiger, V., Deslandes, E. & Gall, E.A. (2004). Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Bot. Mar.*, 47, 410–416.
- Cronin, G. & Hay, M.E. (1996). Induction of Seaweed Chemical Defenses by Amphipod Grazing. *Ecol. Soc. Am.*, 77, 2287–2301
- Costa-Lotufo, L. V., Carnevale-Neto, F., Trindade-Silva, A.E., Silva, R.R., Silva, G.G.Z., Wilke, D. V., *et al.* (2018). Chemical profiling of two congeneric sea mat corals along the Brazilian coast: adaptive and functional patterns. *Chem. Commun.*
- De Nys, R., Steinberg, P.D., Rogers, C.N., Charlton, T.S. & Duncan, M.W. (1996). Quantitative variation of secondary metabolites in the sea hare *Aplysia parvula* and its host plant, *Delisea pulchra*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 130, 135–146.
- De Rosa, S., Kamenarska, Z., Bankova, V., Stefanov, K., Dimitrova-Konaklieva, S., Najdenski, H., *et al.* (2001). Chemical composition and biological activities of the Black Sea algae *Polysiphonia denudata* (Dillw.) Kütz. and *Polysiphonia denudata* f. *fragilis* (Sperk) woronich. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, 56, 1008–1014.
- Dittami, S.M., Gravot, A., Renault, D., Goulitquer, S., Eggert, A., Bouchereau, A., *et al.* (2011). Integrative analysis of metabolite and transcript abundance during the short-term response to saline and oxidative stress in the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *Plant, Cell Environ.*, 34, 629–642.
- Domingo-Almenara, X., Brezmes, J., Vinaixa, M., Samino, S., Ramirez, N., Ramon-Krauel, M., *et al.* (2016). ERah: A Computational Tool Integrating Spectral Deconvolution and Alignment with Quantification and Identification of Metabolites in GC/MS-Based Metabolomics. *Anal. Chem.*, 88, 9821–9829.

- Egan, S., Harder, T., Burke, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S. & Thomas, T. (2013). The seaweed holobiont: understanding seaweed-bacteria interactions. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37, 462–76.
- Elshafie, H.S., Racioppi, R., Bufo, S.A. & Camele, I. (2017). In vitro study of biological activity of four strains of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* and identification of their bioactive metabolites using GC-MS. *Saudi J. Biol. Sci.*, 24, 295–301.
- Fairhead, V.A., Amsler, C.D., McClintock, J.B. & Baker, B.J. (2005). Variation in phlorotannin content within two species of brown macroalgae (*Desmarestia anceps* and *D. menziesii*) from the Western Antarctic Peninsula. *Polar Biol.*, 28, 680–686.
- Farag, M.A., Porzel, A., Schmidt, J. & Wessjohann, L.A. (2012a). Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): A comparison of MS and NMR methods in metabolomics. *Metabolomics*, 8, 492–507.
- Farag, M.A., Porzel, A. & Wessjohann, L.A. (2012b). Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques. *Phytochemistry*, 76, 60–72.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.*, 48, 155–171.
- Gerwick, W. & Fenical, W. (1982). Phenolic lipids from related marine algae of the order dictyotales. *Phytochemistry*, 21, 633–637.
- Gravot, A., Dittami, S.M., Rousvoal, S., Lugan, R., Eggert, A., Collén, J., *et al.* (2010). Diurnal oscillations of metabolite abundances and gene analysis provide new insights into central metabolic processes of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *New Phytol.*, 188, 98–110.
- Greff, S., Zubia, M., Payri, C., Thomas, O.P. & Perez, T. (2017). Chemogeography of the red macroalgae *Asparagopsis*: metabolomics, bioactivity, and relation to invasiveness. *Metabolomics*, 13, 0.
- Gutiérrez-Cepeda, A., Fernández, J.J., Norte, M., Montalvão, S., Tammela, P. & Souto, M.L. (2015). Acetate-Derived Metabolites from the Brown Alga *Lobophora variegata*. *J. Nat. Prod.*, 78, 1716–1722.
- Gutow, L., Eckerlebe, A., Giménez, L. & Saborowski, R. (2016). Experimental Evaluation of Seaweeds as a Vector for Microplastics into Marine Food Webs. *Environ. Sci. Technol.*, 50, 915–923.
- Hay, M.E. (1996). Marine chemical ecology: what's known and what's next? *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 200, 103–134.
- Ivanisevic, J., Pérez, T., Ereskovsky, A. V., Barnathan, G. & Thomas, O.P. (2011). Lysophospholipids in the Mediterranean Sponge *Oscarella tuberculata*: Seasonal Variability and Putative Biological Role. *J. Chem. Ecol.*, 37, 537–545.
- Jaramillo, K.B., Reverter, M., Guillen, P.O., Mcco, G., Rodriguez, J., Sinniger, F., *et al.*

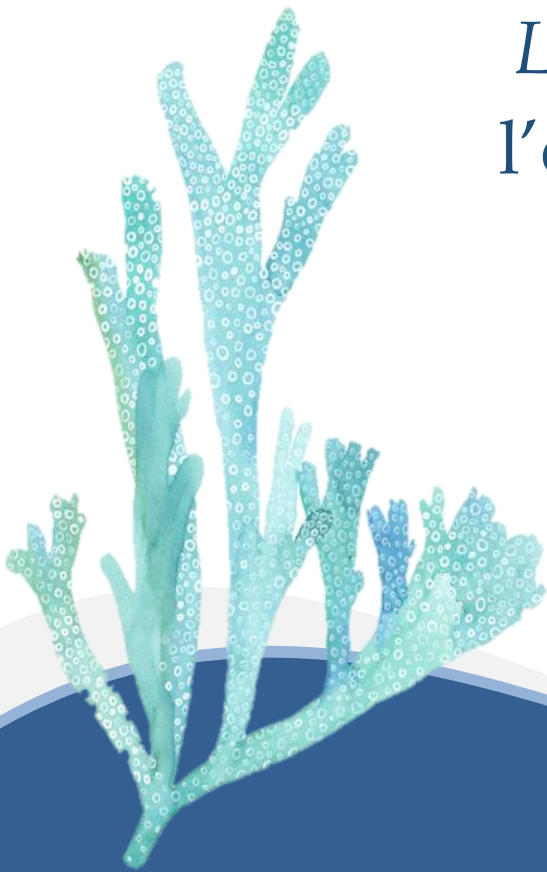
- (2018). Assessing the Zoantharian Diversity of the Tropical Eastern Pacific through an Integrative Approach, 1–15.
- Jégou, C., Culioli, G., Kervarec, N., Simon, G. & Stiger-Pouvreau, V. (2010). LC/ESI-MSn and ¹H HR-MAS NMR analytical methods as useful taxonomical tools within the genus *Cystoseira* C. Agardh (Fucales; Phaeophyceae). *Talanta*, 83, 613–622.
- Konotchick, T., Dupont, C.L., Valas, R.E., Badger, J.H. & Allen, A.E. (2013). Transcriptomic analysis of metabolic function in the giant kelp, *Macrocystis pyrifera*, across depth and season. *New Phytol.*, 198, 398–407.
- Kubaneck, J., Jensen, P.R., Keifer, P. a, Sullards, M.C., Collins, D.O. & Fenical, W. (2003). Seaweed resistance to microbial attack: a targeted chemical defense against marine fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 6916–21.
- López-Legentil, S., Bontemps-Subielos, N., Turon, X. & Banaigs, B. (2006). Temporal variation in the production of four secondary metabolites in a colonial ascidian. *J. Chem. Ecol.*, 32, 2079–2084.
- Meyer, K.D. & Paul, V.J. (1992). Intraplant variation in secondary metabolite concentration in three species of *Caulerpa* (Chlorophyta: Caulerpales) and its effects on herbivorous fishes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 82, 249–257.
- Mooney, B.D., Nichols, P.D., De Salas, M.F. & Hallegraeff, G.M. (2007). Lipid, fatty acid, and sterol composition of eight species of Kareniaceae (dinophyta): Chemotaxonomy and putative lipid phycotoxins. *J. Phycol.*, 43, 101–111.
- Naeher, S., Schaeffer, P., Adam, P. & Schubert, C.J. (2013). Maleimides in recent sediments - Using chlorophyll degradation products for palaeoenvironmental reconstructions. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 119, 248–263.
- Paidi, M.K., Agarwal, P., More, P. & Agarwal, P.K. (2017). Chemical Derivatization of Metabolite Mass Profiling of the Recrethalophyte *Aeluropus lagopoides* Revealing Salt Stress Tolerance Mechanism. *Mar. Biotechnol.*, 19, 207–218.
- Paul, V. & Fenical, W. (1986). Chemical defense in tropical green algae, order Caulerpales. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 34, 157–169.
- Paul, V.J. & Van Alstyne, K.L. (1988). Chemical defense and chemical variation in some tropical Pacific species of *Halimeda* (Halimedaceae; Chlorophyta). *Coral Reefs*, 6, 263–269.
- Pavia, H., Toth, G.B., Lindgren, A. & Aberg, P. (2003). Intraspecific variation in the phlorotannin content of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Phycologia*, 42, 378–383.
- Pavia, H., Toth, G.N. & Aberg, P. (2002). Optimal Defense Theory : Elasticity Analysis as a Tool to Predict Intraplant Variation in Defenses Author (s): Henrik Pavia , Gunilla B . Toth and Per Åberg OPTIMAL DEFENSE THEORY : ELASTICITY ANALYSIS AS A TOOL TO PREDICT INTRAPLANT VARIATION IN DEFENS. *Ecol. Soc. Am.*, 83, 891–897.

- Payo, D.A., Colo, J., Calumpong, H. & De Clerck, O. (2011). Variability of non-polar secondary metabolites in the red alga *Portieria*. *Mar. Drugs*, 9, 2438–2468.
- Pérez, T., Ivanisevic, J., Dubois, M., Pedel, L., Thomas, O.P., Tokina, D., *et al.* (2011). *Oscarella balibalo*, a new sponge species (Homoscleromorpha: Plakinidae) from the Western Mediterranean Sea: Cytological description, reproductive cycle and ecology. *Mar. Ecol.*, 32, 174–187.
- Phillips, D.W. & Towers, G.H.N. (1982). Chemical ecology of red algal bromophenols. I. Temporal, interpopulational and within-thallus measurements of lanosol levels in *Rhodomela larix* (Turner) C. Agardh. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 58, 285–293.
- Rasher, D.B. & Hay, M.E. (2010). Chemically rich seaweeds poison corals when not controlled by herbivores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 9683–8.
- Rempt, M., Weinberger, F., Grosser, K. & Pohnert, G. (2012). Conserved and species-specific oxylipin pathways in the wound-activated chemical defense of the noninvasive red alga *Gracilaria chilensis* and the invasive *Gracilaria vermiculophylla*. *Beilstein J. Org. Chem.*, 8, 283–289.
- Ritter, A., Dittami, S.M., Goulitquer, S., Correa, J. a, Boyen, C., Potin, P., *et al.* (2014). Transcriptomic and metabolomic analysis of copper stress acclimation in *Ectocarpus siliculosus* highlights signaling and tolerance mechanisms in brown algae. *BMC Plant Biol.*, 14, 116.
- Roessner, U. & Bowne, J. (2009). What is metabolomics all about? *Biotechniques*, 46, 363–365.
- Rohde, S., Gochfeld, D.J., Ankisetty, S., Avula, B., Schupp, P.J. & Slattery, M. (2012). Spatial Variability in Secondary Metabolites of the Indo-Pacific Sponge *Stylissa massa*. *J. Chem. Ecol.*, 38, 463–475.
- Shannon, P., Markiel, A., Owen Ozier, 2, Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., *et al.* (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 13, 2498–2504.
- Sharmin, T., Monirul Hasan, C.M., Aftabuddin, S., Rahman, M.A. & Khan, M. (2016). Growth, fatty acid, and lipid composition of marine microalgae *skeletonema costatum* available in Bangladesh coast: Consideration as biodiesel feedstock. *J. Mar. Biol.*, 2016.
- Slattery, M., Starmer, J. & Paul, V.J. (2001). Temporal and spatial variation in defensive metabolites of the tropical Pacific soft corals *Sinularia maxima* and *S. polydactyla*. *Mar. Biol.*, 138, 1183–1193.
- Steinberg, P.D. (1984). Defense Against Predation. *Science* (80-.), 106–111.
- Steinberg, P.D. (1989). Biogeographical variation in brown algal polyphenolics and other secondary metabolites: comparison between temperate Australasia and North America. *Oecologia*, 78, 373–382.
- Takeara, R., Jimenez, P.C., Wilke, D.V., Odorico de Moraes, M., Pessoa, C., Pepporine

- Lopes, N., *et al.* (2008). Antileukemic effects of *Didemnum psammatoedes* (Tunicata: Ascidiacea) constituents. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*, 151, 363–369.
- Terekhova, E.A., Stepicheva, N.A., Pshenichnikova, A.B. & Shvets, V.I. (2010). Stearic acid methyl ester: A new extracellular metabolite of the obligate methylotrophic bacterium *Methylophilus quaylei*. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 46, 166–172.
- Tugwell, S. & Branch, G.M. (1989). Differential polyphenolic distribution among tissues in the angustifolia in relation to plant-defence theory. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 129, 219–230.
- Unamba, C.I.N., Nag, A. & Sharma, R.K. (2015). Next Generation Sequencing Technologies: The Doorway to the Unexplored Genomics of Non-Model Plants. *Front. Plant Sci.*, 6.
- Vieira, C., Camacho, O., Sun, Z., Fredericq, S., Leliaert, F., Payri, C., *et al.* (2017). Historical biogeography of the highly diverse brown seaweed *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 110, 81–92.
- Vieira, C., D'hondt, S., De Clerck, O. & Payri, C.E. (2014). Toward an inordinate fondness for stars, beetles and *Lobophora*? Species diversity of the genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) in New Caledonia. *J. Phycol.*, 50, 1101–1119.
- Vieira, C., Thomas, O.P., Culioli, G., Genta-Jouve, G., Houlbreque, F., Gaubert, J., *et al.* (2016). Allelopathic interactions between the brown algal genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) and scleractinian corals. *Sci. Rep.*, 6, 18637.
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V. V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., *et al.* (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.*, 34, 828–837.
- Wang, Y., Liu, S., Hu, Y., Li, P. & Wan, J.-B. (2015). Current state of the art of mass spectrometry-based metabolomics studies – a review focusing on wide coverage, high throughput and easy identification. *RSC Adv.*, 5, 78728–78737.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3–19.
- Wright, J.T., De Nys, R. & Steinberg, P.D. (2000). Geographic variation in halogenated furanones from the red alga *Delisea pulchra* and associated herbivores and epiphytes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 207, 227–241.
- Wu, C.M. & Chen, S.Y. (1992). Volatile compounds in oils after deep frying or stir frying and subsequent storage. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 858–865.

Chapitre 5

Variation spatio-temporelle
du métabolome de
Lobophora : impact de
l'environnement et de
l'habitat



Ce chapitre a pour but d'étudier la variation du métabolome des quatre espèces de *Lobophora* à l'échelle spatio-temporelle, en lien avec l'habitat et les paramètres environnementaux, via une approche métabolomique par UHPLC-QToF.

L'étude du métabolome à l'échelle temporelle a été réalisée sur une période de 13 mois au site de Ricaudy pour trois espèces (*L. rosacea*, *L. sonderii* et *L. obscura*) et à Sainte-Marie pour *L. monticola*. Plusieurs paramètres environnementaux ont été relevés durant ce suivi (ex : salinité, température de surface de l'eau de mer, photopériode...) afin de mettre en évidence une potentielle corrélation entre ces paramètres et les variations du métabolome. L'étude spatiale du métabolome a été réalisée à travers cinq sites au sein du lagon Sud-Ouest de Nouméa et sur trois espèces : *L. rosacea*, *L. sonderii* et *L. obscura*. Pour chacun des sites, l'habitat a été caractérisé. Afin de compléter cette étude spatiale, des transplantations croisées de l'habitat naturel à un nouvel habitat ont été réalisées sur une période 14 jours pour trois espèces et durant deux saisons (été et hiver australs) : *L. sonderii*, *L. monticola* et *L. obscura*. Le métabolome des spécimens transplantés et en condition naturelle ont ensuite été analysés afin de voir un potentiel effet de l'habitat, en lien avec le substrat d'accrochage et l'environnement proche de l'algue.

I- Variation spatio-temporelle du métabolome de *Lobophora*

Résumé

Les macroalgues font face à des changements de conditions environnementales dans le milieu marin et certaines espèces sont connues pour leur forte capacité à s'adapter à de nouveaux facteurs dans leur niche écologique. Les métabolites algaux jouent diverses fonctions écologiques et font partie des traits adaptatifs de ces espèces. Puisqu'ils sont impliqués dans de nombreux processus qui structurent la biodiversité marine, comprendre leurs sources de variations et de régulations est important.

Ce travail vise à explorer de potentielles sources de variations du métabolome en fonction du temps et de l'espace chez l'algue brune *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae), commune dans les récifs coralliens tropicaux, notamment en Nouvelle-Calédonie. Pour cela, quatre espèces ont été sélectionnées dans le lagon Néo-Calédonien: *Lobophora rosacea*, *L. sonderii*, *L. monticola* et *L. obscura* et une approche de métabolomique non ciblée par UHPLC-HRMS (« metabolomic fingerprinting ») a été employée. Bien que les différences métabolomiques inter-spécifiques dominent, une forte variabilité du métabolome a été observée pour chaque espèce dans divers habitats naturels au sein du lagon, sans relation claire avec les caractéristiques de l'habitat. Des expériences de transplantations croisées dans de nouveaux habitats menées sur deux espèces (*L. sonderii* et *L. obscura*) ont montré des changements métabolomiques sur celles-ci. Notamment, des changements quantitatifs ont été observés lorsque les algues ont été transplantées sur un corail vivant par rapport à un corail mort, suggérant l'implication d'autres facteurs biotiques, en plus de l'environnement proche de l'algue et du substrat d'accrochage, sur le métabolome. Des dérivés d'acides gras oxygénés polyinsaturés, des alcools insaturés ainsi que des polyoléfinés à 21 et 23 carbones ont été identifiés parmi les marqueurs de ces conditions changeantes. Le métabolome des quatre algues a aussi montré des variations mensuelles sur les 13 mois d'étude et une corrélation significative a été

établie avec la température de surface de l'eau de mer et la salinité. Cette étude a montré une plasticité relative du métabolome des espèces de *Lobophora* à l'échelle spatio-temporelle et a fait l'objet d'un article soumis à *Scientific Reports* le 2 Août 2018, intitulé «High metabolic variation for seaweeds in response to environmental changes: a case study of the brown algae *Lobophora* in coral reefs” présenté ci-dessous.

~~~~~

### **High metabolic variation for seaweeds in response to environmental changes: a case study of the brown algae *Lobophora* in coral reefs**

Julie GAUBERT<sup>1,2\*</sup>, Claude E. PAYRI<sup>2</sup>, Christophe VIEIRA<sup>3</sup>, Hiren SOLANKI<sup>4</sup>,  
Olivier P. THOMAS<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Universités, Collège Doctoral, F-75005 Paris, France.

<sup>2</sup> UMR ENTROPIE (IRD, UR, CNRS), Institut de Recherche pour le Développement, B.P. A5, 98848 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie.

<sup>3</sup> Phycology Research Group and Center for Molecular Phylogenetics and Evolution, Ghent University, Krijgslaan 281 (S8), 9000, Gent, Belgium

<sup>4</sup> Marine Biodiscovery, School of Chemistry and Ryan Institute, National University of Ireland Galway (NUI Galway), University Road, H91 TK33 Galway, Ireland.

## **Abstract:**

In the marine environment, macroalgae face changing environmental conditions and some species are known for their high capacity to adapt to the new factors of their ecological niche. Some macroalgal metabolites play diverse ecological functions and belong to the adaptive traits of such species. Because algal metabolites are involved in many processes that shape marine biodiversity, understanding their sources of variation and regulation is therefore of utmost relevance. This work aims at exploring the possible sources of metabolic variations with time and space of four common algal species from the genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) in the New Caledonian lagoon using a UHPLC-HRMS metabolomic fingerprinting approach. While interspecific differences dominated, a high variability of the metabolome was noticed for each species when changing their natural habitats and types of substrates. Fatty acids derivatives and polyolefins were identified as chemomarkers of these changing conditions. The four seaweeds metabolome also displayed monthly variations over the 13-months survey and a significant correlation was made with sea surface temperature and salinity. This study highlights a relative plasticity for the metabolome of *Lobophora* species.

## **1. Introduction**

Together with marine sponges, macroalgae represent a high source of chemical diversity, also called specialized metabolites. Today, over 3,000 specialized metabolites were identified from red (Rhodophyta), green (Chlorophyta) and brown (Ochrophyta) algae (Pereira *et al.* 2016). Comparatively to their temperate counterparts, tropical macroalgal taxa have been shown to produce a higher diversity of metabolites, with a majority of halogenated, terpenoids, acetogenins and terpenoid-aromatic compounds (Amsler *et al.* 2008). These small molecules (< 1500 Da) are mainly regulated by genetic, developmental and environmental factors (Kooke & Keurentjes 2011). They can be seen as adaptive traits that have evolved under natural selection (Wink 2003). They are involved in chemical communication and play diverse

ecological functions in macroalgae. Even if the best known and studied ecological role of these metabolites is the deterrence against competitors and herbivores (Hay & Fenical 1988; Dell & Hay 2016), they can also act as defense against pathogens (Kubaneck *et al.* 2003; Kremb *et al.* 2014) (e.g. bacteria, fungus, virus), epibionts (da Gama *et al.* 2014), UV protector (Pessoa 2012) or sexual pheromones (Pohnert & Boland 2002). These chemicals might also be involved in the competition for space with other benthic organisms (Box & Mumby 2007; Slattery & Lesser 2014).

Specialized metabolite concentrations may vary between and within species, temporally and spatially (Wright *et al.* 2000; Oliveira *et al.* 2013) and their concentration can be affected by environmental factors (biotic and abiotic) (Viant 2007; Kooke & Keurentjes 2011). Nevertheless, most studies on algal chemical variability used bioassays on the crude extract as a proxy of metabolites production or they focused on specific families of compounds therefore overlooking many metabolites likely to play important ecological functions. Because marine algae face changes in the surrounding physico-chemical and biotic parameters (Kumar *et al.* 2016), it is highly relevant to study their global metabolic response when exposed to changing environmental conditions.

The advent of metabolomics allows the study of a large set of metabolites (metabolome), through metabolomic fingerprinting approaches. The variation of macroalgal metabolomic fingerprints will bring useful information to the response of the seaweed to environmental changes. Several studies explored the global metabolomic response of marine organisms to different biotic and abiotic factors. For example, the impacts of salinity and UV stress on the metabolome were explored in the brown macroalgae *Sargassum cymosum* (Polo *et al.* 2015). The exo-metabolome was studied in the green algae *Ulva*, revealing differences according to growth stage and interaction with bacteria (Alsufyani *et al.* 2017). Defense mechanisms against herbivorous were assessed based on the metabolic profile of *Gracilaria vermiculophylla* (Nylund *et al.* 2011). Metabolomic changes related to chemical mediation are also studied for biotic interactions, notably in coral-algal competition (Rasher & Hay 2014). However these interactions are still scarcely investigated at the global metabolomic

level. Changes in *Asparagopsis taxiformis* metabolomic fingerprint were observed after contact with the coral *Astroides calycularis* (Greff *et al.* 2017a) and different coral-algal assemblages can alter the coral metabolome (Quinn *et al.* 2016). These above-mentioned studies indicate that the metabolome of macroalgae is influenced by abiotic and biotic factors, supporting its involvement in biological processes and adaptation to the environment. However, metabolomic studies specifically focused on spatio-temporal variations are rare for macroalgae (but see the study on the red alga *A. taxiformis* from temperate versus tropical regions (Greff *et al.* 2017b)). Understanding how the metabolome varies at these scales and how they respond to different factors is relevant to understand adaptive phenomena. It can also help to understand the biochemical pathways involved in macroalgal/microbial cells in response to different conditions (Hay 1996; Viant 2007).

Here, we studied the metabolomic variations in time and space of four common species of the brown algal genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) in the New Caledonian lagoon using an untargeted UHPLC-QToF metabolomic fingerprinting approach. *Lobophora* is a key macroalgal component of tropical coral reefs, notably in New Caledonia due to their large presence and their outstanding species richness has been recently unveiled (Vieira *et al.* 2014, 2017). Importantly, some species are closely associated with corals and strongly involved in coral-algal interactions (Rasher & Hay 2010), leading in some cases to negative impacts on corals (Vieira *et al.* 2015b). The chemistry of this genus has been investigated since 1982 (Gerwick & Fenical 1982), with only few weakly polar to non-polar compounds characterized to date derived from long chain fatty acids (Gutiérrez-Cepeda *et al.* 2015; Vieira *et al.* 2016). In this study, we chose four species with different morphologies and living in various natural habitats across the lagoon of New Caledonia, i.e. *L. monticola*, *L. obscura*, *L. rosacea* and *L. sonderii* (Vieira *et al.* 2014). *Lobophora rosacea* usually grows attached to the bedrock by a basal mound of hairs niched within *Acropora* spp. branches or grows epiphytically over *L. sonderii*. *Lobophora monticola* is also associated with branching corals (e.g. *Acropora*, *Montipora*) in turbid waters, and its blades can grow partially or completely in contact with them. *Lobophora sonderii* forms dense erected blades among *Sargassum*

and *Turbinaria* beds. Finally, *L. obscura* grows on dead coral, coral rubbles or rock firmly attached to the substratum by ventral rhizoids.

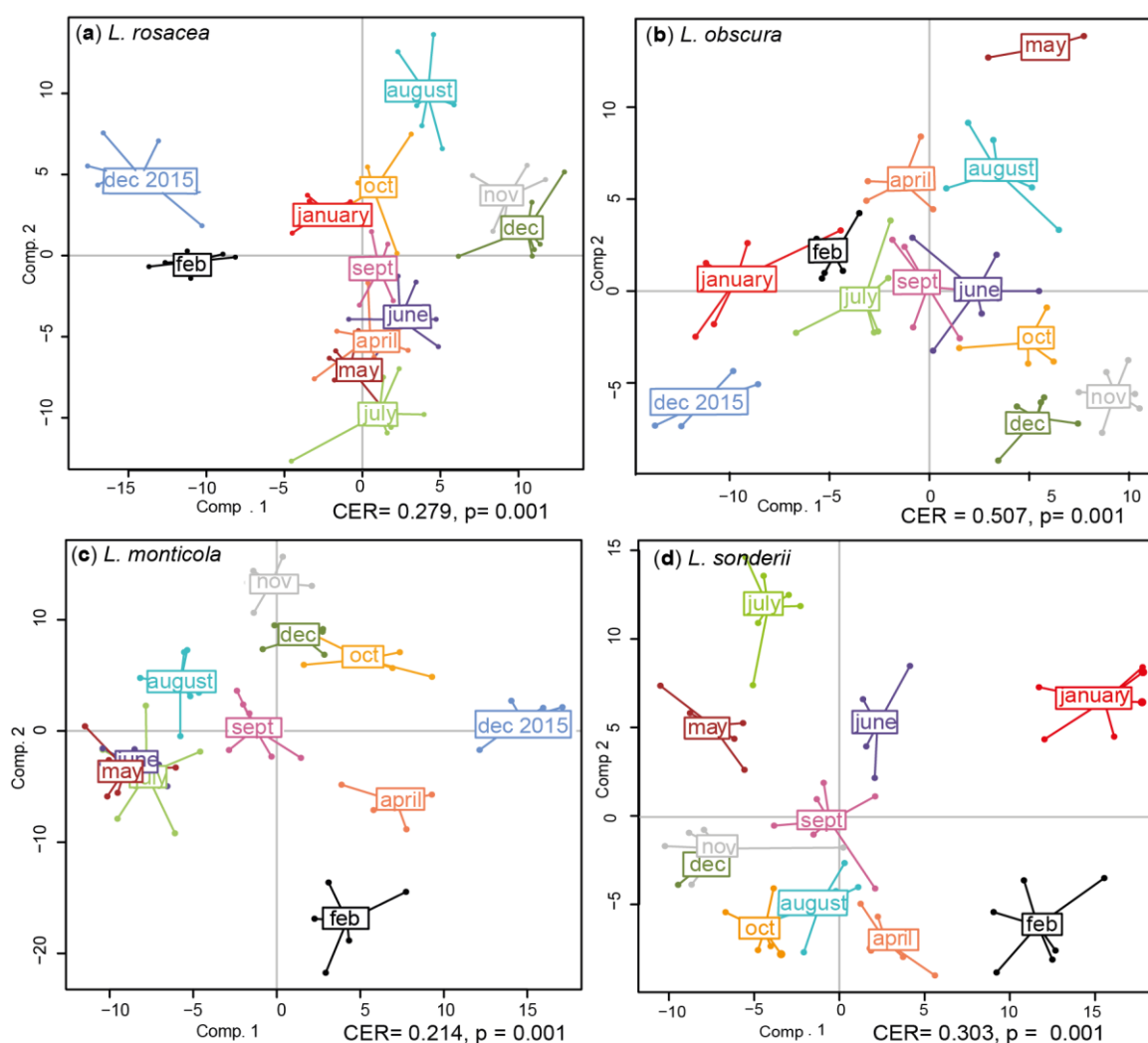
First, we investigated the temporal variability of the metabolic fingerprints of the four *Lobophora* species during a 13-months survey. Physico-chemical parameters were assessed during the survey to highlight some factors likely to affect the metabolome composition. We then studied the spatial metabolomic variation of three species, either in their natural habitat by looking at different sites across the lagoon (five sites), or after short-term *in situ* cross-transplantations between different habitats (two species, three habitats).

## 2. Results

### 2.1. Temporal variation

Temporal variation of the metabolome of the four *Lobophora* species was studied monthly over a 13-months period. After filtration, a total of 326 features were detected in *L. rosacea* (LR), 310 in *L. sonderii* (LS), 404 in *L. monticola* (LM), and 436 in *L. obscura* (LO). Supervised analyses PPLS-DA (Figure 60) conducted for each species supported a significant effect of time on the global metabolomic fingerprinting ( $CER_{LR} = 0.279$ ,  $CER_{LS} = 0.303$ ,  $CER_{LM} = 0.214$ ,  $CER_{LO} = 0.507$ ,  $p = 0.001$ ; CER = Mean classification error rate with p-value after double cross model validation).

The metabolome of *L. rosacea*, *L. monticola* and *L. sonderii* were more variable between months (post-hoc tests Tables S5-S7) compared to *L. obscura* (highest CER, post-hoc tests Table S8) even if no clear seasonal pattern was observed. December 2015 and December 2016 presented significant distinct metabotypes (metabolic phenotypes) for each species and the metabolomic variation does not appear to be yearly cyclic. The metabolome of December 2015 was more distinct on PPLS-DA loading plots for *L. rosacea* and *L. monticola* as was January for *L. sonderii*. These summer months exhibited high mean values of photoperiod, global radiation, Photosynthetically Active Radiation (PAR, one measure per month), sea surface temperature (SST) and salinity.



**Figure 60.** Powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (PPLS-DA) score plots of the metabolome profiles observed in the four *Lobophora* species over a 13-months period. (a) *Lobophora rosacea*, (b) *Lobophora obscura*, (c) *Lobophora monticola* and (d) *Lobophora sonderii* (CER = Mean classification error rate with p-value after double cross model validation).

The correlation between environmental factors (monthly average) and the temporal metabolomic variability was then investigated for each species by PERMANOVA (9999 permutations): SST, photoperiod, global radiation, rainfall, salinity and PAR (Table 22). Salinity and SST were the main factors correlated with metabolomic variations in *L. rosacea* (pseudo- $F_{\text{salinity}} = 3.51$ , pseudo- $F_{\text{sst}} = 3.35$ ,  $p < 0.005$ ), *L. sonderii* (pseudo- $F_{\text{salinity}} = 5.91$ , pseudo- $F_{\text{sst}} = 3.68$ ,  $p < 0.0001$ ), *L. monticola* (pseudo- $F_{\text{salinity}} = 12.65$ , pseudo- $F_{\text{sst}} = 10.24$ ,  $p < 0.001$ ) and *L. obscura* (pseudo- $F_{\text{salinity}} = 4.37$ , pseudo- $F_{\text{sst}} = 4.42$ ,  $p < 0.001$ ). But other factors were also significantly correlated with *L. sonderii* metabolomic fingerprinting: photoperiod (pseudo- $F = 4.89$ ,  $p = 0.0001$ ), PAR (pseudo-

F = 3.5, p = 0.0005) and global radiation (pseudo-F = 2.55, p = 0.0063). All environmental factors significantly affected *L. monticola* metabolomic variability (Table 22, p < 0.001).

**Table 22.** Results of Permanova tests (9999 permutations) on environmental factors explaining the temporal metabolomic variability in the four *Lobophora* species (LR: *Lobophora rosacea*, LO: *Lobophora obscura*, LM: *Lobophora monticola* and LS: *Lobophora sonderii*).

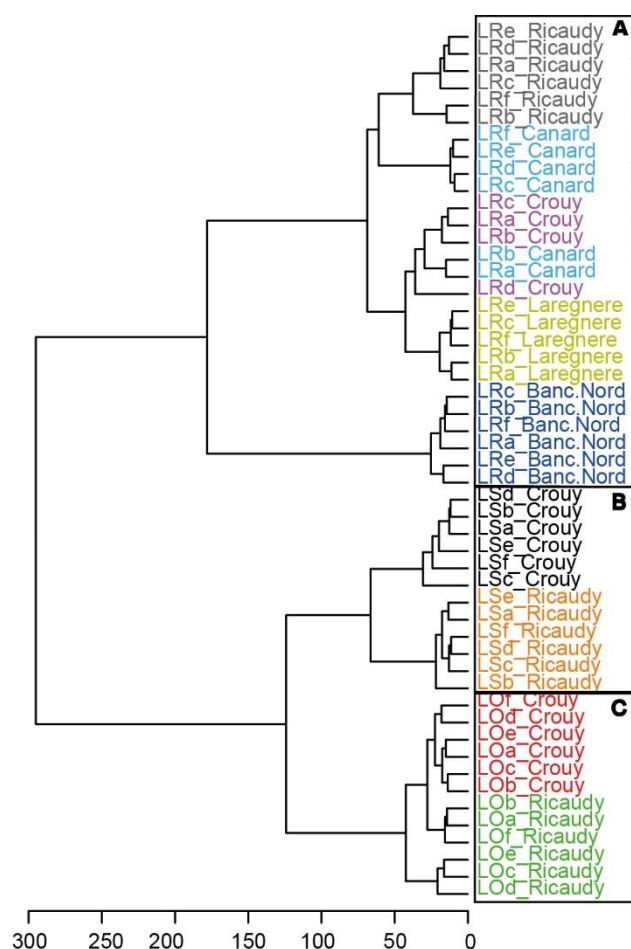
| Species | Response variable | F     | Pr(>F)     |
|---------|-------------------|-------|------------|
| LR      | photoperiod       | 1.80  | 0.0597     |
|         | PAR               | 2.31  | 0.0120 *   |
|         | global_radiation  | 1.12  | 0.3017     |
|         | rainfall          | 1.54  | 0.1103     |
|         | salinity          | 3.51  | 0.0013 **  |
|         | SST               | 3.35  | 0.0020 **  |
| LO      | photoperiod       | 2.61  | 0.0133 *   |
|         | PAR               | 1.50  | 0.1131     |
|         | global_radiation  | 1.70  | 0.0803     |
|         | rainfall          | 1.32  | 0.1871     |
|         | salinity          | 4.37  | 0.0004 *** |
|         | SST               | 4.42  | 0.0003 *** |
| LM      | photoperiod       | 5.24  | 0.0001 *** |
|         | PAR               | 4.44  | 0.0011 **  |
|         | global_radiation  | 5.8   | 0.0002 *** |
|         | rainfall          | 4.9   | 0.0003 *** |
|         | salinity          | 12.65 | 0.0001 *** |
|         | SST               | 10.24 | 0.0001 *** |
| LS      | photoperiod       | 4.89  | 0.0001 *** |
|         | PAR               | 3.50  | 0.0005 *** |
|         | global_radiation  | 2.55  | 0.0063 **  |
|         | rainfall          | 1.26  | 0.2234     |
|         | salinity          | 5.91  | 0.0001 *** |
|         | SST               | 3.68  | 0.0003 *** |

No clear chemomarkers driving differences between metabotypes of each month could be identified. Differentiation appeared to rely on several minor ions and no compound could be identified with the molecular network obtained from GNPS.

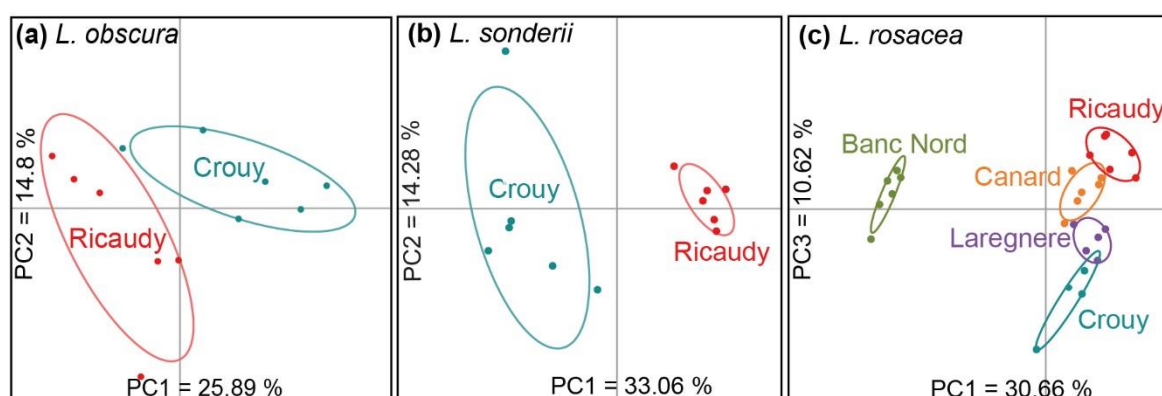
## 2.2. Spatial variation

Significant differences were observed between the metabolomes of the MeOH extracts of three species (*L. rosacea*, *L. sonderii* and *L. obscura*) and five sites studied (Ricaudy, Crouy, Canard islet, Larégnère and Banc Nord). The species explained most of the metabolic variability observed (PERMANOVA, pseudo-F= 19.34,  $p = 1e-04$ ) compared to sites (pseudo-F= 11.28,  $p = 1e-04$ ). Metabolites features were used for Hierarchical Clustering Analysis (HCA). The resulting dendrogram (Figure 61) separated three clusters corresponding to each species: (A) *L. rosacea*, (B) *L. sonderii* and (C) *L. obscura*, supporting a specificity of the metabolome for each species over the influence of the site they come from. No specific chemomarker could be annotated but the inter-specific metabolomic variability of these *Lobophora* species has been previously investigated by Gaubert *et al.* (submitted).

In a second step, metabolomic fingerprintings were analyzed for each species according to sites. For *L. obscura*, metabotypes from Ricaudy were compared to Crouy. The variance explained by the two first components on the principal component analysis (PCA, Figure 62a) was 40.69% and two significant distinct clusters were visible (PPLS-DA, CER = 0.054,  $p = 0.007$ ). Similarly, *L. sonderii* metabotype from Ricaudy was compared to Crouy. The variance was 47.34% (Figure 62b) and the metabolome was significantly different between specimens from Ricaudy and Crouy (PPLS-DA, CER = 0,  $p = 0.004$ ). Metabotypes of *L. rosacea* from Ricaudy, Crouy, Larégnère, Canard Islet and Banc Nord showed more evident separation along the 1-3 axes, with 41.29% of variance (Figure 62c). *Lobophora rosacea* presented significant different metabotypes at each site (PPLS-DA, CER= 0.056,  $p = 0.001$ , post-hoc  $p < 0.05$  for each pair, table S9).



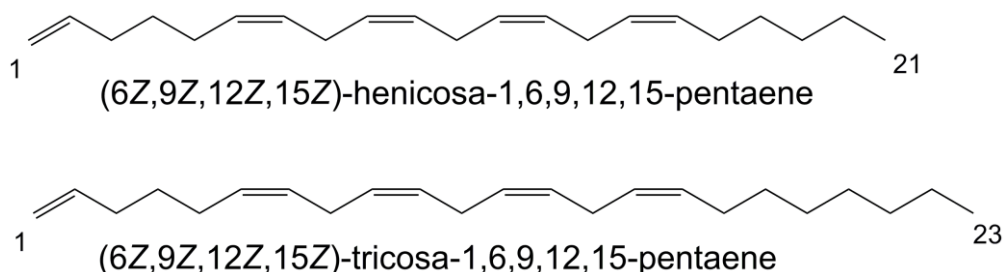
**Figure 61.** Hierarchical Clustering Analysis dendrogram of *Lobophora* species metabolome from different sites in the South-West lagoon of Nouméa, analyzed in LC-MS(qTOF) positive mode (distance measure: Euclidean, clustering algorithm: Ward).



**Figure 62.** Principal component analysis (PCA) of metabolomic fingerprints of (a) *Lobophora obscura*, (b) *Lobophora sonderii* and (c) *Lobophora rosacea* from different sites: Crouy, Ricudy, Larégnère, Canard islet and Banc Nord. Only two sites were sampled for *Lobophora sonderii* and *Lobophora obscura* because these species were not found at Larégnère, Banc Nord and Canard islet.

Correlation with the habitat (Table S10) did not show any clear pattern between species metabotypes and sites. The chemomarkers that explain the differences between sites were highlighted and appeared to be mainly minor intensity ions. However, we were able to annotate 9 chemomarkers after molecular network with GNPS, the use of Sirius and previous in-house chemical work on *Lobophora*.

We putatively found one saturated  $C_{17}$  and three  $C_{20}$ - $C_{22}$  polyunsaturated and oxygenated fatty acids derivatives, two  $C_{14}$ - $C_{16}$  unsaturated alcohols and three polyolefins with 16, 21 and 23 carbon atoms respectively (Table 23). The last two polyolefins ( $C_{21}H_{34}$  and  $C_{23}H_{38}$ ) contain five unsaturations and are major compounds (see Figure S15). Based on an analogy with already isolated lobophorenols and NMR data on a fraction containing these compounds (see Figure S16 for example), we propose the structures below (Figure 63). They could reasonably be assigned to (6Z,9Z,12Z,15Z)-henicosa-1,6,9,12,15-pentaene, as seen in *Fucus vesiculosus* (Hallsall & Hills 1972) and (6Z,9Z,12Z,15Z)-tricocosa-1,6,9,12,15-pentaene.



**Figure 63.** Proposed chemical structures of the two polyolefins identified among chemomarkers explaining the spatial metabolomic variability.

They were markers of Crouy in *L. obscura* and significantly over-expressed in Banc Nord compared to other sites in *L. rosacea* (see Figures S17-S18). Four compounds are common between *L. sonderii* and *L. rosacea* ( $C_{14}H_{28}O$ ,  $C_{16}H_{32}O$ ,  $C_{22}H_{38}O_3$  and  $C_{22}H_{40}O_3$ ) and in higher amount at Crouy in comparison to Ricaudy in *L. sonderii* and depressed in Banc Nord for *L. rosacea* (Figures S17-S18). Venn diagrams showed that no compound was specific to a site for *L. obscura* and *L. rosacea* while one compound was only detected at Ricaudy for *L. sonderii*: M888T571.

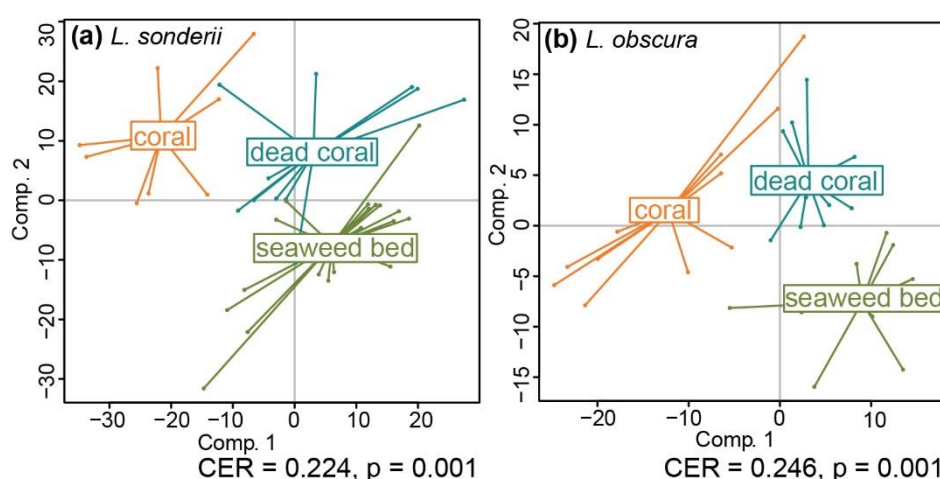
**Table 23.** Chemomarkers responsible for the difference according to sites in *Lobophora rosacea*, *Lobophora sonderii* and *Lobophora obscura* (ion [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>). The score MFG (molecular formulas generation) is the MFG overall match score (0-100 %) combining the MS and MS/MS scores.

| Ion <i>m/z</i>  | RT (s) | Molecular formula                              | Diff. ppm | Score MFG | species                                |
|-----------------|--------|------------------------------------------------|-----------|-----------|----------------------------------------|
| <b>230.2473</b> | 256    | C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O              | 3.26      | 93.86     | <i>L. rosacea</i> & <i>L. sonderii</i> |
| <b>242.2841</b> | 309    | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub>                | -0.15     | 89.47     | <i>L. rosacea</i>                      |
| <b>258.2797</b> | 310    | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O              | -1.72     | 96.4      | <i>L. rosacea</i> & <i>L. sonderii</i> |
| <b>288.2904</b> | 251    | C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> | -0.7      | 85.64     | <i>L. rosacea</i>                      |
| <b>304.3026</b> | 338    | C <sub>21</sub> H <sub>34</sub>                | -2.31     | 93.08     | <i>L. rosacea</i> & <i>L. obscura</i>  |
| <b>332.3332</b> | 377    | C <sub>23</sub> H <sub>38</sub>                | -5.52     | 86.36     | <i>L. rosacea</i> & <i>L. obscura</i>  |
| <b>344.3126</b> | 346    | C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub> | -3.73     | 89.04     | <i>L. rosacea</i>                      |
| <b>368.3165</b> | 338    | C <sub>22</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub> | -2.23     | 79.91     | <i>L. rosacea</i> & <i>L. sonderii</i> |
| <b>370.3319</b> | 362    | C <sub>22</sub> H <sub>40</sub> O <sub>3</sub> | 1.71      | 95.11     | <i>L. rosacea</i> & <i>L. sonderii</i> |

### 2.3. Transplantation experiments

Finally, the effect of a new habitat on *L. sonderii* and *L. obscura* metabolome was studied after cross-transplantations (sites at a distance of < 300 m). Control samples (in natural habitat) were collected at t0, t7 and t14 and transplants at t7 and t14. The habitat influenced significantly the metabolome of each *Lobophora* species (PERMANOVA, pseudo-F<sub>LO</sub> = 3.03, pseudo-F<sub>LS</sub> = 4.09, *p* < 0.05) and time also influenced *L. sonderii* metabolome (pseudo-F = 2.53, *p* = 0.005) with different metabolic fingerprints observed at each sampling time (PPLS-DA, CER = 0.108, *p* = 0.01, post-hoc *p* < 0.05 for each pair, Table S11). However, time is not correlated with metabolomic changes in *L. obscura* (*p* = 0.0627). For both species, different metabotypes were observed for each habitat (CER<sub>LS</sub> = 0.224, CER<sub>LO</sub> = 0.246, *p* = 0.001, post-hoc *p* < 0.05, Table S12, Figure 64). Two compounds are present in *L. sonderii* in its natural habitat (seaweed bed) and in all other habitats (for both *L. rosacea* and *L. sonderii*) only quantitative changes occurred (Venn diagram test). No clear chemomarker linked to the habitat (or substrate) could

be identified for *L. obscura*. In *L. sonderii*, four chemomarkers could be assigned to small alkenes and we also found the two previously highlighted polyolefins ( $C_{21}H_{34}$  and  $C_{23}H_{38}$ ). All these chemomarkers were under-expressed when algae were in contact with living corals (Table S13, Figure S19). The others chemomarkers did not match any known compounds.



**Figure 64.** Powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (PPLS-DA) score plots of the metabolome profiles observed in (a) *Lobophora sonderii* and (b) *Lobophora obscura* according to the habitat (living coral, dead coral or seaweed bed) during the 14 days cross-transplantations (CER= Mean classification error rate with p-value after double cross model validation).

### 3. Discussion

A monthly variation of the metabolic fingerprinting was noticed in the four *Lobophora* species inhabiting a tropical lagoon, with a higher variability during summer (December 2015-February) but no clear seasonal pattern neither annual cycle was evidenced. Physical parameters tend to be more variable during the wet season (austral summer) in the New Caledonian lagoon, with episodes of heavy rains and cyclones (Le Borgne *et al.* 2010). Moreover, end of 2015-beginning of 2016 was marked by El Niño phenomenon, that brings unusually warm water to the equatorial Pacific (Normile 2016). Summer months (December 2015-February) exhibited high values of photoperiod, global radiation, PAR, SST and salinity that can affect metabolites biosynthesis. While seasonal patterns of secondary metabolism was reported for

several temperate macroalgae like *Fucus vesiculosus* and *Gracilaria vermiculophylla* (Rickert *et al.* 2016; Surget *et al.* 2017) or other benthic organisms (Ivanisevic *et al.* 2011), this trend is not clear and little is known for tropical species. No clear pattern of seasonal variation was seen in the red alga *A. taxiformis* studied in the Mediterranean sea (Greff *et al.* 2017b) while no temporal metabolomic variation was highlighted in the tropical macroalga *Portieria hornemannii* (Payo *et al.* 2011). The metabolome of *L. obscura* exhibited less variability than the other species. *Lobophora sonderii*, commonly found in *Sargassum* beds, seems more exposed to biotic and abiotic factors. It presented a strong metabolomic variability over time, also supported by the transplantation experiments where metabolic changes appeared after seven days. The two other species, *L. rosacea* and *L. monticola* are closely associated with corals, and also showed a high global metabolomic variability during the 13-months study, as supported by the permutational pairwise tests between months. Environmental factors explained some of the metabolomic variance, mainly the SST and salinity. The importance of temperature on the production of defense compounds was highlighted in marine organisms like sponges (Reverter *et al.* 2016) and macroalgae (Oliveira *et al.* 2013). While we could not annotate any chemomarker and further investigate the metabolic pathways involved, recent works showed the importance of lipids metabolism in case of salt stress in two microalgae species (Takagi *et al.* 2006; Lu *et al.* 2012). Other abiotic factors also influence the metabolome, like the global radiation and PAR, which are linked to the light necessary for photosynthesis. Previous studies showed the importance of light in metabolites production in algae (Cronin & Hay 1996). A weak light irradiance could lead to a decrease in photosynthetic efficiency while a higher irradiance can cause oxidative damage. Global radiation and photoperiod being high during December 2015 and January, synthesis of UV-protectors may occur. Light and temperature explained most of the seasonal variation in surface metabolites of two *Fucus* species (Rickert *et al.* 2016). Recent work demonstrated the importance of polyamines synthesis in the red macroalga *Pyropia cinnamomea* in case of UV stress (Schweikert *et al.* 2014). Carotenoids and fatty acid metabolism can also be involved in light stress (Lamers *et al.* 2010). Some additional factors may also influence the metabolome in *Lobophora*. For example, the nutrient availability can impact the

metabolites production. But biotic factors, like herbivory pressure, the physiology or life-history stage (Vergés *et al.* 2008) are also known to affect metabolites production in macroalgae. Because life stages are not easily dissociable through *Lobophora* life-cycle, their influence on the metabolome cannot be assessed. Little is known about *Lobophora* life cycle in New Caledonia but this genus is supposed to be reproductive along the full year. No data are recorded regarding herbivory pressure at Ricaudy and Sainte Marie but both sites are not protected areas.

Despite a higher interspecific variability, significant spatial variations around the lagoon were also evidenced in *L. rosacea*, *L. sonderii* and *L. obscura*. At a broader geographical scale, a significant variation of the metabolome was also highlighted for the red alga *Asparagopsis taxiformis* from temperate *versus* tropical regions (Greff *et al.* 2017b). Previous works on spatial variations mainly targeted specific metabolites or their families, like phenolic compounds (Pereira *et al.* 2004; Le Lann *et al.* 2012). In our global metabolomic study, we spotted different metabotypes in sites distant from 2 to 11 km. In previous studies, metabolite variations were noticed in *Laminaria groenlandica* among sites as close as few meters in the northeastern Pacific (Van Alstyne *et al.* 1999). While the environment influences the metabolome, the consideration of the type of habitat did not allow us to define a clear link between metabotypes and natural habitats. Except for *L. sonderii*, all sites were characterized by *Acropora*-dominated coral assemblage. *Lobophora sonderii* was collected in a *Sargassum*-dominated seaweed bed at Ricaudy (fringing reef) and Crouy (intermediate reef), which both present similar characteristics. Metabolic variations may arise from different nutrient concentrations and herbivory pressure between sites. Nevertheless, Canard islet and Larégnère are marine protected areas so herbivory pressure must be higher compared to other sites, potentially leading to an increase in algal chemical defense as suggested in other works (Dell & Hay 2016). To further investigate this hypothesis, it would be interesting to test the bioactivity of MeOH fractions among sites. Micro-environments may also explain some metabolic differences between sites. As shown by PCAs' variance, it also

appeared that metabolomic changes induced by sites are of the same order than those induced over time (Figure 62 and S20).

Among the annotated chemomarkers responsible for the spatial discrimination, we putatively annotated some C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub> polyunsaturated and oxygenated fatty acid derivatives. Fatty acid derivatives present numerous essential roles in membrane structure fluidity, cell maintenance and signaling but are also involve in adaptation to diverse biotic and abiotic stresses (Dunn *et al.* 2012; Kumar *et al.* 2016a). We also found some polyolefins, notably a C<sub>21:5</sub> as previously found in *Fucus vesiculosus* and other brown algae (Halsall & Hills 1972; Youngblood & Blumer 1973) and a C<sub>23:5</sub> homologue. These polyolefins could derived from the decarboxylation of the corresponding C<sub>22</sub> and C<sub>24</sub> unsaturated fatty acids. While we do not know their function here, they are among the major compounds found in our studied fractions and their structures are in agreement with our knowledge of the chemistry of these *Lobophora* species and closely related to the recently described lobophorenols, nonadecaketides and linear methyl ketones (Gutiérrez-Cepeda *et al.* 2015; Vieira *et al.* 2016).

In transplant experiments, different metabotypes were observed when *L. sonderii* and *L. obscura* were placed in a new habitat, suggesting an effect of the nearby environment (including the substrate) on the algal metabolome. These metabolic responses seem specific as metabotypes were significantly different in all tested conditions, notably after contact with living or dead corals. This observation supposed additional biotic sources of metabolic variation (*e.g.* different coral associated microbiome) beyond the scope of this study, which was a first investigation of the sources of chemical variation in *Lobophora*. We could not separate the physico-chemical from the biotic components in this experiment. Among chemomarkers linked to transplant conditions, we found putative small olefins and the two polyolefins early mentioned, under-expressed when *L. sonderii* was transplanted on a living coral compared to its natural habitat. It would be interesting to further assess the bioactivity of algal metabolomes which may increase after contact with corals, as seen in *A. taxiformis* (Greff *et al.* 2017a). Corals metabolome may also be altered by the contact

with macroalgae (Quinn *et al.* 2016). Temporal metabolomic variation can even be noticed at a smaller time-scale (from 7 days), as shown in the cross-transplantations. However, we did not see any resilience to the pre-transplant metabolome so we cannot conclude if the pre-transplant metabolome could revert to the initial conditions after a longer time of transplantations or if the metabolome has just being adapted to new conditions.

This study revealed a high specific variability of *Lobophora* metabolome at the temporal and geographical scales across the New-Caledonian lagoon, in relation with physical factors and the nearby environment. It also suggests the involvement of other abiotic and biotic parameters to explain this variation. Multi-sources of metabolomic fluctuations had also been observed in several benthic organisms notably sponges and corals (Rohde *et al.* 2012). The algal metabolome had adapted and evolved to adjust to a dynamic environment. Indeed, macroalgae face threats from a diverse range of organisms (*e.g.* pathogenic bacteria, epiphytes, herbivores) and are exposed to various stresses and their metabolome must then constantly adapt to new conditions. However, studies conducted in natural habitats do not allow control of all these parameters. Furthermore, biologically active compounds found in macroalgae may also be synthesized by their associated microbiome, as previously suggested for the lobophorolide in *L. variegata* (Kubanek *et al.* 2003) and demonstrated in sponges and bryozoans (Mouchka *et al.* 2010). Disentangling the metabolome from the host and its associated microbiome is challenging. The lack of specific metabolomic databases for marine organisms including macroalgae raises another issue (Kumar *et al.* 2016b): metabolites annotation and identification remain the biggest challenge in global metabolomics (Allard *et al.* 2017), notably for non-model species. This difficulty has been illustrated through the present work where only few chemomarkers could be identified, despite the discrimination of metabotypes according to time and space.

It also appeared that discrimination between groups is mainly driven by minor intensity ions, a problem previously mentioned in other works on macroalgae (Greff *et al.* 2017b). A total of 23 bioactive pure compounds were described in *Lobophora*

(Vieira *et al.* 2015a), included seven recently identified nonadecaketides (Gutiérrez-Cepeda *et al.* 2015) and three lobophorenols (*L. rosacea* (Vieira *et al.* 2016)). These major compounds were not detected as chemomarkers in our LC-MS conditions. Related C21 and C23 polyolefins have however been identified as major components. Interestingly no terpene derivatives were identified in the metabolome of the four studied species of *Lobophora*. This result came as a surprise considering that *Lobophora* is a genus belonging to the Dictyotales, known usually as a producer of this family of natural products. This observation could lead to interesting chemotaxonomic considerations for this particular group of brown macroalgae and the search for terpene synthases in a large set of Dictyotales.

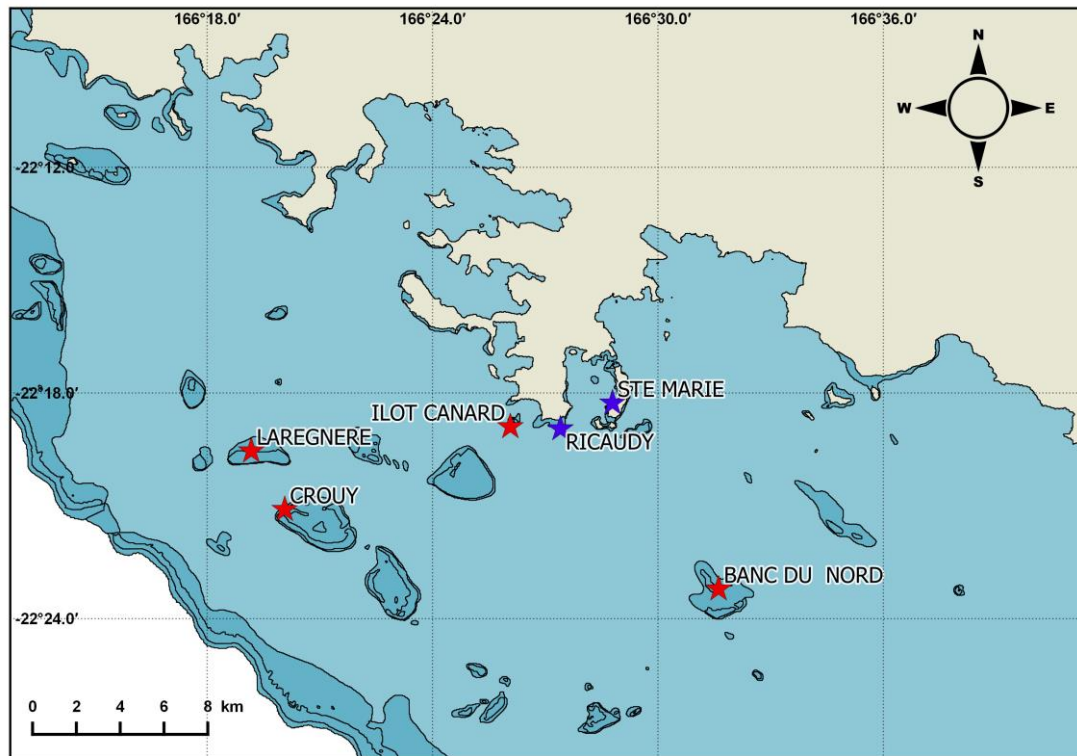
Metabolomics helped us to gain insight into the impact of the environment on the metabolomic fingerprints of marine organisms, and more experimental data are needed to better understand this intrinsic relationship. A global understanding of the main sources of metabolome variations is important in the context of climate change faced by marine ecosystems. Sea surface temperature is predicted to increase by 0.3 °C-4.8 °C by the end of the 21st century and the pH to decrease by 0.06-0.32 units (RCP models, (Contribution of Working Groups I 2014)). Understanding the natural parameters influencing the metabolome in macroalgae will help in a predictive assessment of ecological success of some species fate in a changing ocean. Due to their ecological relevance, changes in the production of defensive metabolites in macroalgae will indeed have profound impacts on biological interactions with marine organisms and thus on the global ecosystems.

## 4. Methods

### 4.1. Sampling

*Lobophora* species were collected by SCUBA in ziplock plastic bags, immediately soaked into ice and frozen at -20 °C until chemical extraction. For the temporal study, six specimens (replicates) of *L. rosacea*, *L. sonderii*, *L. obscura* were collected monthly from December 2015 to December 2016 at Ricaudy (22°18.956'S; 166°27.405'E, Nouméa, New Caledonia) and at Sainte-Marie (22°18.269'S; 166°28.791'E, Nouméa, New

Caledonia) for *L. monticola*. A total of 300 samples were collected for this temporal study (Table S14).



**Figure 65.** Map of the collected sites in the South-West lagoon of Nouméa, New-Caledonia (blue stars: sites used for the temporal study, red stars: sites collected for the spatial study).

For the spatial study, a total of 51 samples of *L. rosacea*, *L. sonderii* and *L. obscura* were collected in austral summer 2015-2016 (December 2015, January and March 2016) at different locations into the lagoon: Ricaudy (22°18.956'S; 166°27.405'E), Canard islet (22°18.904'S; 166°26.147'E), Crouy (22°21.600'S; 166°20.402'E), Larégnère (22°19.3264'S; 166°19.1056'E) or Banc Nord (22°23.1278'S; 166°31.369'E) (Figure 65, Table S14). *Lobophora monticola* was not included because it is only found at Sainte Marie in the South-West lagoon of Nouméa. Habitats characterization was done for each site according to (Andrefouet 2014).

## 4.2. Transplantations

To explore the influence of the environment on the metabolome, cross-transplantations from the natural habitat to new habitats were realized at Ricaudy. Experiments were performed on *L. sonderii* and *L. obscura* in summer 2016 (February-March) as presented in Table 24.

**Table 24.** Experimental framework of *Lobophora* transplantation experiments.

| species            | natural habitat                     | substrate            | transplantations (x2) |             |
|--------------------|-------------------------------------|----------------------|-----------------------|-------------|
| <i>L. sonderii</i> | seaweeds bed                        | rock slab            | living coral          | dead coral  |
| <i>L. obscura</i>  | dead coral, coral<br>rubbles, rocks | dead coral,<br>rocks | living coral          | seaweed bed |

Eighteen fronds of each species were collected by SCUBA and directly fixed to their transplantation support with tulle strips. For the “dead coral” and “seaweed bed” transplants, supports were created with PVC slabs (297 x 420 mm), holding up 18 dead coral fragments fixed with Epoxy resin (Figure S21). Two slabs were fixed with concrete reinforcing bars on the seaweed bed sandy floor (22°18.956’S; 166°27.405’E) or near the coral reef flat (22°18.945’S; 166°27.403’E) at Ricaudy. Algal fronds were then hooked up to the dead coral fragments. Some leaving coral colonies were used as support for the “leaving coral” transplant at Ricaudy (Table 24). Six replicates (when possible) of each transplantation condition were picked up at T7 and T14, and controls at T0, T7 and T14 in natural habitat, placed in ziplock plastic bags, immediately soaked into ice and frozen at -20 °C until chemical extraction (80 samples, Table S14).

### 4.3. Sample preparation

Prior to extraction, the 399 samples were freeze-dried and ground with liquid nitrogen. A mass of 250 mg was extracted 3 times with 5 mL of MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) in an ultrasonic bath (5 min). The filtrates (paper filter, 4-12 µm, Macherey-Nagel) were concentrated under *vacuum* after adsorption to C18 silica powder (Polygoprep® Macherey-Nagel). The extracts were then fractioned by Solid Phase Extraction (Strata C18-E, 500 mg/6 mL, Phenomenex®) after cartridges cleaning (6 mL MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1) and conditioning (6 mL H<sub>2</sub>O), *via* three successive elutions: 6 mL of H<sub>2</sub>O, 6 mL of MeOH and 6 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A volume of 1 mL of the MeOH fraction was then filtered (PTFE, 0.20 µm, Phenomenex®), dried and later used for UHPLC-HRMS (QToF) analyses.

## 4.4. Metabolomic analyses

### 4.4.1. UHPLC-HRMS (QToF)

LC-MS analyses were performed on a UHPLC-QToF (6540 UHD Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight, Agilent Technologies) in Dual Agilent Jet Stream Electrospray Ionization mode. Mass spectra were acquired in positive mode, on an Acquity UPLC® BEH® Phenyl column (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 100 mm, Waters®) for the spatio-temporal samples and an Acquity UPLC® HSS T3 column (1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm x 30 mm, Waters®) for the transplants samples. The mobile phase was: H<sub>2</sub>O + 0.1% formic acid + 10 mM ammonium formate (A) and acetonitrile/ H<sub>2</sub>O (95:5) + 0.1% formic acid + 10 mM ammonium formate (B). Injection volume was set to 3  $\mu\text{L}$ , elution rate to 0.4 mL.min<sup>-1</sup> (5  $\mu\text{L}$  and 0.5 mL.min<sup>-1</sup> for the transplants samples), and column temperature maintained at 40 °C. Elution gradient was programed as follows: 40% B during 2 min, linear increased of B up to 100 % from 2 to 8 min, 100% B during 4 min, return to initial condition from 12 to 14 min, and 3 min of post-run for column equilibration, with a total runtime of 17 min.

MS parameters were: nebulizer gas N<sub>2</sub> at 30 psig, gas temperature: 300 °C, drying gas N<sub>2</sub> at 7 mL.min<sup>-1</sup>, TOF spectra acquisition from  $m/z$  100 to 1600, capillary voltage: 3500 V. MS<sup>2</sup> were acquired in the same conditions (frag = 175.0V). For each study (spatial, temporal or transplantations), a control quality (QC) sample was prepared with mixing 25  $\mu\text{L}$  of each sample. QC samples allow checking for MS shift over time and ensure data normalization. Each study started with blanks injections, followed by 10 QC injections, then the samples and a QC between every five samples injected randomly along the run.

### 4.4.2. Data treatment and statistical analyses

LC-MS raw data files were converted to mzXML files with MSconvert using Python (version 2.7.11). mzXML files were then processed using the package XCMS for R software (R version 3.3.2, XCMS version 1.50.1). Optimized parameters for XCMS were used as follows: peak picking (method = "centwave", peakwidth = c(2,20), ppm = 15, mzdiff = 0.05, prefilter = c(0,0)), retention time correction (method = "obiwarp"), matching peaks across samples (bw = 30, mzwid = 0.015, minfrac = 0.3) and filling in

missing peaks. A matrix of compounds with peak intensity,  $m/z$  value and retention time was generated. The latter was filtered according to blanks and QC to remove technical variability using in-house R scripts (1-Filtering the matrix according to peaks present in blanks relative to pools (signal/noise ratio > 10), 2-filtering the matrix according to peaks coefficient of variation (CV) calculated on pool (CV < 20 %) and 3-filtering the matrix according to autocorrelation between peaks). Data were normalized by log-transformation prior statistical analyses. To identify which significant factors were linked to the metabolites diversity, we used Permutational Multivariate Analysis of Variance using distance matrices (PERMANOVA, 9999 permutations, vegan package for R). Principal component analysis (PCA) was used to visualize the metabolome variation according to sites (ade4 package for R). Powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (PPLS-DA) were used to find the maximum covariance between our data set and their class membership. Permutational tests based on cross model validation (MVA.test and pairwise.MVA.test) were applied to test differences between groups (RVAideMemoire package). In a second time, correlation circles were drawn to identify discriminating compounds (RVAideMemoire package). Venn diagrams were constructed with the Vennerable package for R. Hierarchical Cluster Analysis (HCA) was performed with MetaboAnalyst 3.0 (distance measure: Euclidean, clustering algorithm: Ward). Molecular network based on MS<sup>2</sup> spectra were constructed with GNPS (Wang *et al.* 2016) and visualized under Cytoscape 3.5.0 (Shannon *et al.* 2003). Metlin (<https://metlin.scripps.edu/>), SIRIUS 4.0. (Böcker & Dührkop 2016) and in-house work were used for putative annotation.

#### 4.4.3. Physico-chemical parameters

Some parameters were recorded during the temporal sampling to correlate the chemical variation to environmental factors. Photoperiod was calculated for Nouméa thanks to the day length calendar from December 2015 to December 2016. Monthly means sea surface temperature (SST) and salinity were obtained from the GOPS observatory at Canard islet (22°18.439'N, 166°26.198'E) and Maitre islet (22°20.299'N,

166°24.109'E) stations respectively (measures each 1 min and 15 min respectively) (<http://www.observatoire-gops.org>). Photosynthetically Active Radiation (PAR) was obtained from CTD profiles at Moise station (22°14.600'N; 166°18.569'E, Nouméa, New Caledonia, one measure per month). Monthly means global radiation and rainfall were acquired at Meteo France Nouvelle-Calédonie at Nouméa station 98818001 (Table S15).

~~~~~

Data availability. Metabolomics data have been deposited to the EMBL-EBI MetaboLights database (DOI: 10.1093/nar/gks1004. PubMed PMID: 23109552) with the identifier MTBLS707.

The complete dataset can be accessed

here <https://www.ebi.ac.uk/metabolights/MTBLS707>

Acknowledgments: The PhD of J. Gaubert is supported through a scholarship from Sorbonne University, Paris, France. Part of this project is carried out with the support of the Marine Institute (Grant-Aid Agreement No. PBA/MB/16/01) and is funded under the Marine Research Programme by the Irish Government. S. Greff is acknowledged for his help in data analysis and his precious comments. Thanks to the GOPS for salinity and SST data. We are grateful to G. Culioli and M. Zubia for their fruitful comments.

Contributions: J.G., O.T. and C.P. designed the experiments. J.G. performed algal collections under the supervision of C.P. and carried out extractions and fractionations. J.G. and H.S. analyzed metabolomic fingerprints under the supervision of O.T. and J.G. performed statistical analyses. J.G. drafted the manuscript with input from C.V., C.P. and O.T.

Supplementary information

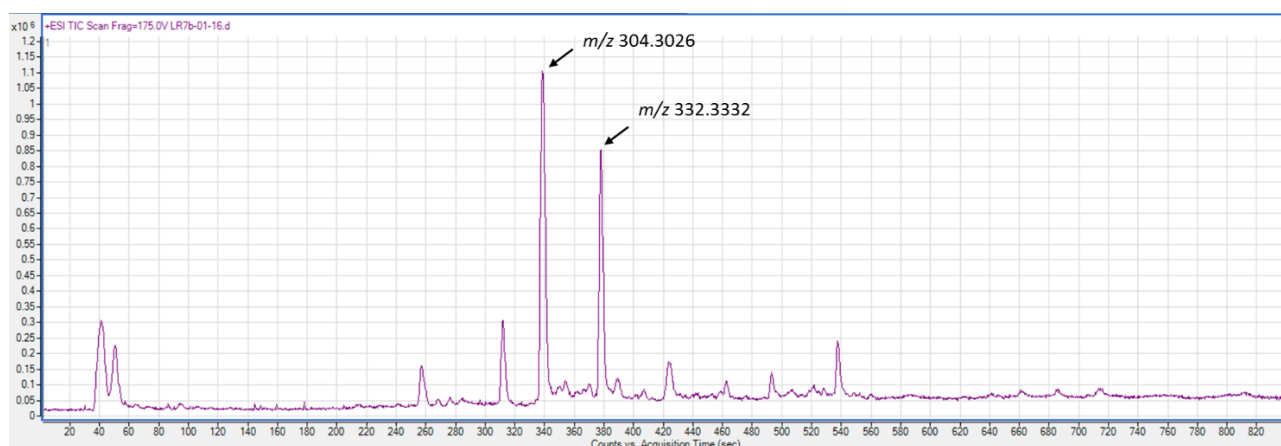


Figure S15. Example of chromatogram obtained by LC-MS showing the two main compounds annotated as polyolefins (m/z 304.3026 $[M+NH_4]^+$, $C_{21}H_{34}$ and m/z 332.3332 $[M+NH_4]^+$, $C_{23}H_{38}$).

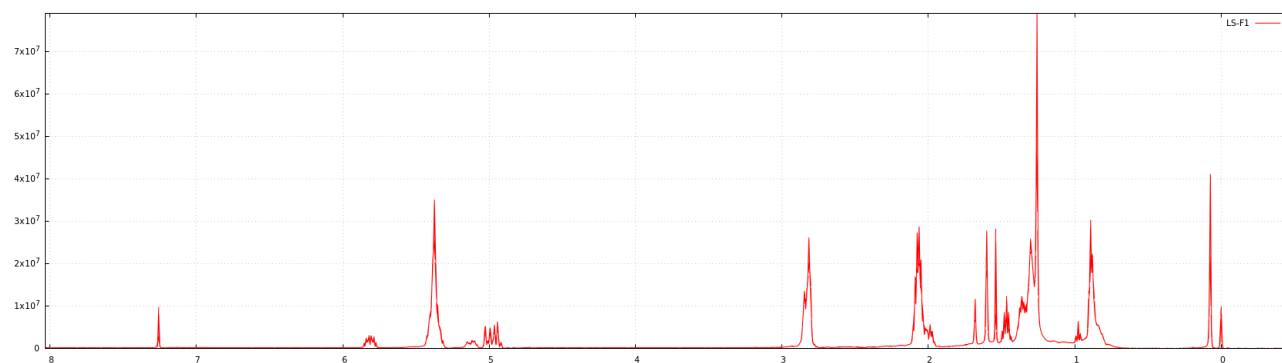


Figure S16. Example of in-house ¹H-NMR spectra (500 Mz) obtained on a fraction of *Lobophora sonderii*.

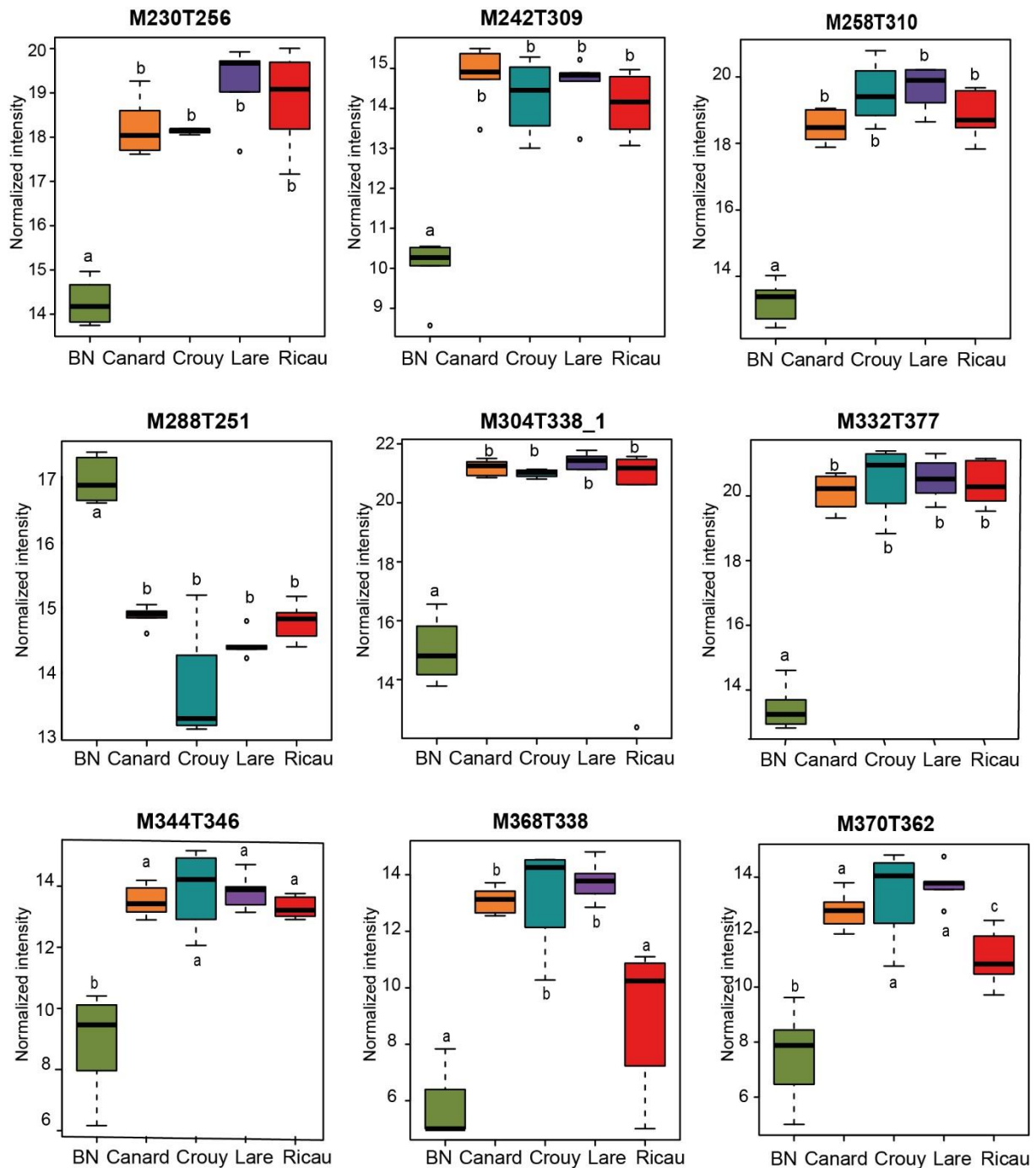
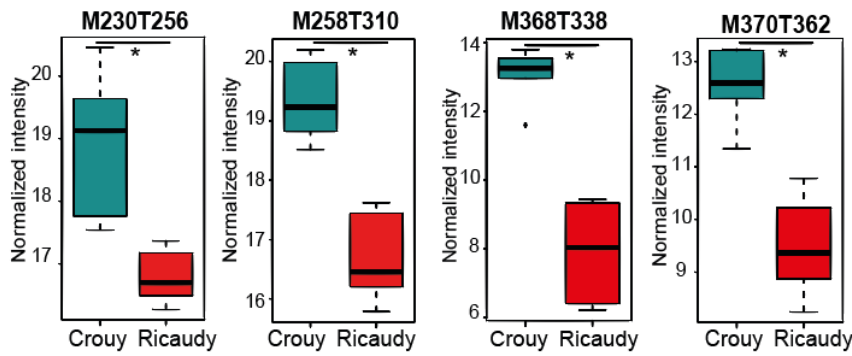


Figure S17. Box plots of the chemomarkers annotated in *Lobophora rosacea* responsible for metabolomic differences according to sites. Ion intensities of chemomarkers are expressed as mean normalized intensities $\pm$ SD (log-transformed data, $n=6$ for Banc Nord (BN), Canard and Ricaudy (Ricau), $n=5$ for Larègnère (Lare) and $n=4$ for Crouy). Statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis (KW) followed by post-hoc Conover's test. Letters indicate distinct groupings based on post-hoc pairwise comparisons among groups for each chemomarker ($p < 0.05$).

(a) *Lobophora sonderii*



(b) *Lobophora obscura*

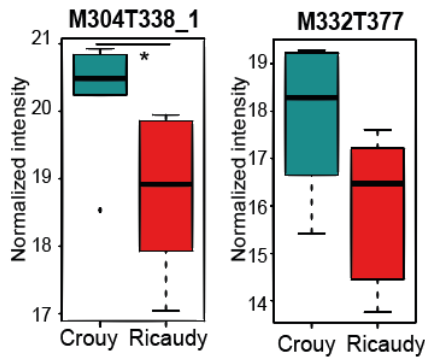


Figure S18. Box plots of the chemomarkers annotated in (a) *Lobophora sonderii* and (b) *Lobophora obscura* responsible for the discrimination according to sites. Ion intensities of chemomarkers are expressed as mean normalized intensities $\pm$ SD (log-transformed data, n= 6). Differences between ion intensities at Crouy vs Ricaudy were tested with Mann-Whitney tests. *: p < 0.01.

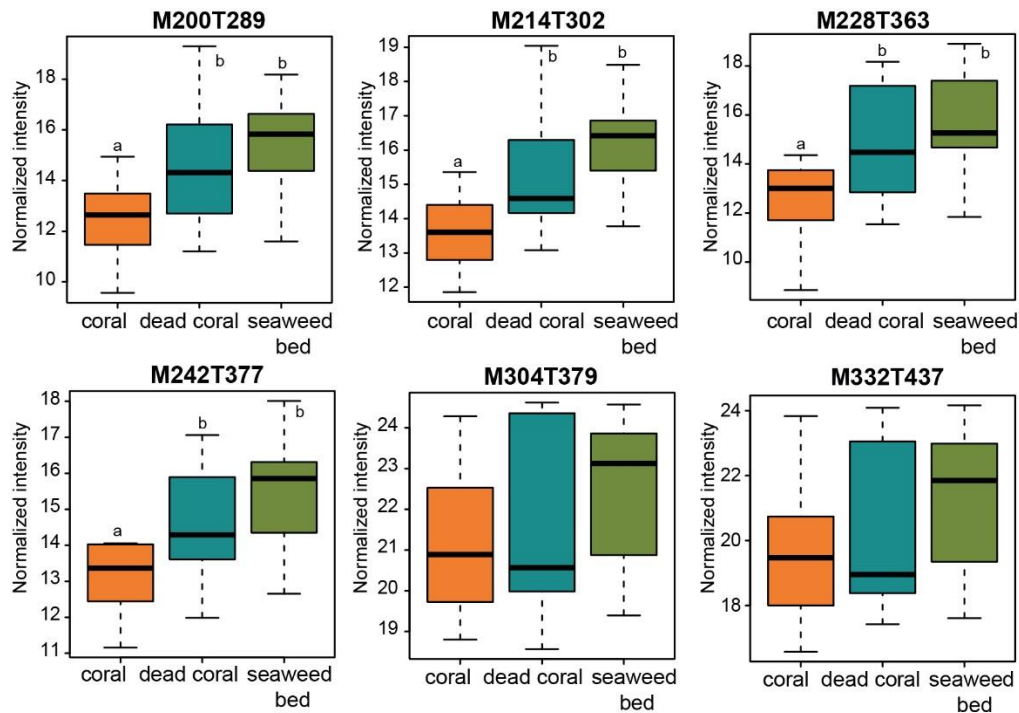


Figure S19. Box plots of the chemomarkers annotated in *Lobophora sonderii* responsible for metabolomic differences according to the substrate of transplantation. Ion intensities of chemomarkers are expressed as mean normalized intensities $\pm$ SD (log-transformed data, n= 8 for coral, n= 11 for dead coral, n= 23 for seaweed bed). Statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis (KW) followed by post-hoc Conover's test. Letters indicate distinct groupings based on post-hoc pairwise comparisons among groups for each chemomarker (p < 0.05).

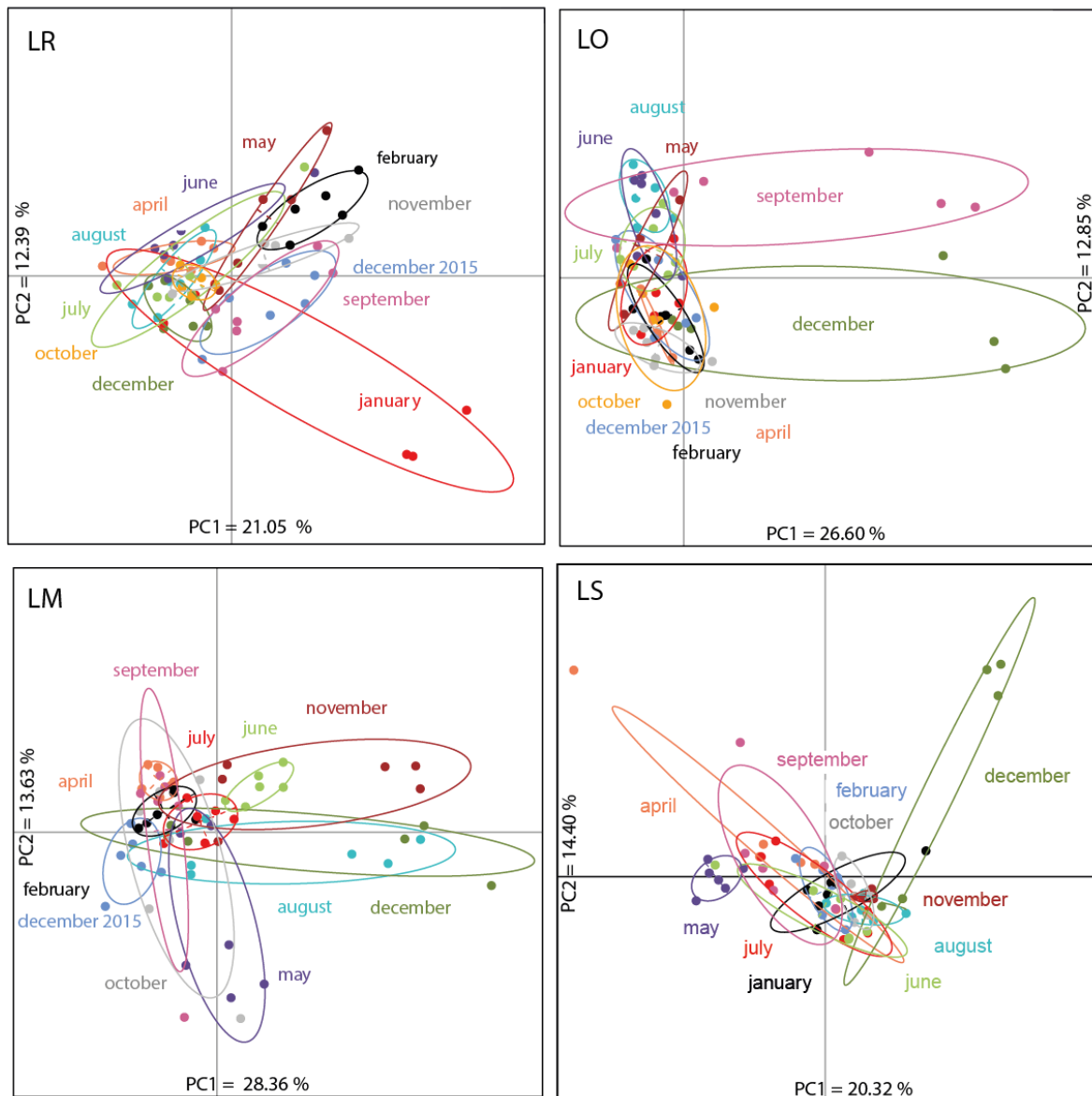


Figure S20. PCA score plots of methanolic fractions of *Lobophora rosacea* (LR), *Lobophora obscura* (LO), *Lobophora monticola* (LM) and *Lobophora sonderii* (LS) according to months.

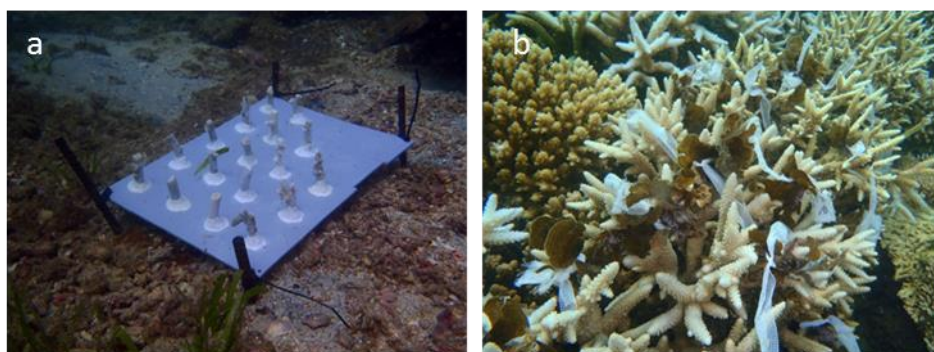


Figure S21. (a) PVC slab holding 18 dead coral fragments, (b) coral colony with fronds of *Lobophora sonderii* fixed with tulle strips (© J. Gaubert.)

Table S5. Results of the permutational pairwise test for metabotype differentiation according to months in *Lobophora rosacea* (999 permutations, P value adjustment method: fdr). None statistically significant results are in bold ($p > 0.05$).

	april	august	december	dec_2015	february	january	july	june	may	November	october
august	0.0078	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
december	0.0087	0.0078	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dec_2015	0.0078	0.0078	0.0090	-	-	-	-	-	-	-	-
february	0.0078	0.0078	0.0078	0.0087	-	-	-	-	-	-	-
january	0.0078	0.0078	0.0078	0.0159	0.0078	-	-	-	-	-	-
july	0.0230	0.0090	0.0078	0.0153	0.0184	0.0090	-	-	-	-	-
june	0.0179	0.0078	0.0078	0.0078	0.0142	0.0078	0.0454	-	-	-	-
may	0.0078	0.0087	0.0078	0.0078	0.0078	0.0078	0.0184	0.0142	-	-	-
november	0.0078	0.0144	0.0144	0.0078	0.0078	0.0078	0.0850	0.0094	0.0094	-	-
october	0.0090	0.0078	0.0078	0.0159	0.0078	0.0094	0.0192	0.0144	0.0087	0.0467	-
september	0.0078	0.0078	0.0078	0.0094	0.0078	0.0094	0.0144	0.0078	0.0078	0.0090	0.0090

Table S6. Results of the permutational pairwise test for metabotype differentiation according to months in *Lobophora monticola* (999 permutations, P value adjustment method: fdr). None statistically significant results are in bold ($p > 0.05$).

	april	august	december	december_2015	february	july	june	may	november	october
august	0.0086	-	-	-	-	-	-	-	-	-
december	0.0086	0.0094	-	-	-	-	-	-	-	-
december_2015	0.0094	0.0131	0.0086	-	-	-	-	-	-	-
february	0.0086	0.0094	0.0086	0.0086	-	-	-	-	-	-
july	0.0086	0.0137	0.0086	0.0162	0.0086	-	-	-	-	-
june	0.0086	0.0254	0.0138	0.0124	0.0086	0.1190	-	-	-	-
may	0.0122	0.0137	0.0086	0.0086	0.0086	0.0086	0.0131	-	-	-
november	0.0086	0.0124	0.0086	0.0157	0.0086	0.0124	0.0162	0.0086	-	-
october	0.0086	0.0138	0.0086	0.0086	0.0086	0.0086	0.0138	0.0086	0.0124	-
september	0.0086	0.1190	0.0086	0.0086	0.0086	0.0405	0.0138	0.0086	0.0086	0.0086

Table S7. Results of the permutational pairwise test for metabotype differentiation according to months in *Lobophora sonderii* (999 permutations, P value adjustment method: fdr). None statistically significant results are in bold ($p > 0.05$).

	april	august	december	february	january	july	june	may	november	october
august	0.0183	-	-	-	-	-	-	-	-	-
december	0.0092	0.0148	-	-	-	-	-	-	-	-
february	0.0183	0.0092	0.0092	-	-	-	-	-	-	-
january	0.0092	0.0092	0.0187	0.0097	-	-	-	-	-	-
july	0.0092	0.0092	0.0092	0.0092	0.0092	-	-	-	-	-
june	0.0092	0.0148	0.0137	0.0171	0.0166	0.1240	-	-	-	-
may	0.0092	0.0092	0.0092	0.0092	0.0092	0.0097	0.0201	-	-	-
november	0.0137	0.0652	0.0092	0.0092	0.0187	0.0092	0.0145	0.0092	-	-
october	0.0092	0.0145	0.0092	0.0097	0.0157	0.0097	0.0092	0.0092	0.0092	-
september	0.0218	0.0092	0.0092	0.0092	0.0092	0.0148	0.0194	0.0092	0.0183	0.0171

Table S8. Results of the permutational pairwise test for metabotype differentiation according to months in *Lobophora obscura* (999 permutations, P value adjustment method: fdr). None statistically significant results are in bold ($p > 0.05$).

	april	august	december	december_2015	february	january	july	june	may	november	october
august	0.016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
december	0.016	0.011	-	-	-	-	-	-	-	-	-
december_2015	0.026	0.011	0.011	-	-	-	-	-	-	-	-
february	0.318	0.018	0.011	0.032	-	-	-	-	-	-	-
january	0.041	0.011	0.018	0.182	0.443	-	-	-	-	-	-
july	0.018	0.020	0.016	0.076	0.021	0.136	-	-	-	-	-
june	0.025	0.022	0.018	0.021	0.018	0.059	0.063	-	-	-	-
may	0.071	0.223	0.033	0.093	0.094	0.434	0.441	0.690	-	-	-
november	0.011	0.011	0.011	0.011	0.016	0.021	0.018	0.020	0.224	-	-
october	0.011	0.021	0.018	0.011	0.020	0.042	0.020	0.076	0.442	0.022	-

Table S9. Post-hoc permutational pairwise test based on crossed model validation for *Lobophora rosacea* metabotype differentiation according to sites (999 permutations, p-value adjustment method: fdr). Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold.

	Banc Nord	Canard	Crouy	Larégnère
Canard	0.0043	-	-	-
Crouy	0.0133	0.0043	-	-
Larégnère	0.004	0.004	0.014	-
Ricaudy	0.004	0.004	0.0112	0.004

Table S10a. Characterization of the type of habitat for *Lobophora rosacea* and *Lobophora obscura*.

Sites	Ricaudy	Crouy	Larégnère	Banc Nord	Canard islet
Type of reef	Fringing reef	Intermediate reef	Islet reef	Bank	Islet reef
geomorphology	Reef flat	Reef flat	Reef flat	Intertidal patch reef flat	Shallow upper reef slope
substrate	Rock, debris, dead corals, Corallinaceae	Rock, slab	Rock, sand and dead corals	Rock, sand	Rock, debris of dead corals, sand
Benthic dominance	Coral assembly dominated by fingers forms of <i>Acropora spp</i> and <i>Montipora spp.</i>	Coral assembly dominated by <i>Acropora spp</i> (fingers and plates forms) and soft corals <i>Sarcophyton spp</i>	Coral assembly dominated by fingers forms of <i>Acropora spp</i>	Coral assembly dominated by branching forms of <i>Acropora spp</i>	Coral assembly dominated by branching forms of <i>Acropora spp</i>
Rugosity	Weak	Medium	Medium	Strong	Medium
depth	3.8 m	1.9 m	1.5 m	5.8 m	4.8 m

Table S10b. Characterization of the type of habitat for *Lobophora sonderii*.

<i>Sites</i>	Ricaudy	Crouy
<i>Type of reef</i>	Fringing reef	Intermediate reef
<i>Geomorphology</i>	Terrasse	Terrasse
<i>Substrate</i>	Slab, sand, debris	Slab, sand, debris
<i>Benthic dominance</i>	Macroalgae dominated by <i>Sargassum spp.</i>	Macroalgae dominated by <i>Sargassum spp.</i>
<i>Rugosity</i>	Weak	Weak
<i>depth</i>	4.6 m	1.9 m

Table S11. Post-hoc permutational pairwise test based on crossed model validation for *Lobophora sonderii* metabotypes differentiation according to the time of transplantation (999 permutations, p-value adjustment method: fdr). Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold.

<i>Lobophora sonderii</i>			
	t0	t14	t14bis
t14	0.014	-	-
t14bis	0.013	0.003	-
t7	0.003	0.003	0.003

Table S12. Post-hoc permutational pairwise test based on crossed model validation for *Lobophora sonderii* and *Lobophora obscura* metabotypes differentiation according to the habitat: seaweed bed, leaving coral or dead coral (999 permutations, p-value adjustment method: fdr). Significant p-values ($p < 0.05$) are in bold.

<i>Lobophora obscura</i>			<i>Lobophora sonderii</i>		
	seaweed bed	leaving coral		seaweed bed	leaving coral
leaving coral	0.044	-	leaving coral	0.0015	-
dead coral	0.021	0.003	dead coral	0.0015	0.0200

Table S13. Ions responsible for the difference according to the habitat in *Lobophora sonderii* during the 14 days cross-transplantations. The score MFG (molecular formulas generation) is the MFG overall match score (0-100 %) combining the MS and MS/MS scores.

<i>m/z</i>	RT (s)	Ion	molecular formula	Diff. ppm	Score MFG
200.2363	289	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₃ H ₂₆	5.88	89.54
214.2520	302	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₄ H ₂₈	5.13	93.79
228.2669	363	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₅ H ₃₀	7.94	75.8
242.2822	377	[M+NH ₄] ⁺	C ₁₆ H ₃₂	8.47	73.36
304.3006	379	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₁ H ₃₄	-2.31	93.08
332.3328	437	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₃ H ₃₈	-20.37	63.35

Table S14. Sampling of *Lobophora* species for the study of metabolomic variations according to space, time and after the transplantation experiments.

Study / species		<i>L. rosacea</i>	<i>L. sonderii</i>	<i>L. obscura</i>	<i>L. monticola</i>
spatial	Larégnère	5	-	-	-
	Crouy	4	6	6	-
	Canard	6	-	-	-
	Banc Nord	6	-	-	-
	Ricaudy	6	6	6	
temporal	13 months of collection	69	66	67	66
transplantations	summer	-	42	38	-
TOTAL of samples					399

Table S15. Monthly means of Sea Surface Temperature (SST, °C), photoperiod (hours. day⁻¹), Photosynthetic Active Radiation (PAR, mol.m⁻².day⁻¹), global radiation (Joules.cm⁻²), rainfall (mm. day⁻¹) and salinity (psu) recorded from December 2015 to December 2016 in the South-West lagoon of Nouméa, New-Caledonia.

months	SST	photoperiod	PAR	Global radiation	rainfall	salinity
December 2015	24.7	13.07	540.08	2652	0.71	36.08
January	25.6	13.45	81.83	2533	1.48	36.08
February	27.5	13.32	155.13	2659	2.03	35.95
April	27.4	12.09	206.39	1708	8.07	35.46
May	26.5	11.34	110.1	1825	1.21	35.55
June	25.9	11.02	127.8	1468	6.3	35.66
July	23.6	10.78	71.76	1080	4.11	35.85
August	23.2	10.96	58.86	1331	0.82	36.09
September	22.6	11.37	130.89	1518	3.05	36.13
October	22.8	11.98	193.45	2174	0.17	36.08
November	24.4	12.6	354.15	2385	0.86	35.72
December	25.4	13.08	256.45	1954	5.8	35.31

II- Influence de l'habitat et du substrat sur le métabolome

1. Contexte

L'étude du métabolome à l'échelle inter-spécifique (cf. chapitre 4) a montré des différences significatives entre les empreintes métabolomiques de *L. rosacea*, *L. sonderii*, *L. monticola* et *L. obscura*. Une variation du métabolome à l'échelle spatiale sur plusieurs sites au sein du lagon a également été mise en évidence pour les trois espèces considérées : *L. rosacea*, *L. sonderii* et *L. obscura*. Bien qu'aucun lien clair n'ait pu être mis en évidence entre la variation du métabolome et les caractéristiques de l'habitat, des métabotypes significativement différents pour chacun des sites ont été observés, avec une dominance du facteur espèce sur ces variations spatiales.

Afin de compléter cette étude spatiale de la variation du métabolome de *Lobophora*, des transplantations croisées entre les différents habitats naturels des algues ont été entrepris sur trois espèces (*L. sonderii*, *L. obscura* et *L. monticola*) dans le lagon Sud-Ouest de Nouméa, en été et hiver australs. L'effet de l'habitat sur les profils métabolomiques des espèces a été testé en transplantant des individus depuis leur habitat naturel vers de nouveaux habitats et en suivant l'évolution de leur métabolome sur une période de 14 jours. Le terme d'habitat englobe le substrat d'accrochage mais également les interactions biotiques (ex : différentes communautés bactériennes), ainsi que les facteurs physico-chimiques et biotiques indissociables dans notre étude. Les analyses chimiques ont ensuite été réalisées par UHPLC-QToF selon la même méthode mise en place dans les études précédentes et détaillées au chapitre 3.

2. Matériel & méthodes

2.1. Les expériences de transplantations croisées

Des expériences de transplantations croisées ont été menées sur trois espèces de *Lobophora*: *L. sonderii*, *L. obscura* et *L. monticola* choisies en raison de la diversité des habitats et des substrats d'accrochage naturels. Pour des raisons techniques, *L. rosacea* n'a pas été considérée pour cette expérience. En effet, les frondes de cette espèce étant de petites tailles et fines, leur fixation et le maintien sur les supports se sont avérés difficiles ; par ailleurs la matière sèche de chaque fronde n'était pas suffisante pour les analyses chimiques. Les transplantations croisées d'un habitat à l'autre ont été réalisées dans le lagon Sud-Ouest de Nouméa. Le plan expérimental est résumé dans le Tableau 25.

Tableau 25. Plan expérimental des transplantations croisées de *Lobophora*.

espèces	habitat naturel	substrat	transplantations (<i>habitat/site</i>)	
<i>L. sonderii</i>	algueraie	dalle rocheuse	corail vivant (Ricaudy)	corail mort (plaque PVC, Ricaudy)
<i>L. monticola</i>	communauté corallienne	corail vivant	corail mort (plaque PVC/St ^e Marie)	algueraie (plaque PVC, Ricaudy)
<i>L. obscura</i>	roches, fragments de coraux	fragments de coraux morts	corail vivant (Ricaudy)	algueraie (plaque PVC, Ricaudy)

Lobophora sonderii, au port dressé, se développe sur des substrats rocheux dans les algueraies dominées par *Sargassum*. Cette espèce a été transplantée dans un habitat corallien et fixée sur des coraux vivants et des coraux morts.

Lobophora obscura est une espèce encroûtante colonisant des fragments de coraux morts et de roche. Cette espèce adhérant fortement au substrat, elle n'a pas été séparée de son substrat naturel (un fragment de roche ou de corail mort a été prélevé avec l'algue) pour les transplantations afin de ne pas induire un stress de manipulation supplémentaire. Elle a été transplantée dans un habitat corallien et fixée sur des coraux vivants (algue en contact avec les branches du corail) et dans une algueraie. Enfin, *L.*

monticola, colonisant des coraux branchus vivants du genre *Acropora* ou *Montipora*, a été transplantée dans l'algueraie et sur des coraux morts.

Pour les conditions de transplantations dans l'algueraie ou sur des coraux morts, un support PVC a été fabriqué et est décrit plus loin.

Dix-huit frondes de chaque espèce ont été récoltées en plongée sous-marine puis fixées sur leur support de transplantation à l'aide de bandelettes de tulle (Figure 66). Ce nombre a été choisi car nous pensions initialement dérouler l'expérience sur 31 jours et prélever six transplants à t7j, six à t14 et six à t32. Pour des raisons techniques, nous avons dû raccourcir la fenêtre d'expérience à 14 jours car les algues se faisaient arracher de leur support.

Pour les transplants dans l'habitat « corail mort » et « algueraie », les frondes ont été fixées à l'aide des bandelettes de tulle sur des fragments de coraux morts préalablement collés à l'aide de résine Epoxy sur des plaques PVC (297 x 420 mm) ; chaque plaque comportant 18 supports (Figure 66a et b). Avant la transplantation des frondes, les plaques ont été ancrées dans le substrat à l'aide de fers à béton. Deux plaques dans l'algueraie à Ricaudy (site JG1, 22°18 956 S; 166°27 405 E), une plaque proche du platier corallien à Ricaudy (site JG2, 22°18 956 S; 166°27 373 E) et une seconde sur le récif corallien à la baie Sainte Marie (site TAB3, 22°18 269 S; 166°28 791 E). Pour les transplants sur coraux vivants, plusieurs colonies de coraux vivants ont été sélectionnées sur le récif à Ricaudy (site JG2 ou JG3, 22°18 956 S; 166°27 322 E) et les frondes ont été fixées directement sur les branches à l'aide des bandelettes de tulle (Figure 66c et d). Les expériences ont été menées en été (février-mars) et hiver (juillet-août) 2016.

Six répliqués de chaque transplantation ont été récoltés à t+7j et t+14j. Des témoins dans les habitats naturels (sur leur substrat naturel, non manipulés) ont été prélevés à t0, t+7j et t+14j (voir Figure 67 pour l'exemple de *L. sonderii*). Les 226 échantillons récoltés ont été stockés à -20 °C jusqu'aux extractions. Le Tableau 26 récapitule l'effort d'échantillonnage réalisé.

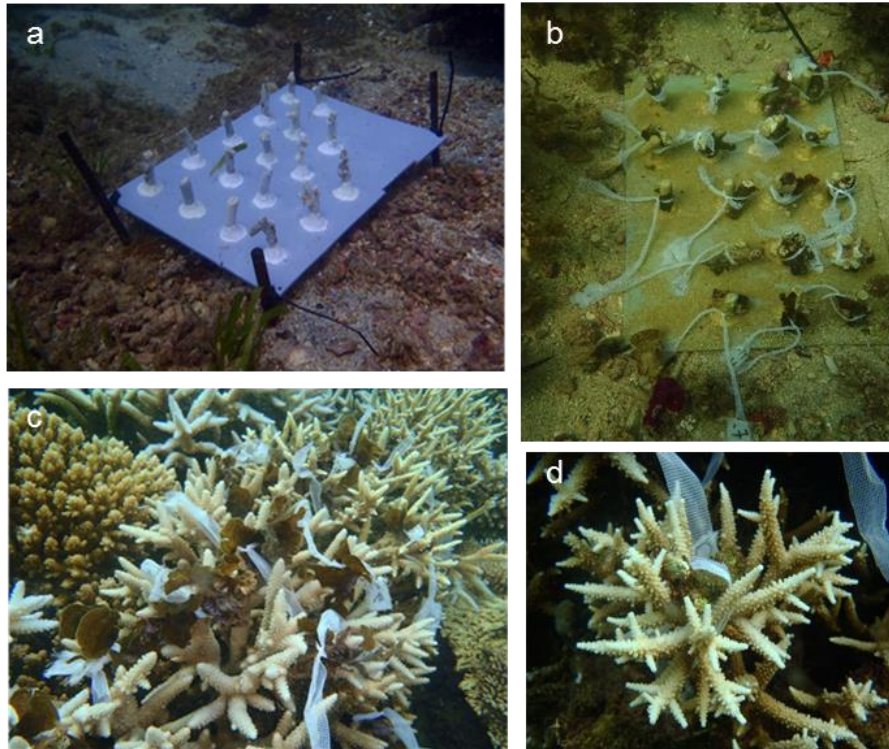


Figure 66. Mise en place des expériences de transplantation de *Lobophora*. (a) plaque PVC sur laquelle sont fixés 18 fragments de coraux morts prêts à recevoir les frondes de *Lobophora*, (b) plaque PVC avec les frondes de *L. monticola* fixées à l'aide de bandelettes de tulle après 7 jours d'expérience, (c) et (d) colonies coralliennes d'*Acropora* sp. avec plusieurs frondes de *L. sonderii* (c) et de *L. obscura* (d) fixées à l'aide de bandelettes de tulle (© J. Gaubert).

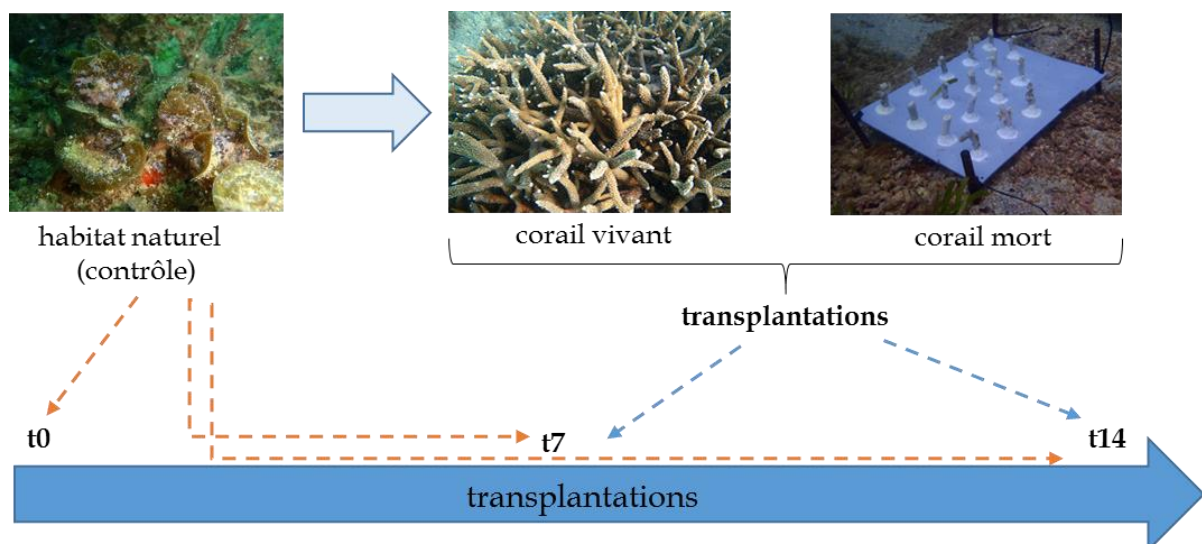


Figure 67. Schéma expérimental des transplantations croisées (cas de *L. sonderii*) (© J. Gaubert).

Tableau 26. Plan d'échantillonnage des expériences de transplantations croisées en été et hiver de *L. sonderii*, *L. obscura* et *L. monticola*

espèce	substrat	durée	échantillons	
<i>L. sonderii</i>			été	hiver
	algueraie (contrôle)	t0	6	6
	algueraie (contrôle)	t7	5	6
	corail vivant	t7	4	6
	corail mort	t7	6	6
	algueraie (contrôle)	t14	6	6
	corail vivant	t14	4	4
	corail mort	t14	5	6
<i>L. obscura</i>			été	hiver
	corail mort (contrôle)	t0	3	6
	corail mort (contrôle)	t7	6	6
	algueraie	t7	6	6
	corail vivant	t7	6	6
	corail mort (contrôle)	t14	6	6
	algueraie	t14	5	6
	corail vivant	t14	6	6
<i>L. monticola</i>			été	hiver
	corail vivant (contrôle)	t0	6	6
	corail vivant (contrôle)	t7	6	6
	algueraie	t7	6	4
	corail mort	t7	4	4
	corail vivant (contrôle)	t14	6	5
	algueraie	t14	6	4
	corail mort	t14	3	4
total			226	

2.2. Extractions, analyses métabolomiques et traitement de données

Les extractions, analyses métabolomiques et traitements des données ont été réalisés selon les protocoles décrits au chapitre 3. Les analyses métabolomiques ont été réalisées à la National University of Ireland à Galway (NUIG) sur l'UHPLC-QToF 6540 UHD Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Agilent Technologies).

Avant le traitement statistique, les données ont été normalisées par log-transformation. Pour identifier les facteurs significativement corrélés à la diversité en

métabolites, des PERMANOVA ont été effectuées (9999 permutations, vegan package sur R). Des régressions des moindres carrés partiels discriminantes (Powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis PPLS-DA) ont été utilisées pour trouver le maximum de covariance entre le jeu de données et leur classe (RVAideMemoire package). Des comparaisons multiples deux à deux ont été effectuées pour identifier les groupes significativement différents les uns des autres (tests post-hoc). Le cercle de corrélation permet alors d'identifier les potentiels marqueurs chimiques qui différencient les groupes. Les diagrammes de Venn ont été réalisés à l'aide de R et de Venny 2.0. Des réseaux moléculaires ont été réalisés à l'aide de GNPS sur les spectres MS² et traités sur Cytoscape. Le logiciel SIRIUS 4.0. (Böcker & Dührkop 2016) a également été utilisé sur les spectres MS² pour aider à l'annotation des marqueurs chimiques

3. Résultats

3.1. Influence de la saison sur le métabolome

Une variation temporelle du métabolome ayant été démontrée au chapitre 5.I sur toutes les espèces de *Lobophora*, nous avons tout d'abord évalué l'influence de la saison (été et hiver) par rapport aux facteurs « habitat » (algueraie, corail vivant et corail mort) ou « durée de transplantation » (t0, t7 et t14) sur le métabolome des algues durant les expériences de transplantations croisées (PERMANOVA avec 9999 permutations, Tableau 27). Le facteur saison est le facteur le plus contributif à la variation du métabolome pour chacune des espèces (*L. obscura* : LO, *L. monticola* : LM et *L. sonderii* : LS) par rapport à l'habitat ou à la durée de transplantation (pseudo-F_{LO} = 5,76 ; pseudo-F_{LM} = 13,1 et pseudo-F_{LS} = 15,36, p-value < 0.001). Le but premier de ces expériences de transplantations étant de voir l'influence de l'habitat sur le métabolome des algues, nous avons donc analysé chaque saison séparément.

Tableau 27. Résultats des PERMANOVA sur les facteurs « saison », « habitat » et « durée » expliquant les variations métabolomiques chez *L. obscura*, *L. monticola* et *L. sonderii* durant les expériences de transplantations croisées (méthode= "euclidean", permutations= 9999).

Resp. variable	F	Pr(>F)
<i>L. obscura</i>		
Saison	5,76	0.0001 ***
Habitat	2,13	0.0063 **
Durée	3,01	0.0004 ***
<i>L. monticola</i>		
Saison	13,1	0.001 ***
Habitat	3,53	0.001 ***
Durée	2,52	0.001 ***
<i>L. sonderii</i>		
Saison	15,36	0.0001 ***
Habitat	4,33	0.0001 ***
Durée	4,36	0.0001 ***

3.2. Influence de l'habitat et de la durée de transplantation sur le métabolome

Outre l'influence de la saison sur le métabolome, nous avons montré que les espèces de *Lobophora* étudiées présentaient chacune une empreinte métabolomique significativement différente (cf. chapitre 4) : les transplantations pour chaque espèce ont donc été traitées séparément.

L'empreinte métabolomique des fractions MeOH a ainsi été étudiée pour chaque espèce et saison séparément par UHPLC-MS-QToF. Un total de 226 échantillons ont été analysés. Après filtration et traitement des données, une matrice contenant 929 signaux a été générée pour *L. sonderii*, 876 pour *L. obscura* et 1048 pour *L. monticola*. Pour voir l'effet de l'habitat mais également celui de la durée de transplantation sur le métabolome, des PERMANOVA (méthode "euclidean", 9999 permutations) ont été menées (Tableau 28). Hormis les transplants de *L. monticola* en hiver, les effets de l'habitat et de la durée pris ensemble influencent significativement l'empreinte métabolomique de chaque espèce ($p\text{-value} < 0,05$). La durée de transplantation en été n'est pas significativement corrélée avec les changements du métabolome chez *L. obscura* ($p\text{-value} = 0,06$). Dans tous les autres scénarios expérimentaux, les facteurs « habitat » et « durée de transplantation » influencent significativement l'empreinte

métabolomique chez toutes les espèces, avec des changements métabolomiques observés à chaque temps de prélèvement (t0, t7 et t14 ; PPLS-DA et tests post-hoc de comparaisons deux à deux par permutations, *p-value* < 0,05 pour chaque paire testée, voir tableau S16)

Tableau 28. Résultats des PERMANOVA sur les facteurs « habitat », « durée » et « habitat + durée » pouvant expliquer les variations métabolomiques chez *L. obscura*, *L. monticola* et *L. sonderii* durant les expériences de transplantations croisées en été et hiver australs (méthode= "euclidean", permutations= 9999). Les *p-values* significatives (*p* < 0.05) sont en gras.

Resp. variable	F	Pr(>F)	F	Pr(>F)
<i>L. obscura</i>	été		hiver	
Habitat	3,03	0,0010 ***	2,38	0,0024 **
Durée	1,64	0,0627	4,24	0,0001 ***
Habitat : Durée	4,48	0,0001 ***	1,74	0,0288 *
<i>L. monticola</i>	été		hiver	
Habitat	4,87	0,0001 ***	2,47	0,0052 **
Durée	3,85	0,0001 ***	3,45	0,0001 ***
Habitat: Durée	2,89	0,0016 **	1,42	0,1392
<i>L. sonderii</i>	été		hiver	
Habitat	4,09	0,0001 ***	4,31	1e-04 ***
Durée	2,53	0,0050 **	4,34	1e-04 ***
Habitat : Durée	2,24	0,0094 **	4,87	2e-04 ***

Afin de ne visualiser que l'influence de l'habitat et de diminuer l'influence des autres potentiels facteurs sur la variation du métabolome, le jeu de données a été soumis à une analyse supervisée PPLS-DA (Figure 68). L'habitat (relié à l'environnement proche de l'algue, incluant le substrat d'accrochage et les interactions biotiques) influence de manière significative le métabolome de *L. sonderii* ($CER_{été} = 0,224$, *p-value* = 0,001 ; $CER_{hiver} = 0,167$, *p-value* = 0,001), *L. monticola* ($CER_{été} = 0,130$, *p-value* = 0,001 ; $CER_{hiver} = 0,195$, *p-value* = 0,001), et *L. obscura* ($CER_{été} = 0,246$, *p-value* = 0,0001 ; $CER_{hiver} = 0,404$, *p-value* = 0,004) pour chaque saison. Exceptée pour *L. obscura* en hiver, une empreinte métabolomique significativement différente est enregistrée dans chaque nouvel habitat (alguaire, corail mort ou corail vivant ; tests post-hoc de comparaisons deux à deux par permutations, *p-value* < 0,05 pour chaque paire testée, Tableau 29).

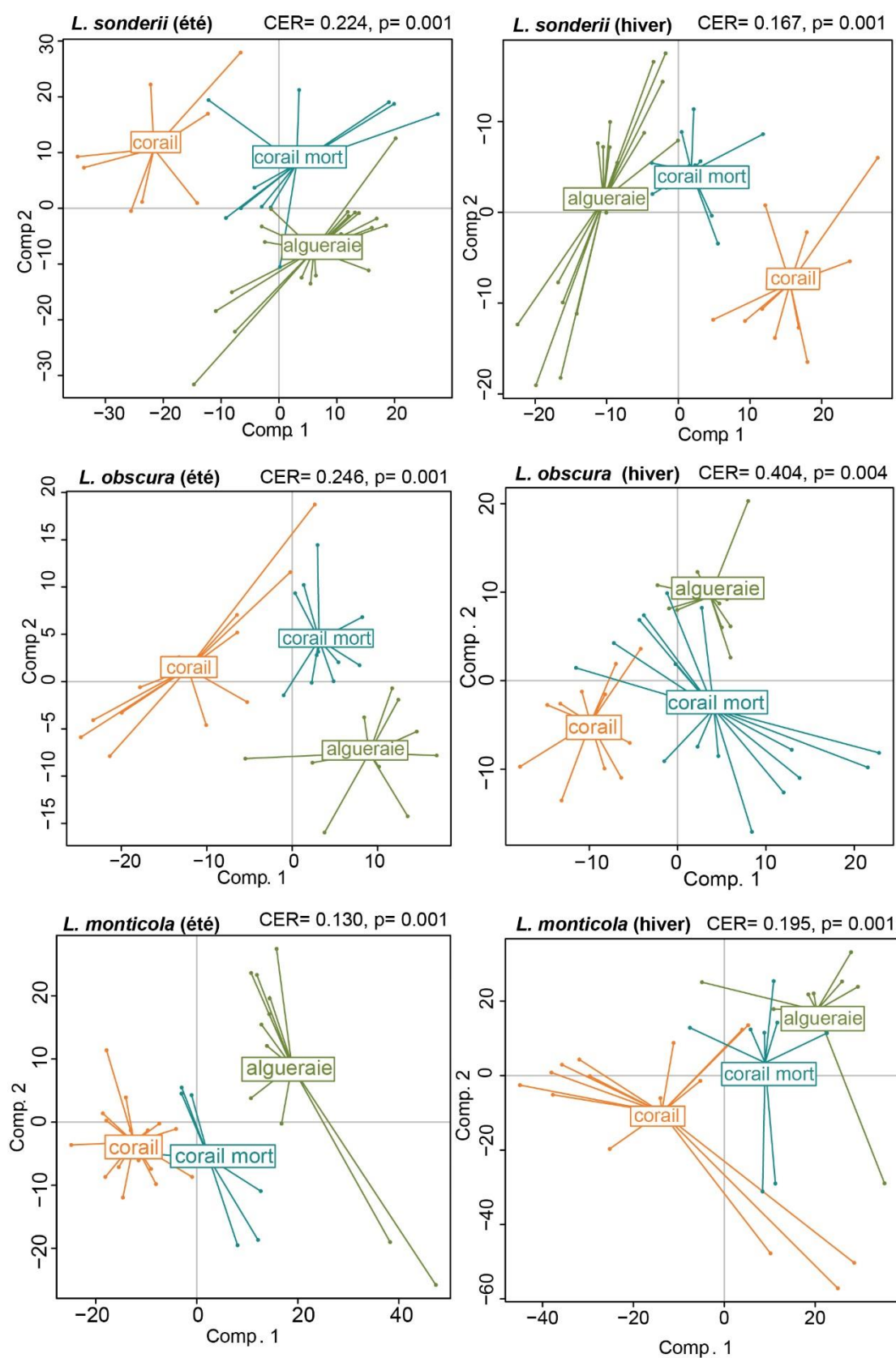


Figure 68. PLS-DA score plots de *L. sonderii*, *L. obscura* et *L. monticola* en fonction des conditions de transplantations (habitats) en été et en hiver (algueraie, corail mort ou corail vivant). CER = classification error rate with p-value after double cross model validation.

Tableau 29. Tests post-hoc de comparaisons deux à deux par permutations basés sur le modèle de validation croisée pour différencier les métabotypes de chaque espèce en fonction de l'habitat (999 permutations, *p-value* adjustment method: fdr). Les *p-values* non significatives (*p* > 0.05) sont en gras (LS : *L. sonderii*, LM : *L. monticola*, LO : *L. obscura*).

été				hiver		
LS		algueraie	corail vivant		algueraie	corail vivant
	corail vivant	0,0015	-	corail vivant	0,0015	-
	corail mort	0,0015	0,0200	corail mort	0,0015	0,002
LM		algueraie	corail vivant		algueraie	corail vivant
	corail vivant	0,0015	-	corail vivant	0,0015	-
	corail mort	0,0015	0,0040	corail mort	0,0520	0,0015
LO		algueraie	corail vivant		algueraie	corail vivant
	corail vivant	0,044	-	corail vivant	0,207	-
	corail mort	0,021	0,003	corail mort	0,190	0,042

3.3. Marqueurs chimiques responsables de la discrimination en fonction des conditions de transplantations

Les marqueurs chimiques responsables de la discrimination des groupes en fonction de l'habitat ou de la durée de transplantation ont été identifiés à la suite des analyses supervisées grâce aux cercles de corrélations pour chaque saison (seuil entre 0.7 et 0.9). Les réseaux moléculaires n'ont malheureusement pas permis l'annotation des marqueurs. Seuls les six marqueurs responsables de la discrimination entre les habitats en été chez *L. sonderii*, déjà mis en avant dans la partie I de ce chapitre, ont pu être annotés. Quatre d'entre eux pourraient correspondre à de petits alcènes et les deux autres à des polyoléfines à 21 et 23 carbones (C₂₁H₃₄ and C₂₃H₃₈), qui ont été assignées au (6Z,9Z,12Z,15Z)-hénicosa-1,6,9,12,15-pentaène, comme identifié chez *Fucus vesiculosus* en 1972 (Halsall & Hills 1972) et au (6Z,9Z,12Z,15Z)-tricocosa-1,6,9,12,15-pentaène. Comme cela a été décrit dans la partie I, ces marqueurs étaient sous-exprimés lorsque les spécimens de *L. sonderii* étaient placés sur des coraux vivants.

Bien qu'aucun autre marqueur chimique n'ait pu être annoté chez les autres espèces, aussi bien en fonction de l'habitat que de la durée de transplantation, les deux polyoléfines majoritaires ont été retrouvées chez les trois espèces (voir Figure S22 pour des exemples de chromatogrammes obtenus).

3.4. Marqueurs chimiques communs entre les saisons

Afin de voir si des marqueurs de l'habitat et de la durée de transplantation étaient potentiellement communs entre les saisons, des diagrammes de Venn ont été effectués sur les marqueurs pour chaque espèce (Figure 69 et Figure 70). Ainsi, il apparaît que deux marqueurs de l'effet habitat sont communs aux marqueurs de l'effet durée en hiver chez *L. sonderii*. Chez *L. obscura*, 10 marqueurs de l'effet durée en été sont communs avec les marqueurs liés à l'habitat en hiver. Enfin, deux marqueurs liés à l'habitat et un marqueur lié à la durée sont communs aux deux saisons chez *L. monticola*. Deux marqueurs de l'habitat sont également identiques avec ceux de la durée de transplantation en été.

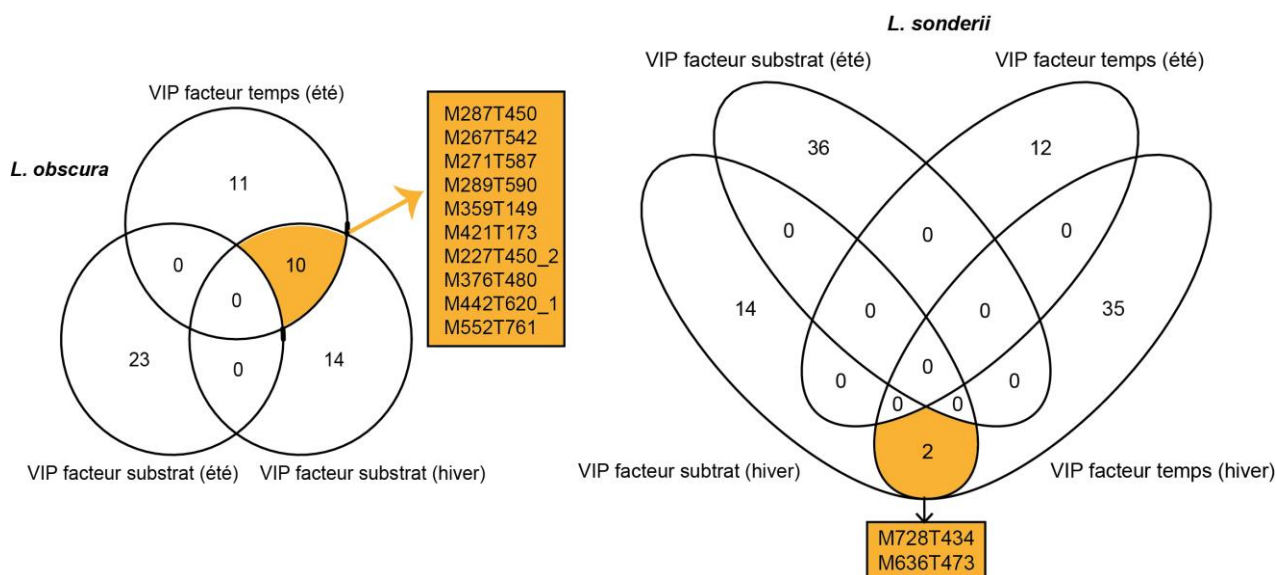


Figure 69. Diagrammes de Venn sur les marqueurs (VIP pour Variable Importance in Projection) liés au substrat et à la durée de transplantation en été et en hiver chez *Lobophora obscura* (gauche) et *Lobophora sonderii* (droite).

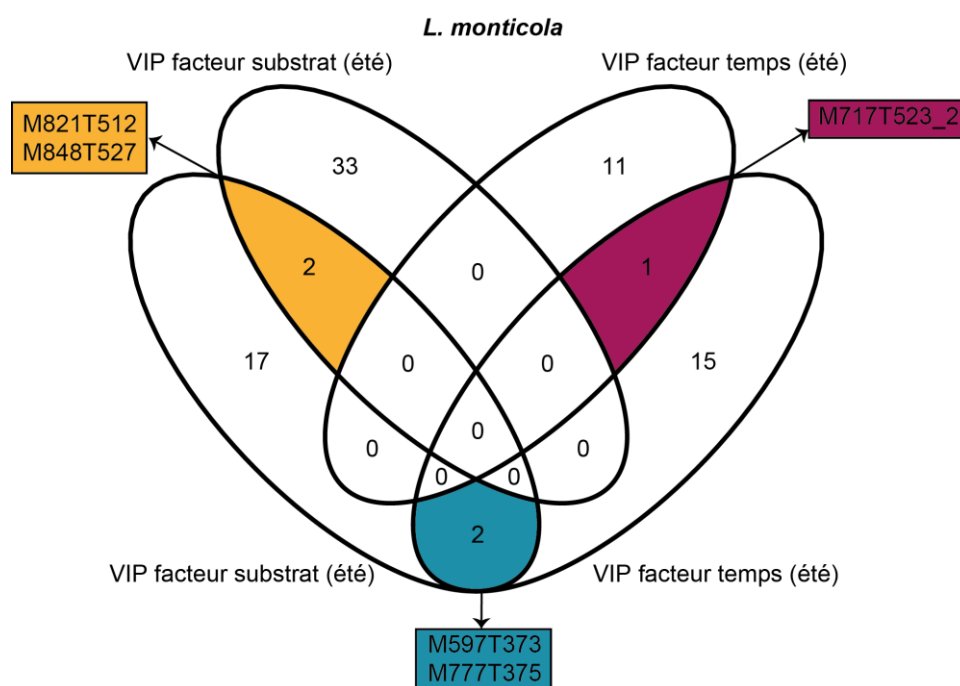


Figure 70. Diagramme de Venn sur les marqueurs liés au substrat et à la durée de transplantation en été et en hiver chez *Lobophora monticola*.

4. Discussion

Les expériences de transplantations croisées ont montré que le facteur saison avait la plus forte influence sur le métabolome des trois algues étudiées, par rapport aux facteurs habitat et durée de transplantation. L'influence de la saison n'est pas surprenante au vue des résultats obtenus dans la partie I de ce chapitre, qui ont montré que le métabolome des algues variait à l'échelle mensuelle. Cette variation temporelle est en partie corrélée aux changements des paramètres environnementaux, notamment la salinité et la température de surface de l'eau de mer (cf. partie I). Les expériences de transplantations ont ainsi été traitées pour chaque saison séparément afin de mettre en avant l'influence des facteurs d'intérêt sur le métabolome : la durée d'expérience mais surtout l'habitat dans lequel les algues sont transplantées.

Ainsi des changements métabolomiques ont été observés lorsque les algues ont été transplantées dans un autre habitat, en contact avec un nouveau substrat, exposées à un environnement et des interactions biotiques différentes par rapport à leur environnement naturel. En particulier, les algues transplantées sur un corail vivant montrent des changements significatifs de leur empreinte métabolomique par rapport à celles en contact avec des coraux morts, suggérant l'implication de diverses interactions biotiques, comme le contact avec les polypes coralliens ou une flore microbienne associée aux coraux vivants différente de celle trouvée sur des coraux morts. Dans ce type d'approche, l'impact de phénomènes biotiques et abiotiques sont de fait indissociables. En effet, les algues en contact avec un corail vivant peuvent par réaction synthétiser des composés particuliers qui leur permettent de se protéger du mucus sécrété par le corail, qui contient entre autres une flore bactérienne et des composés sécrétés par les polypes potentiellement différents de ceux de l'algue.

Ces expériences de transplantations croisées ont également montré que les changements métabolomiques étaient rapides et variables dans le temps (sauf pour *L. obscura* en été), quelles que soient les conditions de transplantation testées. Le métabolome des algues a évolué tout au long de la période d'expérimentation et nous n'avons pas observé de plateau dans ces variations. En effet, un plateau aurait peut-être été observé si les expériences s'étaient déroulées sur une plus longue durée. De plus, nos expériences ne nous permettent pas de savoir si le métabolome des algues transplantées reviendra à son état initial du milieu naturel à un moment donné. Comme cela a été évoqué dans la partie « matériel et méthodes », les algues étaient difficiles à maintenir en condition de transplantation. En effet, avec la faible profondeur des sites et l'intensité des marées, les algues se font facilement arracher de leur support, notamment lorsqu'à proximité du platier

Cette observation d'un métabolome hyper-variable sur une courte durée peut questionner la nécessité d'une période d'acclimatation pour des études métabolomiques sur les algues.

Nos observations ne nous permettent pas de voir l'effet du stress lié à la manipulation des algues par rapport aux autres facteurs testés, ce qui représente un

des biais de l'expérience. Pour essayer d'évaluer ce stress lié à la manipulation, une piste serait d'ajouter un contrôle qui serait traité de la même manière que les transplants, c'est-à-dire qu'il serait transplanté sur un support mais tout en restant dans son habitat naturel. Par exemple, dans le cas de *L. sonderii*, il faudrait placer une plaque PVC dans l'algueraie et accrocher des spécimens de l'algue. La comparaison du métabolome des spécimens sur la plaque PVC (donc manipulés) versus celui des spécimens de l'algueraie non manipulés devrait nous renseigner sur le stress induit par la manipulation de l'algue.

Les sites de transplantations ont été choisis dans une petite échelle géographique (< 300 m au site de Ricaudy) donc il est peu probable que les changements métabolomiques puissent résulter de micro-environnements physico-chimiques, même si cela ne peut être exclu. Pour *L. monticola*, n'ayant pas d'algueraie à Sainte-Marie, les algues ont été transplantées dans l'algueraie à Ricaudy donc l'effet de différents paramètres physico-chimiques est potentiellement plus important pour ces transplants (Ricaudy et Sainte-Marie sont séparés d'environ 1,5 km).

Les changements chimiques mis en avant dans nos expériences semblent être majoritairement quantitatifs plutôt que qualitatifs. Seuls deux composés sont spécifiques à *L. sonderii* dans son habitat naturel (algueraie). Pour les deux autres espèces, aucun composé n'est spécifique à une condition testée (diagrammes de Venn, non présentés). Les diagrammes de Venn réalisés sur les marqueurs liés à l'habitat et à la durée de transplantations pour les deux saisons ont montré que certains d'entre eux étaient communs entre les conditions testées. Il serait intéressant de voir si ces marqueurs en commun sont des marqueurs « généraux » liés à un stress dans l'algue. Sans annotation, il est impossible à ce stade d'investiguer plus précisément leur fonction dans l'algue. Comme cela a été constaté dans les précédents chapitres, de nombreux marqueurs discriminants apparaissent être des ions minoritaires.

Malheureusement, les réseaux moléculaires sur GNPS ont été infructueux dans l'annotation des composés responsables des changements métaboliques entre les conditions testées (marqueurs chimiques). Seuls les petits alcènes et les deux

polyoléfines majeures décrits dans la partie 1 de ce chapitre ont pu être annotés chez *L. sonderii* comme marqueurs liés aux habitats testés en été. Ces deux polyoléfines majeures ont toutefois été détectés dans le métabolome des trois espèces de *Lobophora* étudiées, en accord avec les analyses RMN réalisées sur *L. sonderii* et *L. monticola* au chapitre 1 de cette thèse. *Lobophora obscura* n'avait pas été sélectionnée pour les analyses chimiques sur des collectes de masse mais cette espèce présente bien aussi des molécules de type polyoléfines, qui seraient peut-être des marqueurs du genre.

Comme cela a été évoqué dans les précédents chapitres, le manque de bases de données fournis sur les métabolites de macroalgues est un frein à la compréhension des voies métaboliques impliquées sous différents stress. Comme suggéré dans d'autres travaux, les changements métaboliques observés dans notre expérience peuvent aussi, au moins en partie, provenir de la flore microbienne associée aux holobiontes algaux (Kubaneck *et al.* 2003; Smith *et al.* 2006; Greff *et al.* 2017).

Peu d'expériences de transplantations sur les macroalgues sont retrouvées dans la littérature, et à notre connaissance, aucune d'entre elles ne ciblait le métabolome global. La plupart portait sur l'impact de la pression d'herbivorie sur les macroalgues (McCook 1997), sur les effets des facteurs environnementaux (ex : lumière, nutriments) sur la croissance algale (Lyons *et al.* 2010), sur la photosynthèse (Karsten *et al.* 2001) et sur certains composés chimiques (McGlathery 1992) mais aussi sur la compétition algue-corail (Leone *et al.* 1995; Nugues & Bak 2006; Diaz-Pulido *et al.* 2011; Bonaldo & Hay 2014). La plupart des études sur les interactions chimiques et la compétition se concentraient sur les effets mécaniques, mais il y a de plus en plus d'évidences de l'implication et du rôle fondamental des signaux chimiques dans l'interaction entre les algues et d'autres organismes sessiles. Plus d'études sont nécessaires pour comprendre cette communication chimique. Des changements métabolomiques chez l'algue rouge *Asparagopsis taxiformis* ont été montrés après contact direct avec un corail tempéré dans une expérience de courte durée en aquarium (Greff *et al.* 2017).

Même si aucun effet délétère des algues sur les coraux n'a été détecté au bout de 14 jours dans nos expériences de transplantations, nous ne savons pas si certains composés allélochimiques ont été synthétisés par les trois espèces de *Lobophora* testées. Pour investiguer cette hypothèse, il serait intéressant de tester la toxicité des métabolites synthétisés dans ces conditions de transplantations, notamment lorsque les algues sont en contact avec des coraux vivants, à l'aide du test Microtox par exemple. Une augmentation de la bioactivité d'*Asparagopsis taxiformis* a notamment été mise en évidence avec ce test, après contact de courte durée avec le corail *Astroides calycularis* (Greff *et al.* 2017).

Bien que la nature des métabolites impliqués dans les changements chimiques soit encore inconnue lorsque les espèces de *Lobophora* sont transplantées dans un nouvel habitat et font face à de nouvelles interactions biologiques, cette étude *in situ* met en lumière la plasticité des algues à répondre chimiquement sur le court terme à un nouvel environnement. Cette plasticité est un point important dans le contexte du changement global. Bien que cette étude préliminaire ait des implications importantes, elle reste toutefois à renforcer, avec des protocoles expérimentaux à améliorer.

Figure et table complémentaires

Tableau S16. Résultats des PPLS-DA (NMC= Mean number of misclassifications with p-value after double cross model validation et tests post-hoc de comparaisons deux à deux avec permutations, basés sur le modèle de validation croisée pour différencier les métabotypes de chaque espèce en fonction de la durée de transplantations (999 permutations, p-value adjustment method: fdr) (LS : *L. sonderii*, LM : *L. monticola*, LO : *L. obscura*).

	été			hiver		
LS	PPLS-DA, NMC= 0.108, p = 0.001			PPLS-DA, NMC= 0.027, p = 0.001		
	t0	t14	t14bis	t0	t14	
	t14	0.014	-	t14	0.001	-
	t14bis	0.013	0.003	t7	0.001	0.001
LM	t7	0.003	0.003			
	PPLS-DA, NMC= 0.205, p = 0.001			PPLS-DA, NMC= 0.273, p = 0.001		
	t0	t14		t0	t14	
	t14	0.0030	-	t14	0.003	-
LO	t7	0.0040	0.0045	t7	0.003	0.025
				PPLS-DA, NMC= 0.299, p = 0.001		
				t0	t14	
				t14	0.0015	-
				t7	0.0015	0.034

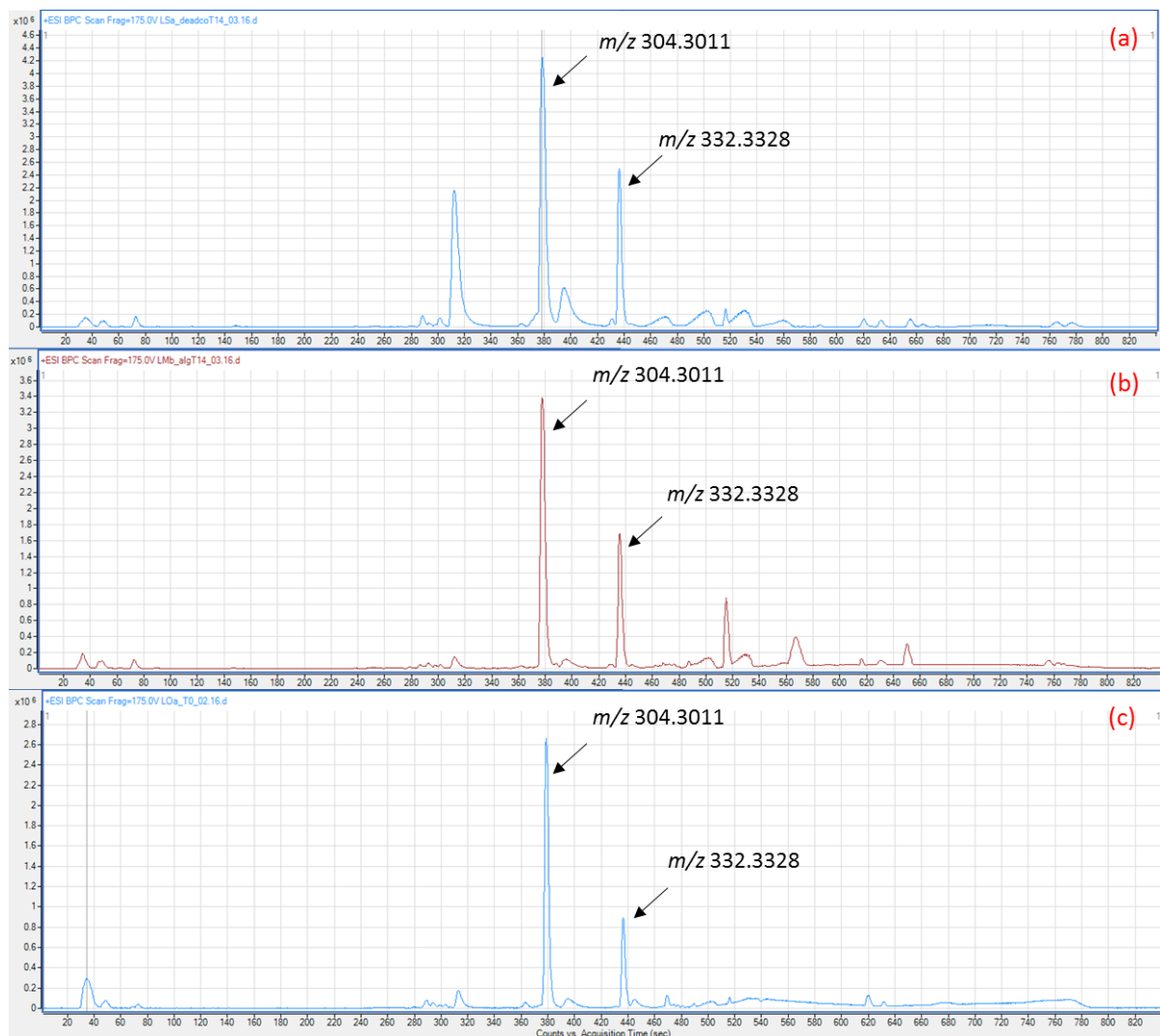


Figure S22. Exemples de chromatogrammes (Base Peak Chromatogram BPC) obtenus sur des échantillons provenant des expériences de transplantations de (a) *Lobophora sonderii*, (b) *Lobophora monticola* et (c) *Lobophora obscura*.

Références

- Allard, P.M., Genta-Jouve, G. & Wolfender, J.L. (2017). Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 36, 40–49.
- Alsufyani, T., Weiss, A. & Wichard, T. (2017). Time course exo-metabolomic profiling in the green marine macroalga *Ulva* (Chlorophyta) for identification of growth phase-dependent biomarkers. *Mar. Drugs*, 15.
- Amsler, C.D., Baker, B.J., Camacho, F.A., da Gama, B., Honkanen, T., Jormalainen, V., et al. (2008). *Algal chemical ecology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Andrefouet, S. (2014). Fiches d'identification des habitats récifo-lagonaires de Nouvelle-Calédonie. In: *Sciences de la Mer. Biologie Marine. Notes techniques*. p. 12.
- Böcker, S. & Dührkop, K. (2016). Fragmentation trees reloaded. *J. Cheminform.*, 8, 1–26.
- Bonaldo, R.M. & Hay, M.E. (2014). Seaweed-coral interactions: Variance in seaweed allelopathy, coral susceptibility, and potential effects on coral resilience. *PLoS One*, 9, 30–34.
- Box, S. & Mumby, P. (2007). Effect of macroalgal competition on growth and survival of juvenile Caribbean corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 342, 139–149.
- Contribution of Working Groups I, I. and I. to the F.A.R. of the I.P. on C.C. (2014). *IPCC, 2014: Climate change 2014: synthesis reports*. Core Writi.
- Cronin, G. & Hay, M.E. (1996). Induction of Seaweed Chemical Defenses by Amphipod Grazing. *Ecol. Soc. Am.*, 77, 2287–2301.
- da Gama, B.A.P., Plouguerné, E. & Pereira, R.C. (2014). The antifouling defence mechanisms of marine macroalgae. *Adv. Bot. Res.*, 71, 413–440.
- Dell, C. & Hay, M.E. (2016). Induced defence to grazing by vertebrate herbivores: Uncommon or under-investigated? *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 561, 137–145.
- Diaz-Pulido, G., Gouezo, M., Tilbrook, B., Dove, S. & Anthony, K.R.N. (2011). High CO₂ enhances the competitive strength of seaweeds over corals. *Ecol. Lett.*, 14, 156–162.
- Dunn, S.R., Thomas, M.C., Nette, G.W. & Dove, S.G. (2012). A Lipidomic Approach to Understanding Free Fatty Acid Lipogenesis Derived from Dissolved Inorganic Carbon within Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *PLoS One*, 7, e46801.
- Gerwick, W. & Fenical, W. (1982). Phenolic lipids from related marine algae of the order dictyotales. *Phytochemistry*, 21, 633–637.
- Greff, S., Aires, T., Serrão, E.A., Engelen, A.H., Thomas, O.P. & Pérez, T. (2017a). The interaction between the proliferating macroalga *Asparagopsis taxiformis* and the coral *Astroides calycularis* induces changes in microbiome and metabolomic fingerprints. *Sci. Rep.*, 7, 42625.

- Greff, S., Zubia, M., Payri, C., Thomas, O.P. & Perez, T. (2017b). Chemogeography of the red macroalgae *Asparagopsis*: metabolomics, bioactivity, and relation to invasiveness. *Metabolomics*, 13, 0.
- Gutiérrez-Cepeda, A., Fernández, J.J., Norte, M., Montalvão, S., Tammela, P. & Souto, M.L. (2015). Acetate-Derived Metabolites from the Brown Alga *Lobophora variegata*. *J. Nat. Prod.*, 78, 1716–22.
- Halsall, T.G. & Hills, I. (1972). Isolation of Heneicosa- 1,6,9,12,15,18-hexaene and - 1,6,9,12,15-pentaene from the Alga *Fucus vesiculosus*. *Chem. Commun.*, 5, 533–539.
- Hay, M.E. (1996). Marine chemical ecology: what' s known and what' s next ? *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 200, 103–134.
- Hay, M.E. & Fenical, W. (1988). MARINE PLAN-HERBIVORE INTERACTIONS: The Ecology of Chemical Defense. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 19, 111–145.
- Ivanisevic, J., Thomas, O.P., Pedel, L., P??nez, N., Ereskovsky, A. V., Culioli, G., *et al.* (2011). Biochemical trade-offs: Evidence for ecologically linked secondary metabolism of the sponge *oscarella balibalo*. *PLoS One*, 6, e28059.
- Karsten, U., Bischof, K. & Wiencke, C. (2001). Photosynthetic performance of arctic macroalgae after transplantation from deep to shallow waters. *Oecologia*, 127, 11–20.
- Kooke, R. & Keurentjes, J.J.B. (2011). Multi-dimensional regulation of metabolic networks shaping plant development and performance. *J. Exp. Bot.*, 63, 3353–3365.
- Kremb, S., Helfer, M., Kraus, B., Wolff, H., Wild, C., Schneider, M., *et al.* (2014). Aqueous extracts of the marine brown alga *Lobophora variegata* inhibit HIV-1 infection at the level of virus entry into cells. *PLoS One*, 9, e103895.
- Kubaneck, J., Jensen, P.R., Keifer, P. a, Sullards, M.C., Collins, D.O. & Fenical, W. (2003). Seaweed resistance to microbial attack: a targeted chemical defense against marine fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 6916–21.
- Kumar, M., Kuzhiumparambil, U., Pernice, M., Jiang, Z. & Ralph, P.J. (2016). Metabolomics: an emerging frontier of systems biology in marine macrophytes. *Algal Res.*, 16, 76–92.
- Lamers, P.P., Van De Laak, C.C.W., Kaasenbrood, P.S., Lorier, J., Janssen, M., De Vos, R.C.H., *et al.* (2010). Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnol. Bioeng.*, 106, 638–648.
- Le Borgne, R., Douillet, P., Fichez, R. & Torréton, J.P. (2010). Hydrography and plankton temporal variabilities at different time scales in the southwest lagoon of New Caledonia: A review. *Mar. Pollut. Bull.*, 61, 297–308.
- Le Lann, K., Connan, S. & Stiger-Pouvreau, V. (2012). Phenology, TPC and size-fractioning phenolics variability in temperate Sargassaceae (Phaeophyceae, Fucales) from Western Brittany: Native versus introduced species. *Mar. Environ. Res.*, 80, 1–11.

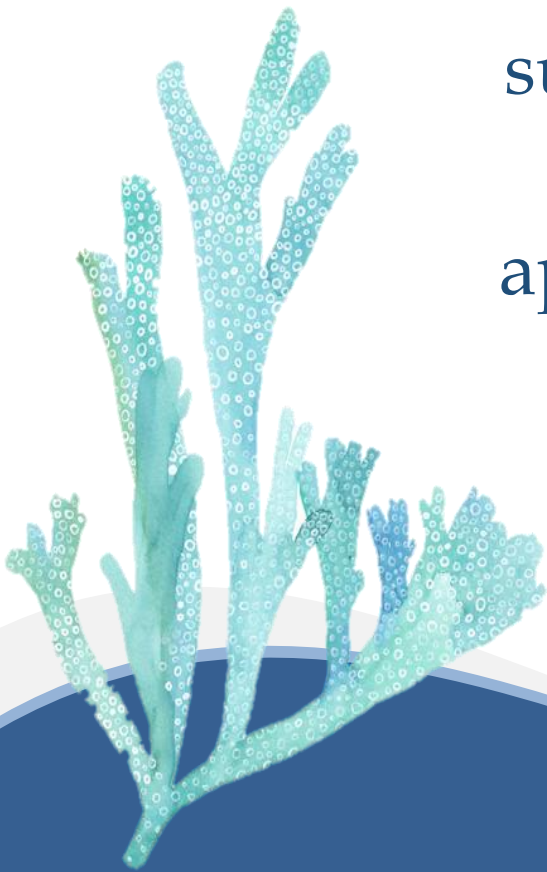
- Leone, P.A., Bowden, B.F., Carroll, A.R. & Coll, J.C. (1995). Chemical consequences of relocation of the soft coral *Lobophytum compactum* and its placement in contact with the red alga *Plocamium hamatum*. *Mar. Biol.*, 122, 675–679.
- Lu, N., Wei, D., Jiang, X.L., Chen, F. & Yang, S.T. (2012). Fatty Acids Profiling and Biomarker Identification in Snow Alga *Chlamydomonas Nivalis* by NaCl Stress Using GC/MS and Multivariate Statistical Analysis. *Anal. Lett.*, 45, 1172–1183.
- Lyons, D.A., Scheibling, R.E. & Van Alstyne, K.L. (2010). Spatial and temporal variation in DMSP content in the invasive seaweed *Codium fragile* ssp. *Fragile*: Effects of temperature, light and grazing. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 417, 51–61.
- McCook, L.J. (1997). Effects of herbivory on zonation of *Sargassum* spp. within fringing reefs of the central Great Barrier Reef. *Mar. Biol.*, 129, 713–722.
- McGlathery, K.J. (1992). Physiological controls on the distribution of the macroalga *Spyridea hypnoides*: patterns along a eutrophication gradient in Bermuda. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 87, 173–182.
- Mouchka, M.E., Hewson, I. & Harvell, C.D. (2010). Coral-associated bacterial assemblages: Current knowledge and the potential for climate-driven impacts. *Integr. Comp. Biol.*, 50, 662–674.
- Normile, D. (2016). El Niño's warmth devastating reefs worldwide. *Science* (80-.), 352, 15–16.
- Nugues, M.M. & Bak, R.P.M. (2006a). Differential competitive abilities between Caribbean coral species and a brown alga : a year of experiments and a long-term perspective. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 315, 75–86.
- Nylund, G.M., Weinberger, F., Rempt, M. & Pohnert, G. (2011). Metabolomic assessment of induced and activated chemical defence in the invasive red alga *gracilaria vermiculophylla*. *PLoS One*, 6.
- Oliveira, A.S., Sudatti, D.B., Fujii, M.T., Rodrigues, S.V. & Pereira, R.C. (2013). Inter- and intrapopulation variation in the defensive chemistry of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia*, 52, 130–136.
- Payo, D.A., Colo, J., Calumpong, H. & De Clerck, O. (2011). *Variability of non-polar secondary metabolites in the red alga Portieria*. *Mar. Drugs*.
- Pereira, R.C., da Gama, B.A.P. & Sudatti, D.B. (2016). The role of chemically defended seaweeds as biodiversity sources. In: *Marine Macrophytes as Foundation Species* (ed. Olafsson, E.). CRC Press, pp. 26–42.
- Pereira, R.C., Soares, A.R., Teixeira, V.L., Villaça, R. & Da Gama, B.A.P. (2004). Variation in chemical defenses against herbivory in southwestern Atlantic *Styopodium zonale* (Phaeophyta). *Bot. Mar.*, 47, 202–208.
- Pessoa, M.F. (2012). Algae and aquatic macrophytes responses to cope to ultraviolet radiation - a Review. *Emirates J. Food Agric.*, 24, 527–545.
- Pohnert, G. & Boland, W. (2002). The oxylipin chemistry of attraction and defense in

- brown algae and diatoms. *Nat. Prod. Rep.*, 19, 108–122.
- Polo, L.K., Felix, M.R.L., Kreusch, M., Pereira, D.T., Costa, G.B., Simioni, C., *et al.* (2015). Metabolic profile of the brown macroalga *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales) under laboratory UV radiation and salinity conditions. *J. Appl. Phycol.*, 27, 887–899.
- Quinn, R.A., Vermeij, M.J.A., Hartmann, A.C., Galtier d'Auriac, I., Benler, S., Haas, A., *et al.* (2016). Metabolomics of reef benthic interactions reveals a bioactive lipid involved in coral defence. *Proc. Biol. Sci.*, 283, 20160469–.
- Rasher, D.B. & Hay, M.E. (2010). Chemically rich seaweeds poison corals when not controlled by herbivores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 9683–8.
- Rasher, D.B. & Hay, M.E. (2014). Competition induces allelopathy but suppresses growth and anti-herbivore defence in a chemically rich seaweed. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 281, 20132615–20132615.
- Reverter, M., Perez, T., Ereskovsky, A. V & Banaigs, B. (2016). Secondary Metabolome Variability and Inducible Chemical Defenses in the Mediterranean Sponge *Aplysina cavernicola*. *J. Chem. Ecol.*, 42, 60–70.
- Rickert, E., Wahl, M., Link, H., Richter, H. & Pohnert, G. (2016). Seasonal Variations in Surface Metabolite Composition of *Fucus vesiculosus* and *Fucus serratus* from the Baltic Sea. *PLoS One*, 11, 1–18.
- Rohde, S., Gochfeld, D.J., Ankisetty, S., Avula, B., Schupp, P.J. & Slattery, M. (2012). Spatial Variability in Secondary Metabolites of the Indo-Pacific Sponge *Stylissa massa*. *J. Chem. Ecol.*, 38, 463–475.
- Schweikert, K., Hurd, C.L., Sutherland, J.E. & Burritt, D.J. (2014). Regulation of polyamine metabolism in *Pyropia cinnamomea* (W.A. Nelson), an important mechanism for reducing UV-B-induced oxidative damage. *J. Phycol.*, 50, 267–279.
- Shannon, P., Markiel, A., Owen Ozier, 2, Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., *et al.* (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 13, 2498–2504.
- Slattery, M. & Lesser, M.P. (2014). Allelopathy in the tropical alga *Lobophora variegata* (phaeophyceae): Mechanistic basis for a phase shift on mesophotic coral reefs? *J. Phycol.*, 505, 493–505.
- Smith, J.E., Shaw, M., Edwards, R. a, Obura, D., Pantos, O., Sala, E., *et al.* (2006). Indirect effects of algae on coral: algae-mediated, microbe-induced coral mortality. *Ecol. Lett.*, 9, 835–45
- Surget, G., Le Lann, K., Delebecq, G., Kervarec, N., Donval, A., Poullaouec, M.A., *et al.* (2017). Seasonal phenology and metabolomics of the introduced red macroalga *Gracilaria vermiculophylla*, monitored in the Bay of Brest (France). *J. Appl. Phycol.*, 29, 2651–2666.
- Takagi, M., Karseno & Yoshida, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular

- accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci. Bioeng.*, 101, 223–226.
- Van Alstyne, K.L., McCarthy, J.J., Hustead, C.L. & Duggins, D.O. (1999). Geographic variation in polyphenolic levels of northeastern Pacific kelps and rockweeds. *Mar. Biol.*, 133, 371–379.
- Vergés, A., Paul, N.A. & Steinberg, P.D. (2008). Sex and life-history stage alter herbivore responses to a chemically defended red alga. *Ecology*, 89, 1334–1343.
- Viant, M.R. (2007). Introducing genomics , proteomics and metabolomics in marine ecology Introduction. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 332, 247–248.
- Vieira, C., Camacho, O., Sun, Z., Fredericq, S., Leliaert, F., Payri, C., *et al.* (2017). Historical biogeography of the highly diverse brown seaweed *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 110, 81–92.
- Vieira, C., D'hondt, S., De Clerck, O. & Payri, C.E. (2014). Toward an inordinate fondness for stars, beetles and *Lobophora*? Species diversity of the genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) in New Caledonia. *J. Phycol.*, 50, 1101–1119.
- Vieira, C., Gaubert, J., de Clerck, O., Payri, C., Culioli, G. & Thomas, O.P. (2015a). Biological activities associated to the chemodiversity of the brown algae belonging to genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae). *Phytochem. Rev.*
- Vieira, C., Payri, C. & De Clerck, O. (2015b). Overgrowth and killing of corals by the brown alga *Lobophora hederacea* (Dictyotales, Phaeophyceae) on healthy reefs in New Caledonia: A new case of the epizoism syndrome. *Phycol. Res.*, 63, 152–153.
- Vieira, C., Thomas, O.P., Culioli, G., Genta-Jouve, G., Houlbreque, F., Gaubert, J., *et al.* (2016). Allelopathic interactions between the brown algal genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) and scleractinian corals. *Sci. Rep.*, 6, 18637.
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V. V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., *et al.* (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.*, 34, 828–837.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3–19.
- Wright, J.T., De Nys, R. & Steinberg, P.D. (2000). Geographic variation in halogenated furanones from the red alga *Delisea pulchra* and associated herbivores and epiphytes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 207, 227–241.
- Youngblood, W.W. & Blumer, M. (1973). Alkanes and alkenes in marine benthic algae. *Mar. Biol.*, 21, 163–17

Chapitre 6

Impact de l'acidification
sur le métabolome de
Lobophora rosacea:
approches *in et ex situ*



Ce dernier chapitre présente la dernière étude métabolomique menée au cours de cette thèse. Nous avons montré au précédent chapitre que le métabolome de *Lobophora* était variable dans le temps et l'espace, en fonction des habitats testés et des paramètres environnementaux. Le métabolome des algues est donc influencé par une multitude de facteurs dans leur environnement naturel. Nous nous sommes demandé ce qu'il en était dans le contexte de changement global de cet environnement. En effet, les écosystèmes marins font face à des changements climatiques et les deux menaces majeures pesant sur ces écosystèmes sont l'augmentation de la température de surface de l'océan et son acidification. C'est sous l'influence de ce dernier facteur que nous avons décidé de mener notre étude. Cette étude a été motivée par la présence d'un site exceptionnel en Nouvelle-Calédonie, Bouraké, où le pH est naturellement bas, variant entre 7.24 et 7.91 en fonction des marées et où l'espèce *Lobophora rosacea* a été repérée. Nous avons donc décidé d'étudier l'impact de l'acidification de l'océan sur le métabolome de cette espèce via une approche *in situ*, en comparant le métabolome des spécimens de Bouraké par rapport à celui des spécimens de Ricaudy, un site à pH ambiant. Nous avons complété cette étude par une expérience *ex situ* sur 14 jours en testant l'effet d'un pH bas (pH 7.65) prévu par des scénarios pour 2100. Cette étude a fait l'objet d'un article en préparation, intitulé « Impact of ocean acidification on the metabolome of *Lobophora rosacea* (Dictyotales, Phaeophyceae): an acidified semi-enclosed lagoon system as a natural laboratory in New Caledonia ».

Résumé

L'océan est un puits carbone : il absorbe plus d'un quart des émissions de CO₂ atmosphérique d'origine anthropique. Cette absorption de CO₂ dans l'océan entraîne une baisse de pH conduisant à son acidification. Depuis la révolution industrielle, cette acidification de l'océan est sans précédent, tant par son ampleur que par sa vitesse : 100 à 1000 fois supérieure que durant les 420 000 dernières années (Hoegh-Guldberg *et al.* 2007)

L'acidification de l'océan est une menace grandissante pour les récifs coralliens, diminuant la croissance des coraux, des algues calcaires et d'autres organismes calcifiants. Cependant, moins d'attention a été portée aux macroalgues non calcaires, aussi appelées algues molles. Les macroalgues marines jouent des rôles écologiques majeurs dans les écosystèmes marins et certains travaux ont montré qu'elles devenaient plus menacées par divers organismes (ex : bactéries pathogènes, virus) en cas de stress environnemental. Leur réponse face à l'acidification de l'océan (OA) est variable, avec des réponses positives, négatives ou neutres suivant les espèces et ces réponses sont encore mal comprises.

Dans la présente étude, nous avons étudié l'impact de l'OA sur l'empreinte métabolomique de l'algue brune non calcaire, *Lobophora rosacea*. Cette espèce est une composante importante dans les interactions algue-corail et elle est commune dans les récifs du lagon néo-calédonien. Récemment trouvée dans un site naturellement acide (Bouraké) en Nouvelle-Calédonie, nous avons combiné des approches *in* et *ex situ* (en aquarium), suivies par des analyses métabolomiques en UHPLC-MS-qToF. Des empreintes métabolomiques différentes ont été observées entre les conditions ambiantes de pH et les conditions acides. Certains marqueurs liés à ces conditions de pH ont pu être mis en évidence grâce aux réseaux moléculaires, incluant les lobophorénols B et C, plusieurs métabolites potentiellement reliés au lobophorénol B à 21 carbones et des dérivés d'acides gras oxygénés polyinsaturés contenant 20 à 24 atomes de carbones. Nous avons également utilisé le test Microtox, servant de proxy de la bioactivité d'un extrait sur les organismes marins, pour estimer les changements potentiels dans la bioactivité de *L. rosacea* en relation avec le pH. Aucune différence de

bioactivité n'a été enregistrée entre les conditions ambiantes et acides. A la vue de ces résultats, une approche métabolomique apparaît être un outil prometteur pour explorer les mécanismes impliqués dans les macroalgues en réponse à l'acidification des océans dans le contexte du changement global.

~~~~~

**Impact of ocean acidification on the metabolome of *Lobophora rosacea*  
(Dictyotales, Phaeophyceae): an acidified semi-enclosed lagoon system  
as a natural laboratory in New Caledonia**

Julie GAUBERT<sup>1,2</sup>, Riccardo RODOLFO-METALPA<sup>2</sup>, Stéphane GREFF<sup>3</sup>,  
Olivier P. THOMAS<sup>4</sup> & Claude E. PAYRI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Universités, Collège Doctoral, F-75005 Paris, France.

<sup>2</sup> UMR ENTROPIE (IRD, UR, CNRS), Institut de Recherche pour le Développement, B.P. A5, 98848 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie.

<sup>3</sup> Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale (IMBE), UMR 7263 CNRS, IRD, Aix Marseille Université, Avignon Université, Station Marine d'Endoume, rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France.

<sup>4</sup> Marine Biodiscovery, School of Chemistry and Ryan Institute, National University of Ireland Galway (NUI Galway), University Road, H91 TK33 Galway, Ireland.

*Full length article in preparation for submission*

## Abstract

Ocean acidification is a growing threat to coral reefs reducing growth rates of corals, calcareous algae and others calcifier organisms but fewer attention has been paid to fleshy macroalgae. Marine macroalgae play yet important ecological functions and evidence shown they become more threaten by diverse natural enemies under environmental stress. Their response to ocean acidification is variable and not well understood. In the present work, we studied the impact of seawater acidification on the metabolomic fingerprint of the fleshy brown macroalgae *Lobophora rosacea*. This species is an important component in coral-algal interaction and common in the New Caledonia lagoon. Recently found in a natural acidified site, we were able to combine in situ and ex situ approaches, followed by non-targeted Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) based metabolomic analyses. Different metabolomic fingerprints were observed between ambient and low pH conditions. Some chemomarkers linked to pH condition were highlighted, including lobophorenols B and C, several metabolites likely related to lobophorenols B and some C20-C24 oxygenated polyunsaturated fatty acid derivatives. We also used ecotoxicological bioassays to assess potential change in the algal bioactivity in relation with pH and no difference was recorded between ambient and low pH. A metabolomic approach appeared as a promising tool to explore the mechanisms implied in macroalgae in response to ocean acidification in the context of climate change.

## 1. Introduction

Rising emissions of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) into the atmosphere, due to human activities, are causing ocean warming and its acidification (Gattuso *et al.* 2015). With regard to ocean acidification (i.e., OA), surface ocean pH has decreased by 0.1 unit since the pre-industrial era, and is expected to lower by another 0.3-0.4 units by 2100 (Collins *et al.* 2013). This rapid underway process of OA represents a global threat to a large range of organisms being part of different marine ecosystems since their physiological

functions, life-history traits and behavior could be negatively affected, potentially leading to shifts and disequilibrium in ecosystems (Doney *et al.* 2012). Because coral reefs are among the most diverse and economically important ecosystems in oceans (Roberts *et al.* 2002), their ongoing degradation could, in the near future, leads to profound ecological shifts, likely having impacts on the populations which depend to them for goods and services (Moberg and Folke, 1999). However, responses to OA vary among species (Ries *et al.* 2009). A meta-analysis suggested a predictable sensitivity among heavily calcified organisms (*e.g.* corals, mollusks, crustose coralline algae) but a higher tolerance among more mobile organisms (*e.g.*, crustaceans and fish) (Kroeker *et al.* 2010).

For non-calcifying macroalgae (*i.e.*, fleshy macroalgae), the effect of OA seems to be highly variable and particularly species- and condition-specific, including positive, negative or neutral effects (Diaz-Pulido *et al.* 2011; Gordillo *et al.* 2016). Different responses have been linked to the species-specific algae dissolved inorganic carbon (DIC) physiology, especially if they passively uptake CO<sub>2</sub> without any carbon-concentrating mechanisms (CCM) or if they used CCM with high or low affinity for DIC (Britton *et al.* 2016; Cornwall *et al.* 2017; Graba-Landry *et al.* 2018). In general, when compared to other taxa, substantially less information is available for fleshy macroalgae (Nunes *et al.* 2016).

Fleshy macroalgae are ecologically important component in tropical coral reef ecosystems and they strongly compete with corals for space (Diaz-Pulido *et al.* 2011; Johnson *et al.* 2014) via a number of mechanisms, such as shading or abrasion, including chemical mediation (McCook *et al.* 2001; Del Monaco *et al.* 2017). Under environmental and anthropogenic stresses, many coral reefs have shifted from coral to macroalgae-dominated regimes (Hughes *et al.* 2010; Diaz-Pulido *et al.* 2011; Del Monaco *et al.* 2017). Ocean acidification is supposed to favor seaweed over corals in these competitive interactions, a phenomenon which could exacerbate these dramatic ecological reef shifts toward reefs dominated by fleshy macroalgae, as already found near CO<sub>2</sub> vents (Hall-Spencer *et al.* 2008; Fabricius *et al.* 2011; Baggini *et al.* 2014).

Under multi-stressors environments (*e.g.* physico-chemical variations, pathogen threats, anthropogenic stress), regulation in the algal physiological balance occur (Kumar et al., 2016). One of the final outputs of cellular regulations (genomic/transcriptomic) are the metabolites synthesized (metabolome) which is subjected to the impact of the environment (Fiehn 2002; Kooke & Keurentjes 2011). The metabolome can therefore be considered as a closer proxy of the phenotype than genome or transcriptome. Non-targeted metabolomics, the study of the whole metabolome, can thus be a quick and useful tool to explore the effects of environmental factors or stressors on organisms and to gain a broad insight on the metabolic pathways involved. Environmental metabolomics, particularly in aquatic organisms, is a growing field in marine science (Viant 2007), and few studies have been carried out on macroalgae (*e.g.* Belghit et al., 2017; Greff et al., 2017). To the best of our knowledge, no metabolomic-based studies have been performed so far on the response of marine macroalgae to ocean acidification while it has been explored on other marine organisms like corals (Sogin *et al.* 2016), marine microbes (Coelho *et al.* 2015), crustaceans (Hammer et al., 2012) and bivalves (Wei et al., 2015; Ellis et al., 2014).

In the present work, we studied the impact of OA on the metabolic fingerprint of the fleshy brown marine macroalgae *Lobophora rosacea* (Dictyotaceae), a common species in tropical coral reefs, including New Caledonian lagoon (Vieira *et al.* 2016). This alga is often found in close association with corals, especially branching *Acropora spp.*

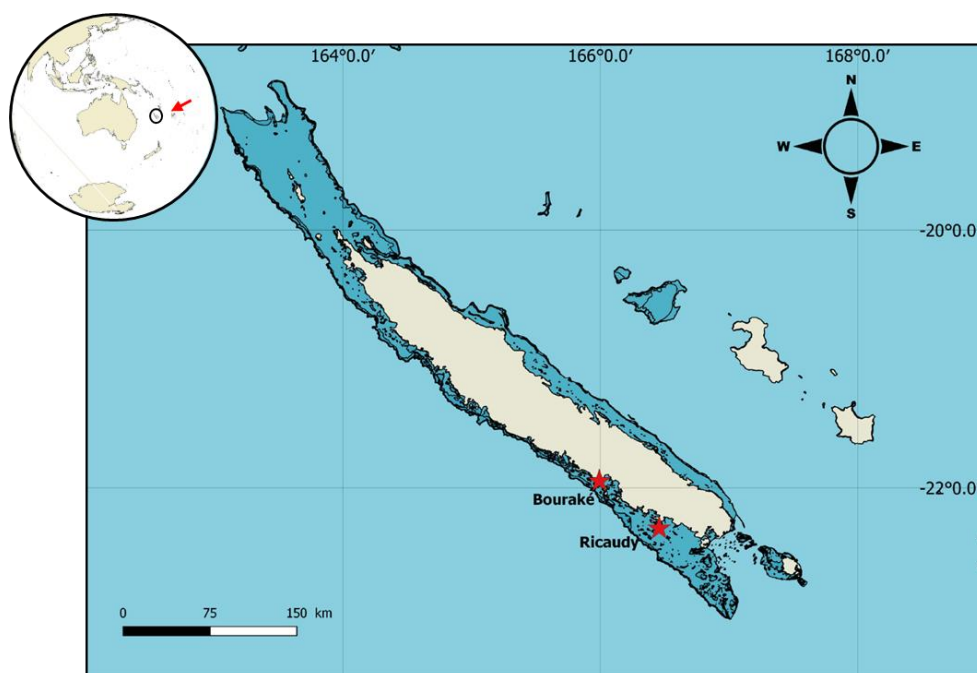
To assess the impact of acidification on *Lobophora rosacea* metabolome, we used for the first time on such a kind of study, a natural acidified system (*in situ* experiment) where the pH varies according to the tide (Camp et al. 2017). Extreme environments such as CO<sub>2</sub> vents, and semi-closed heated lagoons are becoming popular to study the response of species acclimated and likely adapted to near-future conditions, which is almost impossible by using only lab-based approaches (Camp et al. 2018). Therefore, these macroalgae were long-lasting preconditioned to OA in their natural environment and their acclimatization to near-future conditions is likely. Samples of *L. rosacea* were collected at the mangrove lagoon in Bouraké (New Caledonia; Camp et al. 2017) where pH fluctuates between 7.24 and 7.91 and their metabolome analyzed.

We were also interested to see what are the metabolic changes OA causes in the short, i.e., before any mechanism of feedback and full acclimatization take place. For that, *L. rosacea* were collected from a site where pH varies within a normal range for fringing reefs, and were incubated in aquaria at near-future seawater pH conditions (*ex situ* experiment). This approach is commonly used for fleshy algae during short incubations, although with no doubts limited in the scope because the artificial conditions imposed by working in aquaria. For both experiments, non-targeted Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)-based metabolomic analyses were performed to assess changes in metabolomic fingerprinting of *L. rosacea* in acidified conditions, both in natural habitats (*in situ*) or after the short-term experiment (*ex situ*), and to identify potential chemomarkers linked to pH conditions. In addition, we measured algae bioactivity with ecotoxicological bioassays to test for its potential modifications due to OA, which is notably relevant in the context of coral-algal interactions.

## 2. Methods

### 2.1. In situ experiment

To study the metabolome of acclimatized algae to OA, eight samples of *L. rosacea* were collected at 2-3 m depth by SCUBA on the 25<sup>th</sup> September 2017 at Bouraké (21°56.570'S; 165°59.310'E), a semi-enclosed lagoon system where seawater pH fluctuates between 7.24 and 7.91 according to the tidal cycle (Camp *et al.* 2017). Another set of eight samples were collected on the 31<sup>st</sup> August 2017 at Ricaudy (22°18.956'S; 166°27.405'E, Figure 71), a reference site where seawater pH<sub>T</sub> is  $7.99 \pm 0.03$  (pH<sub>T</sub> = total scale). Both set of samples were collected in separated plastic bags and transported in a cooler on ice prior to freezing at -20°C. Voucher numbers are detailed in Figure S23.



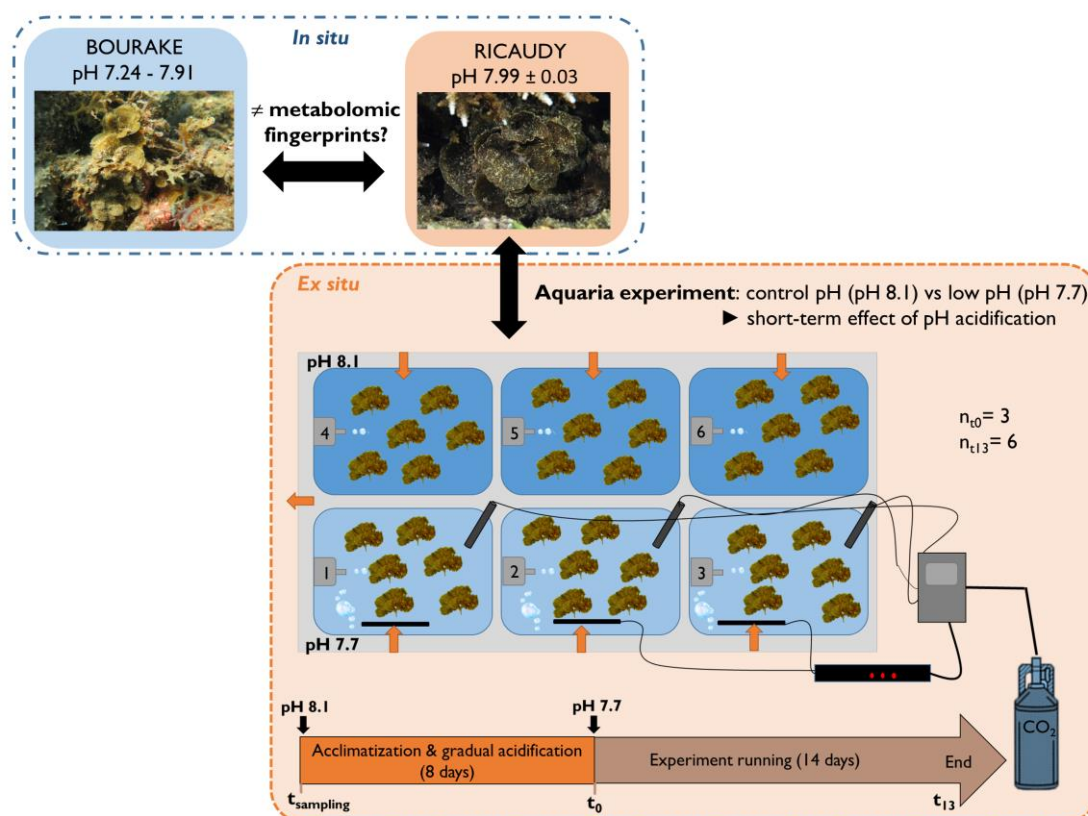
**Figure 71.** Map of the collected sites (Bouraké and Ricaudy) in the South-West lagoon of Nouméa, New-Caledonia (figure not included in the article).

## 2.2. Ex situ experiment

To assess the metabolome change after a short-time exposition of algae to OA, samples of *L. rosacea* were collected on the 31<sup>st</sup> August 2017 at Ricaudy. They were directly transported at the Aquarium des Lagons (Nouméa, New Caledonia) where the experiment were run. Nine samples were randomly assigned to one of six 5 L experimental flow through tanks ( $n=9$ ), while eight samples were frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for metabolomic fingerprinting at the sampling date. Light was provided by two banks of four T5 bulbs each (6,000 and 10,000°K, Giesemann, Germany) giving an irradiance of ca.  $80\text{--}90\text{ }\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ , over a 12:12h dark/light cycle. Each tank received a continuous supply of filtered seawater ( $500\text{ }\mu\text{m}$ ) with an approximate flow rate of  $130\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . In each tank a submersible water pump (Mini-Jet, Aquarium Systems) gently mixed seawater. Algal samples were acclimated at the experimental conditions during five days. During the last three days, the pH was gradually decreased ( $0.1\text{ pH}_T\text{ day}^{-1}$ ) in three tanks to  $7.65\text{ pH}_T$  units, which is among the most pessimistic scenario for the end of century (RCP 8.5 scenario; IPCC 2014). The three remaining aquaria were maintained at ambient pH ( $\text{pH}_T\text{ }8.1$ ) and corresponded to the reference condition (see Figure 72). Seawater pH was continuously controlled using a pH-stat system

(Aquastar, IKS Computer System GmbH, Germany; precision  $\pm 0.05$  pH unit) which bubbled at slow rate pure CO<sub>2</sub> into the aquaria. The computer control system was verified twice a day for the duration of the experiment using a pH meter with a glass electrode (Metrohm 826 pH mobile) equipped with a Pt1000 temperature probe and a Aquatrode Plus pH electrode which was calibrated with Tris/HCl referenced solutions (Dickson et al. 2007).

After five days of acclimatization and three of gradual pH decrease, the acidification experiment started: three specimens per tank were sampled ( $t_0$ ). The six remaining algal specimens (replicates) were maintained under experimental conditions (acidification:  $\text{pH}_T 7.65 \pm 0.04$  and control:  $\text{pH}_T 8.13 \pm 0.04$ ; mean temperature:  $23.9 \pm 0.3$  °C, Table S1) during 14 days. At the end of the experiment ( $t_{14}$ ), all the samples were frozen at -20°C pending chemical extractions. Seawater carbonate chemistry was measured in aquaria experiment and is presented in supplementary Table S17.



**Figure 72.** Global scheme of the in situ and ex situ acidification experiments. Algae collected at Ricaudy were used for the aquaria experiment. Orange arrows indicate seawater circulation. Tanks 1 to 3 correspond to acidified condition of pH (pH 7.7), and tanks 4 to 6 correspond to the control condition of pH (pH 8.1) (figure not included in the article).

### 2.3. Metabolites extraction

Algae from *in situ* and *ex situ* experiments were freeze-dried and reduced in powder by grinding with liquid nitrogen. A mass of 250 mg of each sample was extracted three times with five mL of MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) in a five min ultrasonic bath. After filtration (paper filter, 4-12 µm, Macherey-Nagel) of the supernatant, the crude extract was adsorbed on C18 silica powder (100 mg, Polygoprep 60-50, Macherey-Nagel®) by concentration under vacuum and fractionated on SPE cartridges (Strata C18-E 500 mg/6 mL, Phenomenex®), cleaned with six mL of MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), and conditioned with six mL of milliQ H<sub>2</sub>O. The extract was fractionated by successive elution of H<sub>2</sub>O, MeOH and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (six mL of each solvent). MeOH fractions were filtered on syringe filters (PTFE, 0.20 µm, Phenomenex®), dried and further analyzed by UHPLC-MS-qToF.

### 2.4. Metabolomic analyses

Metabolomic analyses were performed with an UHPLC-QqToF (Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific®) coupled to a mass spectrometer (MS) equipped with an electrospray ion source (Impact II, Bruker Daltonics®). Chromatographic separation of metabolites was performed on an Acclaim™ RSLC 120 C18 column (2.1 x 150 mm, 2.2 µm, Thermo Scientific®) at a constant temperature of 40 °C. The mobile phase was prepared with H<sub>2</sub>O + 0.1 % formic acid + 10 mM ammonium formate (A) and acetonitrile/H<sub>2</sub>O (95/5) + 0.1 % formic acid + 10 mM ammonium formate (B). The optimised elution gradient was programmed as follow: 60 % A – 40 % B during two min, with a linear gradient up to 100 % B from 2 to 8 min, with an isocratic step of 100% B during min, and return to the initial condition from 12 to 14 min. A post-run step of 3 min was set for column equilibration (60 % A – 40 % B) after analysis for a total runtime of 17 min. Injection volume was set to 5 µL and elution rate to 0.5 mL min<sup>-1</sup>. Mass spectra were acquired in positive mode. MS parameters were set as follows: nebulizer gas N<sub>2</sub> at 40 psig, gas temperature: 200 °C, drying gas N<sub>2</sub> at 4 L min<sup>-1</sup>, spectra acquisition at 2 Hz from 50 to 1200 *m/z*, capillary voltage: 3500 V. Auto-MS<sup>2</sup> were acquired in the same conditions. A quality control sample (QC) was prepared with 25 µL of each sample for each experiment. The run started with blank injections, followed

by 10 injections of the QC samples for ToF stabilization. The samples were then injected randomly integrating a QC sample every five samples that allows checking for MS shift over time and data normalization. A final blank was injected to check any memory effect of the compounds on the column. A calibration solution of formate/acetate was injected before the full set of analyses and before each sample analysis.

LC-MS raw data files were calibrated before converting them to netCDF files (centroid mode) using Bruker Compass DataAnalysis 4.3. NetCDF files were processed using the package XCMS (Smith *et al.* 2006) for R software (R version 3.3.2, XCMS version 1.50.1). Optimized parameters for XCMS script were used as follows: peak detection (method= "centwave", peakwidth= c(2,20), ppm= 15, mzdiff= 0.05, prefilter= c(0,0)), retention time correction (method= "obiwarp", plotype= "deviation"), matching peaks across samples (bw= 30, mzwid= 0.015, minfrac= 0.3, minsamp=1) and filling in missing peak data. To remove technical variability, the matrix was then filtered according to blanks and QC using in-house R scripts. The final matrix is composed of ions with an integrated peak area for each  $m/z$  value and retention time. Data were log-transformed prior to statistical analysis. Molecular network based on MS<sup>2</sup> spectra were constructed with GNPS (Wang *et al.* 2016) and managed under Cytoscape 3.5.0 (Shannon *et al.* 2003). Metlin (<https://metlin.scripps.edu/>) and SIRIUS 4.0. (Böcker & Dührkop 2016) were used for putative annotation.

## 2.5 Bioactivity test

Bioactivities (or toxicities) of MeOH extracts were assessed only for sample collected for the *in situ* experiment. For that, the standardized Microtox® assay was used (Johnson 2005, R-Biopharm®, France) as a rapid proxy of the algal toxicity against marine organisms. Bioactivity was measured *via* the effect of extracts on the respiration metabolism of the bioluminescent marine bacteria *Aliivibrio fischeri*. Stock solutions of algal extracts were prepared at 2 mg mL<sup>-1</sup> in artificial seawater with 2% acetone to facilitate dissolution. Stock solutions were then diluted at 0.4 mg mL<sup>-1</sup> and diluted again by a factor two three times to draw EC50 curves. Measures of bacterial

bioluminescence were done after 5 min of exposure to extracts. For relevant ecological comparison,  $\gamma$  units relative to 1 mg of alga  $\text{mL}^{-1}$  of solution were calculated as described in Greff *et al.* (2014).

## 2.6 Statistical analyses

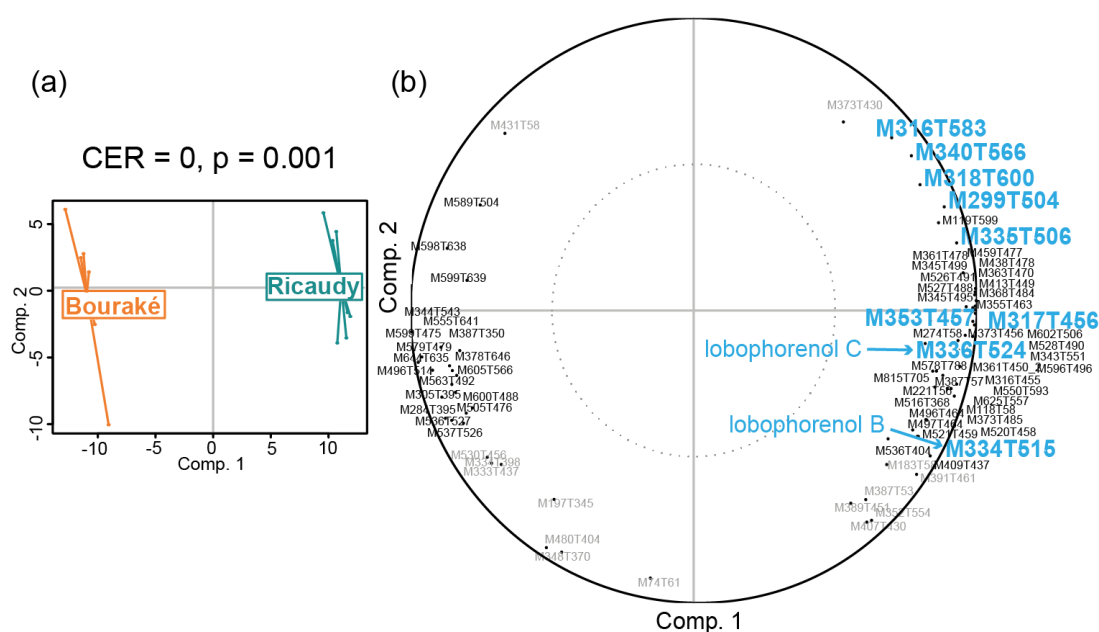
Statistical analyses were performed on R software. Normality of data distribution was tested with Shapiro-Wilk test and homogeneity of variances with Levene test. Homogeneity of variance being satisfied but not the normality, Student t test with permutations (RVAideMemoire package) was used to test difference of pH between aquaria treatments. Principal component analysis (PCA) was constructed to visualize the metabolome variation according to pH conditions (ade4 package). Powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (PPLS-DA) allowed to find the maximum covariance between our data set and their class membership and permutational tests based on cross model validation (MVA.test and pairwise.MVA.test) to test differences between groups (RVAideMemoire package). In a second time, correlation circles were drawn to identify discriminating compounds (chemomarkers or VIP: Variable Importance in Projection) (RVAideMemoire package). To identify which significant factors were linked to the metabolites diversity, we used Permutational Multivariate Analysis of Variance using distance matrices (PERMANOVA, 9999 permutations, vegan package). Wilcoxon's test was used to check differences of EC50 and chemomarker intensities between control and low pH sites (mean  $\pm$  SD). Kruskal-Wallis' test was used to identify differences in normalized intensities of chemomarkers between pH treatments for the *ex situ*. Venn diagram were constructed with the Vennerable package.

## 3. Results

### 3.1. *In situ* experiment

After LC-MS data treatment and filtering, the matrix resulted in 265 features used for the powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (PPLS-DA, Figure 73a). Two

significant distinct clusters (low pH, Bouraké *vs* ambient pH, Ricaudy) were identified (PPLS-DA, CER = 0,  $p = 0.001$ ). The differences between metabolic fingerprints seemed to be only quantitative according to Venn diagram. The metabolites (chemomarkers) driving the separation of metabolomic fingerprints of macroalgae sampled at ambient against low pH were determined (Figure 73b). Thus 56 chemomarkers were selected (threshold 0.8) and tentatively annotated in Table S18. Around 30 % of them were overexpressed in low pH compared to ambient pH, while 70% were depleted. Several polyunsaturated compounds with 21 carbon and one to three oxygen atoms majorly characterized the ambient pH condition, including the polyunsaturated alcohols lobophorenols B and C, while not identified in the low pH condition, along with some C20-C24 oxygenated fatty acid derivatives. Compounds with higher carbon atoms number (C26-C35) and up to 7 oxygen atoms were also identified, in both ambient and low pH conditions. Several minor compounds also participated to the discrimination between low and ambient pH conditions.



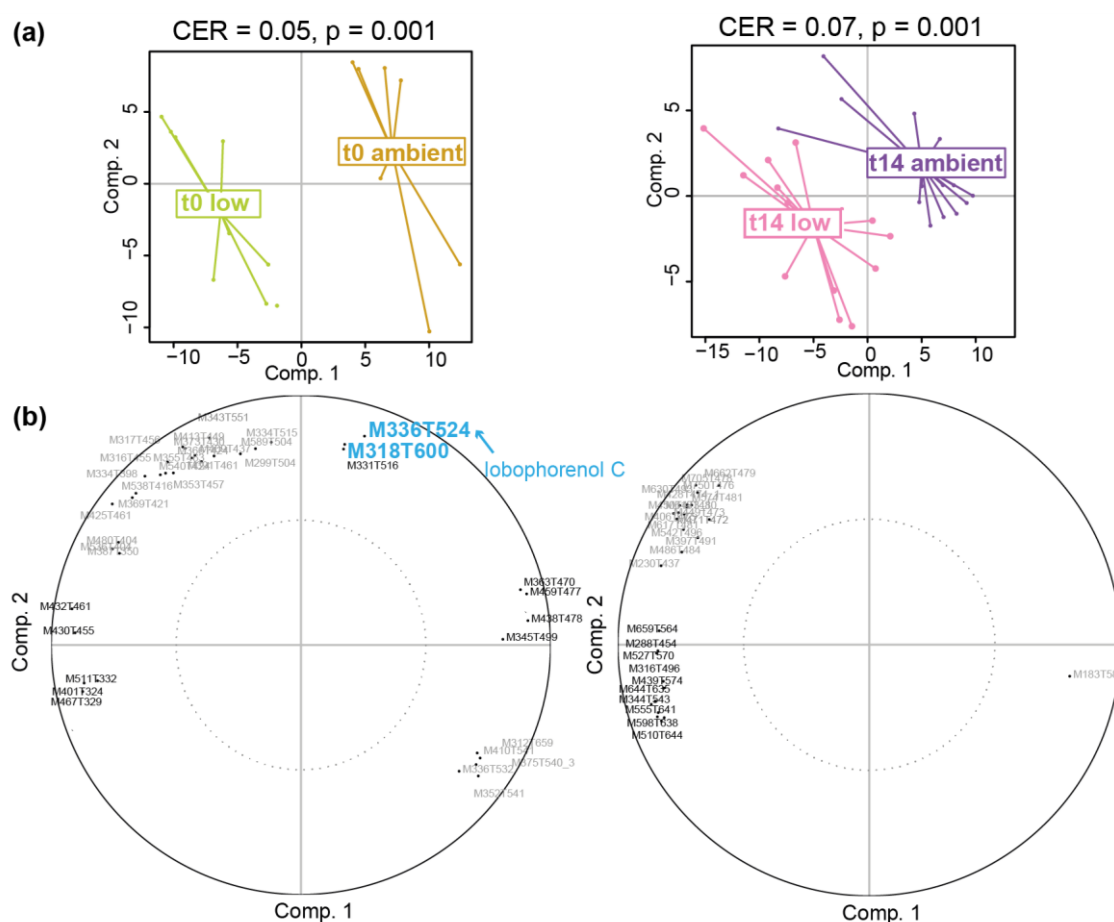
**Figure 73.** (a) powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (PPLS-DA) score plots of the methanol extracts of *Lobophora rosacea* metabolome from ambient (Ricaudy ) and low pH (Bouraké) and (b) PPLS-DA loadings (threshold 0.8, see tables 30 and S18 for metabolite details). Metabolites in blue referred to Fig. 75. Compounds in grey are not considered for markers selection.

### 3.2. Bioactivity assay

The metabolomes of *L. rosacea* collected at ambient pH (Ricaudy) vs low pH (Bouraké) being significantly distincts, we assessed the bioactivity of algal MeOH extracts with Microtox® assays. No significant difference in toxicity was recorded between *L. rosacea* sampled from the two sites ( $\gamma = 0.67 \pm 0.08$  and  $0.55 \pm 0.16$ , from ambient and low pH site respectively ( $n = 8$ , Wilcoxon rank sum test,  $p = 0.96$ ).

### 3.3. Ex situ experiment

We used supervised analyses (PPLS-DA) to focus on the effect of a low pH at the beginning of acidification at pH 7.7 (t0) and after 14 days of treatment (t14). Significant differences between ambient and low pH ( $\text{CER}_{t0} = 0.05$ ;  $\text{CER}_{t14} = 0.07$ ,  $p = 0.001$ ; Figure 74a) were found. Except one specific compound to t0 low pH samples (M722T301), only quantitative change in metabolites were recorded (Venn diagram tests). Chemomarkers driving metabotype differences between each pH condition were selected according to PPLS-DA loading plots (Figure 74b, threshold 0.8) and tentatively annotated in Table S19. Twelve were determined at t0, among which five were overexpressed in low pH condition and seven in ambient condition (C21-C29 and up to 6 oxygen atoms), including lobophorenol C. In t14 samples, 10 markers were overexpressed in acidified condition while none was determined in ambient pH condition. Three compounds could correspond to polyunsaturated oxygenated fatty acid derivatives with 16 to 20 carbon and three oxygen atoms.



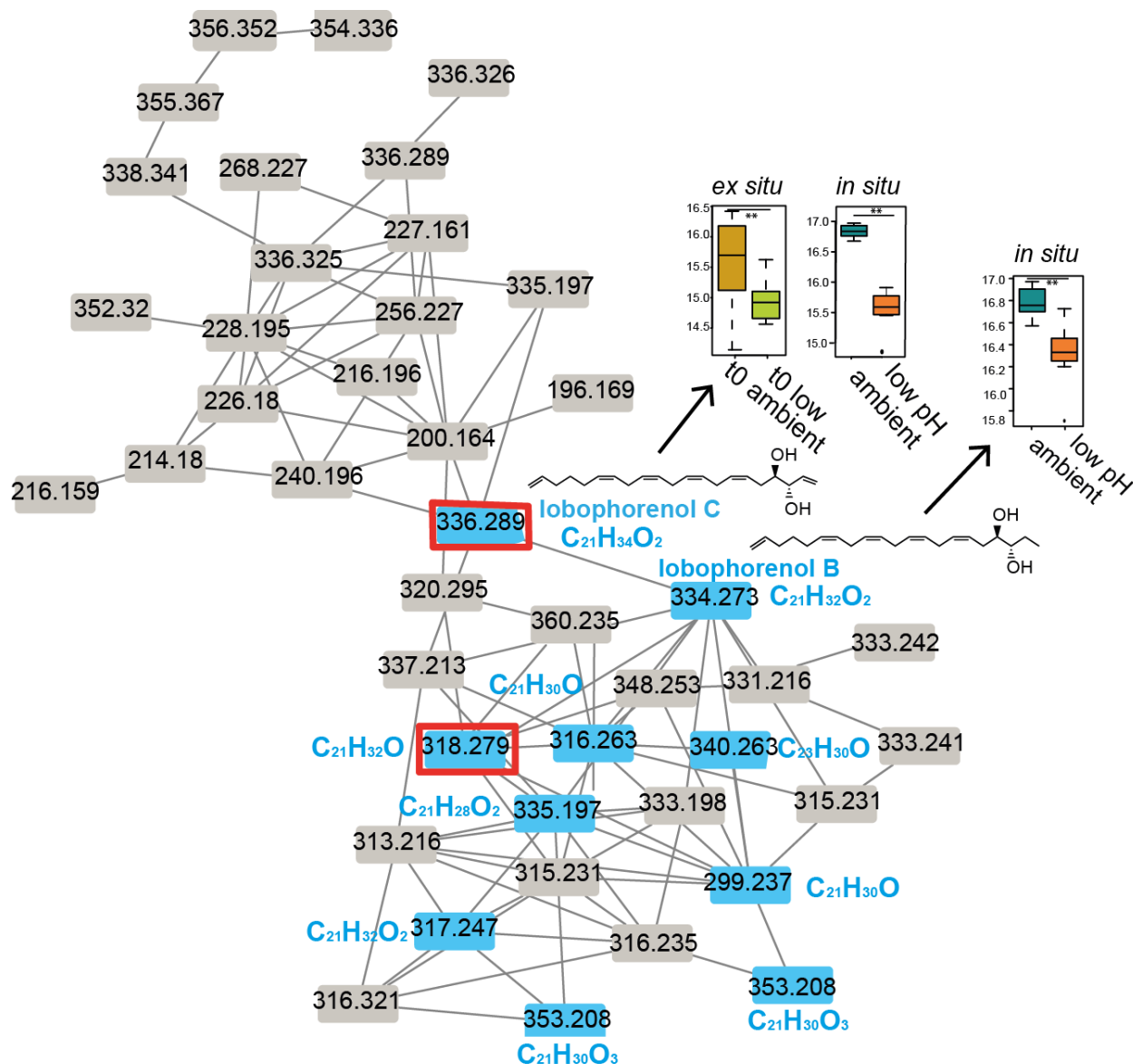
**Figure 74.** (a) powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (PPLS-DA) score plots of *Lobophora rosacea* metabolome analyzed by LC-MS in ambient or low pH conditions at t0 and t14. CER = classification error rate with p-value after double cross model validation. (b) PPLS-DA loadings (threshold 0.8, see tables 30 and S19 for metabolites details). Metabolites in blue referred to Fig. 75. Compounds in grey are not considered for markers selection

### 3.4. Chemomarkers linked to pH condition

The molecular formulae of the chemomarkers linked to pH conditions were established for the two experiments based on the comparison of proposed formulae and isotopic patterns to theoretical ones (Tables S18 and S19). A first set of 56 chemomarkers were determined on the basis of the *in situ* experiment. A second set of 22 chemomarkers were determined after the *ex situ* experiment. To determine chemomarkers relationships and to help annotating them, a molecular network based on MS<sup>2</sup> spectra was also build (Figure 75).

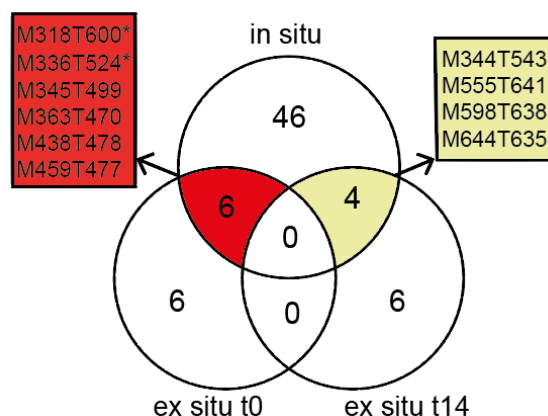
This network allowed to annotate nine chemomarkers featured after the *in situ* approach (Figure 73b, Table 30). Among them were lobophorenols B ( $m/z$  334.2742 [M

+ NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>, C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>) and C (m/z 336.2896 [M + NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>, C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>), two polyunsaturated alcohols previously discovered in *L. rosacea* (Vieira *et al.* 2016) and seven derivatives of lobophorenols B. Except one compound with 23 carbons, they contained 21 carbons, with one to three oxygen atoms and six to eight unsaturations. As mentioned in 3.1, all these markers were depleted in the low pH site (see Figure S24).



**Figure 75.** Molecular network showing the chemomarkers linked to pH condition (blue) identified after the *in situ* (Fig. 73b) and *ex situ* (Fig. 74b) approaches, including the lobophorenols. Red boxes indicate common markers between *ex situ* t0 samples and *in situ* samples (see Fig. 76).

A Venn diagram test was also performed to highlight possible common markers linked to pH condition between *in* and *ex situ* approaches. Six metabolites were common between *in* and *ex situ* t0 samples and overexpressed at ambient pH. Four were common between *in* and *ex situ* t14 samples and overexpressed at low pH (Figure 76, Table 30). No marker was common between *ex situ* t0 and t14 samples.



**Figure 76.** Venn diagram on the macroalgal metabolomic chemomarkers of pH conditions (selected on PPLS-DA loadings with threshold = 0.8) from *in situ* and *ex situ* experiments. The boxes indicate common chemomarkers between *in* and *ex situ* (t0) experiments (red), and *in* and *ex situ* (t14) experiments (yellow) (\* indicate chemomarkers found in the molecular network Fig. 75).

Among the common chemomarkers between *in* and *ex situ* t0 experiments, we found several unsaturated oxygenated fatty acids that likely contain 20 to 29 carbons and three to six oxygen atoms (Table 30). We also found two compounds in the molecular network: lobophorenol C ( $C_{21}H_{34}O_2$ ) and the unidentified compound  $C_{21}H_{32}O$  (see Figure 75)

**Table 30.** *Lobophora rosacea* chemomarkers of pH conditions found in the molecular network (\* including the two common compounds between *in situ* and *t0 ex situ* samples) and common features between *in situ* and *ex situ* experiments (identified with Venn diagram test) responsible for the differences according to pH conditions after LC-MS analyses. The mSigma (mS) value is a measure for the goodness of fit between experimental mass and isotopic pattern with theoretical ones: lower is the mS, better is the annotation. RT = retention time, VIP =Variable Importance in Projection or marker.

| Features                                                                                                                                    | m/z      | RT (s) | molecular formula                              | error (ppm) | mS   | ion                               | annotation     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|--------|------------------------------------------------|-------------|------|-----------------------------------|----------------|
| <i>Chemomarkers of pH conditions found in the molecular network (* including two common markers between in situ and ex situ t0 samples)</i> |          |        |                                                |             |      |                                   |                |
| M299T504                                                                                                                                    | 299.2367 | 504    | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O              | -2.7        | 28.5 | [M+H] <sup>+</sup>                |                |
| M316T583                                                                                                                                    | 316.2634 | 583    | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O              | 1.5         | 7.6  | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> |                |
| M317T456                                                                                                                                    | 317.2474 | 456    | C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> | 0.2         | 5.9  | [M+H] <sup>+</sup>                |                |
| M318T600                                                                                                                                    | 318.2786 | 600    | C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O              | -0.9        | 13.8 | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> |                |
| M334T515                                                                                                                                    | 334.2740 | 515    | C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> | 0           | 6.3  | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | Lobophorenol B |
| M335T506                                                                                                                                    | 335.1971 | 506    | C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> | 6.1         | 37.5 | [M+Na] <sup>+</sup>               |                |
| M336T524                                                                                                                                    | 336.2896 | 524    | C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> | 0.4         | 14.0 | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | Lobophorenol C |
| M340T566                                                                                                                                    | 340.2634 | 566    | C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O              | -0.8        | 31.9 | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> |                |
| M353T457                                                                                                                                    | 353.2086 | 457    | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> | 0.1         | 56.0 | [M+Na] <sup>+</sup>               |                |
| <i>Common chemomarkers of pH conditions between in situ and ex situ experiments</i>                                                         |          |        |                                                |             |      |                                   |                |
| <i>in situ / ex situ t0</i>                                                                                                                 |          |        |                                                |             |      |                                   |                |
| M345T499                                                                                                                                    | 345.2422 | 499    | C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub> | -1          | 35.5 | [M+H] <sup>+</sup>                |                |
| M363T470                                                                                                                                    | 363.2530 | 470    | C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub> | 2.2         | 21.1 | [M+H] <sup>+</sup>                |                |
| M438T478                                                                                                                                    | 438.2850 | 478    | C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub> | 0.1         | 16.0 | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> |                |
| M459T477                                                                                                                                    | 459.2166 | 477    | C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> | 3.4         | 71.7 | [M+H] <sup>+</sup>                |                |
| <i>in situ / ex situ t13</i>                                                                                                                |          |        |                                                |             |      |                                   |                |
| M344T543                                                                                                                                    | 344.3159 | 543    | C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub> | -2.9        | 17.6 | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> |                |
| M555T641                                                                                                                                    | 555.4660 | 641    | -                                              | -           | -    | -                                 |                |
| M598T638                                                                                                                                    | 598.4889 | 638    | -                                              | -           | -    | -                                 |                |
| M644T635                                                                                                                                    | 643.5192 | 635    | -                                              | -           | -    | -                                 |                |

## 4. Discussion

Fewer attention has been paid to fleshy macroalgae regarding the impact of ocean acidification (OA) compared to calcifying organisms, especially corals, in tropical marine ecosystems (*e.g.* Houlbr  que *et al.*, 2015; Tambutt   *et al.*, 2015). Because of their physico-chemical nature, calcifying and fleshy macroalgae may respond differently to OA, thus leading to different consequences in tropical ecosystems. Moreover,

macroalgae are confronted to diverse threats from pathogens (bacteria, fungi or viruses), and there is a growing body of evidence supporting the fact that they become more susceptible to these pathogens under environmental stressors like climate change (Egan *et al.* 2014; Kumar *et al.* 2016a). The goal of this current work was to broaden insights into the effect of seawater acidification on the metabolic fingerprinting of the common fleshy tropical macroalgae *Lobophora rosacea*.

The comparison between the metabolome of *L. rosacea* specimens collected in the naturally low pH site (Bouraké) and in the ambient pH site (Ricaudy) highlighted a significant metabotype differentiation between these two locations, as between specimens at low *versus* ambient pH in the aquaria experiment. Metabolic changes occurring between ambient and low pH conditions seemed to be mostly quantitative, supporting the hypothesis of an algal metabolic plasticity allowing resistance to a low pH. Contrary to the *in situ* experiment, where chemical acclimatization may have occurred gradually over time, the aquaria experiment supports rapid metabolomic changes in *L. rosacea* in response to a rapid pH decrease. Some chemomarkers linked to pH condition could be identified after both approaches, among which 59 % were overexpressed at ambient pH while the other 41 % were overexpressed at low pH. Several chemomarkers appeared to be common between *in* and *ex situ* samples, but none were common between *ex situ* t0 and t14 samples. This supports the implication of different metabolites according to time of exposure to a low pH. The chemomarkers identified represent only a proportion of the metabolomic changes occurring in *L. rosacea* in response to a low pH, as only a part of the metabolome is studied (the methanol fraction). Some other chemical variations in the polar (water fraction) and apolar fractions (dichloromethane) may occur. Metabolites annotation is often limited for marine organisms, especially macroalgae, with the lack of metabolomic reference data, but we were able to annotate a few compounds and give some insights on the metabolomic pathways potentially involved in *L. rosacea* when facing a pH decrease.

Among chemomarkers overexpressed in ambient pH condition, we identified lobophorenols B and C, polyunsaturated alcohols previously isolated in *L. rosacea* (Vieira *et al.* 2016), and other polyunsaturated metabolites. The latter likely being

related to lobophorenols B, with mainly 21 carbons and one to three oxygen atoms. Two were common with the *ex situ* t0 samples at ambient pH, including lobophorenol C. While detected in low pH condition, lobophorenols and their derivatives were significantly under-expressed. Except their bleaching capacity on the coral *Acropora muricata* highlighted by *in situ* bioassays (Vieira *et al.* 2016), the function of lobophorenols in the alga is still unknown. Similar C21 apolar compounds, with the terminal vinylic protons, but no oxygen atom, have been reported in the brown algae *Fucus vesiculosus* (Hallsall & Hills 1972). In low pH condition, some putative C16-C20 polyunsaturated oxygenated fatty acid derivatives were overexpressed, as well as some C20-C24 at ambient pH. Lobophorenols and C21 relatives could be derived from the corresponding C22 polyunsaturated fatty acids. Fatty acids present numerous essential roles. They are involved in membrane structure fluidity, cell maintenance and cell signaling but they also play crucial roles in adaptation mechanisms to diverse biotic and abiotic stresses (Dunn *et al.* 2012; Kumar *et al.* 2016a). Lobophorenols and the likely related C21 metabolites being depleted in low pH condition, we could hypothesize that the metabolic pathways involving lobophorenols is under-activated in a low pH environment or that lobophorenols are transformed in other metabolites. This result could be related to the optimal defense theory (Cronin, 2001; Ivanisevic *et al.*, 2011); to maintain primary biological functions, like homeostasis maintenance or growth, less energy is allocated to the synthesis of specialized metabolites in a stressful environment.

Other works on macroalgae and phytoplankton showed the effect of variations in CO<sub>2</sub> concentrations on lipid contents (Riebesell *et al.* 2000; Gordillo *et al.* 2016). In a recent similar metabolomic-based study on the coral *Pocillopora damicornis*, a depletion in fatty acids (involved in energy storage, cell membrane components and cell signaling) was also observed at low pH and high temperature (Sogin *et al.* 2016). Other biomarkers linked to pH condition were identified in our study but remain unknown. This limited annotation of metabolites narrows our comprehension of the mechanisms and biochemical regulations involved in response to seawater acidification. While metabolomics approach may be successfully applied to detect environmental stress in marine organisms, it is yet constrained by the lack of specific marine databases,

especially when working on non-model organisms. Previous works already raised this issue (e.g. Greff *et al.*, 2017; Sogin *et al.*, 2016), which still remains the greatest challenge in global metabolomics studies (Kumar *et al.*, 2016).

As seen in C<sub>3</sub>-terrestrial plants, a CO<sub>2</sub> increase could lead to changes in allelochemical production in macroalgae (e.g. Swanson and Fox, 2007; Bidart Bouzat and Adebobola, 2008). While the response to elevated CO<sub>2</sub> concentrations seems to be species-specific (Swanson *et al.* 2007; Arnold *et al.* 2012), changes in phenolic compounds involved in several functions (e.g. deterrence, antimicrobial, UV protector or cell wall structure, Gutow *et al.*, 2014) have been observed in marine plants and macroalgae (e.g. Betancor *et al.*, 2014; Del Monaco *et al.*, 2017). In the present work, we did not identify any phenolic compounds, yet *Lobophora* is known to produce some (e.g. Chkhikvishvili and Ramazanov, 2000; Vieira *et al.*, 2015). Then, it will be interesting to further investigate this chemical group in response to seawater acidification. An increase of CO<sub>2</sub> concentrations could also disturb biochemical contents of macroalgae, notably C:N ratio, which could not only change the production of specialized metabolites, but also alter the nutritional quality for herbivores and their palatability (Gutow *et al.*, 2014; Swanson and Fox, 2007; Arnold *et al.*, 1995; Van Alstyne *et al.*, 2009). Herbivores play important roles in the control of algal proliferation and may influence algal assemblages. In this aspect, it would also be important to understand how herbivores could adapt to potential nutritional changes.

Ocean acidification is a growing threat to coral reefs, reducing coral growth rates, but also calcareous algae and others calcifying organisms (Anthony *et al.* 2008; Diaz-Pulido *et al.*, 2011; Ragazzola *et al.*, 2012). Reef-building corals are particularly at risk because they suffer from other stressors like rising sea surface temperature (Rodolfo-Metalpa *et al.* 2011). Because coral-algal competition for space is an important process for the dynamic of coral reefs, understanding both the fate of corals and algae under global change is crucial. *Lobophora* has increased in abundance on many degraded reefs, rising concerns on its potential deleterious effects on corals (Nugues & Bak 2008; Fricke *et al.* 2011). Our study showed that *L. rosacea* can colonize habitat with a fluctuating low

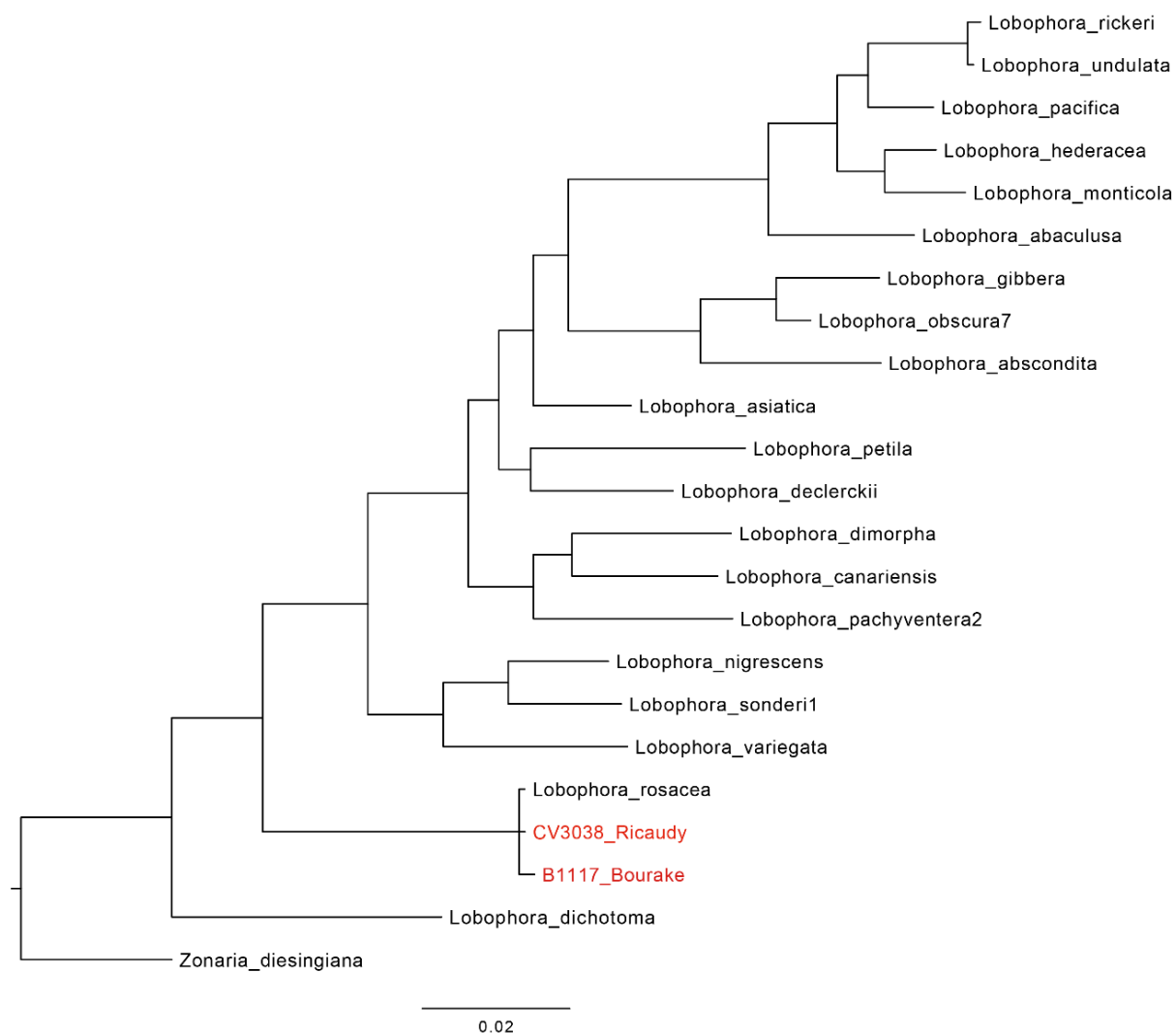
pH. Moreover, *Lobophora* possesses a C3 photosynthetic pathway. Therefore, its capacity to fix CO<sub>2</sub> increases linearly with the quantity of available CO<sub>2</sub>, until the capacity of the Rubisco enzyme becomes saturated (Holbrook *et al.* 1988; Koch *et al.*, 2013; Yamori *et al.*, 2014). As seen in terrestrial C3 communities, a CO<sub>2</sub> concentration increase may benefit C3 non-calcareous algae (Diaz-Pulido *et al.* 2011; Koch *et al.* 2013). *Lobophora* may thus potentially outcompete corals in the near future, therefore leading to coral-algal shifts in tropical reef-associated ecosystems. In a 8-weeks experiment, Diaz-Pulido *et al.* (2011) demonstrated that OA enhances the ability of *Lobophora papenfusii* to kill and potentially win the competition with the coral *Acropora intermedia* via chemical or biological effect. In our study, no significant difference in bioactivity was recorded *in situ* between *L. rosacea* in ambient *vs.* low pH. This means that lobophorenols B and C, which are significantly depleted at low pH, are not responsible for the bioactivity in the extracts, while they can be allelopathic against corals when isolated (Vieira *et al.* 2016). It is also possible that their lower bioactivity is compensated by other compounds. However, results must be nuanced as bioactivity has only been assessed for methanol extracts. As seen in other works, lipidic and hydrophobic compounds can be involved in chemical mediation with other organisms, notably corals (Rasher *et al.* 2011; Andras *et al.* 2012; Del Monaco *et al.* 2017). Thus, further investigation will be needed, coupled with coral-algal interaction experiments (e.g. Del Monaco *et al.* 2017; Greff *et al.* 2017a), to evaluate the potential impact of *L. rosacea* on corals in the context of ocean acidification. Moreover, it is worth noting that *L. rosacea* has not been found in close interaction with corals in the Bouraké site in New Caledonia.

## Conclusion

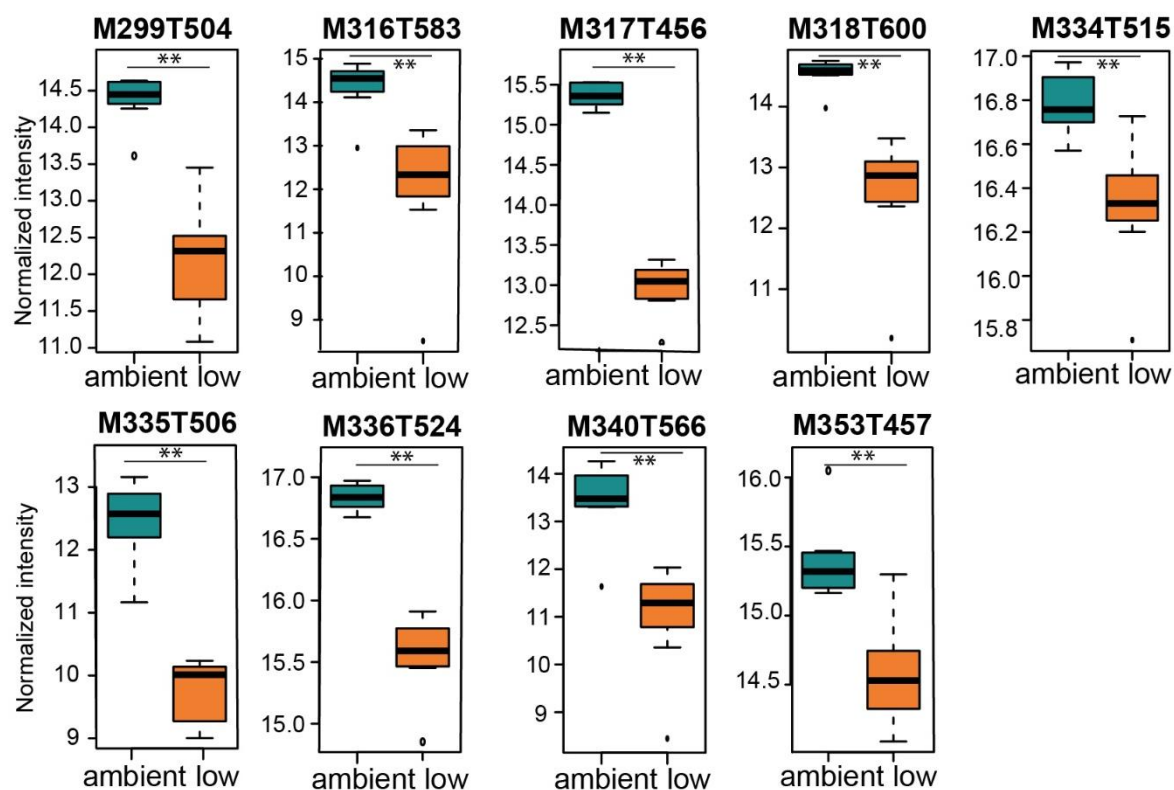
This first metabolomic-based study on a fleshy macroalgae in response to ocean acidification highlighted quantitative metabolomic changes induced by a pH decrease, both in a natural acidified habitat and controlled experiment. A natural acidified site like Bouraké offered a unique opportunity to investigate the effects of ocean acidification on macroalgae and other marine organisms by procuring a “natural

laboratory". *Lobophora rosacea* found in Bouraké is acclimated to living at a fluctuating low pH. Among chemomarkers linked to pH conditions, we found lobophorenols B and C and several related C21 oxygenated polyunsaturated fatty acids derivatives, depleted in acidified conditions, suggesting a down-regulation of metabolic pathways involving lobophorenols in a low pH environment. Our study provides targets for future work aiming at better understanding the metabolic pathways involved in *L. rosacea* in response to OA. A lipid-profiling would be an interesting approach to further explore these aspects. We also faced the limitations in metabolites identification when working on non-model macroalgae. While no difference in macroalgal bioactivity was observed between ambient and low pH in methanol extracts, further investigation will be needed, notably in apolar extracts and via biological assays, to further investigate coral-algal interactions in the context of OA. Because global change goes along with an increase of sea surface temperature, this parameter could potentially influence the metabolomic response of marine macroalgae together with ocean acidification. The combination of these two threats on marine ecosystems should further be investigated to assess its consequences on the macroalgal metabolome. Because metabolites are involved in many functions in algae, like deterrence or homeostasis, the study of the metabolome, is an interesting approach for further work on the effects of climate change on macroalgae. Chemistry is highly linked to biology and can provide important information to better understand and predict how marine organisms, not only macroalgae, will adapt or evolve in our future ocean.

## Supplementary information



**Figure S23.** Phylogenetic tree reconstruction of 20 *Lobophora* species using Bayesian inference (BI) implemented in MrBayes v3.2, using the chloroplast marker *psbA*. Voucher numbers of *L. rosacea* collected at Ricaudy and Bouraké are indicated.



**Figure S24.** Box plots of the chemomarkers linked to seawater pH condition obtained from metabolomic fingerprints of *Lobophora rosacea* sampled at Ricaudy (control pH) vs Bouraké (low pH). Ion intensities of chemomarkers are expressed as mean normalized intensities  $\pm$  SD (log-transformed data,  $n = 8$ ). Differences between ion intensities for control vs low pH conditions were tested with Mann-Whitney tests. \*\*:  $p < 0.001$ .

**Table S17.** Seawater temperature and pH measured in *ambient* and low pH tanks from t0 to t14 for aquaria experiment. Carbonate chemistry parameters were calculated with CO2Sys (Lewis & Wallace, 1998) using mean total alkalinity (TA), salinity (35), temperature (T) and pH.

| days                                     | T<br>(°C)  | TA<br>( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ ) | pH          | pCO <sub>2</sub><br>( $\mu\text{atm}$ ) | HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup><br>( $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ ) | CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup><br>( $\mu\text{mol. kg}^{-1}$ ) | CO <sub>2</sub><br>( $\mu\text{mol. kg}^{-1}$ ) | $\Omega\text{Ca}$ | $\Omega\text{Ar}$ |
|------------------------------------------|------------|-----------------------------------|-------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
| <i>Ambient pH tanks</i>                  |            |                                   |             |                                         |                                                              |                                                               |                                                 |                   |                   |
| 0 (t0)                                   | 24.0 ± 0.1 | 2328 ± 4                          | 8.14 ± 0.02 | 311 ± 17                                | 1723 ± 22                                                    | 246 ± 8                                                       | 9 ± 1                                           | 5.92 ± 0.19       | 3.89 ± 0.13       |
| 1                                        | 23.9 ± 0.1 | 2337 ± 6                          | 8.15 ± 0.01 | 304 ± 11                                | 1721 ± 16                                                    | 251 ± 4                                                       | 9                                               | 6.03 ± 0.1        | 3.96 ± 0.06       |
| 2                                        | 23.8 ± 0.1 | 2337 ± 6                          | 8.16 ± 0.01 | 289 ± 10                                | 1704 ± 16                                                    | 258 ± 5                                                       | 8                                               | 6.19 ± 0.11       | 4.07 ± 0.07       |
| 3                                        | 23.7 ± 0.1 | 2337 ± 6                          | 8.13 ± 0.01 | 316 ± 10                                | 1739 ± 14                                                    | 244 ± 4                                                       | 9                                               | 5.85 ± 0.1        | 3.84 ± 0.07       |
| 4                                        | 23.7 ± 0.1 | 2345 ± 8                          | 8.15 ± 0.02 | 299 ± 19                                | 1724 ± 25                                                    | 253 ± 11                                                      | 9 ± 1                                           | 6.09 ± 0.26       | 4.00 ± 0.17       |
| 5                                        | 23.6 ± 0.1 | 2351 ± 5                          | 8.13 ± 0.03 | 317 ± 27                                | 1749 ± 30                                                    | 246 ± 13                                                      | 9 ± 1                                           | 5.90 ± 0.31       | 3.88 ± 0.20       |
| 6                                        | 23.8 ± 0.1 | 2349 ± 7                          | 8.11 ± 0.02 | 343 ± 17                                | 1773 ± 21                                                    | 235 ± 8                                                       | 10 ± 1                                          | 5.65 ± 0.18       | 3.71 ± 0.12       |
| 7                                        | 24.0 ± 0.3 | 2347 ± 9                          | 8.11 ± 0.04 | 338 ± 43                                | 1763 ± 47                                                    | 238 ± 19                                                      | 10 ± 1                                          | 5.73 ± 0.46       | 3.76 ± 0.31       |
| 8                                        | 24.3 ± 0.4 | 2342 ± 2                          | 8.14 ± 0.07 | 314 ± 71                                | 1723 ± 81                                                    | 253 ± 34                                                      | 9 ± 2                                           | 6.07 ± 0.81       | 4.00 ± 0.54       |
| 9                                        | 23.6 ± 0.1 | 2342 ± 2                          | 8.09 ± 0.01 | 353 ± 8                                 | 1782 ± 7                                                     | 228 ± 3                                                       | 10                                              | 5.49 ± 0.07       | 3.60 ± 0.05       |
| 10                                       | 24.3 ± 0.2 | 2337 ± 7                          | 8.18 ± 0.04 | 273 ± 31                                | 1675 ± 50                                                    | 270 ± 17                                                      | 8 ± 1                                           | 6.49 ± 0.41       | 4.27 ± 0.27       |
| 11                                       | 23.6       | 2341 ± 4                          | 8.09 ± 0.01 | 359 ± 12                                | 1787 ± 9                                                     | 226 ± 5                                                       | 11                                              | 5.43 ± 0.12       | 3.56 ± 0.08       |
| 12                                       | 23.5 ± 0.1 | 2345 ± 9                          | 8.10 ± 0.01 | 345 ± 11                                | 1777 ± 8                                                     | 232 ± 6                                                       | 10                                              | 5.57 ± 0.14       | 3.66 ± 0.09       |
| 13 (t14)                                 | 24.1 ± 0.1 | 2345 ± 9                          | 8.10 ± 0.01 | 346 ± 7                                 | 1770 ± 10                                                    | 235 ± 2                                                       | 10                                              | 5.64 ± 0.06       | 3.71 ± 0.04       |
| <i>Acidified condition: tanks pH 7.7</i> |            |                                   |             |                                         |                                                              |                                                               |                                                 |                   |                   |
| 0 (t0)                                   | 24.0 ± 0.1 | 2333 ± 1                          | 7.66 ± 0.04 | 1135 ± 126                              | 2089 ± 24                                                    | 100 ± 9                                                       | 33 ± 4                                          | 2.40 ± 0.22       | 1.58 ± 0.15       |
| 1                                        | 24.1 ± 0.1 | 2335 ± 4                          | 7.66 ± 0.03 | 1118 ± 71                               | 2088 ± 10                                                    | 101 ± 5                                                       | 32 ± 2                                          | 2.43 ± 0.13       | 1.60 ± 0.08       |
| 2                                        | 24.0 ± 0.1 | 2335 ± 4                          | 7.66 ± 0.03 | 1131 ± 69                               | 2091 ± 9                                                     | 100 ± 5                                                       | 33 ± 2                                          | 2.40 ± 0.12       | 1.58 ± 0.08       |

|          |            |           |             |            |           |          |        |             |             |
|----------|------------|-----------|-------------|------------|-----------|----------|--------|-------------|-------------|
| 3        | 24.0 ± 0.2 | 2335 ± 4  | 7.63 ± 0.02 | 1217 ± 63  | 2105 ± 9  | 94 ± 5   | 35 ± 2 | 2.26 ± 0.12 | 1.48 ± 0.08 |
| 4        | 23.6 ± 0.1 | 2337 ± 9  | 7.62 ± 0.03 | 1248 ± 97  | 2114 ± 9  | 91 ± 7   | 37 ± 3 | 2.19 ± 0.16 | 1.44 ± 0.11 |
| 5        | 23.9 ± 0.1 | 2348 ± 12 | 7.63 ± 0.03 | 1214 ± 105 | 2116 ± 19 | 95 ± 7   | 35 ± 3 | 2.28 ± 0.17 | 1.50 ± 0.11 |
| 6        | 23.9 ± 0.1 | 2340 ± 10 | 7.65 ± 0.04 | 1176 ± 106 | 2103 ± 15 | 97 ± 8   | 34 ± 3 | 2.34 ± 0.2  | 1.53 ± 0.13 |
| 7        | 24.5 ± 0.3 | 2333 ± 10 | 7.67 ± 0.03 | 1105 ± 83  | 2079 ± 11 | 104 ± 8  | 32 ± 3 | 2.50 ± 0.2  | 1.64 ± 0.13 |
| 8        | 24.6 ± 0.1 | 2335 ± 9  | 7.63 ± 0.06 | 1225 ± 175 | 2100 ± 19 | 96 ± 12  | 35 ± 5 | 2.32 ± 0.28 | 1.53 ± 0.18 |
| 9        | 23.8 ± 0.1 | 2335 ± 9  | 7.71 ± 0.06 | 993 ± 138  | 2064 ± 30 | 111 ± 13 | 29 ± 4 | 2.67 ± 0.31 | 1.75 ± 0.20 |
| 10       | 24.1 ± 0.3 | 2337 ± 12 | 7.68 ± 0.01 | 1081 ± 27  | 2083 ± 13 | 104 ± 1  | 31 ± 1 | 2.50 ± 0.02 | 1.65 ± 0.01 |
| 11       | 23.8 ± 0.1 | 2342 ± 12 | 7.64 ± 0.02 | 1182 ± 49  | 2107 ± 10 | 96 ± 4   | 35 ± 1 | 2.31 ± 0.09 | 1.52 ± 0.06 |
| 12       | 23.6 ± 0.1 | 2347 ± 13 | 7.66 ± 0.03 | 1134 ± 87  | 2104 ± 4  | 99 ± 7   | 33 ± 3 | 2.39 ± 0.17 | 1.57 ± 0.11 |
| 13 (t14) | 24.2 ± 0.1 | 2347 ± 13 | 7.65 ± 0.03 | 1163 ± 91  | 2104 ± 25 | 99 ± 6   | 34 ± 3 | 2.39 ± 0.13 | 1.57 ± 0.09 |

### *Seawater carbonate chemistry*

Sixty mL of seawater was collected twice a week from each aquarium, filtered at 0.45 µm (GF/F Whatman) and stored in the dark at 4°C to avoid biological alteration. The pH was measured at 0.1 ml increments of 0.01 N HCl at 25°C using a Metrohm titration system (848 Titrino Plus). For each sample, three 20 mL sub-samples were analyzed. Total alkalinity ( $A_T$ ) was calculated from the Gran function applied to pH variations from 4.2 to 3.0 as mEq L<sup>-1</sup> from the slope of the HCl volume *versus* pH curve. Data were corrected by titrations of  $A_T$  standards provided by A.G. Dickson. For each experimental treatment, the parameters of the carbonate system [ $p\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , and saturation state of aragonite ( $\Omega_{\text{arag}}$ )] were calculated from  $\text{pH}_T$ , mean  $A_T$ , temperature and mean salinity (36) using the free-access CO2SYS package (Pierrot and Wallace 2006).

**Table S18.** *Lobophora rosacea* ions responsible for the discrimination between low pH (Bouraké) and ambient pH conditions (Ricaudy). RT = retention time. The mSigma (mS) value is a measure for the goodness of fit between experimental mass and isotopic pattern with theoretical ones: lower is the mS, better is the annotation

| name                        | m/z       | RT  | err ppm | mS    | ion                               | ion formula                                                   |
|-----------------------------|-----------|-----|---------|-------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <i>low pH - Bouraké</i>     |           |     |         |       |                                   |                                                               |
| M284T395                    | 284.1857  | 395 | 3.4     | 8.4   | [M+H] <sup>+</sup>                | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>4</sub>               |
| M305T395                    | 305.1148  | 395 | -4.6    | 101.9 | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| M344T543                    | 344.3157  | 543 | -2.9    | 17.6  | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> NO <sub>3</sub>               |
| M378T646                    | 378.3576  | 646 | -       | -     | -                                 | -                                                             |
| M496T514                    | 496.2906  | 514 | 2.8     | 20.5  | [M+H] <sup>+</sup>                | C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> NO <sub>8</sub>               |
| M505T476                    | 505.2539  | 476 | -       | -     | -                                 | -                                                             |
| M536T527                    | 536.3797  | 527 | -       | -     | -                                 | -                                                             |
| M537T526                    | 537.3824  | 526 | 1       | 6.8   | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | C <sub>27</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>9</sub>               |
| M555T641                    | 555.466   | 641 | -       | -     | -                                 | -                                                             |
| M563T492                    | 563.3186  | 492 | -       | -     | -                                 | -                                                             |
| M579T479                    | 579.2812  | 479 | -       | -     | -                                 | -                                                             |
| M589T504                    | 589.24459 | 504 | -       | -     | -                                 | -                                                             |
| M598T638                    | 598.4889  | 638 | -       | -     | -                                 | -                                                             |
| M599T475                    | 599.3179  | 475 | -       | -     | -                                 | -                                                             |
| M600T488                    | 600.34155 | 488 | -       | -     | -                                 | -                                                             |
| M605T566                    | 605.2397  | 566 | -0.3    | 55.2  | H <sup>+</sup>                    | C <sub>35</sub> H <sub>33</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> |
| M644T635                    | 643.5192  | 635 | -       | -     | -                                 | -                                                             |
| <i>ambient pH - Ricaudy</i> |           |     |         |       |                                   |                                                               |
| M119T599                    | 119.0855  | 599 | -       | -     | -                                 | -                                                             |
| M299T504                    | 299.2367  | 504 | -2.7    | 28.5  | [M+H] <sup>+</sup>                | C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> O                             |
| M316T455                    | 316.2351  | 455 | 0.4     | 325.1 | [M+H] <sup>+</sup>                | C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>                |
| M316T583                    | 316.2634  | 583 | 1.5     | 7.6   | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> NO                            |
| M317T456                    | 317.2474  | 456 | 0.2     | 5.9   | [M+H] <sup>+</sup>                | C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> O <sub>2</sub>                |
| M318T600                    | 318.2786  | 600 | -0.9    | 13.8  | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> NO                            |
| M334T515                    | 334.274   | 515 | 0       | 6.3   | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> NO <sub>2</sub>               |
| M335T506                    | 335.1971  | 506 | 6.1     | 37.5  | [M+Na] <sup>+</sup>               | C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> NaO <sub>2</sub>              |
| M336T524                    | 336.2896  | 524 | 0.4     | 14    | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>2</sub>               |
| M340T566                    | 340.2634  | 566 | -0.8    | 31.9  | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> NO                            |
| M343T551                    | 343.2606  | 551 | 6.9     | 60.1  | [M+H] <sup>+</sup>                | C <sub>23</sub> H <sub>35</sub> O <sub>2</sub>                |
| M345T499                    | 345.2422  | 499 | -1      | 35.5  | [M+H] <sup>+</sup>                | C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> O <sub>3</sub>                |
| M345T495                    | 345.2436  | 495 | -0.6    | 11.5  | [M+H] <sup>+</sup>                | C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> O <sub>3</sub>                |
| M353T457                    | 353.2086  | 457 | 0.1     | 56    | [M+Na] <sup>+</sup>               | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> NaO <sub>3</sub>              |
| M355T463                    | 355.2242  | 463 | 2.2     | 171.7 | [M+Na] <sup>+</sup>               | C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> NaO <sub>3</sub>              |
| M361T478                    | 361.2373  | 478 | -1.7    | 59.8  | [M+H] <sup>+</sup>                | C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> O <sub>4</sub>                |
| M361T450_2                  | 361.2557  | 450 | -8.2    | 20.6  | [M+H] <sup>+</sup>                | C <sub>26</sub> H <sub>33</sub> O                             |
| M363T470                    | 363.253   | 470 | 2.2     | 21.1  | [M+H] <sup>+</sup>                | C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> O <sub>4</sub>                |
| M368T484                    | 368.2347  | 484 | -4.4    | 249.1 | [M+H] <sup>+</sup>                | C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> |
| M373T485                    | 373.1904  | 485 | -       | -     | -                                 | -                                                             |

|          |          |     |     |       |                                     |                                                               |
|----------|----------|-----|-----|-------|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| M373T456 | 373.2142 | 456 | -   | -     | -                                   | -                                                             |
| M409T437 | 409.2116 | 437 | 3   | 133.8 | H+ / NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ? | C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> |
| M413T449 | 413.183  | 449 | -   | -     | -                                   | -                                                             |
| M438T478 | 438.285  | 478 | 0.1 | 16    | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>   | C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> NO <sub>6</sub>               |
| M459T477 | 459.2119 | 477 | 0.1 | 16    | [M+H] <sup>+</sup>                  | C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>                |
| M496T464 | 496.3632 | 464 | 1.6 | 44.9  | H+ / NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ? | C <sub>28</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>6</sub>               |
| M497T464 | 497.3662 | 464 | -   | -     | -                                   | -                                                             |
| M516T368 | 516.3169 | 368 | -   | -     | -                                   | -                                                             |
| M520T458 | 520.3635 | 458 | 2.2 | 37.2  | H+ / NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ? | C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>6</sub>               |
| M526T491 | 526.293  | 491 | 2.4 | 81.9  | H+ / NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ? | C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> NO <sub>4</sub>               |
| M527T488 | 527.2967 | 488 | 2.4 | 81.9  | H+ / NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ? | C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> NO <sub>4</sub>               |
| M528T490 | 528.3543 | 490 | -   | -     | -                                   | -                                                             |
| M536T404 | 536.3714 | 404 | -   | -     | -                                   | -                                                             |
| M550T593 | 550.4315 | 593 | -   | -     | -                                   | -                                                             |
| M578T788 | 578.4769 | 788 | -   | -     | -                                   | -                                                             |
| M596T496 | 596.3308 | 496 | -   | -     | -                                   | -                                                             |
| M602T506 | 602.4615 | 506 | -   | -     | -                                   | -                                                             |
| M625T557 | 625.2655 | 557 | 0.7 | 62.7  | [M+H] <sup>+</sup>                  | C <sub>35</sub> H <sub>37</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> |
| M815T705 | 814.5459 | 705 | -   | -     | -                                   | -                                                             |

**Table S19.** *Lobophora rosacea* ions responsible for the discrimination between low pH and ambient pH conditions, at the beginning (t0) and the end (t14) of the aquaria experiment. RT = retention time. The mSigma (mS) value is a measure for the goodness of fit between experimental mass and isotopic pattern with theoretical ones: lower is the mS, better is the annotation

| name                           | m/z      | RT  | err ppm | mS    | ion                                | ion formula                                                   |
|--------------------------------|----------|-----|---------|-------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <i>t0 samples - low pH</i>     |          |     |         |       |                                    |                                                               |
| M401T324                       | 401.262  | 324 | -       | -     | -                                  | -                                                             |
| M430T455                       | 430.2023 | 455 | -1.7    | 53.5  | H+/ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ? | C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>4</sub>               |
| M432T461                       | 432.2178 | 461 |         |       |                                    |                                                               |
| M467T329                       | 467.3016 | 329 | -       | -     | -                                  | -                                                             |
| M511T332                       | 511.3277 | 332 | -       | -     | -                                  | -                                                             |
| <i>t0 samples - ambient pH</i> |          |     |         |       |                                    |                                                               |
| M318T600                       | 318.2786 | 600 | -0.9    | 13.8  | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>  | C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> NO                            |
| M331T516                       | 331.2089 | 516 | -       | -     | -                                  | -                                                             |
| M336T524                       | 336.2896 | 524 | 0.4     | 14    | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>  | C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>2</sub>               |
| M345T499                       | 345.2422 | 499 | -1      | 35.5  | [M+H] <sup>+</sup>                 | C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> O <sub>3</sub>                |
| M363T470                       | 363.253  | 470 | 2.2     | 21.1  | [M+H] <sup>+</sup>                 | C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> O <sub>4</sub>                |
| M438T478                       | 438.285  | 478 | 0.1     | 16    | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>  | C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> NO <sub>6</sub>               |
| M459T477                       | 459.2119 | 477 | 0.1     | 16    | [M+H] <sup>+</sup>                 | C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>                |
| <i>t14 samples - low pH</i>    |          |     |         |       |                                    |                                                               |
| M288T454                       | 288.2533 | 454 | 0.2     | n.a   | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>  | C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> NO <sub>3</sub>               |
| M316T496                       | 316.2846 | 496 | -0.2    | 40.6  | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>  | C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>3</sub>               |
| M344T543                       | 344.3157 | 543 | -2.9    | 17.6  | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>  | C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> NO <sub>3</sub>               |
| M439T574                       | 439.3826 | 574 | 2.2     | 42.3  | H+/ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ? | C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> |
| M510T644                       | 510.4366 | 644 | -1.6    | 125.6 | H+/ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ? | C <sub>28</sub> H <sub>56</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> |
| M527T570                       | 527.435  | 570 | -       | -     | -                                  | -                                                             |
| M555T641                       | 555.466  | 641 | -       | -     | -                                  | -                                                             |
| M598T638                       | 598.4889 | 638 | -       | -     | -                                  | -                                                             |
| M644T635                       | 643.5192 | 635 | -       | -     | -                                  | -                                                             |
| M659T564                       | 658.5103 | 564 | -       | -     | -                                  | -                                                             |

## References

- Andras, T.D., Alexander, T.S., Gahlana, A., Parry, R.M., Fernandez, F.M., Kubanek, J., *et al.* (2012). Seaweed allelopathy against coral: surface distribution of a seaweed secondary metabolite by imaging mass spectrometry. *J. Chem. Ecol.*, 38, 1203–14.
- Anthony, K.R.N., Kline, D.I., Diaz-Pulido, G., Dove, S. & Hoegh-Guldberg, O. (2008). Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105, 17442–17446.
- Arnold, T., Mealey, C., Leahey, H., Miller, A.W., Hall-Spencer, J.M., Milazzo, M., *et al.* (2012). Ocean Acidification and the Loss of Phenolic Substances in Marine Plants. *PLoS One*, 7,

- Arnold, T.M., Tanner, C.E. & Hatch, W.I. (1995). Phenotypic variation in polyphenolic content of the tropical brown alga *Lobophora variegata* as a function of nitrogen availability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 123, 177–184.
- Baggini, C., Salomidi, M., Voutsinas, E., Bray, L., Krasakopoulou, E. & Hall-Spencer, J.M. (2014). Seasonality affects macroalgal community response to increases in pCO<sub>2</sub>. *PLoS One*, 9, 1–13.
- Belghit, I., Rasinger, J.D., Heesch, S., Biancarosa, I., Liland, N., Torstensen, B., *et al.* (2017). In-depth metabolic profiling of marine macroalgae confirms strong biochemical differences between brown, red and green algae. *Algal Res.*, 26, 240–249.
- Betancor, S., Tuya, F., Gil-Díaz, T., Figueroa, F.L. & Haroun, R. (2014). Effects of a submarine eruption on the performance of two brown seaweeds. *J. Sea Res.*, 87, 68–78.
- Bidart Bouzat, M. & Adebobola, I.N. (2008). Global change effects on plant chemical defenses against insect herbivores. *J. Integr. Plant*, 50, 1339–1354.
- Bidart-Bouzat, M.G., Mithen, R. & Berenbaum, M.R. (2005). Elevated CO<sub>2</sub> influences herbivory-induced defense responses of *Arabidopsis thaliana*. *Oecologia*, 145, 415–424.
- Böcker, S. & Dührkop, K. (2016). Fragmentation trees reloaded. *J. Cheminform.*, 8, 1–26.
- Britton, D., Cornwall, C.E., Revill, A.T., Hurd, C.L. & Johnson, C.R. (2016). Ocean acidification reverses the positive effects of seawater pH fluctuations on growth and photosynthesis of the habitat-forming kelp, *Ecklonia radiata*. *Sci. Rep.*, 6, 1–10.
- Camp, E.F., Nitschke, M.R., Rodolfo-Metalpa, R., Houlbreque, F., Gardner, S.G., Smith, D.J., *et al.* (2017). Reef-building corals thrive within hot-acidified and deoxygenated waters. *Sci. Rep.*, 7, 1–9.
- Chkhikvishvili, I.D. & Ramazanov, Z.M. (2000). Phenolic substances of brown algae and their antioxidant activity. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 36, 289–291.
- Coelho, F.J.R.C., Cleary, D.F.R., Rocha, R.J.M., Calado, R., Castanheira, J.M., Rocha, S.M., *et al.* (2015). Unraveling the interactive effects of climate change and oil contamination on laboratory-simulated estuarine benthic communities. *Glob. Chang. Biol.*, 21, 1871–1886.
- Collins, M., Knutti, R., Arblaster, J., Dufresne, J.-L., Fichet, T., Friedlingstein, P., *et al.* (2013). Long-term Climate Change: Projections, Commitments and Irreversibility. *Clim. Chang. 2013 Phys. Sci. Basis. Contrib. Work. Gr. I to Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang.*, 1029–1136.
- Cornwall, C.E., Revill, A.T., Hall-Spencer, J.M., Milazzo, M., Raven, J.A. & Hurd, C.L. (2017). Inorganic carbon physiology underpins macroalgal responses to elevated CO<sub>2</sub>. *Sci. Rep.*, 7, 1–12.
- Del Monaco, C., Hay, M.E., Gartrell, P., Mumby, P.J. & Diaz-Pulido, G. (2017). Effects of ocean acidification on the potency of macroalgal allelopathy to a common coral. *Sci. Rep.*, 7, 1–10.

- Diaz-Pulido, G., Gouezo, M., Tilbrook, B., Dove, S. & Anthony, K.R.N. (2011). High CO<sub>2</sub> enhances the competitive strength of seaweeds over corals. *Ecol. Lett.*, 14, 156–162.
- Doney, S.C., Ruckelshaus, M., Emmett Duffy, J., Barry, J.P., Chan, F., English, C.A., *et al.* (2012). Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Ann. Rev. Mar. Sci.*, 4, 11–37.
- Dunn, S.R., Thomas, M.C., Nette, G.W. & Dove, S.G. (2012). A Lipidomic Approach to Understanding Free Fatty Acid Lipogenesis Derived from Dissolved Inorganic Carbon within Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *PLoS One*, 7, e46801.
- Egan, S., Fernandes, N.D., Kumar, V., Gardiner, M. & Thomas, T. (2014). Bacterial pathogens, virulence mechanism and host defence in marine macroalgae. *Environ. Microbiol.*, 16, 925–938.
- Ellis, R.P., Spicer, J.I., Byrne, J.J., Sommer, U., Viant, M.R., White, D.A., *et al.* (2014). <sup>1</sup>H NMR metabolomics reveals contrasting response by male and female mussels exposed to reduced seawater pH, increased temperature, and a pathogen. *Environ. Sci. Technol.*, 48, 7044–7052.
- Fabricius, K.E., Langdon, C., Uthicke, S., Humphrey, C., Noonan, S., De'ath, G., *et al.* (2011). Losers and winners in coral reefs acclimatized to elevated carbon dioxide concentrations. *Nat. Clim. Chang.*, 1, 165–169.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.*, 48, 155–171.
- Fricke, A., Titlyanova, T. V., Nugues, M.M. & Bischof, K. (2011). Depth-related variation in epiphytic communities growing on the brown alga *Lobophora variegata* in a Caribbean coral reef. *Coral Reefs*, 30, 967–973.
- Gattuso, J.P., Magnan, A., Billé, R., Cheung, W.W.L., Howes, E.L., Joos, F., *et al.* (2015). Contrasting futures for ocean and society from different anthropogenic CO<sub>2</sub> emissions scenarios. *Science* (80-. ), 349.
- Gordillo, F.J.L., Carmona, R., Viñeola, B., Wiencke, C. & Jiménez, C. (2016). Effects of simultaneous increase in temperature and ocean acidification on biochemical composition and photosynthetic performance of common macroalgae from Kongsfjorden (Svalbard). *Polar Biol.*, 39, 1993–2007.
- Graba-Landry, A., Hoey, A.S., Matley, J.K., Sheppard-Brennand, H., Poore, A.G.B., Byrne, M., *et al.* (2018). Ocean warming has greater and more consistent negative effects than ocean acidification on the growth and health of subtropical macroalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 595, 55–69.
- Greff, S., Aires, T., Serrão, E.A., Engelen, A.H., Thomas, O.P. & Pérez, T. (2017a). The interaction between the proliferating macroalga *Asparagopsis taxiformis* and the coral *Astroides calycularis* induces changes in microbiome and metabolomic fingerprints. *Sci. Rep.*, 7, 42625.
- Greff, S., Zubia, M., Genta-Jouve, G., Massi, L., Perez, T. & Thomas, O.P. (2014). Mahorones, highly brominated cyclopentenones from the red alga *Asparagopsis taxiformis*. *J. Nat. Prod.*, 77, 1150–1155.

- Greff, S., Zubia, M., Payri, C., Thomas, O.P. & Perez, T. (2017b). Chemogeography of the red macroalgae *Asparagopsis*: metabolomics, bioactivity, and relation to invasiveness. *Metabolomics*, 13, 0.
- Gutow, L., Rahman, M.M., Bartl, K., Saborowski, R., Bartsch, I. & Wiencke, C. (2014). Ocean acidification affects growth but not nutritional quality of the seaweed *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae, Fucales). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 453, 84–90.
- Hall-Spencer, J.M., Rodolfo-Metalpa, R., Martin, S., Ransome, E., Fine, M., Turner, S.M., *et al.* (2008). Volcanic carbon dioxide vents show ecosystem effects of ocean acidification. *Nature*, 454, 96–99.
- Halsall, T.G. & Hills, I. (1972). Isolation of Heneicosa- 1,6,9,12,15,18-hexaene and -1,6,9,12,15-pentaene from the Alga *Fucus vesiculosus*. *Chem. Commun.*, 5, 533–539.
- Hammer, K.M., Pedersen, S.A. & Storseth, T.R. (2012). Elevated seawater levels of CO<sub>2</sub> change the metabolic fingerprint of tissues and hemolymph from the green shore crab *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol. - Part D Genomics Proteomics*, 7, 292–302.
- Hoegh-Guldberg, O., Harvell, C.D., Sale, P.F., Edwards, a J., Caldeira, K., Knowlton, N., *et al.* (2007). Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification. *Science* (80)., 318, 1737–1742.
- Holbrook, G.P., Beer, S., Spencer, W.E., Reiskind, J.B., Davis, J.S. & Bowes, G. (1988). Photosynthesis in marine macroalgae: evidence for carbon limitation. *Can. J. Bot.*, 66, 577–582.
- Houlbr  que, F., Reynaud, S., Godinot, C., Oberh  nsli, F., Rodolfo-Metalpa, R. & Ferrier-Pag  s, C. (2015). Ocean acidification reduces feeding rates in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Limnol. Oceanogr.*, 60, 89–99.
- Hughes, T.P., Graham, N.A.J., Jackson, J.B.C., Mumby, P.J. & Steneck, R.S. (2010). Rising to the challenge of sustaining coral reef resilience. *Trends Ecol. Evol.*, 25, 633–642.
- Ivanisevic, J., Thomas, O.P., Pedel, L., P  nez, N., Ereskovsky, A. V., Culioli, G., *et al.* (2011). Biochemical trade-offs: Evidence for ecologically linked secondary metabolism of the sponge *oscarella balibalo*. *PLoS One*, 6.
- Johnson, M.D., Price, N.N. & Smith, J.E. (2014). Contrasting effects of ocean acidification on tropical fleshy and calcareous algae. *PeerJ*, 2, e411.
- Koch, M., Bowes, G., Ross, C. & Zhang, X.-H. (2013). Climate change and ocean acidification effects on seagrasses and marine macroalgae. *Glob. Chang. Biol.*, 19, 103–32.
- Kooke, R. & Keurentjes, J.J.B. (2011). Multi-dimensional regulation of metabolic networks shaping plant development and performance. *J. Exp. Bot.*, 63, 3353–3365.
- Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R.N. & Singh, G.G. (2010). Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecol. Lett.*, 13, 1419–1434.
- Kumar, M., Kuzhiumparambil, U., Pernice, M., Jiang, Z. & Ralph, P.J. (2016). Metabolomics: an emerging frontier of systems biology in marine macrophytes. *Algal Res.*, 16, 76–92.

- McCook, L., Jompa, J. & Diaz-Pulido, G. (2001). Competition between corals and algae on coral reefs: a review of evidence and mechanisms. *Coral Reefs*, 19, 400–417.
- Moberg, F.F. & Folke, C. (1999). Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecol. Econ.*, 29, 215–233.
- Nugues, M.M. & Bak, R.P.M. (2008). Long-term dynamics of the brown macroalga *Lobophora variegata* on deep reefs in Curaçao. *Coral Reefs*, 27, 389–393.
- Nunes, J., McCoy, S.J., Findlay, H.S., Hopkins, F.E. & Kitidies, V. (2016). Two intertidal, non-calcifying macroalgae (*Palmaria palmata* and *Saccharina latissima*) show complex and variable responses to short-term CO<sub>2</sub> acidification. *ICES J. Mar. Sci.*, 73, 887–896.
- Ragazzola, F., Foster, L.C., Form, A., Anderson, P.S.L., Hansteen, T.H. & Fietzke, J. (2012). Ocean acidification weakens the structural integrity of coralline algae. *Glob. Chang. Biol.*, 18, 2804–2812.
- Rasher, D.B., Stout, E.P., Engel, S., Kubanek, J. & Hay, M.E. (2011). Macroalgal terpenes function as allelopathic agents against reef corals, 2011.
- Riebesell, U., Revill, A.T., Holdsworth, D.G. & Volkman, J.K. (2000). The effects of varying CO<sub>2</sub> concentration on lipid composition and carbon isotope fractionation in *Emiliania huxleyi*. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 64, 4179–4192.
- Ries, J.B., Cohen, A.L. & McCorkle, D.C. (2009). Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO<sub>2</sub>-induced ocean acidification. *Geology*, 37, 1131–1134.
- Roberts, C.M., McClean, C.J., Veron, J.E.N. & Hawkins, J.P. (2002). Marine Biodiversity Hotspots and Conservation Priorities for Tropical Reefs. *Science* (80-. ), 295, 1280–1285.
- Rodolfo-Metalpa, R., Houlbrèque, F., Tambutté, É., Boisson, F., Baggini, C., Patti, F.P., *et al.* (2011). Coral and mollusc resistance to ocean acidification adversely affected by warming. *Nat. Clim. Chang.*, 1, 308–312.
- Shannon, P., Markiel, A., Owen Ozier, 2, Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., *et al.* (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 13, 2498–2504.
- Smith, C.A., Want, E.J., Omaille, G., Abagyan, R. & Siuzdak, G. (2006). XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.*, 78, 779–787.
- Sogin, E.M., Putnam, H.M., Anderson, P.E. & Gates, R.D. (2016). Metabolomic signatures of increases in temperature and ocean acidification from the reef-building coral, *Pocillopora damicornis*. *Metabolomics*, 12, 1–12.
- Swanson, A.K. & Fox, C.H. (2007). Altered kelp (*Laminariales*) phlorotannins and growth under elevated carbon dioxide and ultraviolet-B treatments can influence associated intertidal food webs. *Glob. Chang. Biol.*, 13, 1696–1709.
- Swanson, A.K., Hrinda, S. & Keiper, J.B. (2007). Laboratory assessment of altered atmospheric carbon dioxide on filamentous green algae phenolic content and caddisfly growth and survival. *J. Freshw. Ecol.*, 22, 49–60.

- Tambut  , E., Venn, A.A., Holcomb, M., Segonds, N., Techer, N., Zoccola, D., *et al.* (2015). Morphological plasticity of the coral skeleton under CO<sub>2</sub>-driven seawater acidification. *Nat. Commun.*, 6.
- Van Alstyne, K.L., Pelletreau, K.N. & Kirby, A. (2009). Nutritional preferences override chemical defenses in determining food choice by a generalist herbivore, *Littorina sitkana*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 379, 85–91.
- Viant, M.R. (2007). Introducing genomics , proteomics and metabolomics in marine ecology Introduction. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 332, 247–248.
- Vieira, C., Gaubert, J., de Clerck, O., Payri, C., Culioli, G. & Thomas, O.P. (2015). Biological activities associated to the chemodiversity of the brown algae belonging to genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae). *Phytochem. Rev.*
- Vieira, C., Thomas, O.P., Culioli, G., Genta-Jouve, G., Houlbreque, F., Gaubert, J., *et al.* (2016). Allelopathic interactions between the brown algal genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) and scleractinian corals. *Sci. Rep.*, 6, 18637.
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V. V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., *et al.* (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.*, 34, 828–837.
- Wei, L., Wang, Q., Wu, H., Ji, C. & Zhao, J. (2015). Proteomic and metabolomic responses of Pacific oyster *Crassostrea gigas* to elevated pCO<sub>2</sub> exposure. *J. Proteomics*, 112, 83–94.
- Yamori, W., Hikosaka, K. & Way, D.A. (2014). Temperature response of photosynthesis in C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, and CAM plants: Temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynth. Res.*, 119, 101–117.

## Synthèse sur la partie 2

Cette deuxième partie, qui avait pour but d'explorer les sources potentielles de variations du métabolome de *Lobophora* à plusieurs échelles, a montré que celui-ci était hyper-variable.

Après une longue mise au point des procédures et des méthodes à appliquer pour les analyses LC-MS à Galway, nous avons commencé par étudier la variation du métabolome à l'échelle intra-spécifique chez deux espèces : *L. rosacea* et *L. monticola*. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les différentes parties de la fronde chez *L. rosacea* et entre les parties en contact ou non avec le corail chez *L. monticola*. Nous nous sommes ensuite tournés vers l'étude inter-spécifique du métabolome, étude motivée par la diversité en espèces du genre *Lobophora* récemment mise au jour. Le but était également de voir quelle méthode métabolomique était la mieux adaptée pour discriminer les espèces de *Lobophora* sur la base de leur empreinte métabolomique, un point important pour entreprendre des études à plus larges échelles, notamment spatiale et temporelle. Ces travaux préliminaires ont été menés sur quatre espèces, *L. rosacea*, *L. monticola*, *L. sonderii* et *L. obscura*, présentant des habitats et des morphologies variés. Suivant la technique métabolomique utilisée (LC-MS, GC-MS ou RMN), une discrimination plus ou moins bonne a été obtenue. La technique de LC-MS apparaît la mieux adaptée pour discriminer les quatre espèces étudiées sur la base de leur métabolome dans les extraits méthanol. Cette technique a également mis en avant les lobophorénols comme marqueurs discriminants chez *L. rosacea*. Les lobophorénols B et C ont également été détectés dans deux échantillons de *L. monticola*, en quantité moindre que *L. rosacea*. Cependant, ces composés ayant été détectés dans seulement deux échantillons sur 18, une incertitude persiste sur la synthèse de ces lobophorénols par *L. monticola*. La RMN a également mis en avant les lobophorénols comme marqueurs discriminants majoritaires de *L. rosacea*. La GC-MS sur les fractions dichlorométhane apparaît moins adaptée pour discriminer les quatre espèces même si l'annotation des composés est bien meilleure avec une base de données plus fournie qu'en LC-MS. Cette technique a également mis en évidence la présence de polluants d'origine plastique chez les quatre espèces. La meilleure discrimination obtenue par LC-MS pourrait

en partie s'expliquer par la synthèse de composés minoritaires par les bactéries associées à chaque espèce.

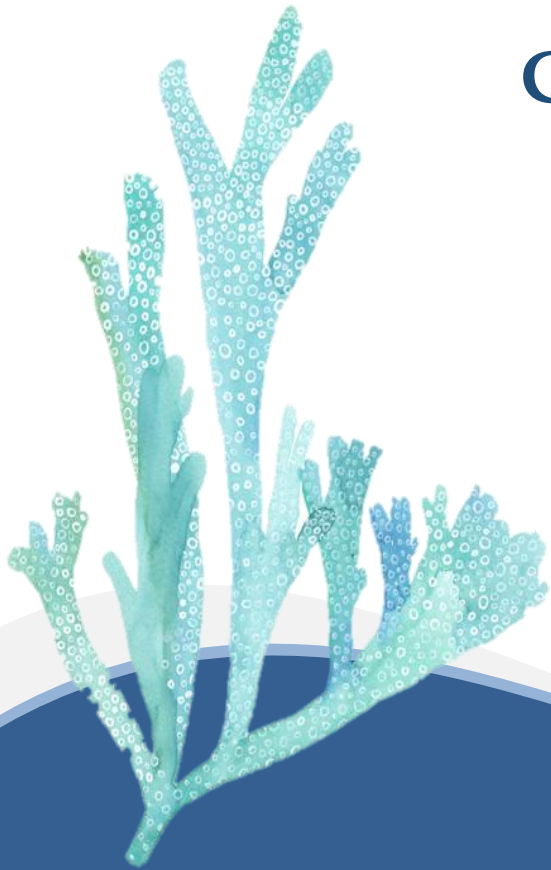
La variation du métabolome a ensuite été étudiée à l'échelle spatio-temporelle avec la technique de LC-MS. Cette étude a montré une variation spatiale du métabolome au sein des cinq sites étudiés dans le lagon chez *L. rosacea*, *L. obscura* et *L. sonderii*, variation marquée mais moins importante que la variation inter-spécifique. Parmi les composés participant à cette discrimination chimique en fonction des sites de collecte, nous avons retrouvé un potentiel acide gras à 17 carbones, des dérivés d'acides gras oxygénés polyinsaturés en C20-C22 et deux polyoléfines contenant cinq insaturations et 21 et 23 carbones respectivement. Ces deux polyoléfines majeures concordent avec les analyses RMN faites sur des fractions de *L. rosacea* et *L. sonderii* dans le chapitre 1 (partie 1), qui montraient la présence de ce type de molécules. Ces composés pourraient dériver de la même voie de synthèse que les lobophorénols. Les expériences de transplantations croisées entre habitats différents menées sur *L. sonderii*, *L. monticola* et *L. obscura* ont aussi montré l'importance de l'environnement proche de l'algue et du substrat d'accrochage sur son métabolome. Notamment, des changements métabolomiques ont été observés lorsque les algues ont été transplantées sur un corail vivant par rapport à un corail mort, suggérant l'implication d'autres phénomènes biotiques sur le métabolome, comme l'interaction avec les polypes ou une flore microbienne différente. Une variation du métabolome à l'échelle mensuelle a également été mise en évidence au cours des 13 mois de collecte, en lien avec des paramètres environnementaux tels que la température de surface de l'eau de mer et la salinité. Une plus forte variabilité chimique a été enregistrée en été, phénomène qui a été mis en lien avec la plus forte variation des paramètres physiques à cette période ou en raison du phénomène el Nino.

L'environnement naturel de l'algue influence le métabolome de *Lobophora*. Cet environnement naturel pourrait évoluer dans le cadre du changement global auquel font face les écosystèmes marins. Nous avons donc voulu tester l'effet de l'acidification de l'eau de mer sur le métabolome d'une espèce (*Lobophora rosacea*), qui correspond à une des deux grandes menaces pesant sur le milieu marin. Pour cela, des approches *in situ* grâce au site particulier de Bouraké qui présente naturellement un faible pH (7.24-7.91) fluctuant en fonction des marées, et *ex situ* via des expériences en aquarium, ont été employées. Nous

avons montré qu'une diminution du pH influençait de manière significative l'empreinte métabolomique de *L. rosacea*. Parmi les marqueurs chimiques reliés aux conditions de pH identifiés, nous avons retrouvés les lobophorénols B et C et plusieurs métabolites potentiellement reliés au lobophorénol B à 21 carbones, ainsi que des dérivés d'acides gras oxygénés polyinsaturés contenant 20 à 24 atomes de carbone. Ces composés étant sous-exprimés en milieu acide, on peut penser que la voie métabolomique des lobophorénols soit sous-activée à faible pH.



## Conclusion générale & perspectives



La première étude réalisée en 2014 dans le cadre de mon stage de Master II au sein de notre équipe sur les substances naturelles de *Lobophora rosacea* semblait très prometteuse, avec l'identification de trois nouvelles molécules, les lobophorénols A, B et C (Vieira *et al.* 2016b). De plus, les travaux de taxonomie et phylogénie moléculaire menés entre 2014 et 2017 sur ce genre ont révélé une grande richesse en espèces de *Lobophora* jusque-là insoupçonnée. En étendant l'étude chimique à deux autres espèces (*L. monticola* et *L. sonderii*) dans le cadre de cette thèse et en reprenant l'étude de *L. rosacea*, nous avons quelques espoirs de découvrir de nouvelles molécules. A l'issue des travaux, aucune des deux nouvelles espèces (*L. monticola* et *L. sonderii*) ne s'est révélée originale au plan chimique et les lobophorénols ont été retrouvés en métabolites majoritaires chez *L. rosacea*. Ces composés n'ont pas été détectés lors des étapes de purifications et d'analyses RMN sur les collectes de masse des deux autres espèces. Ils ont cependant été observés en analyses LC-MS uniquement dans deux échantillons sur 18 identifiés comme *L. monticola*, mais en quantité inférieure à celle observée chez *L. rosacea*. Une erreur d'identification taxonomique des deux spécimens ne peut être écartée et un plus grand nombre d'échantillons devront être analysés pour conclure sur la présence ou non de ces composés chez *L. monticola*. De manière générale ces résultats posent la question des lobophorénols comme marqueurs spécifiques de l'espèce *L. rosacea*. En revanche, nous avons pu détecter des métabolites spécialisés proches des lobophorénols, communs aux trois espèces, comportant une partie vinylique terminale, de longueur de chaîne inconnue mais sans groupement OH. Ces métabolites pourraient correspondre à des molécules polyoléfiniques. Ce type de composé a été documenté dans des travaux datant de 1971-1973 chez d'autres algues brunes de l'ordre des Fucales, Desmarestiales, Ectocarpales et Laminariales (Youngblood *et al.* 1971; Halsall & Hills 1972; Youngblood & Blumer 1973). Cependant leur voie de biosynthèse et leur fonction n'est pas connue. Ces composés ont toutefois été observés en quantités plus importantes dans les structures reproductrices des algues, dans les parties jeunes et en croissance rapide (Youngblood *et al.* 1971; Youngblood & Blumer 1973). Cela laisserait suggérer un rôle de protection dans les parties les plus vulnérables de l'algue, en accord avec la théorie de l'« optimal defense theory » (Cronin 2001).

Les nombreuses fractions étudiées chez les trois espèces étaient largement dominées par des graisses et des pigments. Il s'est donc finalement avéré que ces algues n'ont que peu

de composés originaux. Il est également possible que notre méthode d'extraction utilisée ne soit pas optimale pour travailler sur le contenu chimique de *Lobophora* ; une optimisation de celle-ci pourrait être envisagée.

Dans la liste des composés absents mais pourtant caractéristiques des algues brunes, il est intéressant de rappeler que nous n'avons pas détecté de composés phénoliques alors que le genre *Lobophora* est connu pour en contenir (Rao & Untawale 1991; Chkhikvishvili & Ramazanov 2000; Chung *et al.* 2003). Ces composés sont peut-être minoritaires chez les espèces étudiées, ce qui expliquerait pourquoi ils n'ont pas été détectés. Dans les travaux de Chung *et al.* (2003) sur *L. variegata* du Nord-Est de Hong-Kong et dans ceux de Chkhikvishvili & Ramazanov (2000) sur *L. variegata* des îles Canaries, le contenu en composés phénoliques faisait partie des plus riches parmi les algues brunes investiguées. Notre méthode d'extraction utilisée n'était peut-être pas la meilleure pour étudier ce type de composés. Il se peut également que les composés phénoliques aient été extraits dans les fractions plus polaires (par exemple H<sub>2</sub>O /MeOH 1 :1), non purifiées sur HPLC. De même, l'absence de terpènes, déjà observée par Vieira *et al.* (2016), interpelle également puisque l'ordre des Dictyotales (auquel appartient le genre *Lobophora*) est connu pour synthétiser ces produits naturels. Toutefois, le genre, *Zonaria* ne semble pas non plus synthétiser de terpènes. A l'inverse, chez de nombreux genres de cet ordre comme *Dictyota*, *Dictyopteris*, *Padina*, *Canistrocarpus*, *Dictyopteris*, *Taonia*, *Stypopodium*, *Spatoglossum*, *Rugulopteryx* ou *Stoechospermum*, plusieurs composés terpéniques ont déjà été isolés (e.g. de Paula *et al.*, 2011; Shoubaky and Salem, 2014). Au regard de ces différentes observations, il serait intéressant de mener une étude chimio-taxonomique au sein des Dictyotales centrée sur les terpènes. Il serait également intéressant d'étendre l'étude chimique à d'autres espèces de *Lobophora* pour notamment voir si :

(i) les lobophorénols sont retrouvés chez d'autres espèces. Ces composés étant majoritaires chez *L. rosacea*, l'espèce la plus basale parmi les quatre sélectionnées, il faudrait notamment étudier d'autres espèces basales comme *L. dichotoma* et *L. guadeloupensis*.

(ii) les polyoléfines sont des marqueurs du genre. Au vu de la grande diversité spécifique de *Lobophora*, avec des morphologies variables et des habitats diversifiés, il serait intéressant de voir si ces molécules polyoléfines sont présentes chez toutes les espèces et

investiguer sur leur potentielle fonction. S'agit-il de composés caractéristiques des algues brunes ou de certains ordres ?

Ces différents travaux sur le contenu chimique de *Lobophora* par des approches de chimie traditionnelle ont soulevé plusieurs difficultés liées à la richesse en composés apolaires. En effet, bien que les lobophorénols aient été détectés chez *L. rosacea*, leur purification s'est avérée plus compliquée que prévu et nous n'avons pas réussi à les isoler en quantité suffisante pour effectuer des tests de bioactivité, réduisant en conséquence nos ambitions premières sur le volet valorisation. Cette difficulté s'explique en partie par la nature même de ces lobophorénols avec la présence de doubles liaisons, d'une partie polaire (groupements -OH) et apolaire (chaîne carbonée polyinsaturée). Les polyoléfinés détectés, également de nature apolaire avec plusieurs insaturations, sont difficiles à purifier sur des systèmes classiques HPLC en phase normale et nous n'avons pas pu les isoler avec nos moyens analytiques. En effet, ces molécules étaient éluées directement sur la colonne. Une analyse par GC-MS serait probablement plus appropriée pour ce type de molécules. La richesse en pigments et graisses de *Lobophora* nous a conduit à travailler sur les fractions apolaires de cette algue sur une deuxième collecte de masse. Toutefois, les analyses entreprises au cours de cette thèse sont une première étape qui reste à poursuivre. Il serait notamment intéressant de voir si nous retrouvons les composés lobophorols A-C, lobophopyranones A et B, lobophorones A et B, ainsi que trois métabolites reliés, isolés chez *L. variegata* des îles Canaries par Gutiérrez-Cepeda *et al.* (2015). La caractérisation de cette partie apolaire revêt un intérêt particulier au regard des bioactivités antimicrobiennes obtenues sur *Staphylococcus aureus* pour quatre fractions algales. En effet, afin de valoriser la bioactivité de ces sous-fractions, il faudrait caractériser les composés qui la constituent et notamment voir quel(s) composé(s) est(sont) actif(s).

Outre les difficultés rencontrées avec les méthodes de chimie traditionnelle, nous avons été confrontés à plusieurs problèmes avec les analyses métabolomiques par LC-MS, qui ont fait l'objet d'une longue optimisation méthodologique à Galway. En particulier, nous avons tenté en vain de détecter les lobophorénols considérés dans cette étude comme les composés de référence. Nous avons tenté d'injecter les échantillons de lobophorénols purifiés

en 2014 sans succès, ces derniers étant complètement dégradés. La méthode a donc été optimisée sans les lobophorénols. Par la suite, les analyses métabolomiques par UHPLC-MS-QToF m'ont conduit à la plateforme MALLABAR de la Station Marine d'Endoume (Marseille), tout d'abord dans un but de comparaison des résultats UHPLC-MS-QToF obtenus sur les deux appareils (Marseille et Galway). Avec les spécificités différentes propres à l'appareil de Marseille, nous avons pu détecter les lobophorénols B et C sur l'UHPLC-MS-QToF de la plateforme MALLABAR, qui détectait en moyenne 4 à 5,7 fois plus de composés, avec une bien meilleure ionisation des composés, dont les pics correspondant à ces lobophorénols étaient bien définis. La détection de ces deux composés connus a été un vrai progrès dans notre étude, ce qui nous a permis de confirmer que les lobophorénols sont a priori des marqueurs de *L. rosacea*. Ces composés nous ont aussi aidés lors de la construction des réseaux moléculaires. En effet, le manque de correspondance entre les composés présents dans nos échantillons et ceux répertoriés dans la base de données GNPS était un frein à l'annotation des marqueurs dans les réseaux moléculaires. La présence des lobophorénols nous a permis dans certains cas de proposer une annotation pour quelques composés. Nous avons pu voir toutefois que ce problème d'annotation restait une limite importante dans la compréhension des marqueurs chimiques et des voies métaboliques impliqués chez *Lobophora* face à différents facteurs abiotiques ou biotiques.

L'ensemble des études sur les sources de variations potentielles du métabolome de *Lobophora* entreprises au cours de cette thèse a montré que celui-ci était hypervariable et pouvait être influencé par de nombreux paramètres environnementaux. Une empreinte métabolomique propre à chaque espèce, sans variation intra-spécifique a été montrée. Le métabolome des algues varie également en fonction des sites dans le lagon et entre les habitats testés (en lien avec le substrat d'accrochage, l'environnement proche de l'algue et les interactions biotiques). Des variations temporelles ont également été enregistrées, corrélées avec des facteurs environnementaux comme la température de surface de l'eau de mer et la salinité. Ces changements métaboliques peuvent être rapides puisqu'ils ont été observés à une échelle temporelle aussi petite que 7 jours (cf. expériences de transplantation). Enfin, dans un contexte de changement global, l'acidification de l'océan entraîne également des changements métaboliques chez *L. rosacea*, sans changement de la bioactivité des fractions méthanol. Cette étude est la première à notre connaissance à avoir utilisé la technique de

métabolomique pour étudier l'impact de l'acidification sur une algue molle. Des résultats intéressants ont été obtenus, les lobophorénols B et C ainsi que plusieurs dérivés potentiellement issus de la même voie de synthèse sont sous-exprimés dans un milieu acide. Ces travaux mériteraient d'être poursuivis et supportent le potentiel de la métabolomique pour détecter l'influence d'un stress sur les organismes marins, comme cela a été montré chez les coraux ou bivalves par exemple (Ellis *et al.* 2014; Sogin *et al.* 2016).

Malgré ces différences d'empreinte métabolomique observées aux échelles inter-spécifique, spatiale ou temporelle, nous avons vu que de nombreux marqueurs responsables de la discrimination entre les groupes étaient des composés minoritaires, ou tout du moins qui s'ionisaient très mal, ces problèmes ayant déjà été mentionnés dans d'autres travaux (ex : Greff *et al.* 2017). Malgré les avantages qu'offrent la LC-MS, notamment sa sensibilité, bien adaptée pour les fractions méthanol de faibles quantités de matière, les résultats obtenus par cette approche doivent être considérés avec prudence. En effet, les composés détectés ne sont pas forcément le reflet exact de l'extrait chimique algal analysé, dans notre cas l'extrait méthanolique. Seuls les composés qui s'ionisent sont observés, ce qui donne une image partielle des composés majoritaires de l'extrait.

A l'inverse, la RMN, moins sensible, nous donne une image plus réelle (quantitativement) du contenu chimique de l'extrait analysé. Seuls les composés en bonnes quantités seront observés ainsi que les composés majoritaires. La difficulté dans l'analyse des spectres RMN-<sup>1</sup>H réside dans la capacité à identifier les marqueurs chimiques discriminants dans un extrait. Dans notre cas d'étude, les lobophorénols comme marqueurs quantitatifs de l'espèce *L. rosacea* ont toutefois été confirmés par l'analyse par RMN, qui montre bien que ces composés font partie des majoritaires dans l'algue. L'analyse des spectres RMN a été compliquée par la richesse en graisses qui masque d'autres signaux. Nous nous sommes donc tournés vers, la GC-MS, technique complémentaire pour étudier la fraction apolaire. Cette approche a été utilisée pour l'étude du métabolome à l'échelle inter-spécifique, et bien qu'avantageuse dans l'annotation des composés avec sa base de donnée plus fournie qu'en LC-MS, elle ne s'est pas avérée plus intéressante pour discriminer les espèces entre elles. Cette technique a révélé la présence de plusieurs polluants potentiellement d'origine plastique dans les algues (ex : tributyl acetylcitrate ; naphthalene, 2,6-dimethyl- ; p-cresol,

2,6-di-tert-butyl ; N-Methyl-N-benzyltetradecanamine), qui viennent brouiller l’empreinte métabolomique. Bien que ce résultat sorte du contexte de notre étude, il semble que les espèces accumulent ou adsorbent de manière différente les polluants majoritairement d’origine plastique, mais dont la provenance reste à identifier. Cette tendance a été observée à Ricaudy et Sainte-Marie, des sites côtiers sous influence anthropique. Il serait intéressant d’étendre cette étude aux autres sites collectés au sein du lagon (îlot Canard, Crouy, Larégnère et Banc Nord), qui sont plus éloignés de la côte et de l’influence anthropique. Notamment, Banc Nord, le site le plus éloigné, montrerait-il des teneurs en contaminants plastiques moins élevées que Ricaudy ? La problématique des déchets plastiques et microplastiques est au cœur de l’actualité sur l’environnement marin et les espèces de *Lobophora* pourraient donc servir de bio-indicateurs de la contamination en plastiques. A la base du réseau trophique, elles sont des maillons intéressants pour suivre les différences de contamination à travers le lagon. En 2008, l’espèce *Lobophora variegata* a d’ailleurs été utilisée avec succès comme bio-indicateur de la contamination en métaux (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni et Zn) par les mines dans le lagon calédonien (Hédouin *et al.* 2008). Des travaux réalisés sur *Fucus vesiculosus* ont montré que les microplastiques étaient adsorbés en concentrations variables sur la surface de l’algue (Gutow *et al.* 2016) tandis que *Sargassum spp.* accumulait un dérivé du phtalate dans leur biomasse (Chan *et al.* 2004; Yokota *et al.* 2017).

Le métabolome de *Lobophora* s’est révélé hypervariable en réponse à un environnement complexe et lui-même variable. Ce résultat est à relier au fait que les algues sont des organismes fixés qui « subissent » les pressions de leur environnement et doivent donc s’adapter pour se maintenir. Les présents travaux ont aussi montré les difficultés à étudier le métabolome de *Lobophora* en raison du manque de données en général sur le métabolome des algues et en particulier sur ce genre, ce qui donne un caractère de référence à notre travail. D’autres organismes marins semblent mieux se prêter à de telles approches, notamment les éponges et zoanthaires (*e.g.* Costa-Lotufo *et al.*, 2018; Ivanišević *et al.*, 2011; Jaramillo *et al.*, 2018; Ternon *et al.*, 2017) dont les métabolites majoritaires ont tendance à mieux s’ioniser.

Afin d’améliorer les études sur le métabolome de *Lobophora*, et des macroalgues en général, il serait pertinent de coupler les études métabolomiques avec des études

transcriptomiques et génomiques pour obtenir une vision plus holistique de l'organisme étudié. Peu d'organismes modèles sont présents chez les macroalgues. Le génome complet d'*Ectocarpus siliculosus*, *Chondrus crispus* et *Porphyridium purpureum* sont disponibles et des travaux couplant des données de métabolomiques avec transcriptomiques / génomiques ont été réalisées avec succès chez ces espèces (e.g. Dittami *et al.*, 2014; Gravot *et al.*, 2010; Ritter *et al.*, 2014). Bien que *Lobophora* ne soit pas un modèle type et reste à ce jour difficile à cultiver en laboratoire (Vieira, pers. com.), les progrès et diminution des coûts en Next Generation Sequencing pourraient rendre possible la caractérisation du génome de *Lobophora* dans le futur.

Très peu de marqueurs chimiques ont pu être annotés au cours des différentes expériences menées. Un des obstacles majeurs demeure le manque de base de données pour les organismes marins. Cependant, les lobophorénols sont ressortis comme marqueurs chimiques à deux reprises : à la fois comme marqueur quantitatif de *L. rosacea* dans l'étude sur la variation inter-spécifique mais également comme marqueur des conditions de pH. D'autres dérivés oxygénés d'acides gras polyinsaturés, majoritairement à 21 carbones, pour certains potentiellement dérivés du lobophorénol B, ont été retrouvés dans les marqueurs discriminants au cours des travaux. Nous avons également détecté des composés proches sans oxygène : des polyènes et polyoléfines. Ces résultats sont en accord avec les études chimiques traditionnelles menées dans la première partie de cette thèse, avec la présence de polyoléfines chez toutes les espèces étudiées. La méthode du lipid-profiling (e.g. Knittelfelder *et al.* 2014) et un ciblage sur ces composés apolaires, avec l'injection de standards appropriés, pourrait peut-être permettre d'aller plus loin dans l'identification des marqueurs chimiques chez *Lobophora*. Bien que la méthode de métabolomique non ciblée (*metabolomic fingerprinting*) ait été sélectionnée pour cette thèse, une approche plus ciblée (notamment sur les acides gras et dérivés) permettrait peut-être une meilleure annotation des composés. Il serait également très intéressant d'investiguer la voie de synthèse des lobophorénols, qui semble être sous-activée lorsque les algues sont en conditions de pH plus faible. En effet, hormis leur capacité à blanchir le corail *Acropora muricata*, nous ne savons rien de leur potentiel d'activité pour l'algue.

Etant donné le pouvoir de la LC-MS pour discriminer les espèces sur la base de leur métabolome, il serait intéressant d'étendre cette méthode à d'autres espèces de *Lobophora*, notamment aux espèces cryptiques. Nous pourrions ainsi voir si des espèces proches peuvent également être distinguées sur la base de leur empreinte métabolomique mais également voir si les lobophorénols sont des marqueurs présents dans d'autres espèces du genre. Comme cela a été évoqué à travers plusieurs chapitres, la bonne discrimination obtenue en LC-MS peut aussi venir des composés synthétisés par les bactéries associées aux algues. Une approche de metabarcoding serait pertinente pour avoir une idée de la diversité microbienne associée à chaque espèce de *Lobophora*. Aussi, pour étudier les composés synthétisés par la flore microbienne associée aux thalles de *Lobophora*, il faudrait isoler celle-ci puis extraire et analyser les composés présents par UHPLC-MS. Cette caractérisation des bactéries associées aux thalles de *Lobophora* avait débuté dans les travaux de Vieira *et al.* (2016a) et il serait donc intéressant de les poursuivre. Nous pourrions également étudier l'exométabolome des algues, intéressant dans un contexte d'interactions biologiques. Nous aurions ainsi une meilleure image des composés excrétés par l'algue.

La technique de LC-MS s'est avérée efficace pour étudier les changements du métabolome en cas de stress lié à l'acidification de l'océan. Cette étude, liée au changement climatique, première menace majeure pesant sur les écosystèmes marins et au cœur de l'actualité scientifique, pourrait être poursuivie notamment en testant l'effet d'une augmentation de la température sur le métabolome de *L. rosacea*. L'effet combiné de l'augmentation de la température et de l'acidification de l'océan pourrait ensuite être testé sur cette espèce afin d'obtenir une image plus réaliste des conditions futures. Il serait également intéressant de poursuivre les travaux sur l'effet de l'acidification sur le métabolome de *L. rosacea* en ciblant les lipides, mais aussi en complétant les analyses LC-MS par des analyses GC-MS, notamment dans la fraction apolaire (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

Cette thèse, centrée sur les sources de variation potentielles du métabolome de *Lobophora*, apporte donc des éléments de compréhension sur les facteurs pouvant influencer la synthèse de métabolites chez cette algue. Ces résultats permettent de poser les fondations de futurs travaux en écologie chimique, visant à mieux comprendre le rôle des métabolites secondaires dans l'adaptation des algues à leur environnement changeant.

## Références

- Chan, H.W., Lau, T.C., Ang, P.O., Wu, M. & Wong, P.K. (2004). Biosorption of di ( 2-ethylhexyl ) phthalate by seaweed biomass. *J. Appl. Phycol.*, 263–274.
- Chkhikvishvili, I.D. & Ramazanov, Z.M. (2000). Phenolic substances of brown algae and their antioxidant activity. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 36, 289–291.
- Chung, H.Y., Ma, W.C.J., Ang, P.O., Kim, J.-S. & Chen, F. (2003). Seasonal variations of bromophenols in brown algae (*Padina arborescens*, *Sargassum siliquastrum*, and *Lobophora variegata*) collected in Hong Kong. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2619–24.
- Costa-Lotufo, L. V., Carnevale-Neto, F., Trindade-Silva, A.E., Silva, R.R., Silva, G.G.Z., Wilke, D. V., *et al.* (2018). Chemical profiling of two congeneric sea mat corals along the Brazilian coast: adaptive and functional patterns. *Chem. Commun.*
- Cronin, G. (2001). Ressource allocation in Seaweeds and Marine Invertebrates: Chemical Defense Patterns in Relation to Defenses Theories. *Mar. Chem. Ecol.*
- de Paula, J.C., Vallim, M.A. & Teixeira, V.L. (2011). What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae). *Brazilian J. Pharmacogn.*, 21, 216–228.
- Dittami, S.M., Eveillard, D. & Tonon, T. (2014). A metabolic approach to study algal-bacterial interactions in changing environments. *Mol. Ecol.*, 23, 1656–1660.
- Ellis, R.P., Spicer, J.I., Byrne, J.J., Sommer, U., Viant, M.R., White, D.A., *et al.* (2014). <sup>1</sup>H NMR metabolomics reveals contrasting response by male and female mussels exposed to reduced seawater pH, increased temperature, and a pathogen. *Environ. Sci. Technol.*, 48, 7044–7052.
- Gravot, A., Dittami, S.M., Rousvoal, S., Lugan, R., Eggert, A., Collén, J., *et al.* (2010). Diurnal oscillations of metabolite abundances and gene analysis provide new insights into central metabolic processes of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *New Phytol.*, 188, 98–110.
- Gutiérrez-Cepeda, A., Fernández, J.J., Norte, M., Montalvão, S., Tammela, P. & Souto, M.L. (2015). Acetate-Derived Metabolites from the Brown Alga *Lobophora variegata*. *J. Nat. Prod.*, 78, 1716–1722.
- Gutow, L., Eckerlebe, A., Giménez, L. & Saborowski, R. (2016). Experimental Evaluation of Seaweeds as a Vector for Microplastics into Marine Food Webs. *Environ. Sci. Technol.*, 50, 915–923.
- Halsall, T.G. & Hills, I.. (1972). Isolation of Heneicosa- 1,6,9,12,15,18-hexaene and -1,6,9,12,15-pentaene from the Alga *Fucus vesiculosus*. *Chem. Commun.*, 5, 533–539.
- Hédouin, L., Bustamante, P., Fichez, R. & Warnau, M. (2008). The tropical brown alga *Lobophora variegata* as a bioindicator of mining contamination in the New Caledonia lagoon : A field transplantation study. *Mar. Environ. Res.*, 66, 438–444.
- Ivanišević, J., Thomas, O.P., Lejeusne, C., Chevaldonné, P. & Pérez, T. (2011). Metabolic

fingerprinting as an indicator of biodiversity: Towards understanding inter-specific relationships among Homoscleromorpha sponges. *Metabolomics*, 7, 289–304.

- Jaramillo, K.B., Reverter, M., Guillen, P.O., McCormack, G., Rodriguez, J., Sinniger, F., *et al.* (2018). Assessing the Zoantharian Diversity of the Tropical Eastern Pacific through an Integrative Approach. *Sci. Rep.*, 8, 1–15.
- Knittelfelder, O.L., Weberhofer, B.P., Eichmann, T.O., Kohlwein, S.D. & Rechberger, G.N. (2014). A versatile ultra-high performance LC-MS method for lipid profiling. *J. Chromatogr. B*, 951–952, 119–128.
- Rao, C.K. & Untawale, A.G. (1991). Polyphenols content of indian seaweeds. *Mahasagar*, 24, 99–102.
- Ritter, A., Dittami, S.M., Goulitquer, S., Correa, J.A., Boyen, C., Potin, P., *et al.* (2014). Transcriptomic and metabolomic analysis of copper stress acclimation in *Ectocarpus siliculosus* highlights signaling and tolerance mechanisms in brown algae. *BMC Plant Biol.*, 14, 116.
- Shoubaky, G.A. El & Salem, E.A. (2014). Terpenes and Sterols Composition of Marine Brown Algae *Padina*. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.*, 6, 894–900.
- Sogin, E.M., Putnam, H.M., Anderson, P.E. & Gates, R.D. (2016). Metabolomic signatures of increases in temperature and ocean acidification from the reef-building coral, *Pocillopora damicornis*. *Metabolomics*, 12, 1–12.
- Ternon, E., Perino, E., Manconi, R., Pronzato, R., Thomas, O.P. & Long, P. (2017). How environmental factors affect the production of guanidine alkaloids by the mediterranean sponge *crambe crambe*. *Mar. Drugs*, 15.
- Vieira, C., Engelen, A.H., Guentas, L., Aires, T., Houlbrequé, F., Gaubert, J., *et al.* (2016a). Species specificity of bacteria associated to the brown seaweeds *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) and their potential for induction of rapid coral bleaching in *Acropora muricata*. *Front. Microbiol.*, 7, 1–13.
- Vieira, C., Thomas, O.P., Culioli, G., Genta-Jouve, G., Houlbrequé, F., Gaubert, J., *et al.* (2016b). Allelopathic interactions between the brown algal genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) and scleractinian corals. *Sci. Rep.*, 6, 18637.
- Yokota, K., Waterfield, H., Hastings, C., Davidson, E., Kwietniewski, E. & Wells, B. (2017). Finding the missing piece of the aquatic plastic pollution puzzle: Interaction between primary producers and microplastics. *Limnol. Oceanogr. Lett.*, 2, 91–104.
- Youngblood, W.W. & Blumer, M. (1973). Alkanes and alkenes in marine benthic algae. *Mar. Biol.*, 21, 163–172.
- Youngblood, W.W., Blumer, M., Guillard, R.L. & Fiore, F. (1971). Saturated and unsaturated hydrocarbons in marine benthic algae. *Mar. Biol.*, 8, 190–201.

## Table des illustrations

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1.</b> Exemples d'organismes trouvant refuge dans des habitats colonisés par <i>Lobophora</i> . (a) <i>Ablabys taenianotus</i> bien camouflé au milieu des <i>Lobophora sonderii</i> (© V. Bouvot), (b) juvénile <i>Miamira magnifica</i> sur <i>Lobophora</i> (© G. Boussarie), (c) <i>Goniobranchus fidelis</i> sur <i>Lobophora</i> (© G. Boussarie) et (d) <i>Hypselodoris tryoni</i> sur <i>Lobophora rosacea</i> (© J. Gaubert).<br>.....                                            | 14 |
| <b>Figure 2.</b> Exemples de <i>Lobophora</i> retrouvées en Nouvelle-Calédonie : (a) <i>Lobophora rosacea</i> , (b) <i>Lobophora hederacea</i> enveloppant un corail branchu, (c) <i>Lobophora hederacea</i> sous sa forme encroûtante, (d) et (e) <i>Lobophora hederacea</i> en association proche avec des coraux branchus et (f) <i>Lobophora obscura</i> , adhérant fortement au substrat, dont les iridescences grises sont bien visibles (© C. Vieira dans Payri <i>et al.</i> 2018).<br>..... | 20 |
| <b>Figure 3.</b> Composés identifiés chez <i>Lobophora</i> (adapté de Vieira <i>et al.</i> 2015).<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 24 |
| <b>Figure 4.</b> <i>Lobophora monticola</i> en contact avec un corail branchu (© G. Boussarie).<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 25 |
| <b>Figure 5.</b> <i>Lobophora rosacea</i> nichée à la base d'un corail branchu. La disposition en rosette des lames est bien visible (© G. Boussarie).<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 26 |
| <b>Figure 6.</b> <i>Lobophora sonderii</i> , classiquement retrouvée dans les algues brunes comme <i>Sargassum sp</i> (© J. Gaubert et C. Vieira).<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 27 |
| <b>Figure 7.</b> <i>Lobophora obscura</i> sous sa forme encroûtante, adhérant fortement à un débris de corail mort. L'iridescence grise est bien visible (© G. Boussarie).<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 27 |
| <b>Figure 8.</b> En aval du génome et soumis aux facteurs environnementaux, le métabolome permet une mesure directe du phénotype cellulaire à l'échelle moléculaire.<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 29 |
| <b>Figure 9.</b> Schéma général d'une étude de métabolomique (© G. Boussarie & J. Gaubert).<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 30 |
| <b>Figure 10.</b> Carte des sites de collectes en Nouvelle-Calédonie et plus particulièrement dans le lagon Sud-Ouest, utilisés au cours de la thèse.<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 40 |
| <b>Figure 11.</b> Structures chimiques des lobophorénols (A, B et C) isolés chez <i>L. rosacea</i> (Vieira <i>et al.</i> 2016).<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 59 |
| <b>Figure 12.</b> Montage de la VLC (adapté de silicageldesiccant.wordpress.com).<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 62 |
| <b>Figure 13.</b> Montage du fractionnement SPE en phase normale (© J. Gaubert).<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 65 |
| <b>Figure 14.</b> Schéma récapitulatif du traitement de la matière algale depuis la collecte de masse.<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 66 |
| <b>Figure 15.</b> Tubes collecteurs utilisés pour le fractionnement sur colonne de silice ouverte (© J. Gaubert).<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 68 |
| <b>Figure 16.</b> Fractionnement sur colonne ouverte de silice des nouvelles collectes de masse de <i>L. monticola</i> , <i>L. rosacea</i> et <i>L. sonderii</i> (© J. Gaubert).<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 68 |
| <b>Figure 17.</b> Schémas résumant le fractionnement de <i>Lobophora monticola</i> , <i>Lobophora rosacea</i> et <i>Lobophora sonderii</i> .<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 70 |
| <b>Figure 18.</b> Profil chromatographique de la purification de LR-F4 (issue de la VLC) en phase inverse (UV à 210 nm).<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 71 |
| <b>Figure 19.</b> Schémas du fractionnement par VLC de <i>Lobophora rosacea</i> effectué à Galway (2017) et à Nice (2014).<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 72 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure 20.</b> Structure d'un composé polyoléfine proche des lobophorénols (la longueur de la chaîne étant inconnue). On peut voir la partie vinylique terminale caractéristique, marque de métabolite spécialisé.....                                                                                | 74  |
| <b>Figure 21.</b> Spectre RMN $^1\text{H}$ de LR-F5-f1 après SPE en phase normale. Les signaux caractéristiques des protons vinyliques terminaux sont indiqués par les flèches rouges.                                                                                                                   | 74  |
| <b>Figure 22.</b> Spectre $^1\text{H}$ -RMN de LS-F5-f1 après SPE en phase normale. Les signaux caractéristiques des protons vinyliques terminaux sont indiqués par les flèches.....                                                                                                                     | 75  |
| <b>Figure 23.</b> Spectre RMN $^1\text{H}$ de LM-F5-f1 après SPE en phase normale. Les signaux caractéristiques des protons vinyliques terminaux sont indiqués par les flèches.....                                                                                                                      | 75  |
| <b>Figure 24.</b> Spectre RMN $^1\text{H}$ de LR-F5-f2 après SPE en phase normale. Les flèches noires indiquent notamment des régions caractéristiques des protons vinyliques terminaux.                                                                                                                 | 76  |
| <b>Figure 25.</b> (a) cages utilisées pour les expériences et (b) préparation de la mixture contenant les extraits à tester dans les boîtes de pétri (© J. Gaubert). .....                                                                                                                               | 87  |
| <b>Figure 26.</b> Nombre moyen de mouches mortes après 24 h en fonction de l'appât proposé dans les cages (LS : <i>L. sonderii</i> , LM : <i>L. monticola</i> ). Témoin - : mélange de protéines, sucre et eau ; témoin + : insecticide Success 4 ®.....                                                 | 88  |
| <b>Figure 27.</b> (a) Aperçu de la cage : les mouches attirées par la substance sur le coton dentaire restent collées dans la boîte de Pétri. (b) Boîte de Pétri recouverte de colle et contenant le coton dentaire sur lequel l'extrait à tester est déposé (© J. Gaubert). .....                       | 89  |
| <b>Figure 28.</b> Nombre moyen de mouches piégées dans les boîtes de Pétri contenant les extraits à tester et les conditions témoins en fonction du temps (LS : <i>L. sonderii</i> , LM : <i>L. monticola</i> ). Témoin - : eau distillée ; témoin + : hydrolysate de protéines et de sucre.....         | 91  |
| <b>Figure 29.</b> Nombre moyen de mouches mortes après 24 h d'exposition et en fonction de l'appât testé (LS : <i>L. sonderii</i> , LM : <i>L. monticola</i> ). Témoin - : hydrolysate de protéines et de sucre; témoin + : hydrolysate de protéines et de sucre mélangé à l'insecticide Success 4 ®. .. | 92  |
| <b>Figure 30.</b> Disques de diffusion imprégnés des substances à tester, milieu de culture PDA sur Boîte de Pétri (témoin positif : au centre et témoin négatif en haut) (© J. Gaubert)....                                                                                                             | 98  |
| <b>Figure 31.</b> Schéma de préparation de la microplaque 96 puits pour le test antifongique (* suspension de conidies à $10^6/\text{mL}$ ).....                                                                                                                                                         | 98  |
| <b>Figure 32.</b> Plaque 96 puits contenant les extraits à tester et les témoins positifs et négatifs. Nous pouvons observer la présence de dépôt dans les puits correspondant aux extraits algaux les plus concentrés (© J. Gaubert).....                                                               | 99  |
| <b>Figure 33.</b> Pontes de femelles tiques adultes (© J. Gaubert).....                                                                                                                                                                                                                                  | 105 |
| <b>Figure 34.</b> Larves de tiques âgées de 15 jours mises en tubes à hémolyse (© J. Gaubert).                                                                                                                                                                                                           | 106 |
| <b>Figure 35.</b> (a) Séchage sous hotte des buvards imprégnés des extraits à tester. (b) Enveloppes formées avec les buvards et renfermant les larves de tiques (© J. Gaubert).....                                                                                                                     | 107 |
| <b>Figure 36.</b> Pourcentage moyen de larves vivantes dans les buvards après 24 h de contact avec les extraits algaux (T- : témoin négatif, éthanol 100 % ; T+ : témoin positif, solution à 1 % d'Amitraz®).....                                                                                        | 108 |
| <b>Figure 37.</b> Schéma expérimental de préparation de la microplaque pour les tests antibactériens.....                                                                                                                                                                                                | 113 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure 38.</b> Courbes de croissance de <i>S. aureus</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait LMF5 (250, 200 et 150 µg/mL) de <i>L. monticola</i> . La courbe de croissance du témoin négatif (T-) est en rouge. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 114 |
| <b>Figure 39.</b> Courbes de croissance de <i>S. aureus</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait LSF8 de <i>L. sonderii</i> (TN= témoin négatif). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 116 |
| <b>Figure 40.</b> Courbes de croissance de <i>S. aureus</i> en présence de différentes concentrations de l'extrait LRF4 de <i>L. rosacea</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 117 |
| <b>Figure 41.</b> Schéma d'un transect fixe pour l'acquisition des photos-quadrats. Le quadrat coulisse le long du câble tendu entre les deux fers à béton fixés en permanence et le temps de l'étude. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 122 |
| <b>Figure 42.</b> Exemple de photoquadrat de 25 cm <sup>2</sup> avant traitement (a) et après traitement (b) avec le logiciel CPCe (© J. Gaubert). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 123 |
| <b>Figure 43.</b> Pourcentage de quadrats où <i>L. rosacea</i> a été observée sur les deux transects. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 124 |
| <b>Figure 44.</b> Pourcentage (%) de recouvrement moyen de <i>L. sonderii</i> par sous-quadrat sur les deux transects entre mars 2016 et juin 2017. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 125 |
| <b>Figure 45.</b> Carte des sites de collectes utilisées au cours de cette thèse dans le lagon Sud de Nouvelle-Calédonie. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 138 |
| <b>Figure 46.</b> Gradient d'élution optimisé pour les analyses en LC-MS. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 143 |
| <b>Figure 47.</b> Chromatogramme du pool non dilué (a), dilué au 1/5 <sup>e</sup> (b) et dilué au 1/10 <sup>e</sup> (c). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 144 |
| <b>Figure 48.</b> Exemple de chromatogramme obtenu en mode d'ionisation positive (a) et négative (b). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 145 |
| <b>Figure 49.</b> Chromatogramme d'un échantillon de <i>L. sonderii</i> présentant des pics indiquant une probable contamination par caoutchouc de silicone ou polysiloxanes. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 151 |
| <b>Figure 50.</b> Frondes de <i>L. monticola</i> en contact avec le corail ou libre (sans contact avec le corail) (© G. Boussarie). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 160 |
| <b>Figure 51.</b> Subdivision en trois parties (basale, centrale et distale) de la fronde de <i>L. rosacea</i> (© J. Gaubert). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 161 |
| <b>Figure 52.</b> Analyse en composantes principales des fractions MeOH du métabolome de <i>Lobophora monticola</i> en fonction des parties de la fronde : en contact avec le corail (bleu) vs sans contact (rouge). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 162 |
| <b>Figure 53:</b> Analyse en Composantes Principales (ACP) des fractions méthanoliques du métabolome de <i>Lobophora rosacea</i> en fonction des parties du thalle : distale (orange), centrale (rouge) et basale (bleu). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 163 |
| <b>Figure 54.</b> Graphique résumant l'étude. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 171 |
| <b>Figure 55.</b> Discriminant power of the three chemical approaches via unsupervised (Principal Component Analysis, PCA, a, c, e) and supervised discriminant analyses (Powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis, PPLS-DA, b, d, f) of <i>Lobophora</i> species metabolome analyzed by (a, b) NMR and (c, d) LC-MS for MeOH fractions and (e, f) GC-MS for CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fractions (LO: <i>L. obscura</i> , LR: <i>L. rosacea</i> , LM: <i>L. monticola</i> and LS: <i>L. sonderii</i> ). CER = classification error rate with p-value after double cross model validation. .... | 175 |
| <b>Figure 56.</b> Overlay of <sup>1</sup> H-NMR (600 MHz) spectra of the four <i>Lobophora</i> species (one representative sample per species was chosen, the full overlay spectra is available in Figure                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| S5. <i>L. monticola</i> in red, <i>L. obscura</i> in green, <i>L. rosacea</i> in blue and <i>L. sonderii</i> in purple). Regions of discriminating signals are highlighted by black rectangles. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 176 |
| <b>Figure 57.</b> Box plots of lobophorenols B and C (and chemical structure of lobophorenols A-C) among the four <i>Lobophora</i> species and blank (log-transformed data), detected by LC-MS, expressed as mean normalized intensities $\pm$ SD (n = 3 for blank, n= 6 for LM, LO, LR and n= 5 for LS) (LM: <i>L. monticola</i> , LO: <i>L. obscura</i> , LR: <i>L. rosacea</i> , and LS: <i>L. sonderii</i> ). The statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis (KW) followed by post-hoc Conover's test. Letters indicate significant differences between groups based on post-hoc pairwise comparisons (p < 0.05). .... | 177 |
| <b>Figure 58.</b> Multiple Factor Analysis (MFA) obtained with LC-MS and NMR data from the MeOH fractions of <i>Lobophora</i> species (LM: <i>L. monticola</i> , LO: <i>L. obscura</i> , LR: <i>L. rosacea</i> , and LS: <i>L. sonderii</i> ). Confidence level used to construct the ellipses = 0.95, variables scaled to unit variance. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 178 |
| <b>Figure 59.</b> Pictures of <i>Lobophora</i> species: (a) <i>L. rosacea</i> , (b) <i>L. sonderii</i> , (c) <i>L. obscura</i> and (d) <i>L. monticola</i> (images by G. Boussarie). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 184 |
| <b>Figure 60.</b> Powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (PPLS-DA) score plots of the metabolome profiles observed in the four <i>Lobophora</i> species over a 13-months period. (a) <i>Lobophora rosacea</i> , (b) <i>Lobophora obscura</i> , (c) <i>Lobophora monticola</i> and (d) <i>Lobophora sonderii</i> (CER = Mean classification error rate with p-value after double cross model validation). ....                                                                                                                                                                                                               | 213 |
| <b>Figure 61.</b> Hierarchical Clustering Analysis dendrogram of <i>Lobophora</i> species metabolome from different sites in the South-West lagoon of Nouméa, analyzed in LC-MS(qTOF) positive mode (distance measure: Euclidean, clustering algorithm: Ward). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 216 |
| <b>Figure 62.</b> Principal component analysis (PCA) of metabolomic fingerprints of (a) <i>Lobophora obscura</i> , (b) <i>Lobophora sonderii</i> and (c) <i>Lobophora rosacea</i> from different sites: Crouy, Ricaudy, Larégnère, Canard islet and Banc Nord. Only two sites were sampled for <i>Lobophora sonderii</i> and <i>Lobophora obscura</i> because these species were not found at Larégnère, Banc Nord and Canard islet. ....                                                                                                                                                                                                | 216 |
| <b>Figure 63.</b> Proposed chemical structures of the two polyolefins identified among chemomarkers explaining the spatial metabolomic variability. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 217 |
| <b>Figure 64.</b> Powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (PPLS-DA) score plots of the metabolome profiles observed in (a) <i>Lobophora sonderii</i> and (b) <i>Lobophora obscura</i> according to the habitat (living coral, dead coral or seaweed bed) during the 14 days cross-transplantations (CER= Mean classification error rate with p-value after double cross model validation). ....                                                                                                                                                                                                                              | 219 |
| <b>Figure 65.</b> Map of the collected sites in the South-West lagoon of Nouméa, New-Caledonia (blue stars: sites used for the temporal study, red stars: sites collected for the spatial study). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 225 |
| <b>Figure 66.</b> Mise en place des expériences de transplantation de <i>Lobophora</i> . (a) plaque PVC sur laquelle sont fixés 18 fragments de coraux morts prêts à recevoir les frondes de <i>Lobophora</i> , (b) plaque PVC avec les frondes de <i>L. monticola</i> fixées à l'aide de bandelettes de tulle après 7 jours d'expérience, (c) et (d) colonies coralliennes d' <i>Acropora sp.</i> avec plusieurs frondes de <i>L. sonderii</i> (c) et de <i>L. obscura</i> (d) fixées à l'aide de bandelettes de tulle (© J. Gaubert). ....                                                                                             | 242 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure 67.</b> Schéma expérimental des transplantations croisées (cas de <i>L. sonderii</i> ) (© J. Gaubert).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 242 |
| <b>Figure 68.</b> PPLS-DA score plots de <i>L. sonderii</i> , <i>L. obscura</i> et <i>L. monticola</i> en fonction des conditions de transplantations (habitats) en été et en hiver (algueraie, corail mort ou corail vivant). CER = classification error rate with p-value after double cross model validation. ....                                                                                                                                                                    | 247 |
| <b>Figure 69.</b> Diagrammes de Venn sur les marqueurs (VIP pour Variable Importance in Projection) liés au substrat et à la durée de transplantation en été et en hiver chez <i>Lobophora obscura</i> (gauche) et <i>Lobophora sonderii</i> (droite).....                                                                                                                                                                                                                               | 249 |
| <b>Figure 70.</b> Diagramme de Venn sur les marqueurs liés au substrat et à la durée de transplantation en été et en hiver chez <i>Lobophora monticola</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 250 |
| <b>Figure 71.</b> Map of the collected sites (Bouraké and Ricaudy) in the South-West lagoon of Nouméa, New-Caledonia (figure not included in the article). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 271 |
| <b>Figure 72.</b> Global scheme of the in situ and ex situ acidification experiments. Algae collected at Ricaudy were used for the aquaria experiment. Orange arrows indicate seawater circulation. Tanks 1 to 3 correspond to acidified condition of pH (pH 7.7), and tanks 4 to 6 correspond to the control condition of pH (pH 8.1) (figure not included in the article).272                                                                                                          |     |
| <b>Figure 73.</b> (a) powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (PPLS-DA) score plots of the methanol extracts of <i>Lobophora rosacea</i> metabolome from ambient (Ricaudy ) and low pH (Bouraké) and (b) PPLS-DA loadings (threshold 0.8, see tables 30 and S18 for metabolite details). Metabolites in blue referred to Fig. 75. Compounds in grey are not considered for markers selection.....                                                                            | 276 |
| <b>Figure 74.</b> (a) powered Partial Least-Squares-Discriminant Analysis (PPLS-DA) score plots of <i>Lobophora rosacea</i> metabolome analyzed by LC-MS in ambient or low pH conditions at t0 and t14. CER = classification error rate with p-value after double cross model validation. (b) PPLS-DA loadings (threshold 0.8, see tables 30 and S19 for metabolites details). Metabolites in blue referred to Fig. 75. Compounds in grey are not considered for markers selection ..... | 278 |
| <b>Figure 75.</b> Molecular network showing the chemomarkers linked to pH condition (blue) identified after the <i>in situ</i> (Fig. 73b) and <i>ex situ</i> (Fig. 74b) approaches, including the lobophorenols. Red boxes indicate common markers between <i>ex situ</i> t0 samples and <i>in situ</i> samples (see Fig. 76). ....                                                                                                                                                      | 279 |
| <b>Figure 76.</b> Venn diagram on the macroalgal metabolomic chemomarkers of pH conditions (selected on PPLS-DA loadings with threshold = 0.8) from <i>in situ</i> and <i>ex situ</i> experiments. The boxes indicate common chemomarkers between <i>in</i> and <i>ex situ</i> (t0) experiments (red), and <i>in</i> and <i>ex situ</i> (t14) experiments (yellow) (* indicate chemomarkers found in the molecular network Fig. 75).....                                                 | 280 |

## Figures supplémentaires

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure S1.</b> Spectre $^1\text{H}$ -RMN entre 0-8 ppm de la fraction F4 (issue de la VLC) de <i>Lobophora rosacea</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 81  |
| <b>Figure S2.</b> Spectre $^1\text{H}$ -RMN entre 0-8 ppm de la fraction F4 (issue de la VLC) de <i>Lobophora monticola</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 81  |
| <b>Figure S3.</b> Spectre $^1\text{H}$ -RMN entre 0-8 ppm de la fraction F4 (issue de la VLC) de <i>Lobophora sonderii</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 81  |
| <b>Figure S4.</b> Kruskal-Wallis test loading plots with bins varying among species in red ( $p < 0.05$ ).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 188 |
| <b>Figure S5.</b> Overlay of $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz) spectra of the four <i>Lobophora</i> species ( <i>L. monticola</i> in red, <i>L. obscura</i> in green, <i>L. rosacea</i> in blue and <i>L. sonderii</i> in purple). Regions of discriminating signals are highlighted by black rectangles. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 188 |
| <b>Figure S6.</b> Venn diagram test on <i>Lobophora</i> MeOH fractions analyzed by LC-MS (LO: <i>L. obscura</i> , LR: <i>L. rosacea</i> , LM: <i>L. monticola</i> and LS: <i>L. sonderii</i> ). Minimal threshold was selected for each species when the ion intensity detected by LC-MS becomes very low and closed to the noise.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 189 |
| <b>Figure S7.</b> Box plots of the chemomarkers annotated with NIST 2011 among the four <i>Lobophora</i> species (log-transformed data), detected by GC-MS, expressed as mean normalized intensities $\pm$ SD ( $n = 6$ for each species) (LM: <i>L. monticola</i> , LO: <i>L. obscura</i> , LR: <i>L. rosacea</i> , and LS: <i>L. sonderii</i> ). The statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis (KW) followed by post-hoc Conover's test. Letters indicate distinct groupings based on post-hoc pairwise comparisons among groups for each compound ( $p < 0.05$ ).....                                                                                                                                                                  | 189 |
| <b>Figure S8.</b> <i>Lobophora</i> species tree reconstructed with BEAST using the mitochondrial marker <i>cox3</i> and the chloroplast markers <i>psbA</i> and <i>rbcl</i> (adapted from Vieira <i>et al.</i> 2016, 2017) (LO: <i>L. obscura</i> , LR: <i>L. rosacea</i> , LM: <i>L. monticola</i> and LS: <i>L. sonderii</i> ).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 190 |
| <b>Figure S9.</b> Example of chromatogram obtained by GC-MS on the $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ fraction of <i>Lobophora rosacea</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 191 |
| <b>Figure S10.</b> Example of chromatogram obtained by LC-MS on the MeOH fraction of <i>Lobophora rosacea</i> with the elution peaks corresponding to the lobophorenols B and C.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 192 |
| <b>Figure S11.</b> Molecular network on $\text{MS}^2$ spectra managed under Cytoscape 3.5.0, with parent mass label. Lobophorenol B ( $m/z$ 334.272) and lobophorenols C ( $m/z$ 336.287) are in red. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 193 |
| <b>Figure S12.</b> (a) PCA and (b) PPLS-DA of <i>Lobophora</i> species metabolome analyzed by LC-MS in MeOH fractions, including the additional samples available for <i>L. monticola</i> and <i>L. rosacea</i> (LO: <i>L. obscura</i> , LR: <i>L. rosacea</i> , LM: <i>L. monticola</i> and LS: <i>L. sonderii</i> ). CER = classification error rate with p-value after double cross model validation.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 196 |
| <b>Figure S13.</b> Box plots of lobophorenols B and C among the four <i>Lobophora</i> species and blank, including the additional samples available for <i>L. monticola</i> and <i>L. rosacea</i> (log-transformed data), detected by LC-MS, expressed as mean normalized intensities $\pm$ SD ( $n_{\text{blank}} = 3$ , $n_{\text{LM}} = 18$ , $n_{\text{LO}} = 6$ , $n_{\text{LR}} = 23$ and $n_{\text{LS}} = 5$ ) (LM: <i>L. monticola</i> , LO: <i>L. obscura</i> , LR: <i>L. rosacea</i> , and LS: <i>L. sonderii</i> ). The statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis (KW) followed by post-hoc Conover's test. Letters indicate significant differences between groups based on post-hoc pairwise comparisons ( $p < 0.05$ )..... | 196 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure S14.</b> Pie chart showing the main chemical families found in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fraction of <i>Lobophora</i> species.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 198 |
| <b>Figure S15.</b> Example of chromatogram obtained by LC-MS showing the two main compounds annotated as polyolefins ( $m/z$ 304.3026 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> , C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> and $m/z$ 332.3332 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> , C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> ).                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 230 |
| <b>Figure S16.</b> Example of in-house <sup>1</sup> H-NMR spectra (500 Mz) obtained on a fraction of <i>Lobophora sonderii</i> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 230 |
| <b>Figure S17.</b> Box plots of the chemomarkers annotated in <i>Lobophora rosacea</i> responsible for metabolomic differences according to sites. Ion intensities of chemomarkers are expressed as mean normalized intensities ± SD (log-transformed data, n= 6 for Banc Nord (BN), Canard and Ricaudy (Ricaud), n= 5 for Larégnère (Lare) and n= 4 for Crouy). Statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis (KW) followed by post-hoc Conover's test. Letters indicate distinct groupings based on post-hoc pairwise comparisons among groups for each chemomarker (p < 0.05). | 231 |
| <b>Figure S18.</b> Box plots of the chemomarkers annotated in (a) <i>Lobophora sonderii</i> and (b) <i>Lobophora obscura</i> responsible for the discrimination according to sites. Ion intensities of chemomarkers are expressed as mean normalized intensities ± SD (log-transformed data, n= 6). Differences between ion intensities at Crouy vs Ricaudy were tested with Mann-Whitney tests. *: p < 0.01.                                                                                                                                                                                | 232 |
| <b>Figure S19.</b> Box plots of the chemomarkers annotated in <i>Lobophora sonderii</i> responsible for metabolomic differences according to the substrate of transplantation. Ion intensities of chemomarkers are expressed as mean normalized intensities ± SD (log-transformed data, n= 8 for coral, n= 11 for dead coral, n= 23 for seaweed bed). Statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis (KW) followed by post-hoc Conover's test. Letters indicate distinct groupings based on post-hoc pairwise comparisons among groups for each chemomarker (p < 0.05).            | 232 |
| <b>Figure S20.</b> PCA score plots of methanolic fractions of <i>Lobophora rosacea</i> (LR), <i>Lobophora obscura</i> (LO), <i>Lobophora monticola</i> (LM) and <i>Lobophora sonderii</i> (LS) according to months.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 233 |
| <b>Figure S21.</b> (a) PVC slab holding 18 dead coral fragments, (b) coral colony with fronds of <i>Lobophora sonderii</i> fixed with tulle strips (© J. Gaubert.).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 233 |
| <b>Figure S22.</b> Exemples de chromatogrammes (Base Peak Chromatogram BPC) obtenus sur des échantillons des expériences de transplantations de (a) <i>Lobophora sonderii</i> , (b) <i>Lobophora monticola</i> et (c) <i>Lobophora obscura</i> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 256 |
| <b>Figure S23.</b> Phylogenetic tree reconstruction of 20 <i>Lobophora</i> species using Bayesian inference (BI) implemented in MrBayes v3.2, using the chloroplast marker psbA. Voucher numbers of <i>L. rosacea</i> collected at Ricaudy and Bouraké are indicated.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 287 |
| <b>Figure S24.</b> Box plots of the chemomarkers linked to seawater pH condition obtained from metabolomic fingerprints of <i>Lobophora rosacea</i> sampled at Ricaudy (control pH) vs Bouraké (low pH). Ion intensities of chemomarkers are expressed as mean normalized intensities ± SD (log-transformed data, n = 8). Differences between ion intensities for control vs low pH conditions were tested with Mann-Whitney tests. **: p < 0.001.                                                                                                                                           | 288 |

## **Table des tableaux**

|                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tableau 1.</b> Molécules identifiées chez <i>Lobophora</i> .....                                                                                                                                                                                       | 22  |
| <b>Tableau 2.</b> Etudes chez les macroalgues et plantes marines utilisant des techniques de métabolomiques pour étudier l'impact de stress biotiques ou abiotiques.....                                                                                  | 35  |
| <b>Tableau 3.</b> Coordonnées GPS des sites de collectes utilisés durant l'étude.....                                                                                                                                                                     | 41  |
| <b>Tableau 4.</b> Gradient utilisé pour la purification de la fraction F4 de <i>L. sonderii</i> .....                                                                                                                                                     | 63  |
| <b>Tableau 5.</b> Gradient utilisé pour la purification de la fraction F4 de <i>L. monticola</i> .....                                                                                                                                                    | 64  |
| <b>Tableau 6.</b> Paramètres utilisés pour la purification des fractions LR-F5-f4, LS-F5-f4, LR-F5-f2 et LS-F5-f2 sur HPLC en isocratique. ....                                                                                                           | 66  |
| <b>Tableau 7.</b> Masses des fractions (mg) issues du fractionnement sur colonne ouverte de silice en phase normale de <i>L. rosacea</i> , <i>L. sonderii</i> et <i>L. monticola</i> .....                                                                | 73  |
| <b>Tableau 8.</b> Masses des fractions (mg) issues du fractionnement sur colonne ouverte de silice en phase normale de <i>L. rosacea</i> , <i>L. sonderii</i> et <i>L. monticola</i> .....                                                                | 78  |
| <b>Tableau 9.</b> Nombres moyens de mouches mortes après 24 h en fonction de l'appât et mortalité standardisée par rapport aux témoins.....                                                                                                               | 88  |
| <b>Tableau 10.</b> Nombre moyen (moy) de mouches piégées (et écarts types) dans les boîtes de Pétri contenant les extraits à tester ou les conditions témoins en fonction du temps.....                                                                   | 90  |
| <b>Tableau 11.</b> Activités insecticides, nématocides et acaricides reportées chez les macroalgues marines (C : Chlorophyceae, P : Phaeophyceae, R : Rhodophyceae).....                                                                                  | 94  |
| <b>Tableau 12.</b> Récapitulatif des concentrations ou masses de chaque échantillon utilisées pour les tests.....                                                                                                                                         | 97  |
| <b>Tableau 13.</b> Activités antifongiques reportées chez les macroalgues marines (C : Chlorophyceae, P : Phaeophyceae, R : Rhodophyceae). ....                                                                                                           | 101 |
| <b>Tableau 14.</b> Récapitulatif des concentrations de chaque échantillon utilisées pour les tests. ....                                                                                                                                                  | 106 |
| <b>Tableau 15.</b> Taux de croissance $\mu$ obtenus en fonctions des concentrations de l'extrait LMF6 testé. ....                                                                                                                                         | 115 |
| <b>Tableau 16.</b> Activités antibactériennes retrouvées dans la littérature associées au genre <i>Lobophora</i> .....                                                                                                                                    | 119 |
| <b>Tableau 17.</b> Plan d'échantillonnage pour l'étude des sources de variation du métabolome de <i>Lobophora</i> .....                                                                                                                                   | 139 |
| <b>Tableau 18.</b> Groupes d'ions retrouvés dans des contaminations en mode d'analyse ESI+ (Electrospray ionization, mode positive) issu de Waters ®.....                                                                                                 | 151 |
| <b>Tableau 19.</b> Tests utilisés (avec leur package R ou logiciel) en fonction des techniques d'analyses du métabolome (LC-MS, GC-MS ou RMN). ....                                                                                                       | 155 |
| <b>Tableau 20.</b> Etudes sur les variations en composés chimiques intra-thalle observées chez les trois grands divisions d'algues (B= brunes, V= vertes, R= rouges).....                                                                                 | 168 |
| <b>Table 21.</b> Chemomarkers detected by GC-MS in the CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fraction of <i>Lobophora</i> species, annotated with NIST 2011 database (RI = Van Del Dool and Kratz Retention Index, exp. = experimental, lit. = literature)..... | 179 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Table 22.</b> Results of Permanova tests (9999 permutations) on environmental factors explaining the temporal metabolomic variability in the four <i>Lobophora</i> species (LR: <i>Lobophora rosacea</i> , LO: <i>Lobophora obscura</i> , LM: <i>Lobophora monticola</i> and LS: <i>Lobophora sonderii</i> ). .214                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 214 |
| <b>Table 23.</b> Chemomarkers responsible for the difference according to sites in <i>Lobophora rosacea</i> , <i>Lobophora sonderii</i> and <i>Lobophora obscura</i> (ion [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> ). The score MFG (molecular formulas generation) is the MFG overall match score (0-100 %) combining the MS and MS/MS scores. ....218                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 218 |
| <b>Table 24.</b> Experimental framework of <i>Lobophora</i> transplantation experiments. ....226                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 226 |
| <b>Tableau 25.</b> Plan expérimental des transplantations croisées de <i>Lobophora</i> .....240                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 240 |
| <b>Tableau 26.</b> Plan d'échantillonnage des expériences de transplantations croisées en été et hiver de <i>L. sonderii</i> , <i>L. obscura</i> et <i>L. monticola</i> .....243                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 243 |
| <b>Tableau 27.</b> Résultats des PERMANOVA sur les facteurs « saison », « habitat » et « durée » expliquant les variations métabolomiques chez <i>L. obscura</i> , <i>L. monticola</i> et <i>L. sonderii</i> durant les expériences de transplantations croisées (méthode= "euclidean", permutations= 9999). 245                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 245 |
| <b>Tableau 28.</b> Résultats des PERMANOVA sur les facteurs « habitat », « durée » et « habitat + durée » pouvant expliquer les variations métabolomiques chez <i>L. obscura</i> , <i>L. monticola</i> et <i>L. sonderii</i> durant les expériences de transplantations croisées en été et hiver australs (méthode= "euclidean", permutations= 9999). Les p-values significatives (p < 0.05) sont en gras.246                                                                                                                                                                                                                                                | 246 |
| <b>Tableau 29.</b> Tests post-hoc de comparaisons deux à deux par permutations basés sur le modèle de validation croisée pour différencier les métabotypes de chaque espèce en fonction de l'habitat (999 permutations, p-value adjustment method: fdr). Les p-values non significatives (p > 0.05) sont en gras (LS : <i>L. sonderii</i> , LM : <i>L. monticola</i> , LO : <i>L. obscura</i> ).248                                                                                                                                                                                                                                                          | 248 |
| <b>Table 30.</b> <i>Lobophora rosacea</i> chemomarkers of pH conditions found in the molecular network (* including the two common compounds between <i>in situ</i> and <i>t0 ex situ</i> samples) and common features between <i>in situ</i> and <i>ex situ</i> experiments (identified with Venn diagram test) responsible for the differences according to pH conditions after LC-MS analyses. The mSigma (mS) value is a measure for the goodness of fit between experimental mass and isotopic pattern with theoretical ones: lower is the mS, better is the annotation. RT = retention time, VIP =Variable Importance in Projection or marker. ....281 | 281 |

## Tables supplémentaires

|                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Table S1.</b> Post-hoc permutational pairwise test based on crossed model validation for metabotype differentiation according to species by NMR, LC-MS or GC-MS (999 permutations, p-value adjustment method: fdr). Significant p-values (p < 0.05) are in bold. ....194                 | 194 |
| <b>Table S2.</b> Selection of the most significant regions in the spectra varying among <i>Lobophora</i> species (from Kruskal-Wallis test, with p-value < 0.05). Characteristic signals (ppm) of lobophorenols A, B and C are also assigned to the corresponding chemical shift range..194 | 194 |

**Table S3.** *Lobophora* ions responsible for the difference according to species after LC-MS analysis. The mSigma (mS) value is a measure for the goodness of fit between experimental mass and isotopic pattern with theoretical ones: lower is the mS, better is the annotation.

195

**Table S4:** Annotated main compounds in the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction of *Lobophora* species. Annotation was done with NIST 2011 and Wiley databases (RI= Van Del Dool and Kratz Retention Index).

197

**Table S5.** Results of the permutational pairwise test for metabotype differentiation according to months in *Lobophora rosacea* (999 permutations, P value adjustment method: fdr). No statistically significant results are in bold (p > 0.05).

234

**Table S6.** Results of the permutational pairwise test for metabotype differentiation according to months in *Lobophora monticola* (999 permutations, P value adjustment method: fdr). No statistically significant results are in bold (p > 0.05).

234

**Table S7.** Results of the permutational pairwise test for metabotype differentiation according to months in *Lobophora sonderii* (999 permutations, P value adjustment method: fdr). No statistically significant results are in bold (p > 0.05).

234

**Table S8.** Results of the permutational pairwise test for metabotype differentiation according to months in *Lobophora obscura* (999 permutations, P value adjustment method: fdr). No statistically significant results are in bold (p > 0.05).

235

**Table S9.** Post-hoc permutational pairwise test based on crossed model validation for *Lobophora rosacea* metabotype differentiation according to sites (999 permutations, p-value adjustment method: fdr). Significant p-values (p < 0.05) are in bold.

235

**Table S10a.** Characterization of the type of habitat for *Lobophora rosacea* and *Lobophora obscura*.

235

**Table S10b.** Characterization of the type of habitat for *Lobophora sonderii*.

236

**Table S11.** Post-hoc permutational pairwise test based on crossed model validation for *Lobophora sonderii* metabotypes differentiation according to the time of transplantation (999 permutations, p-value adjustment method: fdr). Significant p-values (p < 0.05) are in bold.

236

**Table S12.** Post-hoc permutational pairwise test based on crossed model validation for *Lobophora sonderii* and *Lobophora obscura* metabotypes differentiation according to the habitat: seaweed bed, leaving coral or dead coral (999 permutations, p-value adjustment method: fdr). Significant p-values (p < 0.05) are in bold.

236

**Table S13.** Ions responsible for the difference according to the habitat in *Lobophora sonderii* during the 14 days cross-transplantations. The score MFG (molecular formulas generation) is the MFG overall match score (0-100 %) combining the MS and MS/MS scores.

237

**Table S14.** Sampling of *Lobophora* species for the study of metabolomic variations according to space, time and after the transplantation experiments

237

**Table S15.** Monthly means of Sea Surface Temperature (SST, °C), photoperiod (hours. day<sup>-1</sup>), Photosynthetic Active Radiation (PAR, mol.m<sup>-2</sup>.day<sup>-1</sup>), global radiation (Joules.cm<sup>-2</sup>),

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| rainfall (mm. day <sup>-1</sup> ) and salinity (psu) recorded from December 2015 to December 2016 in the South-West lagoon of Nouméa, New-Caledonia.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 238 |
| <b>Tableau S16.</b> Résultats des PPLS-DA (NMC= Mean number of misclassifications with p-value after double cross model validation et des tests post-hoc de permutations deux à deux basé sur le modèle de validation croisée pour différencier les métabotypes de chaque espèce en fonction de la durée de transplantations (999 permutations, p-value adjustment method: fdr) (LS : <i>L. sonderii</i> , LM : <i>L. monticola</i> , LO : <i>L. obscura</i> )..... | 255 |
| <b>Table S17.</b> Seawater temperature and pH measured in <i>ambient</i> and low pH tanks from t0 to t14 for aquaria experiment. Carbonate chemistry parameters were calculated with CO2Sys (Lewis & Wallace, 1998) using mean total alkalinity (TA), salinity (35), temperature (T) and pH.....                                                                                                                                                                    | 289 |
| <b>Table S18.</b> <i>Lobophora rosacea</i> ions responsible for the discrimination between low pH (Bouraké) and ambient pH conditions (Ricaudy). RT = retention time. The mSigma (mS) value is a measure for the goodness of fit between experimental mass and isotopic pattern with theoretical ones: lower is the mS, better is the annotation.....                                                                                                               | 291 |
| <b>Table S19.</b> <i>Lobophora rosacea</i> ions responsible for the discrimination between low pH and ambient pH conditions, at the beginning (t0) and the end (t14) of the aquaria experiment. RT = retention time. The mSigma (mS) value is a measure for the goodness of fit between experimental mass and isotopic pattern with theoretical ones: lower is the mS, better is the annotation.....                                                                | 293 |

## Abréviations

|                                 |                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ACP                             | Analyse en Composantes Principales                                                                                                                                      |
| CD <sub>3</sub> OD              | méthanol deutéré                                                                                                                                                        |
| CDCl <sub>3</sub>               | chloroforme deutéré                                                                                                                                                     |
| CER                             | classification error rate with p-value after double cross model validation (taux d'erreur de classification avec p-values après un modèle de double validation croisée) |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | dichlorométhane                                                                                                                                                         |
| CO <sub>2</sub>                 | dioxyde de carbone                                                                                                                                                      |
| DO                              | densité optique                                                                                                                                                         |
| ESI                             | electrospray ionization                                                                                                                                                 |
| EtOAc                           | acétate d'éthyle                                                                                                                                                        |
| EtOH                            | éthanol                                                                                                                                                                 |
| GC-MS                           | Gaz chromatography coupled to mass spectrometry (chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse)                                                           |
| GNPS                            | Global Natural Products Social Molecular Networking                                                                                                                     |
| GOPS                            | Grand Observatoire de l'environnement et de la biodiversité terrestre et marine du Pacifique Sud                                                                        |
| H <sub>2</sub> O                | eau                                                                                                                                                                     |
| HCA                             | Hierarchical Cluster Analysis (Classification Ascendante Hiérarchique)                                                                                                  |
| HPLC                            | High performance Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Haute Performance)                                                                                      |
| IC <sub>50</sub>                | concentration d'extrait nécessaire pour obtenir un taux de croissance bactérien diminué de 50 %                                                                         |
| LC-MS                           | Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse)                                                                   |
| LM                              | <i>Lobophora monticola</i>                                                                                                                                              |
| LO                              | <i>Lobophora obscura</i>                                                                                                                                                |
| LR                              | <i>Lobophora rosacea</i>                                                                                                                                                |

|                |                                                                                             |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| LS             | <i>Lobophora sonderii</i>                                                                   |
| MeOH           | méthanol                                                                                    |
| MFA            | Multiple Factor Analysis (Analyse Factorielle Multiple)                                     |
| N <sub>2</sub> | diazote                                                                                     |
| OA             | ocean acidification (acidification de l'océan)                                              |
| PERMANOVA      | Analyse Multivariée de la Variance par Permutations                                         |
| PLS-DA         | Régression PLS discriminante ou régression des moindres carrés partiels discriminante       |
| ppm            | partie par million                                                                          |
| QC             | Quality Control (Contrôle Qualité)                                                          |
| NMR            | Nuclear Magnetic Resonance (Résonance Magnétique Nucléaire RMN du proton ( <sup>1</sup> H)) |
| SPE            | Solid Phase Extraction (Extraction en Phase Solide)                                         |
| TFA            | Trifluoroacetic Acid (Acide Trifluoroacétique)                                              |
| UHPLC-MS-QToF  | Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry    |
| UV             | ultraviolet                                                                                 |
| VLC            | Vacuum Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide sous Vide)                            |

## Diffusion scientifique

### Articles scientifiques

#### *Soumis*

- Comparing the metabolomic variability of four macroalgal species of the genus *Lobophora* using diverse approaches. J. Gaubert, S. Greff, O.P. Thomas & C. Payri.  
*Soumis le 1<sup>er</sup> Juillet 2018 à Phytochemistry*
- High metabolic variation for seaweeds in response to environmental changes: a case study of the brown algae *Lobophora* in coral reefs. J. Gaubert, C. E. Payri, C. Vieira, H. Solanki & O. P. Thomas.

*Soumis le 2 Août 2018 à Scientific reports*

#### *En préparation*

- Impact of ocean acidification on the metabolome of *Lobophora rosacea* (Dictyotales, Phaeophyceae): an acidified semi-enclosed lagoon system as a natural laboratory in New Caledonia. J. Gaubert, R. Rodolfo-Metalpa, S. Greff, C. E. Payri & O. P. Thomas.

### Posters

- Atelier à la fête de la Science 2016 (3 posters)  
« Les algues marines », « Des molécules naturelles intéressantes » et « *Lobophora* : du lagon au laboratoire »
- **MetaboMeeting 2017 à Birmingham (UK).** Influence of the environment on the metabolic fingerprint of the marine brown macroalgae *Lobophora* in the New Caledonian lagoon.

## Cours & formations

- Formation IRD « Statistiques et logiciel R » (**30h**, octobre 2015, Pr. J.N Bacro)
- Enseignement à distance ENSAD (Criobe) sur les récifs coralliens, UE « Biodiversité et Ecologie des récifs coralliens » (**30h**, octobre-novembre 2015, note à l'examen : 18/20, Dr. D. Lecchini).
- Encadrement d'un étudiant de Seconde dans le cadre du module « Science Académie » - 1<sup>er</sup> prix au concours (**20 h**, décembre 2015).
- Formation à l'Université de la Nouvelle-Calédonie (UNC) en « Instrumentation dans l'analyse du vivant » (**6h**, Juin 2016, Cyril Antheaume)
- Fête de la Science 2016 (**12h**, juillet 2016)
- Formation à la National University of Ireland Galway « Introduction à la RMN » (**12h**, février-mars 2017, Pr. O. Thomas)
- Doctoriales de l'UNC (**20h**, août 2017)
- “An introduction to Scleratinia” (**6h**, septembre 2017, Dr. F. Benzoni)
- Formation en ligne « Metabolomics Data Processing and Data Analysis » University of Birmingham (**4 semaines**, février- mars 2016)

## Bourses

- The Murray Foundation (1000 euros)
- Ambassade de France en Irlande (2250 euros)

**Résumé.** Les macroalgues marines constituent un riche réservoir de composés, aussi appelés métabolites spécialisés, qui jouent diverses fonctions écologiques et font partie des traits adaptatifs. Leur concentration peut varier en fonction de facteurs biotiques et abiotiques mais peu d'études sur les réponses globales des métabolites (métabolome) sont disponibles. C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude doctorale centrée sur les sources potentielles de variations du métabolome chez une algue brune commune des récifs coralliens, *Lobophora*. Pour cela, quatre espèces de *Lobophora* présentant des morphologies et des habitats variés ont été sélectionnées dans le lagon de Nouvelle-Calédonie. Nous avons dans un premier temps cherché à caractériser et identifier des métabolites via des approches de chimie traditionnelle. Les lobophorénols, précédemment identifiés chez *L. rosacea*, ont été retrouvés chez cette espèce ainsi que des molécules polyoléfiniques chez toutes les espèces étudiées. Plusieurs tests de bioactivité sur diverses souches biologiques ont été mis en place sur des fractions algales dans une visée de valorisation et des résultats positifs ont été obtenus lors du criblage antibactérien contre *Staphylococcus aureus*. Dans un deuxième temps, les sources de variations du métabolome ont été étudiées à plusieurs échelles par des approches de métabolomique non ciblée. Il ressort de ces diverses études que le métabolome de *Lobophora* est hyper-variable. Les espèces présentent une empreinte métabolomique propre, sans variation intra-thalle. Leur métabolome varie à l'échelle spatiale, en fonction des sites d'étude et des habitats testés, et au cours du temps en lien avec les facteurs environnementaux, tels que température et salinité. En outre, des conditions de faible pH entraînent également des changements métabolomiques comme nous avons pu le tester en conditions naturelles (site de Bouraké) et en conditions contrôlées. Parmi les marqueurs chimiques liés à ces conditions changeantes nous avons identifié les lobophorénols et plusieurs de leurs potentiels dérivés, des dérivés d'acides gras oxygénés polyinsaturés et des composés polyoléfiniques. Bien que la métabolomique ait été appliquée avec succès pour discriminer les espèces ou détecter l'effet d'un stress environnemental, les présents travaux ont également souligné la difficulté à travailler sur le genre *Lobophora*, riche en graisses et pigments, et la limitation dans l'annotation des marqueurs en raison du peu de références disponibles pour ce groupe d'organismes marins encore peu étudiés via cette approche.

**Mots-clés :** macroalgues, *Lobophora*, Nouvelle-Calédonie, métabolome, métabolomique, bioactivités

**Abstract.** Marine macroalgae represent a rich source of compounds, also known as specialized metabolites that play diverse ecological functions and are part of adaptive traits. Their concentration can vary according to biotic and abiotic factors but just a few studies on the overall responses of metabolites (metabolome) are available. In this context, the present doctoral study focuses on the potential sources of metabolomic variations in a common coral reef's brown alga, *Lobophora*. To this end, four *Lobophora* species with various morphologies and habitats have been selected within the New Caledonian lagoon. We first sought to characterize and identify metabolites via traditional chemical approaches. Lobophorenols, previously identified in *L. rosacea*, were found in this species as well as polyolefin molecules in all studied species. Several bioactivity tests on various biological targets have been set up on algal fractions in a valorization goal and positive results were obtained during antibacterial screening against *Staphylococcus aureus*. In a second step, the sources of metabolomic variations were studied at several scales by non-targeted metabolomics approaches. These various studies showed that the metabolome of *Lobophora* is highly variable. The species have their own metabolomic fingerprinting, without intra-thallus variation. Their metabolome varies spatially, depending on the study sites and tested habitats, and over time in relation to environmental factors, such as temperature and salinity. In addition, low pH conditions also lead to metabolomic changes, both in natural conditions (Bouraké site) and under controlled conditions. Among the chemomarkers linked to these changing conditions, we identified lobophorenols as well as several of their potential derivatives, some oxygenated polyunsaturated fatty acid derivatives and polyolefin compounds. Although metabolomics has been successfully applied to discriminate species or to detect the effect of environmental stress, the present work also highlighted the difficulty of working on *Lobophora* genus, rich in fats and pigments, and the limitation in markers annotation due to the lack of available references for this group of marine organisms still under-researched using this approach.

**Keywords:** macroalgae, *Lobophora*, New Caledonia, metabolome, metabolomic, bioactivity