

Mémoire

Auteur : Preud'homme, Sophie

Promoteur(s) : Poulicek, Mathieu; Frederich, Michel

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en océanographie, à finalité approfondie

Année académique : 2020-2021

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/11777>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Année académique 2020 – 2021

Influence de l'origine des gorgones du genre *Eunicella* (Verril, 1869) sur la production de métabolites secondaires pharmacologiquement actifs

Sophie Preud'homme

Promoteur du mémoire : Dr. Mathieu Poulicek
Laboratoire d'écologie animale et
écotoxicologie,
Unité d'écologie marine

Co-promoteur du mémoire : Dr. Michel Frederich
Département de pharmacie
Laboratoire de Pharmacognosie

Encadrant : M. Olivier Bonnet
Département de pharmacie
Laboratoire de Pharmacognosie

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du titre de Master en
Océanographie, à finalité approfondie

Université de Liège

Faculté des Sciences

« Conformément aux règles imposées à la rédaction, ce mémoire ne doit pas dépasser 50 pages, rédigées en Times 12 ou équivalent »

Remerciements

J'insère au début de ce travail une partie importante, celle des remerciements. Sans toutes ces personnes, je n'aurais pu rendre mon mémoire de fin d'études et réaliser ces analyses qui m'ont tant intéressée.

Premièrement, je tiens à remercier et saluer avec gratitude mon promoteur de mémoire, Monsieur Mathieu POULICEK, qui a été le premier à être enthousiasmé et à me soutenir dans mon idée de joindre l'Océanographie et la Pharmacie. Ses nombreux contacts tout autour de l'Europe ainsi que ses connaissances sur les gorgones du genre *Eunicella* ont permis de mener à bien ce projet, sans oublier sa confiance, sa disponibilité et sa gentillesse.

Je voudrais également remercier Monsieur Michel FREDERICH, Monsieur Olivier BONNET ainsi que toutes les personnes présentes dans le laboratoire de Pharmacognosie. Sans leurs précieuses aides dans le laboratoire, ce projet n'aurait simplement pas pu voir le jour. Je les remercie donc pour leurs conseils et leurs disponibilités ainsi que l'accueil chaleureux lors de mon arrivée.

Je remercie également Monsieur Cédric MALHERBE, du département de Chimie de la faculté des Sciences, pour m'avoir accordé de son temps pour réaliser quelques analyses Raman sur mes échantillons.

Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes autour de l'Europe qui m'ont permis d'obtenir les échantillons de gorgones : Monsieur Thomas RICHARD, de l'Institut Océanographique de Monaco, qui m'a envoyé très gentiment des gorgones élevées en aquarium ; Monsieur Georges SKOUFAS, professeur à l'Institut de Thessaloniki, sans qui je n'aurais pu obtenir des gorgones provenant de la mer Egée ; Madame Michèle LEDUC, de la Station de Recherches Sous-Marines et Océanographiques STARESO en Corse ; la station Biologique de Roscoff en Bretagne pour m'avoir envoyé des gorgones provenant de l'océan Atlantique et enfin, le club de plongée PlanetOcéan à Hendaye dirigé par Monsieur Olivier CREYSSAC qui m'a permis de plonger avec eux dans l'océan Atlantique afin de récolter quelques échantillons de gorgones.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui ont pu répondre à mes questions ou à mes recherches lors de mon avancée dans mon mémoire.

Pour terminer, un énorme merci à mes proches et surtout à ma famille qui m'ont soutenu tout le long de ce travail lors de mes moments de doute et de stress.

Résumé

L'océan couvre 71% de la surface de la terre et présente une biodiversité beaucoup plus importante que la biodiversité terrestre. Cependant, très peu de molécules pharmacologiquement actives ont été isolées de cet environnement pourtant très prometteur.

De plus en plus d'études sont réalisées sur la présence de métabolites secondaires pharmacologiquement actifs chez les gorgones, produits par une microbiocénose interne à la gorgone, composée de nombreux microorganismes. Afin de pouvoir extraire ces molécules, des espèces de gorgones peuvent alors être surexploitées dans leur milieu naturel, essentiellement en milieu corallien. Des analyses pharmacologiques ont déjà été réalisées sur les gorgones du genre *Eunicella* avec la mise en évidence de molécules comme des terpènes ou des stéroïdes, mais aucune comparaison n'a encore été faite entre les différentes origines de ces espèces.

Des analyses pour détecter la présence de terpènes et de stéroïdes ont été réalisées sur des échantillons de *Eunicella cavolini* (Koch, 1887), *Eunicella singularis* (Esper, 1791) et *Eunicella verrucosa* (Pallas, 1766) provenant de différentes localisations : la mer Egée, la Corse (mer Ligure), Roscoff (mer Celtique) et enfin, Hendaye (golfe de Gascogne). Ces analyses ont ensuite été comparées au milieu de culture en aquarium. Dans l'environnement naturel, plusieurs variables ont été étudiées : la profondeur, l'hydrodynamisme et les conditions anthropiques. Plusieurs techniques ont été utilisées pour détecter la présence de ces molécules : des chromatographies sur couche mince, une spectroscopie à résonance magnétique nucléaire, une spectroscopie de masse et enfin, une spectroscopie Raman.

Les résultats de ces différentes analyses ont bien mis en évidence la présence de terpènes et de stéroïdes chez les gorgones du genre *Eunicella*. Les métabolites secondaires analysés sont formés en quantités égales voir plus importantes dans les échantillons provenant de l'aquarium par rapport aux gorgones se trouvant dans l'environnement naturel. La diversité et la quantité de métabolites secondaires produits sont fortement influencées par la localisation principale : c'est la caractéristique dominante ressortant de cette comparaison. Une température aux alentours de 16°C favoriserait le rendement et la diversité de métabolites secondaires produits. Parmi les 3 espèces étudiées, l'espèce *Eunicella verrucosa* présenterait les résultats les plus prometteurs, même s'il existe peu de corrélations entre les résultats d'une même espèce. Par contre, la profondeur, les conditions hydrodynamiques et l'impact anthropique ne semblent pas influencer la diversité de métabolites secondaires produits. Les gorgones du genre *Eunicella* sont donc des organismes marins prometteurs pour le développement de molécules pharmacologiques en milieu de culture.

Abstract

The ocean covers 71% of the planet and has a biodiversity much wider than terrestrial biodiversity. However, very few pharmaceutical molecules have been isolated from this environment, yet very promising.

Studies on secondary metabolites with pharmacological properties in gorgonians have been increasingly growing. Those molecules are made by a symbiosis between gorgonians and microorganisms. To extract it, some species can be overexploited in their natural environment on coral reefs. Pharmacological analyses have already been done on gorgonians of the genus *Eunicella* with the highlight of molecules such as terpenes and steroids, but no comparison have been made yet between different origins of those species.

For this study, analyses to detect the presence of terpenes and steroids were made on the species *Eunicella cavolini* (Koch, 1887), *Eunicella singularis* (Esper, 1791) and *Eunicella verrucosa* (Pallas, 1766) coming from different locations: Aegean Sea, Corsica (Ligurian Sea), Roscoff (Celtic Sea) and Hendaye (Biscay Bay). Those analyses were then compared to samples coming from the culture medium in aquarium. In the natural environment, three variables were studied: depth, hydrodynamic conditions and anthropic conditions. Several techniques were used to detect the presence of secondary metabolites: thin layer chromatography, nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectroscopy and Raman spectroscopy.

The results highlighted the presence of terpenes and steroids in the gorgonians of the genus *Eunicella*. They are present in the same or even larger amount in the samples coming from the aquarium compared to the ones coming from the natural environment. Diversity and quantity is mainly influenced by the location: it's the main characteristic coming out of this comparison. Temperature around 16°C seems to favor the development of the secondary metabolites. Between the three species studied, *Eunicella verrucosa* is likely to present the best results, though there are few correlations between the results of the same species. Depth, hydrodynamic conditions and anthropic conditions doesn't seem to influence the diversity of the secondary metabolites produced. Gorgonians of the genus *Eunicella* are therefore marine organisms very promising for the development of pharmacological molecules in a culture environment.

Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1. Les gorgones et le genre <i>Eunicella</i>	1
1.1.1 Classification.....	1
1.1.2. Description des gorgones.....	2
1.1.3. Le genre <i>Eunicella</i>	4
1.1.4. Espèces bioindicatrices.....	7
1.2. Caractéristiques de la Mer Méditerranée et de l’Océan Atlantique.....	8
1.3. Formation de métabolites secondaires.....	9
1.3.1. Définition des métabolites secondaires.....	9
1.3.2. Microorganismes impliqués.....	9
1.3.3. Rôles des métabolites secondaires.....	10
1.3.4. Description des terpènes et des stéroïdes.....	12
1.4. Action pharmacologique des métabolites secondaires.....	13
1.4.1. Diterpènes.....	14
1.4.1.1. <i>Eunicella singularis</i>	15
1.4.1.2. <i>Eunicella cavolini</i>	16
1.4.1.3. <i>Eunicella verrucosa</i>	16
1.4.2. Stéroïdes.....	16
1.4.2.1. <i>Eunicella singularis</i>	17
1.4.2.2. <i>Eunicella cavolini</i>	17
1.4.2.3. <i>Eunicella verrucosa</i>	17
2. Contexte et objectifs.....	18
3. Matériel et méthodes.....	19
3.1. Sites d’échantillonnage.....	19
3.1.1. Mer Méditerranée Orientale – Grèce - Mer Egée.....	19
3.1.2. Mer Méditerranée Occidentale – Corse (Station STARESO) – Mer Ligure.....	21
3.1.3. Océan Atlantique – Bretagne (Station biologique de Roscoff) – Mer Celtique.....	23
3.1.4. Océan Atlantique – Hendaye – Golfe de Gascogne.....	24
3.1.5. Aquarium de Monaco.....	25
3.2. Collecte et séchage du matériel.....	26

3.3. Extraction des composés à partir des gorgones.....	26
3.4. Calcul du rendement.....	27
3.5. Chromatographie sur couche mince (CCM)	27
3.6. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.....	28
3.7. Spectroscopie de masse.....	29
3.8. Localisation des molécules par spectroscopie Raman.....	29
4. Résultats.....	31
4.1. Rendements.....	31
4.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)	32
4.3. Spectre de résonance magnétique.....	37
4.4. Spectroscopie de masse.....	41
4.5. Localisation des molécules par spectroscopie Raman.....	43
5. Discussion.....	44
5.1. Comparaison.....	44
5.1.1. Variation inter-sites.....	44
5.1.2. Variation interspécifique.....	44
5.1.3. Variation de la profondeur.....	45
5.1.4. Variation de l'hydrodynamisme.....	45
5.1.5. Variation des conditions anthropiques.....	46
5.2. Masse des molécules.....	46
5.3. Localisation des molécules dans la structure des gorgones.....	46
6. Conclusion.....	47
7. Perspectives.....	48
8. Bibliographie.....	50
9. Annexes.....	58

Liste des figures

Figure 1: classification des gorgones (Fabricius K. & Alderslade P., 2001 ; Lecointre G. & Le Guyader H., 2013 ; WoRMS).....	1
Figure 2 : structure type d'un polype d'une gorgone avec la présence de sclérites dans le coenenchyme et de 8 tentacules pennées sur chaque polype (repris de Poulicek M., 2020)	2
Figure 3: morphologie des 5 types de spicules les plus communs chez les gorgones (Lewis J.C. & Von Wallis E., 1991).....	3
Figure 4 : <i>Eunicella cavolini</i> sur un substrat rocheux dans la mer Méditerranée (modifié de Sini M. <i>et al.</i> , 2015).....	5
Figure 5: <i>Eunicella singularis</i> dans la mer Méditerranée (modifié de Issaris Y.)	6
Figure 6 : <i>Eunicella verrucosa</i> dans la mer Méditerranée à une profondeur de 65 m et les polypes verruqueux (Chimienti G., 2020).....	7
Figure 7 : <i>Eunicella cavolini</i> récolté en Corse colonisé par des algues (CO – Site 3).....	12
Figure 8 : structure de base d'un terpène, le squelette isoprène (Frederich M., 2018)	13
Figure 9 : squelette de base pour les molécules de type eunicelline (Matulja D. <i>et al.</i> , 2020).....	13
Figure 10 : structure type d'un stéroïde (Frederich M., 2018).....	13
Figure 11 : palmonine D, E et F isolés de <i>Eunicella singularis</i> et <i>Eunicella verrucosa</i> (Lajili S. <i>et al.</i> , 2017 ; Ortega M.J. <i>et al.</i> , 1993 ; Ortega M.J. <i>et al.</i> , 1994)	15
Figure 12 : massileunicelline A isolée de <i>Eunicella cavolini</i> (Mancini I. <i>et al.</i> , 1999)	16
Figure 13 : structure type d'un pregnane ("Pregnane", 2020)	17
Figure 14 : 9,11-sécostéroïdes isolés de <i>Eunicella cavolini</i> (Ioannou E. <i>et al.</i> , 2009b).....	17
Figure 15 : <i>Eunicella singularis</i> prélevée dans la mer Egée	19
Figure 16 : localisation des sites d'échantillonnage dans la mer Egée – Grèce (GoogleMaps)	20
Figure 17 : échantillons récoltés à STARESO - Corse a : <i>Eunicella cavolini</i> encombré d'épiphytes récolté à la pointe de Spano (CO - Site 3) ; b : <i>Eunicella singularis</i> récolté à Saint-François (CO – Site 2)	21
Figure 18 : localisation de Calvi - Corse (a) et de la pointe de Spano et de Saint-François (b) (Jousseau M. <i>et al.</i> , 2013 ; GoogleEarth)	22
Figure 19 : échantillons récoltés à la station Biologique de Roscoff – Bretagne a : <i>Eunicella singularis</i> (RO – site 1), b : <i>Eunicella verrucosa</i> (RO – site 2).....	23

Figure 20 : localisation de la Station Biologique de Roscoff - Bretagne (a) et de la roche d'Astan - Roscoff (b) (GoogleEarth)	24
Figure 21 : échantillons récoltés à Hendaye	
a : <i>Eunicella cavolini</i> , b : <i>Eunicella verrucosa</i>	25
Figure 22 : localisation de Hendaye - France (a) et du site gorgones blanches (b).....	25
Figure 23 : échantillons élevés en culture obtenus de l'aquarium de Monaco	
a : <i>Eunicella singularis</i> (AQ - Site 1), b : <i>Eunicella cavolini</i> (AQ - Site 2)	25
Figure 24 : chromatographie sur couche mince des échantillons de Roscoff et de la mer Egée	33
Figure 25 : chromatographie sur couche mince d'un site de référence (RO - Site 2), de échantillons de Corse, de Hendaye et de l'aquarium	33
Figure 26 : graphiques du facteur d'absorption des spots en fonction de la distance de migration pour chaque bande de migration CCM des sites d'échantillonnage (Cosentino P., 2020)	37
Figure 27 : spectre protons RMN obtenus pour les 17 sites d'échantillonnage	
a : mer Egée, b : Roscoff, c : Corse, d : Hendaye, e : aquarium.....	38
Figure 28 : spectre protons RMN d'un site de chaque localisation principale	39
Figure 29 : graphiques de corrélations des variables obtenus aux différents sites d'échantillonnage par analyse PCA des spectres protons RMN (rose : mer Egée, brun : Roscoff, mauve : aquarium, vert : Corse, Rouge : Hendaye).....	40
Figure 30 : spectre de masse obtenu par UPLC-QDa de l'intensité des pics en fonction du temps de rétention d'un extrait de gorgone	
a : mode négatif, b : mode positif	42
Figure 31 : spectre Raman de l'intensité en fonction de la longueur d'onde dans le coenenchyme d'une gorgone du genre <i>Eunicella</i>	43
Figure 32 : voies biosynthétiques pour former le squelette cembrane et cladielline (Matulja D. et al., 2020).....	58
Figure 33 : principe d'une chromatographie sur couche mince (« Réaliser une chromatographie sur couche mince »).....	60
Figure 34 : spectre protons RMN des sites d'échantillonnage en fonction des espèces	
a : <i>Eunicella verrucosa</i> , b : <i>Eunicella cavolini</i> , c : <i>Eunicella singularis</i>	63
Figure 35 : spectre protons RMN des sites d'échantillonnage en fonction de la profondeur	
a : 5 - 10 m, b : 10 - 20 m, c : 20 - 30 m.....	64

Liste des tableaux

Tableau 1 : description des sites d'échantillonnage dans la mer Egée	20
Tableau 2 : description des sites d'échantillonnage en Corse	21
Tableau 3 : bilan des pressions connues sur la pointe de Spano et la pointe de Saint-François (Jousseau M. <i>et al.</i> , 2013).....	22
Tableau 4 : description des sites d'échantillonnage en Bretagne	23
Tableau 5 : description des sites d'échantillonnage à Hendaye.....	24
Tableau 6 : description des échantillons obtenus à l'aquarium de Monaco	26
Tableau 7 : masse d'extrait obtenu et rendement d'extraction des gorgones <i>Eunicella cavolini</i> , <i>Eunicella singularis</i> et <i>Eunicella verrucosa</i> aux différents sites (ME : site 1 à 7 ; CO : site 1 à 4 ; RO : site 1 et 2 ; HE : site 1 et 2 ; AQ : site 1 et 2).....	31
Tableau 8 : récapitulatif des spots présents sur les plaques CCM pour les différents sites étudiés (p : présence de spots)	35
Tableau 9 : masse réelle des molécules présentes dans les échantillons obtenus par spectroscopie de masse à partir des temps de rétention et du mode d'analyse	42
Tableau 10 : récapitulatif des sites d'échantillonnage	59
Tableau 11 : pesée des échantillons non broyés de <i>Eunicella singularis</i> , <i>Eunicella cavolini</i> et <i>Eunicella verrucosa</i>	60

1. Introduction

1.1. Les gorgones et le genre *Eunicella*

1.1.1. Classification

Les gorgones sont des animaux qui font partie de l'embranchement des cnidaires (figure 1). Ceux-ci sont reconnus grâce à plusieurs caractéristiques : la symétrie radiaire du corps, l'alternance entre la phase attachée et la phase méduse, la présence de cellules urticantes, les cnidocytes, la structuration en polypes pour former une colonie (Poulicek M., 2020), la musculature d'origine ectodermique et endodermique ou encore, le développement d'une larve ciliée typique appelée planula (Lecointre G. & Le Guyader H., 2013).

Dans le cas des gorgones, la phase attachée est dominante. En effet, elles font partie de la classe des anthozoaires, caractérisée par la disparition de la phase méduse. Les anthozoaires se distinguent aussi par d'autres structures morphologiques comme le siphonoglyphe qui permet de créer un courant dans la cavité gastrique ou encore une symétrie bilatérale rajoutée à la symétrie radiaire (Lecointre G. & Le Guyader H., 2013).

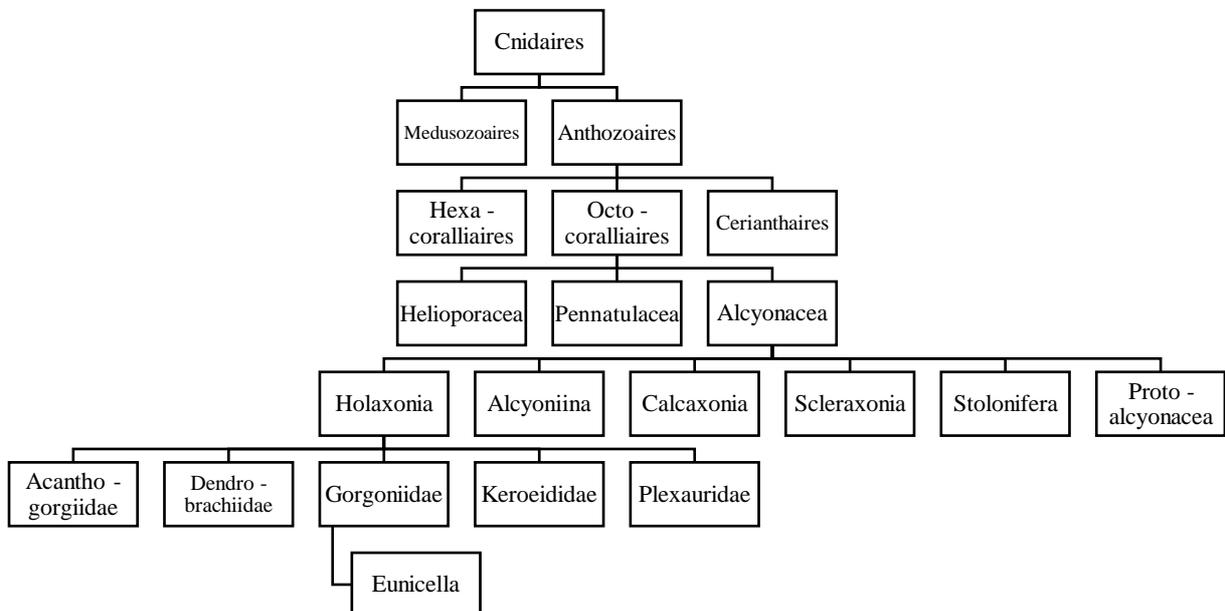


Figure 1: classification des gorgones (Fabricius K. & Alderslade P., 2001 ; Lecointre G. & Le Guyader H., 2013 ; WoRMS)

Les gorgones font partie de la sous-classe des octocoralliaires, autrefois appelés alcyonaires. Celle-ci est caractérisée par une symétrie radiaire d'ordre 8 et la présence de polypes pennés (figure 2). Il existe environ 6100 espèces de gorgones regroupées dans 13

familles différentes (Qi S.-H., 2012). Les coraux sclératinaires, les constructeurs principaux des récifs coralliens, font partie de la sous-classe des hexacoralliaires, autrefois appelés les zoanthaires. Ils sont alors caractérisés par une symétrie d'ordre 6.

1.1.2. Description des gorgones

Les gorgones sont aussi appelées coraux cornés ou coraux écorces avec une structure aplatie, dressée ou ramifiée. Les gorgones peuvent se retrouver sur les fonds mous et durs dans toutes les mers et océans de l'infralittoral jusqu'aux profondeurs abyssales (Lecointre G. & Le Guyader H., 2013). La plus grande diversité se trouve au niveau des Caraïbes et dans la région de l'Atlantique, contrairement aux coraux sclératinaires qui sont plus diversifiés dans l'Indo-Pacifique. Cela est dû à la plus grande résistance des gorgones aux températures basses et aux différents phénomènes d'extinction des coraux sclératinaires ayant lieu dans l'Atlantique (Sammarco P.W. & Coll J.C., 1992).

Certaines espèces sont photosynthétiques grâce à la présence de dinoflagellés qui vivent en symbiose avec les coraux, appelés les zooxanthelles. Ces espèces doivent donc vivre dans des eaux peu profondes afin de capter de la lumière et réaliser la photosynthèse. D'autres sont azooxanthellées et peuvent se retrouver à des profondeurs plus importantes (Poulícek M., 2020).

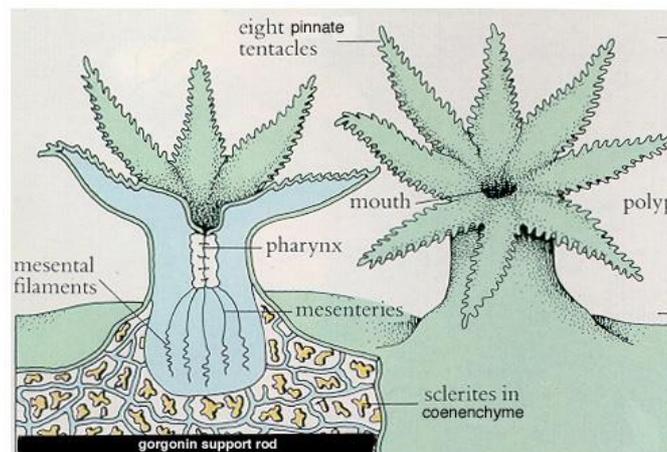


Figure 2 : structure type d'un polype d'une gorgone avec la présence de sclérites dans le coenenchyme et de 8 tentacules pennées sur chaque polype (repris de Poulícek M., 2020)

La forme et la croissance des gorgones dépendent de l'intensité de courant mais aussi de l'apport en nutriments (Weinbauer M.G. & Velimirov B., 1995). En effet, certaines espèces réduisent leur surface pour résister aux courants plus intenses alors que d'autres peuvent modifier leur flexibilité pour résister aux courants (Skoufas G. *et al.*, 2000). En général, des courants trop violents pourraient endommager les colonies ce qui réduit leur distribution aux

endroits plus agités (Skoufas G. *et al.*, 2006). Dans les biotopes plus calmes, les gorgones augmentent leur surface de manière à maximiser l'apport en nourriture et la capture de particules (Weinbauer M.G. & Velimirov B., 1998). Cela se traduit par des formes arborescentes de plus en plus imposantes.

Une colonie est toujours composée d'une structure interne supportant l'ensemble de la gorgone, ce qui correspond au squelette de l'organisme. Cependant, celui-ci reste assez flexible pour pouvoir résister aux forces hydrodynamiques. Il est composé d'une protéine solide, la gorgonine (Poulicek M., 2020). Le tissu, aussi appelé coenenchyme, se trouve autour de ce squelette et comprend de très nombreuses structures calcaires libres appelées « spicules » ou « sclérites » (figure 2). Elles aident au maintien du squelette au niveau des mouvements de flexion et de compression mais peuvent aussi avoir un rôle défensif en rendant le corail moins facile à ingérer pour les organismes qui essaieraient de s'en nourrir. Cinq morphologies de spicules sont rencontrées dans les gorgones (figure 3) (Lewis J.C. & Von Wallis E., 1991). En fonction de la profondeur et des conditions hydrodynamiques, ces structures peuvent être plus ou moins développées. Elles présentent un intérêt comme outil taxonomique pour identifier les espèces.

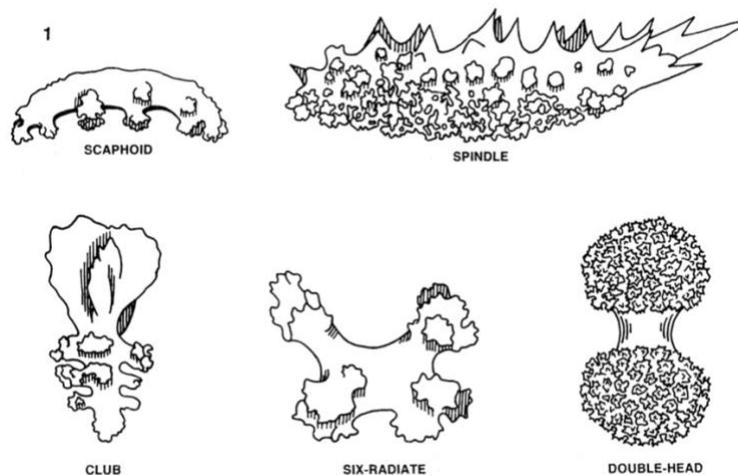


Figure 3: morphologie des 5 types de spicules les plus communs chez les gorgones (Lewis J.C. & Von Wallis E., 1991)

Le tissu entourant l'axe de la gorgone peut parfois être endommagé et même disparaître à cause de prédateurs qui détruisent ce tissu ou à cause d'un stress thermique entraînant une nécrose (Hereu B. *et al.*, 2014 ; Pey A. *et al.*, 2013). Lorsque ce tissu disparaît, il peut alors être colonisé par des épiphytes. La présence de ces organismes indésirables est donc témoin d'un stress passé (Pey A. *et al.*, 2013). Sur une gorgone saine, les épiphytes ne sont pas présents et la surface de celle-ci est stérile. Lorsque l'organisme subit un stress, la colonisation se fait en

plusieurs étapes (Poulicek M. *et al.*, 2007b) : premièrement, des microorganismes se déposent sur la surface des gorgones. Ensuite, le coenenchyme est petit à petit dégradé et les spicules sont érodés. Le squelette de gorgonine est alors exposé aux microorganismes, avec une prédominance de diatomées. Enfin, des populations algaires peuvent se développer sur l'axe dénudé mais aussi des populations animales sous forme d'épibiontes.

Les gorgones peuvent être séparées en trois groupes. Les gorgones holaxones possèdent un axe solide formé seulement de gorgonine. Les gorgones calcaxones possèdent un axe formé de gorgonine mais aussi de calcite. Enfin, les gorgones scléroxones possèdent un axe seulement formé de sclérites (Lecointre G. & Le Guyader H., 2013).

Les gorgones font partie intégrante et structurante des récifs coralliens à côté des coraux sclératinaires. Différents rôles peuvent être mis en évidence : le site de biodiversité important qu'ils abritent avec un rôle de nurserie, le rôle économique avec les pêches mais aussi le tourisme ou encore le rôle de barrière de protection contre l'érosion, les tsunamis ou les cyclones (Poulicek M., 2020).

Comme la plupart des coraux, les gorgones vivent longtemps avec une croissance lente (environ 1 cm / an), une maturité retardée et une reproduction peu fructueuse (Sini M. *et al.*, 2015). Leur croissance lente les rend plus sensibles à l'altération des conditions du milieu et aux pressions anthropiques. La pêche et le chalutage de fond, la pollution ou les changements climatiques peuvent endommager les organismes (Chimienti G., 2020). En effet, la densité de gorgones est plus importante dans des aires marines protégées où le chalutage de fond est contrôlé (Guillot G., 2016).

1.1.3. Le genre *Eunicella*

Le genre *Eunicella* étudié fait partie de la famille des *Gorgoniidae* dans le sous-ordre *Holaxonia*. Le site de référence WoRMS accepte 29 espèces valides. Toutefois, dans le cadre de ce travail, seules 3 espèces seront envisagées : *Eunicella cavolini* (Koch, 1887), *Eunicella singularis* (Esper, 1791) et *Eunicella verrucosa* (Pallas, 1766).

Eunicella cavolini et *Eunicella singularis* sont les espèces les plus abondantes en Méditerranée Occidentale et se retrouvent en densité moins importante au niveau de la mer Egée (Munari C. *et al.*, 2013). D'après OBIS (2021), ces deux espèces peuvent aussi se retrouver dans l'Atlantique le long des côtes européennes. L'abondance serait cependant beaucoup plus faible. *Eunicella verrucosa* se rencontre plus rarement dans la Méditerranée et plus fréquemment dans l'Atlantique. Sa distribution est très vaste, de l'Ecosse à l'Afrique centrale (Sartoretto S. & Francour P., 2012).

Le principal mode de nutrition de ces organismes est la filtration. Ils sont capables de capturer le zooplancton et la matière en suspension qui se trouvent dans la colonne d'eau grâce à leur forme en éventail (Russo A.R., 1995 ; Coelho M., 2013 ; Coma R. *et al.*, 2015). Les gorgones s'orientent par rapport au courant afin de capturer le maximum de particules. Une étude a démontré la diminution de la vitesse du courant lorsqu'il passe à travers les organismes, ce qui révèle la surface importante exposée aux courants de manière à pouvoir se nourrir (Russo A.R., 1985). Cependant, les courants ne doivent pas être trop importants car 80% de la mortalité des gorgones du genre *Eunicella* est due au détachement des organismes de leur substrat par les courants (Weinbauer M.G. & Velimirov B., 1996b).

Pour les trois espèces, la forme des sclérites varie avec la profondeur et les forces hydrodynamiques. Ces structures sont plus grandes dans les eaux peu profondes avec un hydrodynamisme plus important (Hall-Spencer J.M. *et al.*, 2012 ; Skoufas G., 2006). Les 3 espèces peuvent être facilement différenciées grâce à la forme de leurs sclérites et de leurs ramifications externes (Carpine C. & Grasshoff M., 1975).



Figure 4 : *Eunicella cavolini* sur un substrat rocheux dans la mer Méditerranée (modifié de Sini M. *et al.*, 2015)

Les densités les plus importantes de *Eunicella cavolini* (gorgone jaune, figure 4) se retrouvent là où la lumière n'est pas trop importante, de manière à éviter la prolifération excessive d'algues (Weinbauer & Velimirov B., 1996). De plus, la gorgone jaune est thermophile et se retrouve donc à des températures plus élevées. Cette espèce préfère des profondeurs de l'ordre de 10 à 200 m avec des forces hydrodynamiques limitées, moins susceptibles d'endommager les colonies, surtout sur des murs rocheux verticaux (Russo A.R., 1985 ; Sini M. *et al.*, 2015). Les colonies possèdent une ramification plane avec des branches courtes et ramifiées, ainsi qu'une couleur allant du jaune à l'orange (Gori A. *et al.*, 2012). La hauteur des colonies peut aller d'une dizaine de centimètres jusqu'à 70cm (Sini M. *et al.*, 2015). L'orientation de la structure de *Eunicella cavolini* est classique : elle se dispose toujours pour

être perpendiculaire aux courants ce qui permet de capturer le maximum de nourriture (Velmirinov B., 1973). La morphologie des branchements varie aussi fortement en fonction de l'intensité des courants (Weinbauer M.G. & Velimirov B., 1995).

Eunicella singularis, aussi appelée gorgone blanche (figure 5), est la seule espèce de gorgones méditerranéennes qui peut posséder des zooxanthelles (Gori A. *et al.*, 2012 ; Ransome E. *et al.*, 2014). Comme chez les sclératinaires, ces algues symbiotiques permettent d'amener des nutriments à leur hôte grâce à la photosynthèse. Cette symbiose entre les deux organismes peut donc changer totalement le fonctionnement et l'écologie de la gorgone. A partir d'une profondeur d'environ 40 à 60m, ces algues disparaissent. *E. singularis* est capable d'être totalement autotrophe grâce à ces zooxanthelles mais lorsque la lumière disparaît, elle peut capturer de la nourriture et être hétérotrophe. Cette espèce peut donc s'adapter à l'environnement avec la présence ou non de zooxanthelles (Ezzat L. *et al.*, 2013 ; Gori A. *et al.*, 2012). Cette espèce de gorgone a une distribution bathymétrique assez large, allant de 10 m jusqu'à 150 m (Gori A. *et al.*, 2012 ; Linares C. *et al.*, 2008).



Figure 5: *Eunicella singularis* dans la mer Méditerranée (modifié de Issaris Y.)

Eunicella singularis possède peu de ramifications avec des branchements parallèles les uns aux autres avec une couleur en général blanche-grise. La morphologie varie avec la profondeur mais aussi avec la turbulence jusqu'à environ 35 m. Les colonies sont petites avec une morphologie en forme de candélabre alors que les colonies établies dans les eaux plus profondes ont une morphologie plus variable et une couleur plus brillante (Gori A. *et al.*, 2012). Elles ont plus de ramifications et des branches plus courtes. Pour les endroits avec beaucoup de turbulence, les branches peuvent se plier facilement et les ramifications sont moins nombreuses. Cela permet de résister à un courant plus violent et éviter que des algues s'attachent aux

différentes ramifications. *Eunicella singularis* est en forme de bouquet alors que *Eunicella cavolini* et *Eunicella verrucosa* possèdent une structure plane.

Eunicella verrucosa, aussi appelée gorgone verruqueuse ou gorgone rose (figure 6), est une espèce des eaux tempérées à froides. Elle se retrouve principalement dans l’Océan Atlantique à une profondeur de 2 à 60 m sur des tombants rocheux, plus rarement jusqu’à 200 m de profondeur (Guillot G., 2016). Dans la Mer Méditerranée, cette espèce est plus rare, à des profondeurs de 35 m à 200 m (Sartoretto S. & Francour P., 2012). Cette espèce gagnerait des profondeurs de plus en plus faibles dans la Méditerranée à cause d’un apport nutritif de plus en plus important en provenance du milieu terrestre (Guillot G., 2016). Une augmentation de la température dans la Mer Méditerranée a engendré une perte importante des colonies, notamment le long du littoral Corse où l’espèce a quasiment disparu pendant les années 2000 (Poulicek M. *et al.*, 2007). Cette espèce a été classée comme « vulnérable » par l’IUCN (2021) alors que *Eunicella singularis* et *Eunicella cavolini* sont répertoriées comme « presque menacés ».

Sa couleur peut varier en fonction de la localisation : elle est blanche en Méditerranée mais peut être rose, jaune ou blanche dans l’Atlantique. Les polypes sont portés par des protubérances qui peuvent faire penser à des verrues, d’où leur nom de gorgones verruqueuses (figure 6) (Dumas J. *et al.* dans Doris, 2021).



Figure 6 : *Eunicella verrucosa* dans la mer Méditerranée à une profondeur de 65 m et les polypes verruqueux (Chimienti G., 2020)

1.1.4. Espèces bioindicatrices

Ces 3 espèces peuvent être utilisées comme bioindicatrices de la santé de l’océan : une augmentation de température entraîne une nécrose voire une disparition des gorgones dans la Méditerranée (Poulicek M. *et al.*, 2007). Leur croissance lente les rend vulnérables aux

changements environnementaux et cette caractéristique permet de voir l'impact sur une longue durée. Par exemple, un réchauffement important des eaux de la Méditerranée en 1999 a engendré la nécrose d'énormément de colonies de *Eunicella cavolini*. Les bactéries présentes dans les gorgones peuvent aussi être impliquées dans cette nécrose suite à une température trop élevée (Martin Y. *et al.*, 2011). En 2003, un réchauffement identique a affecté énormément de colonies de *Eunicella cavolini* et *Eunicella singularis* (Canovas-Molina A. *et al.*, 2018 ; Pey A. *et al.*, 2013).

1.2. Caractéristiques de la mer Méditerranée et de l'océan Atlantique

La mer Méditerranée et l'océan Atlantique sont les 2 environnements dans lesquels *Eunicella cavolini*, *Eunicella singularis* et *Eunicella verrucosa* peuvent se retrouver. La distribution de *Eunicella verrucosa* est plus large que celle des 2 autres espèces : des colonies ont été recensées jusque dans l'océan Indien (OBIS, 2021).

La mer Méditerranée avec ses îles est un hotspot de biodiversité : elle représente moins d'1% de la surface totale des océans mais abrite 17% de la biodiversité globale, aussi bien marine que terrestre (Gobert S., 2019). Cela est notamment dû aux gradients nord-sud et ouest-est qui existent dans cette mer fermée entraînant des habitats fort différents. La température et la salinité augmentent d'ouest en est alors que la production biologique diminue. La température moyenne dans la mer Méditerranée est de 19,6°C (« Oceans and Seas of the World », 2021) et la salinité moyenne est de 38 (Boxer B. & Salah M., 2019). Le réchauffement climatique affecte fortement la mer Méditerranée, avec une augmentation de la température de 0,4 °C par décennie depuis 1986 (Sakalli A., 2017).

Les échanges avec l'océan Atlantique par le détroit de Gibraltar ainsi que l'évaporation par le soleil sont les raisons principales de ce gradient. De plus, à cause des échanges faibles avec l'océan Atlantique et des apports négligeables provenant des rivières et des pluies, la mer Méditerranée est un environnement oligotrophique. Les courants dans cette mer fermée sont faibles, avec des phénomènes de marées presque inexistantes (Gobert S., 2019). Des échantillons de *Eunicella cavolini* et de *Eunicella singularis* ont pu être prélevés dans la mer Ligure et dans la mer Egée, permettant d'envisager la différence entre les 2 bassins dans le cadre de ce travail.

L'océan Atlantique est divisé en océan Atlantique Nord et en océan Atlantique Sud. Pour ce travail, seule la partie nord sera considérée. La température moyenne dans cette partie de l'océan est de 16,1°C (« Oceans and Seas of the World », 2021) et la salinité moyenne est de 35,5 (Barnes C.A. *et al.*, 2020). Les courants ainsi que les phénomènes de marée sont plus importants car c'est un océan ouvert. Des échantillons de *Eunicella singularis*, *Eunicella*

cavolini et *Eunicella verrucosa* ont pu être prélevés dans la mer Celtique et dans le golfe de Gascogne, aussi appelé baie de Biscaye (Britannica, 2011). La température de l'eau est plus basse dans la mer Celtique que dans le golfe de Gascogne (DCSMM, 2012). De plus, les courants sont plus importants dans la mer Celtique avec des eaux plus turbides, ce qui peut être expliqué par les fonds sableux plus facilement remis en suspension (DCSMM, 2012).

1.3. Formation de métabolites secondaires

1.3.1. Définition des métabolites secondaires

Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions biochimiques qui se déroulent dans un organisme vivant (Kornprobst J.-M., 2005). Les métabolites secondaires sont des molécules se définissant comme « non-essentiels pour la croissance des cellules, mais servant à la survie de l'organisme lors de conditions défavorables (Gokulan K. *et al.*, 2014) ». Elles sont très diversifiées et spécifiques en fonction des organismes (Kornprobst J.-M., 2005). Au contraire, les molécules formées par le métabolisme primaire se définissent comme « la source primaire d'énergie pour réaliser des fonctions biochimiques et physiologiques variées des cellules vivantes (acides aminées, pyruvate) (Gokulan K. *et al.*, 2014) ». Elles permettent la survie et la reproduction des organismes (Kornprobst J.-M., 2005). Les métabolites primaires et secondaires peuvent aussi être appelés respectivement métabolites fondamentaux et métabolites complémentaires (Fabricius K. & Alderslade P., 2001). Ces mécanismes ont lieu chez tous les organismes cellulaires.

Les gorgones vivent en symbiose avec un ensemble de microorganismes, constituant un holobionte. Ces microorganismes sont responsables de la production de molécules intéressantes au niveau pharmacologique grâce au métabolisme secondaire (O'Brien J. & Wright G.D., 2011 ; Raimundo I. *et al.*, 2018). Les macro-organismes eux-mêmes ne sont pas responsables de la formation de ces molécules (Blockley A. *et al.*, 2018). La communauté holobiontique permet ainsi à leurs hôtes de s'adapter d'une manière plus efficace aux changements environnementaux. Ces molécules formées peuvent être des terpènes, des peptides, des carbohydrates, des polycétides, des lipides, des stéroïdes ou encore des alcaloïdes (O'Brien J. & Wright G.D., 2011).

1.3.2. Microorganismes impliqués

Les microorganismes responsables de la formation des molécules chez les gorgones peuvent être de nature très diverse comme des eu- ou procaryotes, par exemple des bactéries ou

des fungi (Zhang X.-Y. & Qi S.-H., 2019). Des études ont mis en évidence la présence majoritaire de bactéries du type *Endozoicomonas* chez *Eunicella cavolini* mais aussi chez d'autres espèces de gorgones. Ces bactéries se retrouvent surtout chez les invertébrés marins dans des habitats très variés et à des endroits géographiques différents (Bayer T. *et al.*, 2013). Les communautés sont spécifiques à l'hôte et peuvent être différentes d'un hôte sain à un hôte malade. Elles dépendent aussi des saisons et des stressseurs environnementaux. Avec un changement environnemental, par exemple, une augmentation de température ou un enrichissement en nutriments, les communautés bactériennes dominantes restent les mêmes mais certaines unités taxonomiques peuvent varier. Cela permet aux gorgones, comme aux coraux sclératinaires, d'être plus résistants et plus stables dans l'environnement. En effet, ces organismes sont capables de modifier les proportions de certains genres de bactéries sans altérer le microbiome (McCauley M. *et al.*, 2020).

1.3.3. Rôles des métabolites secondaires

Les bactéries produisent des métabolites secondaires présentant plusieurs types de fonctionnalités pour la communauté holobiontique : une activité antimicrobienne et antifouling, elles aident dans la reproduction et enfin, elles permettent de protéger les organismes contre le broutage et donc de minimiser la prédation (Sammarco P.W. & Coll J.C., 1992).

L'activité antimicrobienne permet aux bactéries d'avoir un avantage sur les autres bactéries présentes dans les organismes et donc de limiter la compétition interspécifique grâce à la libération de substances chimiques : les biofilms peuvent être très rapprochés les uns des autres dans l'environnement marin et la libération de substances impliquées dans la compétition pour l'espace est donc fondamentale (Fabricius K. & Alderslade P., 2001 ; Gao C.H. *et al.*, 2010). Cette activité a été testée pour plusieurs espèces de gorgones. L'étude de ces molécules pourrait offrir de nouvelles possibilités pour le développement de molécules pharmaceutiques.

L'activité antifouling permet d'empêcher le dépôt des larves ou d'algues sur la surface des gorgones (Satheesh S. *et al.*, 2016). Le biofouling se définit comme une accumulation indésirée de molécules organiques, de microorganismes, de plantes ou d'animaux sur des surfaces submergées (Shao C.H. *et al.*, 2015). Au niveau économique, ce phénomène engendre de grandes pertes et des matériaux antifouling ont été synthétisés. Le problème de ceux-ci est qu'ils sont toxiques pour l'environnement : toxicité sur des organismes non ciblés, activités mutagéniques et carcinogéniques. Certains ont déjà été interdits, comme par exemple le TBT ou tribultin (Qi S.H. *et al.*, 2008). Des matériaux d'origine naturelle, comme ces métabolites

secondaires, sont donc recherchés pour éviter les effets toxiques puisque les molécules d'origine naturelle se retrouvent « normalement » dans l'eau.

Aucune étude n'a encore mis en évidence le lien entre l'activité antifouling et l'activité anticancéreuse de ces molécules. Cependant, ces deux activités pourraient être reliées car l'activité antifouling empêche le dépôt d'organismes sur les surfaces des gorgones. Cela pourrait être appliqué au dépôt de métastases sur des cellules dans le corps humain : une activité antifouling pourrait l'en empêcher (Poulicek M., 2020). Des molécules isolées d'octocoraux possèdent une activité anticancéreuse et une activité antifouling, ce qui pourrait témoigner du lien entre les deux activités (Raimundo I. *et al.*, 2018).

Si les organismes marins sont stressés par la pollution ou une augmentation de température, les substances anti-fouling ne sont plus produites car ils sont affaiblis et gardent l'énergie pour les besoins fondamentaux. De ce fait, les branches des coraux peuvent être envahies par des algues et d'autres petits organismes, ce qui peut entraîner la mort de la colonie (figure 7) (Fabricius K. & Alderslade P., 2001).

Certains métabolites secondaires ont été retrouvés dans les œufs produits par les gorgones mais ne sont pas présents dans les organismes adultes. Ils jouent un rôle dans la ponte des œufs en permettant la contraction des polypes et donc le relâchement de l'œuf. Ils permettent aussi de protéger l'œuf grâce à une activité anti-brouillage (Sammarco P.W. & Coll J.C., 1992).

La dernière activité attribuée à ces molécules est la protection des gorgones contre le brouillage ce qui permet de minimiser la prédation. Les gorgones sont des organismes benthiques et ne peuvent donc pas fuir les prédateurs. Elles synthétisent donc des molécules chimiques pour se défendre (Kornprobst J.-M., 2005). La grande diversité de poissons sur les récifs engendre de plus en plus d'habitats d'alimentation spécifiques, ce qui augmente la pression de brouillage sur les coraux et gorgones. Ceux-ci réagissent en fabriquant ces métabolites secondaires. Par exemple, une molécule trouvée en concentration habituelle chez les gorgones cause des vomissements chez les poissons corallivores (Goh N.K.C. & Ming Chou L., 1998). Evolutivement, les poissons vont s'adapter à ces métabolites secondaires et les coraux seront à nouveau attaqués par ces prédateurs. Pour se défendre, les proies vont modifier leur métabolisme secondaire afin de former des molécules nouvelles qui empêchent la prédation par les poissons. Une espèce est donc en évolution constante afin de pouvoir faire face aux adaptations des espèces avec lesquelles elle coévolue. L'écosystème marin change perpétuellement. Cette théorie est appelée l'hypothèse de la reine rouge, et pourrait être une des

raisons de la grande diversité de métabolites secondaires présents dans l'océan, et particulièrement dans les sites à haute biodiversité (Brockhurst M.A. *et al.*, 2014).



Figure 7 : *Eunicella cavolini* récolté en Corse colonisé par des algues (CO – Site 3)

Cependant, il est important de préciser que l'activité antimicrobienne n'était pas présente pour toutes les espèces testées (Jensen P.R. *et al.*, 1996). Ce n'est donc pas le rôle primaire des molécules synthétisées. Par contre, l'activité toxique sur les poissons et les prédateurs est un rôle présent dans un plus grand nombre d'espèces, donc celui-ci est prédominant (Fabricius K. & Alderslade P., 2001).

Dans le cas de cette étude, nous limiterons notre intérêt aux métabolites secondaires des gorgones du genre *Eunicella* et plus spécifiquement sur la formation de terpènes et de stéroïdes (Deghrigue M. *et al.*, 2014 ; Mancini I. *et al.*, 2000 ; Matulja D. *et al.*, 2020), qui possèdent des activités intéressantes au niveau pharmaceutique même si elles peuvent aussi former des nucléosides de différentes sortes (Cimino G. *et al.*, 1984).

1.3.4. Description des terpènes et stéroïdes

Les terpènes représentent une classe de molécules d'hydrocarbures produits par de nombreuses plantes. Ils sont composés d'assemblage d'unités à 5 carbones appelées isoprènes (figure 8) et sont donc toujours formés d'un multiple de 5 carbones (Frederich M., 2018). Ces molécules sont surtout utilisées pour leurs arômes et leurs odeurs diverses mais elles sont de plus en plus étudiées pour leurs effets thérapeutiques. Dans le cas des molécules étudiées dans les gorgones du genre *Eunicella*, ce sont des diterpènes génines liposolubles composés de 20

atomes de carbone. Plus précisément, les molécules retrouvées sont de type eunicelline (figure 9) et sont formées par une voie biosynthétique bien précise (figure 33, annexe 1).

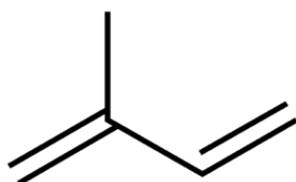


Figure 8 : structure de base d'un terpène, le squelette isoprène (Frederich M., 2018)

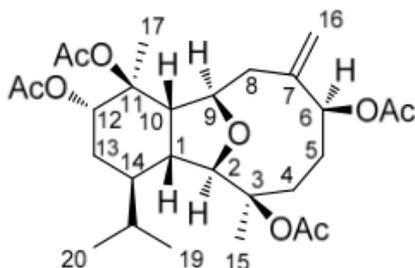


Figure 9 : squelette de base pour les molécules de type eunicelline (Matulja D. et al., 2020)

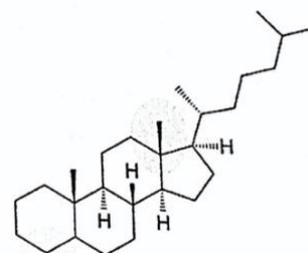


Figure 10 : structure type d'un stéroïde (Frederich M., 2018)

Les stéroïdes sont issus des terpènes, et précisément des triterpènes (C30). Le précurseur de ces molécules est le squelette squalène qui se cyclise. Lors de ce processus, les stéroïdes perdent des unités de carbone et se retrouvent au final avec un squelette tétracyclique et 27 carbones (figure 10) (Frederich M., 2018). Plusieurs types de stéroïdes peuvent se retrouver dans les gorgones étudiées avec des étages d'oxydation supérieurs, des chaînes latérales plus ou moins longues, mais aussi l'ouverture du troisième cycle pour former des sécostéroïdes (Ioannou E. et al., 2009).

1.4. Action pharmacologique des métabolites secondaires

La découverte de molécules d'origine naturelle est primordiale pour le développement de médicaments. L'environnement naturel permet de découvrir de nouveaux modèles de molécules, malgré les avancées importantes dans la biologie moléculaire (Fenical W., 1996). L'océan est un site de diversité très important et pourtant, très peu de recherches sur des molécules pharmacologiquement actives ont été réalisées. L'environnement marin est donc encore une source inexploitée pour le développement de médicaments (Malve A., 2016).

La mise sur le marché d'un médicament est un processus très long et très coûteux, ce qui explique la faible quantité de médicaments formés à partir de molécules marines (Guezennec J. & Debitus C., 2006). Néanmoins, plus de 30 000 composés ont déjà été isolés d'organismes marins dont certains ont déjà été approuvés pour une utilisation clinique. D'autres composés sont pour le moment étudiés dans des tests cliniques et précliniques (Matulja D. et al., 2020). Les éponges sont, jusqu'à ce jour, les organismes présentant la plus grande variété de molécules pharmacologiquement actives (Rocha J. et al., 2011). Cela est dû à leur capacité

filtrante qui permet de capturer énormément de bactéries dans leurs tissus. De ce fait, la diversité bactérienne est très importante et les microorganismes peuvent alors former des métabolites secondaires (Taylor M.W. *et al.*, 2007). De nombreuses molécules isolées des éponges sont en phase d'essais cliniques (Kornprobst J.-M., 2005). Les cnidaires sont aussi fortement étudiés pour leurs molécules bioactives.

Cette découverte de molécules marines pourrait avoir un impact négatif sur l'écosystème à cause d'une exploitation abusive. En effet, les régulations dans l'océan sont compliquées à faire appliquer et les organismes marins pourraient être surexploités pour profiter de ces molécules marines (Goodrich G., 2014). De plus, les quantités de molécules actives pouvant être extraites des organismes marins sont très faibles (Kornprobst J.-M., 2005). Il faut donc développer des techniques pour éviter cette surexploitation dans le milieu naturel. Par exemple, la culture d'organismes marins en aquarium permettrait d'utiliser ces molécules sans impacter l'écosystème. De plus, après la découverte des molécules, celles-ci pourraient être synthétisées afin d'éviter l'exploitation des organismes.

Les gorgones sont les organismes contenant le plus de molécules prometteuses dans l'embranchement des cnidaires : en 2012, il y avait déjà environ 1000 composés retrouvés dans seulement 1% de la diversité totale des gorgones (Qi S.-H., 2012 ; Rocha J. *et al.*, 2011).

Des médicaments ont déjà été fabriqués à partir d'extrait de gorgones. Par exemple, une prostaglandine qui permet de diminuer la pression artérielle a été isolée de la gorgone *Plexaura homomalla*. Cette molécule avait déjà été fabriquée de manière synthétique et par la suite, a été isolée de l'organisme marin (Banaigs B., 2013). Ensuite, une crème antirides contenant des extraits d'une gorgone du genre *Pseudopterogorgia elisabethae* a été mise sur le marché. Dans ce cas, la molécule intéressante est la pseudoptérosine, un diterpène glycosidique, qui possède, en plus de l'activité antirides, une activité anti-inflammatoire et analgésique (Desroy N., 2013).

1.4.1. Diterpènes

Les terpènes, en tant que métabolites secondaires, possèdent déjà beaucoup d'applications dans le milieu pharmaceutique et médical. Ils sont utilisés comme antitumoraux, antibactériens, antiviraux, antimalariques mais aussi dans le traitement des maladies cardiovasculaires (Yang W. *et al.*, 2020). Parmi les diterpènes connus pour leurs activités pharmacologiques, le paclitaxel est utilisé contre le cancer de sein et peut être isolé d'un arbre, le *Taxus brevifolia*. Cette molécule est formée, comme chez les gorgones, par un microorganisme de type fungi (Priyadarshini K., & Keerthi Aparajitha U., 2012).

Les diterpènes sont les métabolites secondaires les plus abondants chez les gorgones, ils représentent environ 65% des molécules analysées dans ces organismes marins (Qi S.-H., 2012).

1.4.1.1. *Eunicella singularis*

De nombreux diterpènes ont été isolés et caractérisés à partir de *Eunicella singularis* (Mancini I. *et al.*, 2000). L'activité antiproliférative de ces molécules contre des cellules cancéreuses a été testée sur des cellules humaines et aussi sur l'inhibition de la formation de clones. L'IC50 (concentration qui inhibe la prolifération de cellules sur 50% des échantillons testés) ainsi que l'EC50 (concentration nécessaire pour avoir une activité efficace pour 50% des échantillons testés) ont été établis grâce à des tests d'activité sur des cellules responsables du cancer du sein : il s'agit de molécules de type eunicelline, appelées palmonines, présentant l'activité cytotoxique la plus importante parmi les molécules testées dans le genre *Eunicella* (figure 11) (Deghrigue M. *et al.*, 2013 ; Lajili S. *et al.*, 2017 ; Matulja D. *et al.*, 2020).

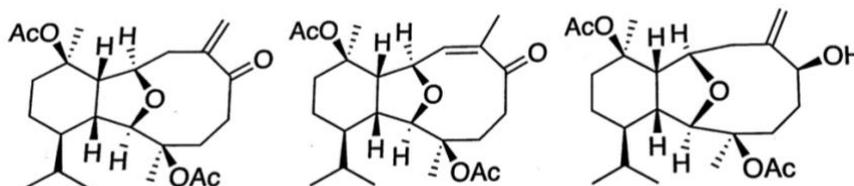


Figure 11 : palmonine D, E et F isolés de *Eunicella singularis* et *Eunicella verrucosa* (Lajili S. *et al.*, 2017 ; Ortega M.J. *et al.*, 1993 ; Ortega M.J. *et al.*, 1994)

L'activité antioxydante des diterpènes présents chez *Eunicella singularis* a aussi été mise en évidence avec une action contre les radicaux libres responsables de processus dégénératifs (vieillesse, cancer, maladies cardiovasculaires ou encore maladie d'Alzheimer). Cette activité se rapproche de celle de la vitamine C, utilisée fréquemment comme complément alimentaire (Deghrigue M. *et al.*, 2013).

L'effet anti-inflammatoire a été testé sur l'inhibition de la croissance d'un œdème chez le rat. Un effet gastroprotecteur a aussi été mis en avant par l'inhibition d'un ulcère gastrique (Deghrigue M. *et al.*, 2014). Enfin, une diminution des convulsions chez une souris après l'injection d'acide acétique a permis de mettre en évidence l'effet analgésique des diterpènes présents chez la gorgone *Eunicella singularis* (Deghrigue M. *et al.*, 2015).

1.4.1.2. *Eunicella cavolini*

Des diterpènes de type eunicelline ont également été mis en évidence chez *Eunicella cavolini*, dont certains avec une activité cytotoxique (De Rosa S. *et al.*, 1995 ; Mancini I. *et al.*, 2000).

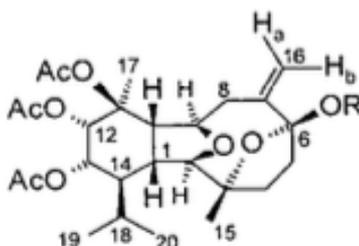


Figure 12 : massileunicelline A isolée de *Eunicella cavolini* (Mancini I. *et al.*, 1999)

Des massileunicellines ont pu aussi être isolées. Ces molécules ont subi plusieurs oxydations par rapport au squelette eunicelline diterpénique de base (figure 12) (Mancini I. *et al.* 1999). Toutefois, cette classe de molécules a été testée et ne possède pas d'activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses ou d'activité antivirale.

1.4.1.3. *Eunicella verrucosa*

Des palmonines très actives ont pu être isolées chez *Eunicella verrucosa*. Celles-ci sont semblables aux molécules retrouvées chez *Eunicella singularis* et possèdent une activité cytotoxique (Ortega M.J. *et al.*, 1993 ; Ortega M.J. *et al.*, 1994).

1.4.2. Stéroïdes

Les stéroïdes sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique car ils possèdent une grande gamme d'activité. Ils sont notamment capables de réguler l'inflammation et d'agir sur la réponse immunitaire, ce qui peut se traduire par une régulation du métabolisme dans son entièreté allant jusqu'à influencer la pression sanguine (Ericson-Neilsen W. & Kaye A.D., 2014).

Ces molécules représentent environ 16% de la totalité des molécules isolées des gorgones (Qi S.-H., 2012).

1.4.2.1. *Eunicella singularis*

L'activité des stéroïdes isolés de la gorgone *Eunicella singularis* est identique sur quelques points à celles des diterpènes cités précédemment. En effet, l'activité anti-inflammatoire et gastroprotective a pu être mise en évidence (Deghrigue M. *et al.*, 2014).

1.4.2.2. *Eunicella cavolini*

Une classe de molécules simplifiée de stéroïdes, les pregnanes (figure 13), ainsi que des stéroïdes à différents étages d'oxydations ont été isolés de *Eunicella cavolini*. Ces molécules ressemblent fortement aux hormones sexuelles et peuvent donc agir au niveau des mêmes récepteurs. Elles ont été testées contre le cancer du sein et possèdent une activité antiproliférative contre ces cellules responsables (Cimino G. *et al.*, 1978 ; Ioannou E. *et al.*, 2008 ; Ioannou E. *et al.*, 2009).

Des sécostéroïdes sont des métabolites des stéroïdes fortement oxydés avec une ouverture d'un des cycles de la structure de base. Ces molécules ont déjà été testées et possèdent une activité antimicrobienne, antivirale, anti-inflammatoire, antiproliférative, anti-fouling ou encore cytotoxique. Des sécostéroïdes (figure 14) ont pu être isolés de *Eunicella cavolini* et leur activité antiproliférative contre les cellules du cancer du sein mais aussi contre les cellules du cancer de la prostate ont pu être mises en évidence (Ioannou E. *et al.*, 2009b).

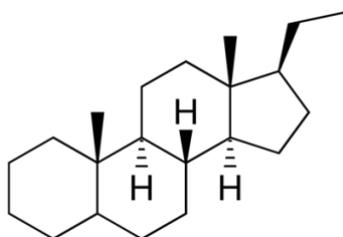


Figure 13 : structure type d'un pregnane ("Pregnane", 2020)

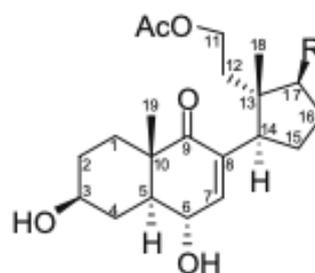


Figure 14 : 9,11-sécostéroïdes isolés de *Eunicella cavolini* (Ioannou E. *et al.*, 2009b)

1.4.2.3. *Eunicella verrucosa*

Un pregnane glycoside a pu être isolé de *Eunicella verrucosa*. Cette molécule possède une activité cytotoxique contre le cancer humain du colon et des poumons (Kashman Y. & Green D., 1991).

2. Contexte et objectifs

Le but de cette étude est de comparer la diversité et la quantité de métabolites secondaires formés par *Eunicella cavolini*, *Eunicella singularis* et *Eunicella verrucosa* en différentes localisations et différentes conditions environnementales. Les gorgones ont été collectées dans leur milieu naturel à ces différentes localisations :

- Mer Méditerranée Orientale– Grèce - Mer Egée
- Mer Méditerranée Occidentale– Corse (Station STARESO) – Mer Ligure
- Océan Atlantique – Bretagne (Station biologique de Roscoff) – Mer Celtique
- Océan Atlantique – Hendaye – Golfe de Gascogne

Ensuite, ces données seront comparées à celles obtenues pour des organismes de la même espèce provenant de l'Aquarium de Monaco. Les échantillons de l'aquarium ont été cultivés dans des conditions de culture et ne présentent pas les caractéristiques de l'environnement naturel (absence de prédation, stabilité de température,...) . Si les métabolites secondaires présents sont les mêmes en culture et dans l'environnement naturel, cela permettrait d'éviter un impact de prélèvement trop important sur ces trois organismes. En effet, comme expliqué précédemment, ils possèdent des molécules qui sont intéressantes sur le plan pharmaceutique, et pourraient donc être exploités pour en extraire ces molécules. Si les résultats de cette étude sont concluants, les gorgones pourraient être cultivées en milieu artificiel ou, à tout le moins protégé, afin d'en extraire les molécules ainsi que c'est déjà l'usage pour le bouturage et la croissance des coraux destinés à l'aquariophilie. Cela pourrait permettre d'éviter une exploitation trop importante de ces organismes.

3. Matériel et méthodes

3.1. Sites d'échantillonnage

Les trois espèces n'ont pu être récoltées sur chaque site à cause de leur distribution. De plus, seulement des échantillons de *Eunicella cavolini* et *Eunicella singularis* provenant de l'aquarium de Monaco ont pu être obtenus. Une comparaison des molécules synthétisées par *Eunicella verrucosa* entre le milieu de culture et le milieu naturel n'est donc pas possible. Un tableau récapitulatif de tous les sites d'échantillonnage est repris en annexe 2 (tableau 10, annexe 2).

La date de récolte des échantillons n'influence pas le résultat car les molécules de types diterpènes et stéroïdes ont une structure avec beaucoup de carbones. Elles ont donc une masse moléculaire élevée et ne sont pas volatiles (Frederich M., 2018).

3.1.1. Mer Méditerranée Orientale– Grèce – Mer Egée

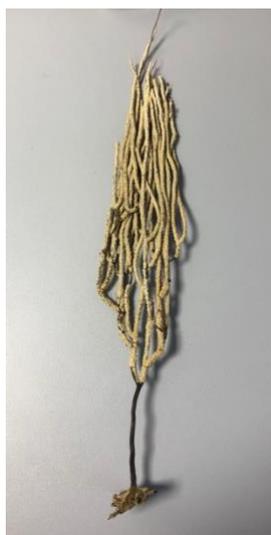


Figure 15 : *Eunicella singularis* prélevée dans la mer Egée

Les échantillons obtenus de la mer Egée appartiennent tous à l'espèce *E. singularis* (figure 15). Plusieurs colonies de cette même espèce ont pu être collectées en 7 sites différents. Ils ont été référencés en fonction de leur profondeur (tableau 1) et de leur localisation (figure 16). *Eunicella cavolini* peut aussi se retrouver dans la mer Egée car cette espèce supporte des températures chaudes (Salomidi M. *et al.*, 2009). Cependant, *Eunicella verrucosa* ne s'y retrouve pas car les températures sont trop élevées.

Abréviation du site de récolte	Localisation	Espèce	Profondeur	Date de récolte
ME – Site 1	Baie de Porto Koufo, Chalkidiki	<i>Eunicella singularis</i>	27-32 m	2018
ME – Site 2	Ile d'Arethoussa	<i>Eunicella singularis</i>	5 – 8 m	Octobre 2020
ME – Site 3	Ile d'Arethoussa	<i>Eunicella singularis</i>	11 – 13 m	Octobre 2020
ME – Site 4	Ile de Phidonissi	<i>Eunicella singularis</i>	5 – 10 m	Octobre 2020
ME – Site 5	Ile de Phidonissi	<i>Eunicella singularis</i>	11 – 13 m	Octobre 2020
ME – Site 6	Ile de Phidonissi	<i>Eunicella singularis</i>	11 – 13 m	Octobre 2020
ME – Site 7	Ile de Phidonissi	<i>Eunicella singularis</i>	11 – 13 m	Octobre 2020

Tableau 1 : description des sites d'échantillonnage dans la mer Egée

Les différents échantillons provenant du même endroit et à la même profondeur permettent d'aborder la diversité intra-populationnelle. La comparaison inter-site permet d'aborder la biodiversité entre plusieurs populations dans des conditions environnementales plus différentes (profondeur, hydrodynamisme, luminosité, ...). Toutefois, l'échantillonnage n'ayant pas été réalisé dans cette optique, la mesure de l'intensité lumineuse ou d'autres paramètres de l'environnement n'ont pas été réalisés. Pour cette espèce symbiotique, *Eunicella singularis*, la différence d'intensité de lumière pourrait avoir un impact important sur l'écologie de la microbiocénose associé à la gorgone.



Figure 16 : localisation des sites d'échantillonnage dans la mer Egée – Grèce (GoogleMaps)

Les conditions hydrodynamiques des sites dans la mer Egée sont assez différentes. Porto Koufo est une baie protégée et donc les conditions sont assez calmes. Cet endroit est plus protégé que les deux îles d'Arethoussa et de Phidonissi (figure 16). L'île d'Arethoussa est plus

exposée à l'hydrodynamisme que celle de Phidonissi (Skoufas G., 2006). Ces conditions différentes d'hydrodynamisme pourraient également avoir un impact sur l'écologie de la gorgone et donc sur la production de métabolites secondaires. Les 3 sites d'échantillonnage sont peu impactés par des conditions anthropiques.

3.1.2. Mer Méditerranée Occidentale – Corse (Station STARESO) – Mer Ligure

Des échantillons d'*E. singularis* et d'*E. cavolini* (figure 17) ont pu être collectés à proximité de la station Stareso à une profondeur de 20 à 24 m (tableau 2). *Eunicella verrucosa* ne se retrouve pas dans la mer Ligure car les températures sont trop élevées et augmentent à cause du réchauffement climatique. En effet, la dernière colonie présente dans la baie de Calvi a disparu en 2005 (Poulicek M. *et al.*, 2007).

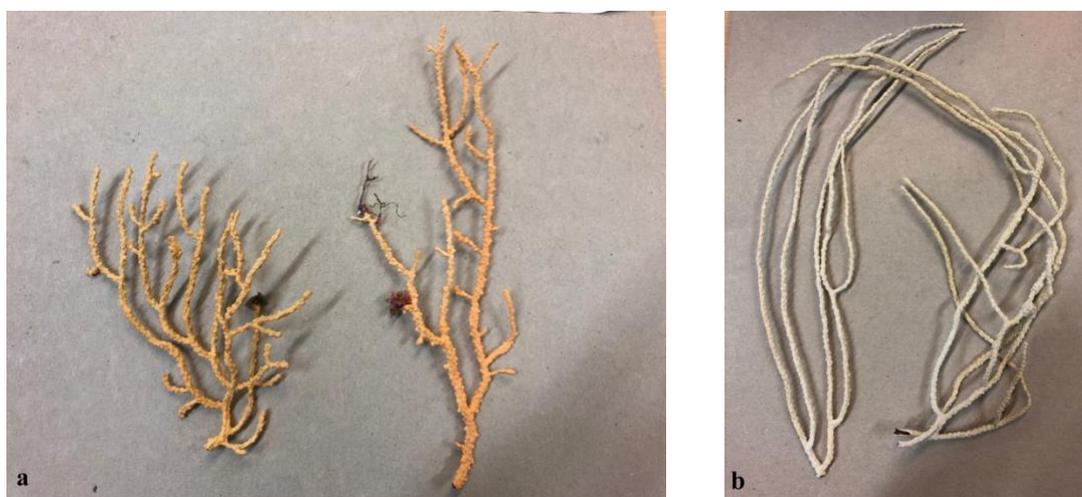


Figure 17 : échantillons récoltés à STARESO - Corse
a : *Eunicella cavolini* encombré d'épiphytes récolté à la pointe de Spano (CO - Site 3) ; *b* : *Eunicella singularis* récolté à Saint-François (CO – Site 2)

Abréviation du site de récolte	Localisation	Espèce	Profondeur	Date de récolte
CO – Site 1	Pointe de Saint-François	<i>Eunicella cavolini</i>	20 – 24 m	5/03/2021
CO – Site 2	Pointe de Saint-François	<i>Eunicella singularis</i>	20 – 24 m	5/03/2021
CO – Site 3	Pointe de Spano	<i>Eunicella cavolini</i>	20 – 24 m	5/03/2021
CO – Site 4	Pointe de Spano	<i>Eunicella singularis</i>	20 – 24 m	5/03/2021

Tableau 2 : description des sites d'échantillonnage en Corse

Dans ce cas, l'échantillonnage a été réalisé à des profondeurs très semblables et au cours de la même journée ce qui permet d'homogénéiser les conditions environnementales. La pointe de Saint-François et la pointe de Spano (figure 18) sont des environnements très différents avec des pressions anthropiques différentes. Le tableau 3 permet de rassembler les différentes pressions subies sur les deux pointes analysées. La pointe de Spano est un endroit beaucoup moins impacté par les rejets urbains ou par les composés chimiques provenant des ports, il serait donc beaucoup moins pollué. Cependant, l'échantillon de *Eunicella cavolini* obtenu provenant de Spano (CO – Site 3, figure 7) est fortement colonisé par des épiphytes et dans ce cas-ci, par des algues, démontrant un stress passé. Cet endroit ne semble donc pas totalement épargné par la pollution. Ces échantillons vont permettre d'analyser l'influence de la pollution sur la production de molécules.

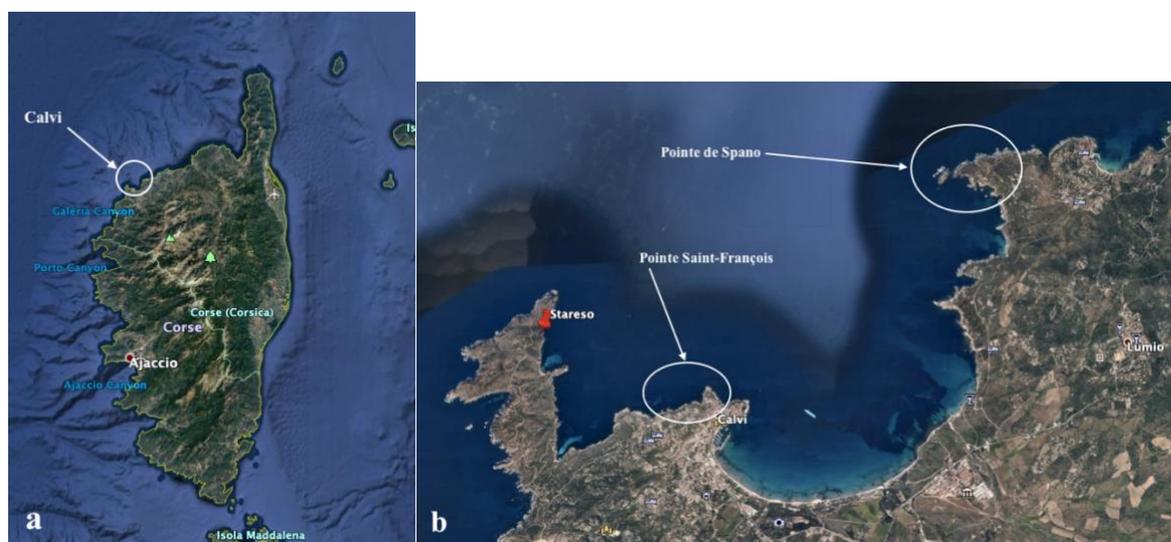


Figure 18 : localisation de Calvi - Corse (a) et de la pointe de Spano et de Saint-François (b) (Jousseau M. et al., 2013 ; GoogleEarth)

	Pêche (professionnelle / sportive)	Plongée sous-marine	Rejets urbains (enrichissement organique)	Zone portuaires (composés chimiques)	Pressions
	Impact mécanique	Impact mécanique	Impact organique	Impact chimique	
Pointe Saint-François	-	+	+++	+	++ (impact physico-chimique)
Pointe de Spano	+	-	/	/	/

Tableau 3 : bilan des pressions connues sur la pointe de Spano et la pointe de Saint-François (Jousseau M. et al., 2013)

3.1.3. Océan Atlantique – Bretagne (Station biologique de Roscoff) – Mer Celtique

Les espèces échantillonnées en Bretagne sont *E. singularis* et *E. verrucosa* (figure 19). L'espèce *Eunicella cavolini* se retrouve à des températures un peu plus chaudes, et elle n'est présente qu'en très petite quantité dans les eaux de l'océan Atlantique. Pour éviter de détruire les quelques colonies présentes dans l'océan Atlantique, seulement *Eunicella singularis* et *Eunicella verrucosa* ont été prélevés. Elles ont été prélevées au niveau de la roche d'Astan, à une profondeur de 27 m (figure 20, tableau 4).



Figure 19 : échantillons récoltés à la station Biologique de Roscoff – Bretagne
a : *Eunicella singularis* (RO – site 1), b : *Eunicella verrucosa* (RO – site 2)

Abréviation du site de récolte	Localisation	Espèce	Profondeur	Date de récolte
RO – Site 1	Roche d'Astan	<i>Eunicella singularis</i>	27 m	9/03/2021
RO – Site 2	Roche d'Astan	<i>Eunicella verrucosa</i>	27 m	9/03/2021

Tableau 4 : description des sites d'échantillonnage en Bretagne



Figure 20 : localisation de la Station Biologique de Roscoff - Bretagne (a) et de la roche d'Astan - Roscoff (b) (GoogleEarth)

Comme le montre la figure 19, *E. singularis* et *E. verrucosa* se ressemblent fortement lorsqu'elles sont séchées. *E. verrucosa* peut être de couleur orange ou rose mais dans les échantillons obtenus, c'est une colonie blanche. La différenciation entre les deux espèces a donc été effectuée sur les colonies vivantes par les plongeurs de la Station Biologique de Roscoff. De plus, Carpine C. & Grasshof M. (1975) fournissent un guide afin d'identifier les gorgones de la Méditerranée grâce aux ramifications, aux polypes verruqueux mais aussi aux spicules. Il faut aussi remarquer les aspects identiques des colonies d'*E. singularis* entre les différents sites de prélèvement.

3.1.4. Océan Atlantique – Hendaye – Golfe de Gascogne

Pour ces échantillons, j'ai eu la chance d'aller plonger pour les récolter moi-même et les voir dans leur milieu naturel. Des échantillons de *E. cavolini* et *E. verrucosa* (figure 21) ont pu être récoltés en les coupant de la colonie. Ces espèces se retrouvent au niveau du site appelé « Gorgones blanches » à Hendaye (figure 22) à une profondeur de 18 m (tableau 5). *E. singularis* a pu être observé, mais vu la faible abondance de cette espèce à cet endroit, j'ai préféré ne pas l'échantillonner.

Abréviation du site de récolte	Localisation	Espèce	Profondeur	Date de récolte
HE – Site 1	Site gorgones blanches	<i>Eunicella cavolini</i>	18 m	5/05/2021
HE – Site 2	Site gorgones blanches	<i>Eunicella verrucosa</i>	18 m	5/05/2021

Tableau 5 : description des sites d'échantillonnage à Hendaye



Figure 21 : échantillons récoltés à Hendaye
 a : *Eunicella cavolini*, b : *Eunicella verrucosa*



Figure 22 : localisation de Hendaye - France (a) et du site gorgones blanches (b)

3.1.5. Aquarium de Monaco

Des échantillons de *E. singularis* et de *E. cavolini* élevés en aquarium ont pu être obtenus (figure 23, tableau 6). La température de ces aquariums est de 16°C avec un pH de 7,87 et un renouvellement de l'eau de mer de 252 L/h. Les deux espèces ont été transplantées en aquarium en juillet 2020, elles ont donc eu suffisamment de temps (environ 8 mois) pour s'adapter au milieu de culture. Les gorgones ont initialement été prélevées à La Ciotat, près de Marseille, dans la mer Méditerranée.



Figure 23 : échantillons élevés en culture obtenus de l'aquarium de Monaco
 a : *Eunicella singularis* (AQ - Site 1), b : *Eunicella cavolini* (AQ - Site 2)

Abréviation du site de récolte	Localisation	Espèce	Profondeur	Date de récolte
AQ – Site 1	/	<i>Eunicella singularis</i>	/	14/04/2021
AQ – Site 2	/	<i>Eunicella cavolini</i>	/	14/04/2021

Tableau 6 : description des échantillons obtenus à l'aquarium de Monaco

3.2. Collecte et séchage du matériel

Les échantillons peuvent être collectés à partir de l'environnement naturel de deux manières. Premièrement, un échantillon peut être coupé à partir d'une colonie plus grande à l'aide d'un ciseau. La deuxième technique consiste à détacher une petite colonie de son substrat à l'aide d'un couteau de plongée. Lorsque la colonie est suffisamment grande, la première technique est à privilégier car elle est non destructive. Les échantillons sont ramenés à la surface dans un sachet en plastique et sont ensuite séchés pendant 24 heures sur du papier absorbant. Une température de séchage trop élevée pourrait influencer les molécules présentes dans les prélèvements. De plus, ce séchage basique a été choisi pour avoir les conditions les plus simples qui seraient certainement préconisées dans l'industrie pharmaceutique, dans le cas où ces organismes marins pourraient être exploités. Une lyophilisation ou une conservation dans un solvant plus approprié pourrait donner des résultats différents sur la présence de métabolites secondaires dans les gorgones.

3.3. Extraction des composés à partir des gorgones

Premièrement, les gorgones sont prises en photo et pesées afin d'avoir une idée de la masse disponible pour les analyses (tableau 11, annexe 3).

Si les gorgones sont encombrées d'épiphytes, la partie envahie est éliminée afin d'éviter une contamination par les organismes présents.

Les gorgones ont ensuite été broyées en extrait fin grâce à un broyeur de type IKA A10. Les poudres obtenues ont ensuite été mises dans des récipients en plastique, classés et annotés en fonction des différents endroits d'échantillonnage. L'extraction des molécules d'intérêt présentes dans les différentes espèces de gorgones a été réalisée dans une solution apolaire de dichlorométhane. Pour ce faire, 0,33g de poudre de gorgone est mise dans un ballon avec 3,33ml de dichlorométhane. La solution est ensuite placée sous reflux dans un bain-marie à 37°C. L'extraction sous reflux est réalisée deux fois afin d'extraire le plus possible de

molécules. Le filtrat obtenu est ensuite évaporé à sec grâce à un Rotavapor de type BUCHI B-721 Vacuum Controller. Pour une meilleure conservation des extraits, ils sont séchés une nuit dans une étuve à vide et conservés dans une chambre froide à 7°C.

Cette extraction est une méthode spécifique pour analyser les terpènes et donc les stéroïdes, qui font aussi partie de cette grande classe de molécules : les extraits obtenus contiendront en priorité des molécules de ce type.

3.4. Calcul du rendement

Afin de calculer la masse d'extrait obtenu, il doit être transféré dans un tube à essai préalablement annoté et taré. Ce transfert se fait grâce à une mise en solution dans le dichlorométhane. Ensuite, l'échantillon est évaporé au Rotavapor et séché une nuit entière dans une étuve à vide. Le lendemain, le tube à essai peut être pesé à la balance analytique pour en déduire la masse d'extrait obtenu.

Le rendement permet de connaître le pourcentage de masse de molécules d'intérêt isolé à partir de la poudre de gorgones. Il est calculé comme suit :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse d'extrait obtenu (mg)}}{\text{Masse pesée pour l'extraction (mg)}} \times 100$$

3.5. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Pour faire les analyses des molécules, plusieurs techniques seront utilisées. Premièrement, une chromatographie sur couche mince (CCM) sera réalisée afin d'avoir une idée de l'ensemble des molécules présentes dans les échantillons. Cette technique se base sur une séparation entre les composés polaires et apolaires avec une phase stationnaire solide (annexe 4). Les chromatographies sur couche mince ne peuvent donner que des informations qualitatives quant à la présence de molécules dans les extraits.

Pour la réalisation de la CCM des gorgones, l'extrait séché est dilué dans 0,1ml de dichlorométhane. Pour que le mélange soit bien homogène, il est passé dans un bain à ultrasons. Un dépôt de 20 µL est ensuite déposé sur une plaque de gel de silice polaire à l'aide d'un capillaire. La phase mobile utilisée est un mélange apolaire toluène – acétate d'éthyle (60 : 40). Des tests ont été réalisés avec un mélange (93 : 7) et un mélange (80 : 20) mais la migration des composés n'était pas suffisante. Une modification de la phase mobile en d'autres proportions a donc permis de faire migrer les différents composés et de les séparer plus aisément. Lorsque le front de solvant arrive sur le dessus de la plaque chromatographique, la plaque est retirée de la

cuve de migration et séchée à l'air libre pendant quelques minutes. Dans la cadre de cette étude, les terpènes et les stéroïdes vont être mis en avant grâce à un révélateur spécifique pour cette classe de molécules, la vanilline sulfurique. Cette solution est préparée à l'aide de vanilline, d'éthanol et d'acide sulfurique concentré. Elle est pulvérisée sur la plaque chromatographique qui est ensuite séchée à 100°C pendant 10 minutes. Les spots présents sur la plaque sont ensuite entourés et numérotés pour être mis en évidence.

Le logiciel Mesurim2 (Cosentino P., 2020) permet de créer un graphique reprenant les facteurs d'absorption des spots présents sur les plaques CCM en fonction de la distance de migration par rapport à la ligne de base, ce qui quantifiera l'intensité des spots pour chaque site. Pour ce faire, la photographie des plaques CCM est insérée dans le logiciel et une ligne est tracée sur chaque bande de migration des sites, d'un point A, correspondant à la ligne de base, à un point B, correspondant au front de solvant. Le logiciel génère ensuite un graphique.

3.6. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire, aussi appelée RMN, est une technique qui se base sur les propriétés magnétiques des noyaux et est utilisée pour caractériser la structure des molécules organiques à l'aide d'un spectre RMN (annexe 4).

Dans le cas de cette analyse, le spectre RMN proton de chaque site sera recherché. Les atomes d'hydrogène pourront alors être analysés grâce aux pics obtenus sur le spectre aux différents déplacements chimiques. Les 17 extraits ont été analysés dans un spectromètre RMN de type Bruker 500MHz. Ils sont dissous dans du chloroforme deutéré et transférés dans des tubes RMN correctement annotés. Les emplacements dans le spectromètre sont encodés en fonction des échantillons et ceux-ci sont placés aux endroits adéquats. L'analyse proton est ensuite lancée pour obtenir les spectres RMN des différents échantillons. Ceux-ci sont ensuite analysés grâce au logiciel MestreNova.

La molécule utilisée pour avoir la fréquence de résonance de référence est le tétramethylsilane (TMS). Cette molécule se retrouve sur les spectres RMN à un déplacement chimique de 0 ppm. Le chloroforme deutéré utilisé comme solvant est représenté sur le spectre RMN à un déplacement chimique de 7,28 ppm.

A partir des spectres RMN, une analyse en composantes principales (PCA) peut être réalisée grâce au logiciel MestreNova. Le nombre de composantes déterminées à partir du logiciel peut être choisi, et sera de 3 dans ce cas afin de ressortir un maximum de corrélations. Pour les spectres RMN, l'analyse PCA isole des composantes qui permettent de corrélérer les différents spectres. Le résultat est un graphique de nuage de points des différents échantillons.

3.7. Spectroscopie de masse

La spectroscopie de masse est une autre méthode de spectroscopie moléculaire qui permet d'avoir une information sur la masse des molécules présentes dans un échantillon, sur leur structure ou encore leur concentration. Elle est réalisée pour avoir une analyse préliminaire des masses retrouvées dans l'échantillon. Des analyses pharmaceutiques plus poussées sont alors nécessaires pour pouvoir déterminer la structure d'une molécule (annexe 4).

Le spectromètre utilisé est un Acquity UPLC Waters QDa, composé d'un spectromètre de masse d'ionisation par électronébuliseur (ESI-MS). Il permet d'analyser l'échantillon sous forme de gouttelettes chargées qui vont ensuite passer dans une colonne phényl perfluoré (PFP). Cette colonne permet de séparer des composés aromatiques, des composés très polaires, des isomères ou encore des composés conjugués (« Explore Luna PFP (2) »). Le champ magnétique permettant de séparer les ions est un quadropole : ils seront donc séparés par un champ magnétique émis par 4 pôles.

Pour réaliser cette analyse, un échantillon présentant le plus grand rendement et les résultats les plus concluants pour les chromatographies sur couche mince et l'analyse RMN doit être choisi. A partir de la masse obtenue pour le rendement, il doit être dilué à une concentration de 0,5mg / ml dans du méthanol car ce solvant est apolaire et permettra de diluer les terpènes et stéroïdes, eux aussi apolaires. La phase mobile utilisée pour faire passer l'échantillon dans la colonne est une solution de méthanol / acide formique à 0,1%. Un mode positif et un mode négatif seront appliqués sur les ions, en les chargeant donc positivement et négativement, permettant d'avoir une analyse plus complète des molécules présentes dans l'échantillon. Après avoir fixé la colonne adéquate et enregistré les échantillons dans l'ordinateur, l'analyse peut être lancée.

Les spectres de masse obtenus sont présentés sous forme d'un graphique de l'intensité des pics en fonction du temps de rétention. Le temps de rétention (t_r) correspond à l'intervalle de temps entre l'injection de l'échantillon dans le spectromètre et l'arrivée de celui-ci sur le détecteur, à la sortie de la colonne (Guillaume G., 2017). Il est associé à une masse précise d'une molécule présente dans l'échantillon de gorgones.

3.8. Localisation des molécules par spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman permet de déterminer la composition moléculaire d'un milieu grâce aux phénomènes de vibrations et de changements d'énergie des liaisons entre les molécules (annexe 4).

Comme expliqué précédemment, les gorgones sont composées d'un squelette de gorgonine entouré d'un tissu, le coenenchyme. Afin d'avoir une analyse complète des métabolites secondaires, il est intéressant de localiser ces molécules qui pourraient se trouver soit dans le tissu, soit dans le squelette. Pour ce faire, une analyse par spectre Raman a été effectuée sur des échantillons de gorgone. Une lumière rouge à 785 nm est envoyée sur l'échantillon car cette lumière possède la plus grande longueur d'onde et donc la plus petite énergie, ce qui permet de diminuer l'effet de fluorescence que les échantillons peuvent avoir en spectroscopie Raman.

Un petit fragment de gorgone est isolé et fixé sur une lame. Ensuite, à l'aide d'un microscope de type Olympus BX40 équipé d'un objectif Olympus x50, un point dans le tissu est visé avec le laser rouge, afin d'obtenir un spectre Raman à ce point précis. Dans cette partie de la gorgone, le spectre Raman de la calcite doit être retrouvé à cause de la présence des spicules calcifiés. Le spectre de la calcite est assez caractéristique et possède 3 bandes d'absorption Raman : 279 cm^{-1} , 710 cm^{-1} et 1085 cm^{-1} . Pour les fonctions organiques qui se retrouvent dans les terpènes, des bandes d'absorption devraient apparaître à des fréquences entre 1200 et 2000 cm^{-1} .

4. Résultats

4.1. Rendements

Le tableau 7 reprend, pour chaque site d'échantillonnage, la masse de poudre prélevée pour l'extraction ainsi que la masse de l'extrait obtenue, permettant de calculer le rendement d'extraction pour les molécules d'intérêt.

Site d'échantillonnage	Masse de poudre prélevée (mg)	Masse de l'extrait (mg)	Rendement	Moyenne du rendement de chaque localisation
ME – Site 1	330	0,18	0,05%	0,14%
ME – Site 2	330	0,13	0,03%	
ME – Site 3	330	1,11	0,34%	
ME – Site 4	330	0,68	0,21%	
ME – Site 5	330	0,30	0,09%	
ME – Site 6	330	0,18	0,05%	
ME – Site 7	330	0,65	0,20%	
CO – Site 1	330	2,65	0,80%	0,76%
CO – Site 2	330	2,92	0,88%	
CO – Site 3	330	1,37	0,41%	
CO – Site 4	330	3,08	0,93%	
RO – Site 1	332,24	1,79	0,54%	0,66%
RO – Site 2	335,9	2,62	0,78%	
HE – Site 1	333,32	5,43	1,63%	1,66%
HE – Site 2	331,71	5,58	1,68%	
AQ – Site 1	332,17	3,71	1,12%	1,40%
AQ – Site 2	330,73	5,53	1,67%	

Tableau 7 : masse d'extrait obtenu et rendement d'extraction des gorgones *Eunicella cavolini*, *Eunicella singularis* et *Eunicella verrucosa* aux différents sites (ME : site 1 à 7 ; CO : site 1 à 4 ; RO : site 1 et 2 ; HE : site 1 et 2 ; AQ : site 1 et 2)

Les échantillons provenant de la mer Egée présentent les résultats de rendement les plus faibles suivis par ceux de Roscoff, de Corse, de l'aquarium et enfin, de Hendaye. Les rendements de ces deux derniers sont significativement plus élevés (> 1%) que ceux provenant de Corse, de Roscoff et de la mer Egée.

Le rendement de l'espèce *E.singularis* est de 0,4% en moyenne, celui de *E.cavolini* est de 0,9% et enfin, celui de *E.verrucosa* est de 1,23%. Cependant, pour une même espèce, les rendements sont différents entre les localisations. En effet, le rendement de *E.singularis* est de 0,14% en moyenne dans la mer Egée ; 0,91% en Corse ; 0,54% à Roscoff et 1,12% dans l'aquarium. Pour l'espèce *E.cavolini*, le rendement est de 0,61% en Corse ; 1,63% à Hendaye et 1,67% dans l'aquarium. Enfin, pour l'espèce *E.verrucosa*, il est de 0,78% à Roscoff et 1,68% à Hendaye.

Les résultats peuvent aussi être classés en fonction de la profondeur : de 5 à 10 m, le rendement est de 0,12% ; de 10 à 20 m, il est de 0,67% et enfin, de 20 à 30 m, il est de 0,63%.

Les résultats obtenus pour les échantillons de la mer Egée permettent d'analyser l'effet de l'hydrodynamisme et la diversité intra-populationnelle. Le rendement moyen pour l'endroit le plus exposé à l'hydrodynamisme, l'île d'Arethoussa, est de 0,19% ; celui pour l'endroit le plus protégé, la baie de Porto Koufo, est de 0,05% et enfin, il est de 0,14% pour l'île de Phidonissi. Pour une même espèce à la même localisation et même profondeur (ME – Site 5, 6, 7), les rendements sont différents : 0,09 % ; 0,05 % et 0,2 %.

Enfin, les échantillons provenant de Corse permettent d'analyser l'effet de la pollution sur la production de métabolites secondaires. Pour l'endroit le plus impacté, la pointe de Saint-François, le rendement est de 0,84% et pour la pointe de Spano, moins impactée par la pollution physico-chimique, il est de 0,67%. Le rendement de l'échantillon CO – Site 3, fortement encombré d'épiphytes, est nettement plus faible que celui des autres échantillons provenant de Corse.

4.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les figures 24 et 25 représentent les plaques chromatographiques obtenues pour les échantillons. Afin d'avoir un élément de comparaison entre les deux plaques, un site de référence (RO – Site 2) a été repris pour chaque CCM. La numérotation des spots se fait donc à partir de ce site de référence. Un tableau récapitulatif (tableau 8) reprend la présence de spots annotés et numérotés. La figure 26 reprend les graphiques des facteurs d'absorption en fonction

de la distance de migration obtenus grâce au logiciel Mesurim2. Chaque pic représente un spot quantifié par une intensité, le facteur d'absorption.

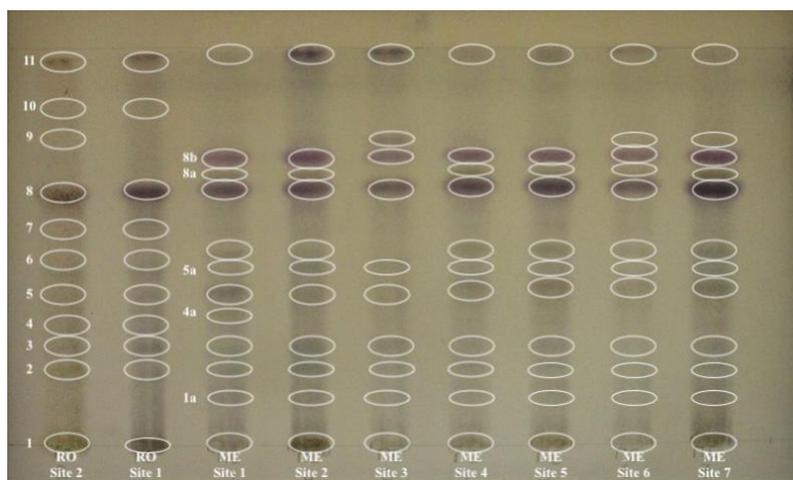


Figure 24 : chromatographie sur couche mince des échantillons de Roscoff et de la mer Egée



Figure 25 : chromatographie sur couche mince d'un site de référence (RO - Site 2), des échantillons de Corse, de Hendaye et de l'aquarium

Tout d'abord, les chromatographies sur couche mince mettent en évidence la présence de terpènes et de stéroïdes car le révélateur utilisé est spécifique à cette classe de molécules. Les spots colorés présents sur les plaques à différentes distances de migration de la ligne de base démontrent la présence de molécules de différents types car elles possèdent des affinités différentes pour la phase stationnaire polaire.

Les bandes de migration présentent des similarités avec, cependant, des intensités différentes. Le nombre de spots présents pour chaque site varie entre 9 et 12 et ceux numérotés 1, 8 et 11 se retrouvent pour chaque échantillon.

Les bandes de migration de chaque localisation principale se ressemblent d'une manière plus notable entre elles : celles de la mer Egée, de Roscoff, de Corse, de Hendaye et enfin celles de l'aquarium. Le tableau 8 permet de mettre ces résultats en valeur avec le nombre de spots.

Les facteurs d'absorption sont plus élevés pour les échantillons provenant de Corse, de Hendaye et de l'aquarium. Les facteurs d'absorption maximaux sont de l'ordre de 90 à 95% pour ces 3 derniers alors que pour ceux de Roscoff, ils sont entre 70 et 75% et pour ceux de la mer Egée, entre 65 et 80%.

Il y a peu de corrélations entre les spots des 3 espèces. Les spots présents sur les bandes de migration pour les échantillons de l'espèce *E. cavolini* sont différents : les bandes de migrations pour les échantillons de Corse de cette espèce présentent des spots différents par rapport à ceux de Hendaye ou de l'aquarium (tableau 8). Les facteurs d'absorption maximaux sont aussi différents : de 85 à 90% pour ceux de Corse et de 95% pour ceux de Hendaye et de l'aquarium. Les mêmes observations peuvent être tirées pour l'espèce *E. singularis* : le nombre de spots et les facteurs d'absorption sont différents pour les échantillons de la même espèce provenant de la mer Egée, de Roscoff, de Corse et de l'aquarium. La bande de migration de RO – Site 2 ressemble peu à celle de HE – Site 2, représentant pourtant toutes les deux l'espèce *E. verrucosa* : 4 spots sont différents entre les 2 sites. Les graphiques des facteurs d'absorption sont aussi forts différents : le maximum est de 72% pour RO – Site 2 et de 95% pour HE – Site 2. Les résultats pour cette espèce sont cependant les plus concluants, avec un grand nombre de spots et de facteurs d'absorption élevés.

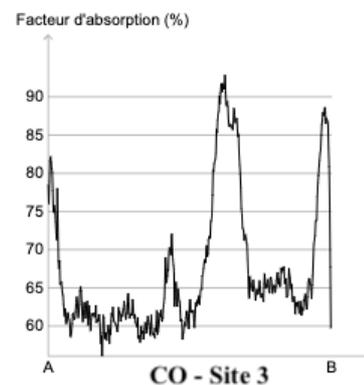
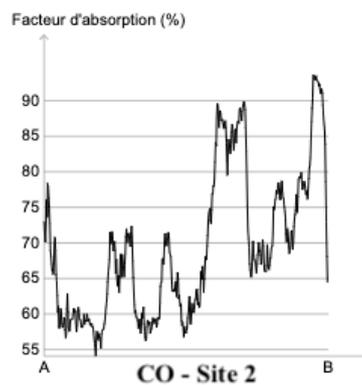
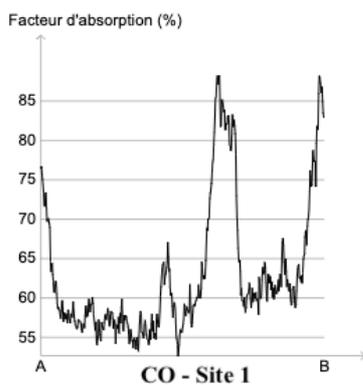
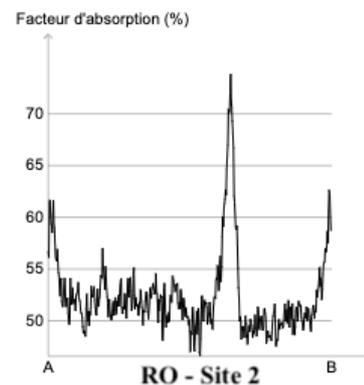
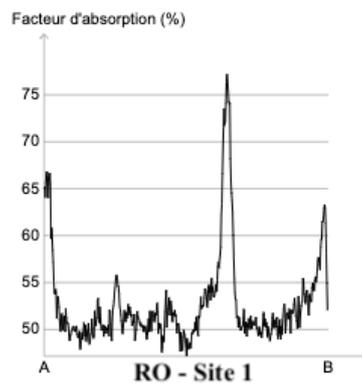
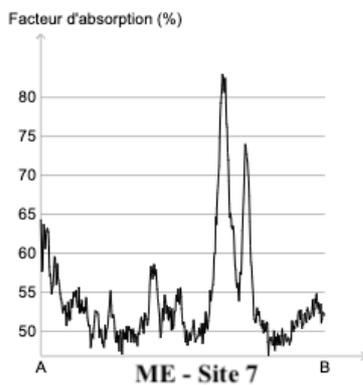
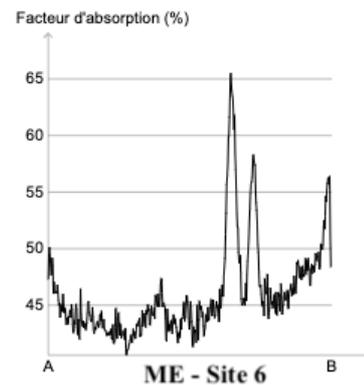
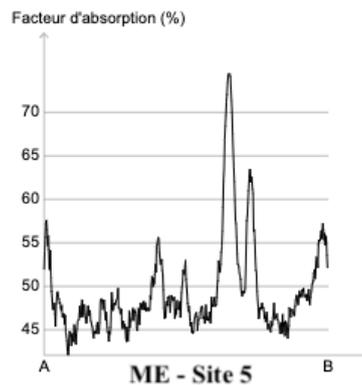
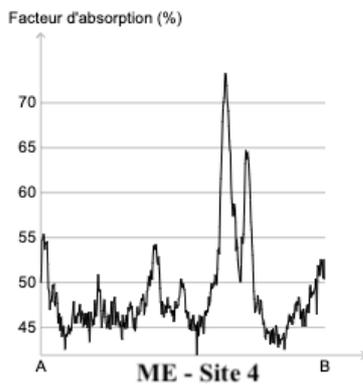
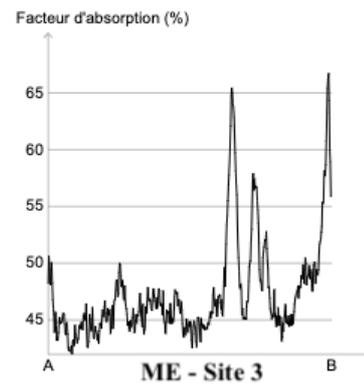
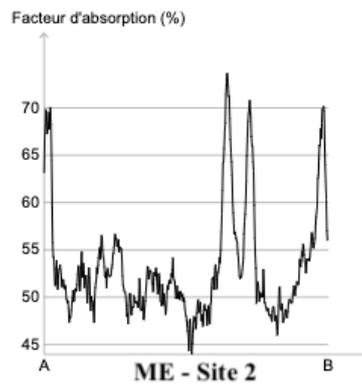
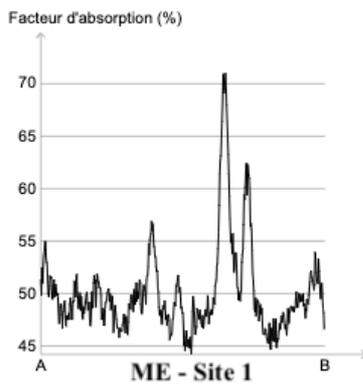
Pour les échantillons provenant de Roscoff, la bande de migration de l'espèce *E. singularis* présente un spot de moins que l'espèce *E. verrucosa*. Pour ceux de Corse, l'espèce *E. singularis* est reconnaissable grâce à l'apparition d'un spot numéroté 3. L'espèce *E. verrucosa* est reconnaissable à Hendaye grâce à un nombre de spots plus élevés. Enfin, l'espèce *E. cavolini* présente de meilleurs résultats que l'espèce *E. singularis* dans un environnement de culture en aquarium : les facteurs d'absorption sont plus élevés ainsi que le nombre de spots.

Dans l'intervalle de 5 à 10 m, les bandes de migrations présentent en moyenne 11 spots avec un facteur d'absorption de 72% au maximum. Pour 10 – 20 m, il y a en moyenne 11 spots et un facteur d'absorption de 80% au maximum. Enfin, pour l'intervalle de 20 à 30 m, il y a en moyenne 10 spots et un facteur d'absorption de 83% au maximum.

Parmi les échantillons de la mer Egée, aucune tendance ne peut être mise en évidence en fonction de l'hydrodynamisme. Le nombre de spots est de 12 pour l'endroit le plus protégé comme pour le plus exposé. De plus, les facteurs d'absorption ne permettent pas d'établir une tendance générale en fonction de l'hydrodynamisme. Les spots ne sont pas totalement identiques (11 à 12 spots) et les facteurs d'absorption sont différents (de maximum 65% à 80%) pour les échantillons provenant de la même localisation et de la même espèce (ME – Site 5,6, 7).

Site	Total de spots	Total de spots = par rapport à RO – Site 2	Total de spots ≠ par rapport à RO – Site 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		1a	4a	5a	8a	8b	8c	9a	X
RO Site 1	10	10	1	p	p	p	p	p	p	p	p		p	p									
RO Site 2	11	11	0	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p									
ME Site 1	12	7	5	p	p	p		p	p		p			p		p	p	p	p	p			
ME Site 2	11	7	4	p	p	p		p	p		p			p		p		p	p	p			
ME Site 3	10	7	3	p	p	p		p			p	p		p				p		p			
ME Site 4	11	7	4	p	p	p		p	p		p			p		p		p	p	p			
ME Site 5	11	7	4	p	p	p		p	p		p			p		p		p	p	p			
ME Site 6	12	8	4	p	p	p		p	p		p	p		p		p		p	p	p			
ME Site 7	12	8	4	p	p	p		p	p		p	p		p		p		p	p	p			
CO Site 1	10	8	2	p	p		p		p		p	p	p	p						p			p
CO Site 2	10	8	2	p	p	p	p		p		p		p	p						p			p
CO Site 3	9	7	2	p	p		p		p		p		p	p						p			p
CO Site 4	10	8	2	p	p	p	p		p		p		p	p						p			p
HE Site 1	10	8	2	p		p	p		p		p	p	p	p						p			p
HE Site 2	12	8	4	p	p	p		p			p	p	p	p						p	p	p	p
AQ Site 1	9	7	2	p		p	p		p		p		p	p						p	p		
AQ Site 2	12	10	2	p	p	p	p		p	p	p	p	p	p						p		p	

Tableau 8 : récapitulatif des spots présents sur les plaques CCM pour les différents sites étudiés (p : présence de spots)



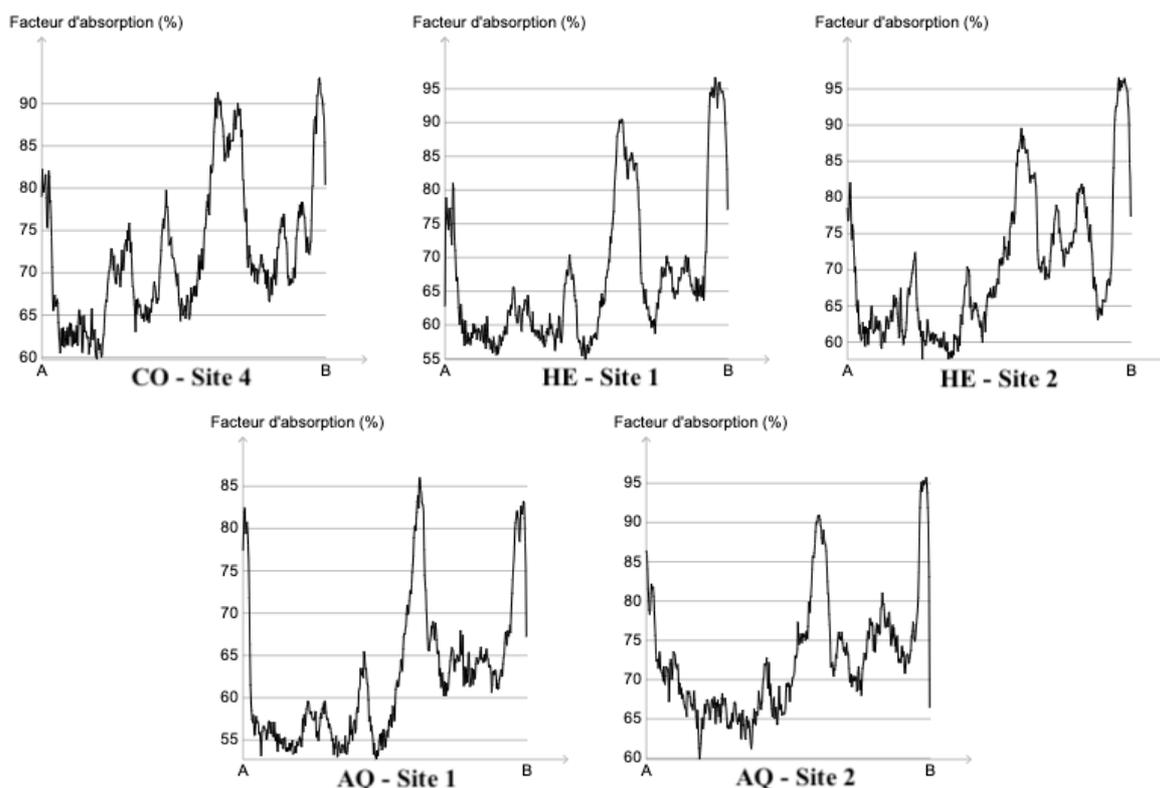


Figure 26 : graphiques du facteur d'absorption des spots en fonction de la distance de migration pour chaque bande de migration CCM des sites d'échantillonnage (Cosentino P., 2020)

Les bandes de migration et les graphiques du facteur d'absorption pour les sites provenant de différentes conditions anthropiques (Corse) sont similaires : les facteurs d'absorption oscillent entre 90 et 95% et les spots se ressemblent pour les localisations, le spot numéroté 9 apparaît cependant seulement pour l'échantillon CO – Site 1.

4.3. Spectre de résonance magnétique nucléaire

Les spectres protons RMN des 17 échantillons ont été obtenus, classés et analysés en fonction de la localisation principale (figure 27). L'échelle des spectres a été adaptée pour chaque site d'échantillonnage afin de pouvoir analyser au mieux les pics.

Les pics se trouvent principalement à un déplacement chimique entre 0 et 5 ppm pour tous les sites d'échantillonnage. Cette zone est caractéristique des fonctions organiques, ce qui correspond aux terpènes et stéroïdes. La méthode d'extraction utilisée a donc bien permis d'isoler des molécules de ce type.

Les spectres RMN se ressemblent pour les échantillons provenant de la même localisation principale : la figure 27 permet de comparer les pics de chaque site et une ressemblance en ressort.

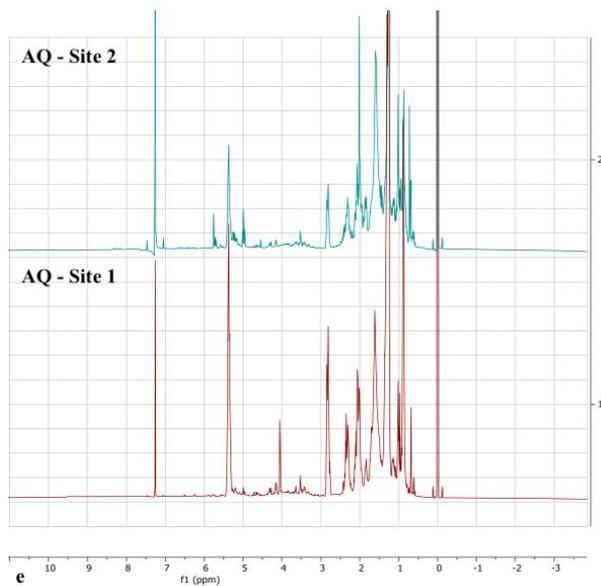
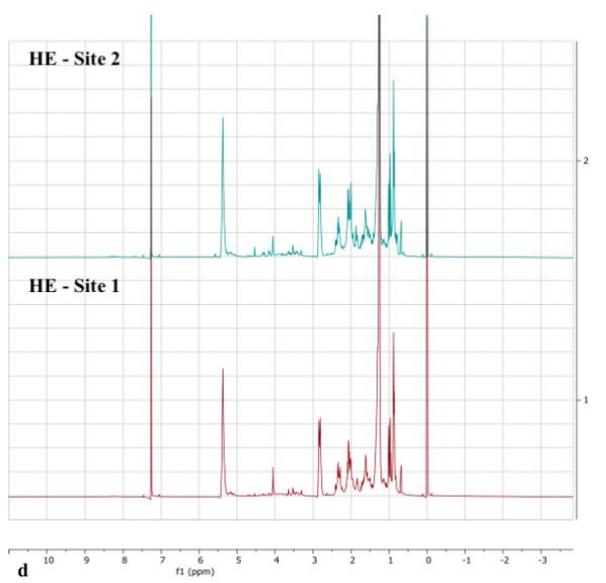
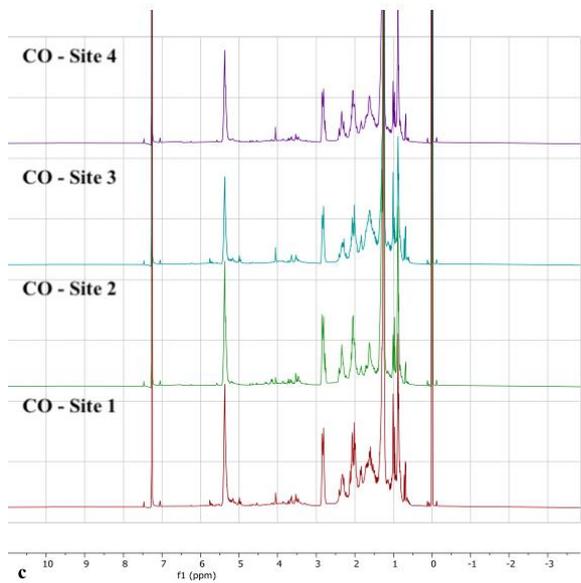
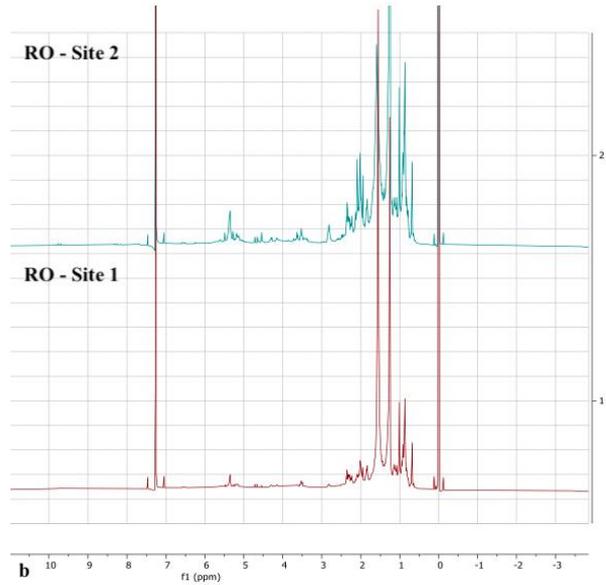
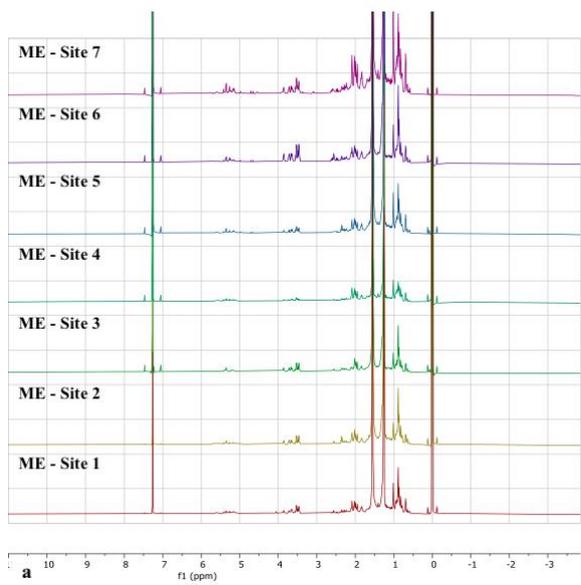


Figure 27 : spectre protons RMN obtenus pour les 17 sites d'échantillonnage a : mer Egée, b : Roscoff, c : Corse, d : Hendaye, e : aquarium

Ensuite, des petites différences sont notables entre les localisations principales. Etant donné la ressemblance entre les sites d'une même localisation principale, une comparaison d'un seul site de chaque localisation permet une analyse plus aisée (figure 28). Un grand nombre de pics sont présents pour tous les échantillons mais certains sont plus remarquables en fonction des localisations principales. Le pic à 5,3 ppm est présent d'une manière plus intense pour les échantillons de Corse, de Hendaye et de l'aquarium. De plus, un pic à 4 ppm et à 2,8 ppm apparaît pour les échantillons de ces mêmes localisations.

La comparaison des spectres protons pour chacune des 3 espèces (figure 34, annexe 5) ne montre pas de ressemblances entre les espèces. Les pics principaux sont toujours présents mais il n'y a pas de pics caractéristiques pour chaque espèce. Les spectres de l'espèce *E.cavolini* provenant de l'aquarium présentent plus de pics. Pour les échantillons provenant de Roscoff et de Hendaye, l'espèce *E.verrucosa* présente les meilleurs résultats. Pour les échantillons provenant de Corse, les spectres des 2 espèces analysées sont similaires.

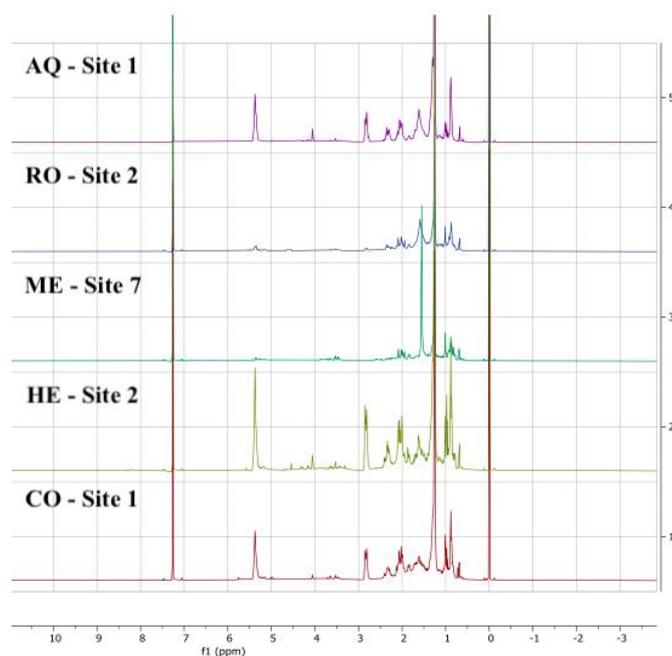


Figure 28 : spectre protons RMN d'un site de chaque localisation principale

De même, les intervalles de profondeur de 5 à 10 m, de 10 à 20 m et de 20 à 32 m influencent peu la formation de métabolites secondaires dans l'intervalle étudié (figure 35, annexe 5). En effet, aucun pic caractéristique dans les mêmes intervalles de profondeur ne peut être mis en évidence.

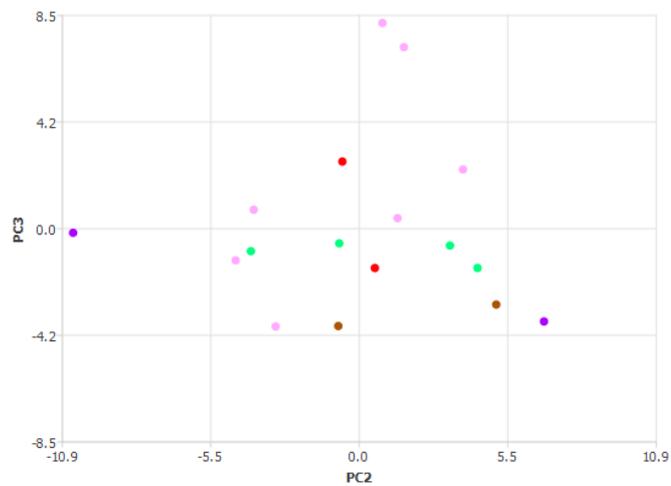
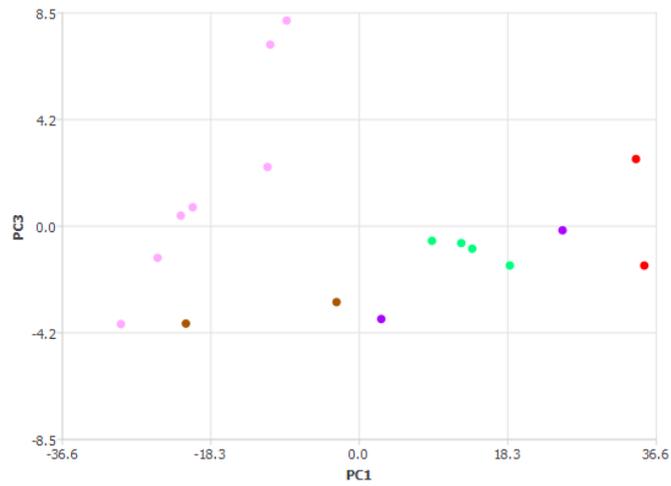
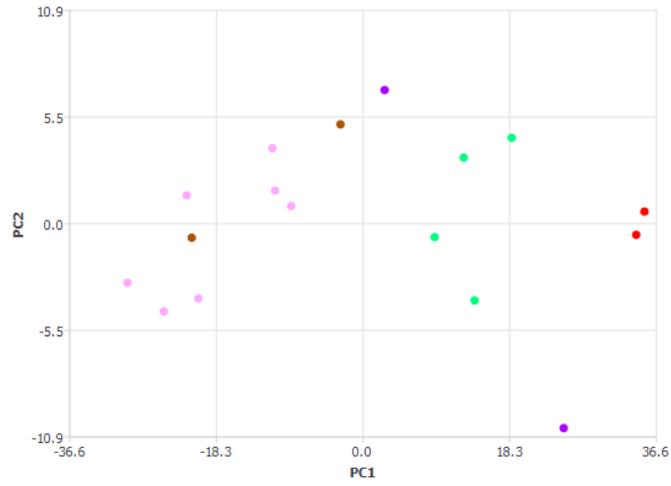


Figure 29 : graphiques de corrélations des variables obtenus aux différents sites d'échantillonnage par analyse PCA des spectres protons RMN (rose : mer Egée, brun : Roscoff, mauve : aquarium, vert : Corse, Rouge : Hendaye)

Pour les échantillons de la mer Egée, l'hydrodynamisme n'influence pas les résultats car les spectres se ressemblent entre les 7 sites : tous les sites provenant de la mer Egée sont similaires. Enfin, pour les échantillons de Corse, les conditions anthropiques n'influencent pas les résultats des spectres protons RMN.

Ensuite, une analyse PCA est réalisée sur les spectres RMN (figure 29). Trois composantes sont déterminées pour corrélérer les variables. La composante 1 (PC1) est corrélée pour tous les échantillons à 90%, la relation entre les échantillons est donc expliquée en majorité par cette composante. La composante 2 (PC2) et la composante 3 (PC3) corrèlent les échantillons pour seulement 5% chacune, il y a donc peu de relation entre les échantillons expliquée par ces composantes.

Les échantillons se corrèlent en fonction des localisations mais aucune autre caractéristique ne peut être mise en évidence. En effet, les couleurs représentant les localisations principales sont groupées ensemble mais aucun autre regroupement ne peut être mis en évidence.

4.4. Spectroscopie de masse

L'échantillon analysé est le AQ – Site 2 car les résultats de rendement, sur la plaque CCM et sur les spectres RMN démontrent une grande quantité et diversité de métabolites secondaires.

Tout d'abord, la technique utilisée a permis d'obtenir des résultats de masses. La colonne PFP permet donc de séparer les molécules présentes dans l'extrait, qui doivent être des molécules avec une partie aromatique, très polaires, ou encore des composés conjugués. Cela correspond aux molécules de type diterpènes et stéroïdes retrouvées dans la littérature. En effet, certaines molécules possèdent des noyaux avec dans certains cas, des doubles liaisons.

La figure 30a représente l'analyse en mode négatif et la figure 30b en mode positif. A partir du mode d'analyse et de la masse obtenue sur base du temps de rétention, la masse réelle de la molécule peut être retrouvée (tableau 9). En mode positif, la molécule est chargée positivement et possède donc un proton en plus : la masse réelle est donc augmentée de 1. En mode négatif, c'est l'inverse : la masse réelle est diminuée de 1.

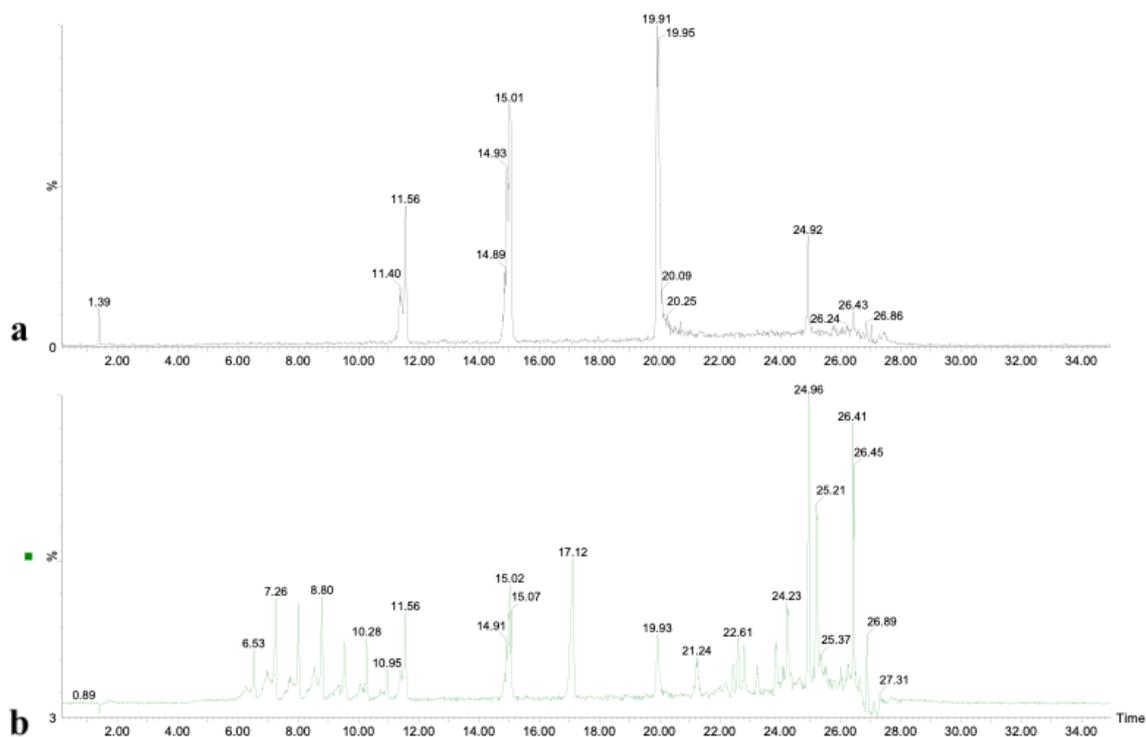


Figure 30 : spectre de masse obtenu par UPLC-QDa de l'intensité des pics en fonction du temps de rétention d'un extrait de gorgone
a : mode négatif, *b* : mode positif

Mode	Temps de rétention (min)	Masse ionisée (m/z)	Masse réelle	Mode	Temps de rétention (min)	Masse ionisée (m/z)	Masse réelle
+	6.53	305.15	304.15	+	24.23	575.35	574,35
+	7.26	365.37	364.37	+	24.96	357.42	356,42
+	8.02	409.39	408.39	+	25.21	445.41	444,41
+	8.8	453.31	452.31	+	26.02	483.57	483,57
+	9.54	497.27	496.27	+	26.41	379.38	378,38
+	10.28	541.29	540.29	+	26.89	282.28	281,28
+	11.56	453.31	452.31	+	27.31	113.17	112,17
+	15.02	701.58	700,58	-	1.39	521.18	522,18
+	17.12	453.31	452,31	-	11.56	489.42	490,42
+	19.93	209.29	208,29	-	15.01	715.78	716,78
+	21.24	517.28	516,28	-	19.91	207.29	208,29
+	22.61	453.31	452,31	-	24.92	183.27	184,27
+	22.44	577.15	576,15				

Tableau 9 : masse réelle des molécules présentes dans les échantillons obtenus par spectroscopie de masse à partir des temps de rétention et du mode d'analyse

Les masses obtenues dans l'extrait oscillent entre 112,17 et 716,78. Sur le tableau 9, des temps de rétention correspondent à une molécule de même masse ($t_r = 8,8$ min ; $t_r = 11,56$ min ; $t_r = 17,12$ min ; $t_r = 22,61$ min mode positif avec une masse = 452, 31) : ces molécules ne sont pas identiques car elles sont retenues sur la colonne différemment en fonction de leurs charges. Les molécules avec une masse de 208,29 ; 357,42 et 378,28 sont prédominantes dans l'extrait.

4.5. Localisation des molécules par spectroscopie Raman

Le spectre Raman obtenu pour le coenenchyme (figure 31) permet de distinguer 3 pics à différentes longueurs d'ondes : 279 cm^{-1} , 710 cm^{-1} et 1085 cm^{-1} . L'intensité du pic à 1085 cm^{-1} est, respectivement, plus élevée que celui à 279 cm^{-1} et que celui à 710 cm^{-1} . Peu de fluorescence est associée à cette zone car 3 pics sont clairement visibles et la ligne de base est relativement plate. Des pics dans la zone des fonctions organiques correspondant aux molécules de types terpènes et stéroïdes (1200 cm^{-1} à 2000 cm^{-1}) ne sont pas visibles dans l'analyse du coenenchyme.

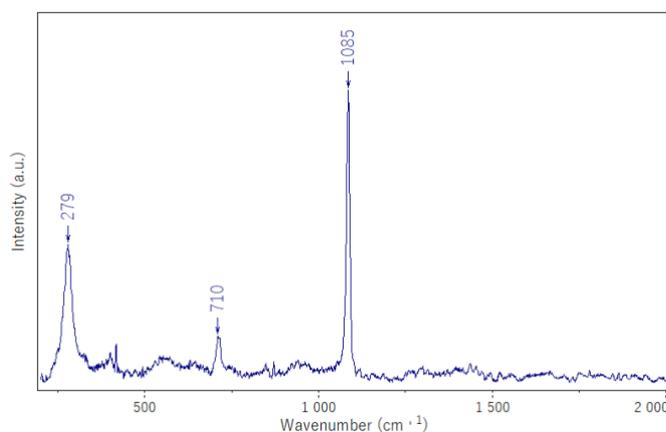


Figure 31 : spectre Raman de l'intensité en fonction de la longueur d'onde dans le coenenchyme d'une gorgone du genre *Eunicella*

5. Discussion

5.1. Comparaison

Les résultats du rendement, des chromatographies sur couche mince et de la spectroscopie à résonance magnétique permettent de comparer la présence de métabolites secondaires de type terpènes et stéroïdes pour les différents sites.

5.1.1. Variation inter-sites

Les résultats sont plus concluants pour les échantillons provenant de l'aquarium et de Hendaye, suivis par ceux de Corse, de Roscoff et enfin, de la mer Egée : l'environnement dans lequel les gorgones vivent est donc plus ou moins favorable au développement de métabolites secondaires. Ceci pourrait être expliqué par une différence de température : elle est plus élevée dans les eaux de la Méditerranée que dans celles de l'océan Atlantique. La température d'élevage en aquarium est de 16°C et se rapproche donc de la température moyenne de l'océan Atlantique Nord. Les résultats des échantillons provenant de la mer Celtique sont plus faibles que ceux du golfe de Gascogne : la température plus froide de la mer Celtique pourrait expliquer cette différence. Enfin, les gorgones provenant de la mer Egée présentent peu de métabolites secondaires : cela pourrait être expliqué par le gradient de température qui existe dans la mer Méditerranée. Les températures dans cette mer sont en effet très élevées. Les métabolites secondaires seraient donc formés chez les gorgones du genre *Eunicella* à un optimum de température aux alentours de 16°C, avec une influence négative d'un milieu trop froid ou trop chaud. La température pourrait avoir un impact sur le métabolisme de la gorgone, sur celui du microbiote ou alors sur la symbiose qui existe entre les deux, l'holobionte.

5.1.2. Variation interspécifique

Les métabolites secondaires présents chez les gorgones *E.cavolini*, *E.singularis* et *E.verrucosa* présentent globalement les mêmes signatures moléculaires. Les petites différences qui peuvent être retrouvées sont majoritairement influencées par la localisation, et non par l'espèce en elle-même. En effet, les ressemblances entre les sites sont plus remarquables qu'entre les individus d'une même espèce.

Cependant, parmi une même localisation et donc un même environnement, une espèce peut être distinguée d'une autre grâce à quelques caractéristiques (spots CCM ou pics RMN).

Une tendance peut quand même être isolée de cette comparaison : la diversité et la quantité de métabolites secondaires serait plus importante pour *Eunicella verrucosa*, suivi par

Eunicella cavolini et enfin *Eunicella singularis*. Cela pourrait aussi être dû à la localisation de *Eunicella verrucosa*, se retrouvant en majorité l'océan Atlantique, et donc à des températures plus basses. Par contre, la présence de zooxanthelles chez *E.singularis* semble défavorable au développement de métabolites secondaires.

D'autres variables semblent influencer ces résultats car pour une même espèce dans le même environnement et à même profondeur (ME – Site 5, 6, 7), la quantité et la diversité de métabolites secondaires sont différents. Des études plus poussées de l'environnement seraient nécessaires pour découvrir d'autres variables susceptibles d'influencer la quantité et la diversité des molécules entre les populations.

5.1.3. Variation de la profondeur

La profondeur ne semble pas influencer la présence et la diversité de métabolites secondaires dans l'intervalle de profondeur étudié : les résultats des échantillons de la mer Egée à une profondeur de 5 à 13 m sont peu concluants ainsi que les résultats de ceux provenant de Roscoff, à une profondeur de 27 m. Une profondeur de 18 à 24 m semblerait avantageuse pour le développement des métabolites secondaires, mais l'influence des sites pourrait aussi être la variable prédominante. La comparaison d'une même espèce à la même localisation (mer Egée) mais à différentes profondeurs ne montre pas de tendance en fonction de cette variable.

Les zooxanthelles présentes chez *E.singularis* ne semblent pas influencer la production de molécules. En effet, l'intensité de la lumière diminue avec la profondeur donc les zooxanthelles photosynthétiques sont moins productives. Cependant, les résultats se ressemblent pour des profondeurs différentes donc l'écologie de cette gorgone autotrophe n'influencerait pas la présence de métabolites secondaires. Des études sur le morphotype azooxanthellé de *E.singularis* permettraient de confirmer cette hypothèse.

L'intervalle étudié est de 5 à 32 m mais les gorgones du genre *Eunicella* peuvent se retrouver jusqu'à une profondeur de 200 m. Des analyses sur ces profondeurs pourraient donner des résultats différents.

5.1.4. Variation de l'hydrodynamisme

Selon les résultats obtenus pour les échantillons de la mer Egée, les conditions hydrodynamiques ne semblent pas influencer le développement des métabolites secondaires. Les résultats pour les échantillons de Roscoff permettent d'isoler une hypothèse : les eaux de la mer Celtique sont plus agitées et plus turbides que celles du golfe de Gascogne et que celles

de la mer Méditerranée. Les résultats moins concluants pour la mer Celtique pourraient être reliés à cet hydrodynamisme, les métabolites secondaires se développeraient donc mieux dans des eaux plus calmes. Cependant, des analyses plus poussées de l'environnement dans lequel les gorgones ont été récoltées à Roscoff seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

5.1.5. Variation des conditions anthropiques

La pollution physico-chimique différente entre la pointe de Spano et la pointe de Saint-François n'impacte pas les résultats. En effet, la quantité et la diversité de terpènes présents dans les échantillons sont similaires pour les 2 localisations. Les conditions anthropiques ne semblent donc pas avoir d'effet sur la production de métabolites secondaires.

Cependant, l'échantillon CO – Site 3, encombré d'épiphytes, possède un rendement plus faible que les autres échantillons récoltés en Corse. Grâce à cette observation, la production des molécules analysées de type terpènes et stéroïdes pourrait être mise en relation avec l'activité antifouling : cette colonie a produit moins de molécules antifouling car une partie est colonisée par des algues. La quantité de métabolites secondaires analysée serait donc plus faible car une partie de la colonie ne les produit plus.

5.2. Masse des molécules

Sur le spectre de masse obtenu, les masses prédominantes dans l'extrait pourraient correspondre aux molécules retrouvées sur chaque plaque CCM (les spots 1, 8 et 11). En effet, les intensités de ces spots sur la bande de migration AQ – Site 2 (figure 25) sont les plus élevées, les concentrations sont donc les plus hautes. Cependant, il existe beaucoup de molécules associées à une même masse. En déduire la structure des molécules à partir de celle-ci est impossible avec les analyses réalisées.

La spectroscopie de masse permet donc d'avoir une idée de la masse des molécules présentes dans l'extrait AQ – Site 2. D'autres perspectives d'analyses plus poussées sont nécessaires pour pouvoir identifier les molécules présentes.

5.3. Localisation des molécules dans la structure des gorgones

Le spectre Raman obtenu pour les échantillons du tissu démontre la présence de calcite mais aucune fonction organique de type terpènes et stéroïdes ne peut être mise en évidence. Le tissu est majoritairement composé d'un amas de spicules calcifiés et les molécules d'intérêt pharmaceutique se retrouvent donc seulement dans le squelette de gorgonine.

6. Conclusion

En conclusion, les gorgones du genre *Eunicella* et plus précisément les espèces *Eunicella cavolini*, *E. singularis* et *E. verrucosa* produisent des métabolites secondaires intéressants au niveau pharmaceutique, avec notamment des terpènes et des stéroïdes. Ceux-ci sont formés grâce à une microbiocénose avec des microorganismes. Ces espèces se développent majoritairement dans la mer Méditerranée et dans l'océan Atlantique.

La présence de métabolites secondaires a été étudiée à plusieurs localisations : la mer Egée, la Corse, Roscoff (Bretagne) et enfin Hendaye (Golfe de Gascogne). Ensuite, ces résultats ont été comparés à des échantillons provenant d'un milieu de culture en aquarium. Différents points de comparaison ont été étudiés, en plus de la localisation : l'influence des espèces, de la profondeur entre 5 et 32 m, de l'hydrodynamisme et enfin, des conditions anthropiques.

Tout d'abord, les métabolites secondaires présents dans les gorgones sont influencés de manière prédominante par l'environnement de récolte. Une température aux alentours de 16°C semble favorable au développement de métabolites secondaires : les échantillons provenant de Hendaye et de l'aquarium présentent les résultats les plus concluants. L'espèce *E. verrucosa* est la plus prometteuse, le rendement ainsi que la diversité de molécules produites sont en moyenne les plus élevés. La profondeur, les conditions hydrodynamiques et anthropiques influencent peu la production de métabolites secondaires. Enfin, les analyses effectuées sur les échantillons provenant de l'aquarium donnent des résultats très concluants par rapport à l'environnement naturel : les gorgones pourraient donc être cultivées afin d'extraire ces molécules.

Les masses des molécules présentes dans les gorgones du genre *Eunicella* ont été analysées, avec une prédominance de molécules de masse entre 200 et 400. Enfin, les molécules d'intérêt pharmaceutique se trouvent dans le squelette, car aucune fonction organique pouvant correspondre à des terpènes ou des stéroïdes n'a pu être retrouvée dans le tissu.

La découverte de molécules pharmaceutiques d'origine marine est en développement car l'océan présente une biodiversité importante et est encore majoritairement inexploré. Cependant, il faut éviter un trop gros impact de prélèvement sur les espèces marines afin de préserver cette biodiversité. L'analyse du milieu de culture en aquarium permet d'avoir de nouvelles perspectives pour l'exploitation de ces molécules d'intérêt pharmaceutique.

7. Perspectives

La croissance des gorgones étant très lente (environ 1 cm / an), l'élaboration d'une technique de croissance plus rapide de ces organismes permettrait d'exploiter les propriétés intéressantes qu'ils possèdent. Pour ce faire, la structure Biorock (« Biorock, Mineral accretion technology, Seament ») pourrait donner des résultats avantageux : la croissance des coraux est accélérée grâce à un passage de courant dans cette structure. Des expériences ont déjà été réalisées sur une espèce de gorgone, *Isis hippuris*, avec des résultats concluants. Le genre *Eunicella* pourrait alors être expérimenté et une analyse de la production de métabolites secondaires pourrait aussi être réalisée. L'accord du propriétaire de la licence Biorock, le Professeur Thomas Goreau (Université de Cambridge), nous a été garanti.

Les microorganismes présents dans le microbiote des gorgones du genre *Eunicella* pourraient être isolés, identifiés et cultivés. Etant donné qu'ils sont responsables de la production des métabolites secondaires pharmacologiquement actifs, la production de molécules en milieu de culture des microorganismes seuls pourrait être analysée et exploitée.

Les hypothèses mises en avant dans ce travail pourrait être confirmées grâce à des expériences en aquarium : les mêmes analyses pourraient être effectuées sur des gorgones cultivées à différentes températures (par exemple : 14°C, 16°C et 20°C). Des conditions de luminosité différentes pourraient aussi être étudiées. Enfin, des analyses sur l'espèce azooxanthellée de *E.singularis* pourraient être comparées aux analyses de l'espèce zooxanthellée déjà réalisées.

L'influence de la profondeur sur la production de métabolites secondaires pourrait être analysée de manière plus poussée en étudiant la même espèce dans le même environnement mais avec plusieurs colonies se trouvant à des profondeurs différentes. L'expérience pourrait aussi être réalisée à des profondeurs plus importantes.

De plus, l'analyse des molécules par spectroscopie de masse a permis d'avoir des résultats de masse sur l'extrait brut. A l'aide d'une méthode plus appropriée à déterminer et à expérimenter, une purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pourrait être réalisée. Cela permettrait d'avoir des fractions pures contenant les molécules identifiées par spectroscopie de masse. Après, la formule exacte des molécules pourrait être déduite afin de comparer avec les molécules déjà trouvées dans les gorgones du genre *Eunicella*. De nouvelles molécules pourraient être découvertes, avec peut-être de nouvelles propriétés pharmaceutiques.

Ces gorgones possèdent d'autres types de molécules que des terpènes et des stéroïdes, comme par exemple des nucléosides. Les techniques d'extraction et d'analyse pourraient alors être adaptées à ce type de molécules afin de pouvoir les comparer : les variables influençant la présence de nucléosides pourraient être différentes ou similaires à celles retrouvées pour les terpènes et les stéroïdes.

D'autres méthodes de séchage et de conservation des échantillons de gorgones mériteraient d'être élaborées afin d'avoir de meilleurs résultats. En effet, dans le cas de cette étude, les échantillons étaient seulement séchés à l'air libre. Un séchage dans de l'azote liquide ou encore une lyophilisation, par exemple, pourrait donner de meilleurs résultats quant aux molécules présentes dans l'échantillon.

Enfin, une meilleure conservation serait à envisager pour les analyses en spectre Raman. En effet, le squelette présentait une fluorescence trop élevée à cause de l'agrégation des terpènes et des stéroïdes avec le temps. Les pics des fonctions organiques n'étaient donc pas visibles, car ils étaient noyés dans cette fluorescence trop élevée. Une meilleure conservation pourrait permettre d'éviter ce problème et d'analyser les molécules par spectre Raman.

8. Bibliographie

- Banerjee S. & Mazumdar S. (2012). Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012 : 40 pp.
- Barnes C.A., Fleming R.H. , LaMourie M.J, Namias J., Broadus J.M. and Ericson D.B. (2020). *Atlantic Ocean*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/place/Atlantic-Ocean>
- Bayer T., Arif C., Ferrier-Pagès C., Zoccola D., Aranda M., Voolstra C.R. (2013). Bacteria of the genus *Endozoicomonas* dominate the microbiome of the Mediterranean gorgonian coral *Eunicella cavolini*. *Marine Ecology Progress Series*, 479 : 75 – 84.
- Biorock, Mineral accretion technology, Seament (n.d.). *Global Coral Reef Alliance*. <http://www.globalcoral.org/biorock-coral-reef-marine-habitat-restoration/>
- Blockley A., Elliott D.R., Roberts A.P., Sweet M. (2017). Symbiotic Microbes from Marine Invertebrates: Driving a New Era of Natural Product Drug Discovery. *Diversity*, 9 (49) : 13pp.
- Boxer B. & Salah S. (2019). *Mediterranean Sea*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/place/Mediterranean-Sea>
- Britannica Editors of Encyclopaedia (2011). *Bay of Biscay*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/place/Bay-of-Biscay>
- Brockhurst M.A., Chapman T., King K.C., Mang J.E., Paterson S., Hurst G.D.D. (2014). Running with the Red Queen: the role of biotic conflicts in evolution. *Proceedings of the Royal Society*, 281 : 9pp.
- Canovas-Molina A., Montefalcone M., Bavestrello G., Masmoudi M.B., Haguenaer A., Hammami P., Chaoui L., Hichem Kara M., Aurelle D. (2018). From depth to regional spatial differentiation of *Eunicella cavolini* in the NW Mediterranean. *Compte rendus biologiques*, 341 : 421 – 432.
- Carpine C. & Grasshoff M. (1975). Les Gorgonaires de la Méditerranée. *Bulletin de l'Institut océanographique*, 71 : 2 – 137.
- Chimienti G. (2020). Vulnerable Forests of the Pink Sea Fan *Eunicella verrucosa* in the Mediterranean Sea. *Diversity*, 12 (176) : 17pp.
- Cimino G., De Rosa S., De Stefano S. (1984). Antiviral agents from a gorgonian, *Eunicella cavolini*. *Experientia*, 40 : 339.
- Cimino G., Desiderio B., De Stefano S., Sodano G. (1978). Chemistry of Mediterranean gorgonians. Pregna 4,20-dien-11 α -ol-3-one-acetate, a novel steroid from the gorgonian *Eunicella cavolini*. *Experientia*, 35 (3) : 298.
- Coelho M. (2009). Master's thesis in Marine Biology : Phylogeography and phylogeny of European gorgoniids (Gorgoniidae) : genera *Eunicella* and *Leptogorgia*. *Faculty of Sciences and Technology, University of Algarve*, 50pp.

Coma R., Llorente-Llurba E., Serrano E., Gili J.-M., Ribes M. (2015). Natural heterotrophic feeding by a temperate octocoral with symbiotic zooxanthellae : a contribution to understanding the mechanisms of die-off events. *Coral Reefs*, 34 : 549 – 560.

Cosentino P. (2020). Mesurim2 (v1.42). *Académie de Nice*. <https://www.pedagogie.ac-nice.fr/svt/productions/mesurim2/>

Deghrigue M., Dellai A., Akremi N., Le Morvan V., Robert J., Bouraoui A. (2013). Evaluation of antiproliferative and antioxidant activities of the organic extract and its polar fractions from the Mediterranean gorgonian *Eunicella singularis*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36 : 339 – 346.

Deghrigue M., Festa C., Ghribi L., D'auria M.V., de Marino S., Ben Jannet H., Ben Said R., Bouraoui A. (2014). Pharmacological evaluation of the semi-purified fractions from the soft coral *Eunicella singularis* and isolation of pure compounds. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22 (64) : 8p.

Deghrigue M, Festa C., Ghribi L., D'Auria M.V., De Marino S., Ben Jannet H., Bouraoui A. (2015). Anti-inflammatory and analgesic activities with gastroprotective effect of semi-purified fractions and isolation of pure compounds from Mediterranean gorgonian *Eunicella singularis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*.

De Rosa S., Cimino G., De Giulio A., Milone A., Crispino A., Iodice C. (1995). A new bioactive eunicellin-type diterpene from the gorgonian *Eunicella cavolini*. *Natural Product Letters*, 7 (4) : 259-265.

Desroy N. (2004). Synthèse de béto-lactames polycycliques et du fragment C15-C30 des dolabélides, macrolides cytotoxiques d'origine marine, par catalyse organométallique. *Chimie ParisTec.*, 287pp.

Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM) (2012). Plan d'action pour le milieu marin – Sous-région marine mers Celtiques – Evaluation initiale des eaux marines – Analyse des caractéristiques et de l'état écologique, 127pp.

Dumas J., Maran V., Ader D., Huet S. (2021). *DORIS : Eunicella verrucosa (Pallas, 1766)*. Doris. <https://doris.ffessm.fr/ref/specie/235>

Ericson-Neilsen W. & Kaye A.D. (2014). Steroids : Pharmacology, Complications and Practice Delivery Issues. *The Ochsner Journal*, 14 : 203 – 207.

Explore Luna PFP (2) (n.d.). *Phenomenex*. http://phx.phenomenex.com/lib/5732_I.pdf

Ezzat L., Merle P-L., Furla P., Buttler A., Ferrier-Pagès C. (2013). The Response of the Mediterranean Gorgonian *Eunicella singularis* to Thermal Stress is Independent of Its Nutritional Regime. *PLoS ONE*, 8 (5) : e64370.

Fabricius K. & Alderslade P. (2001). *Soft Corals and Sea Fans : a comprehensive guide to the tropical shallow-water genera of the Central-West Pacific, the Indian Ocean and the Red Sea*. Queensland (Australia) : Australian Institute of Marine Science.

Fenical W. (1996). Marine biodiversity and the medicine cabinet : The status of new drugs from marine organisms. *Oceanography*, 9 (1) : 23 – 27.

Frederich M. (2018). *Pharmacognosie I, chapitre 10 : Terpénoïdes et stéroïdes*. Université de Liège.

Gao C.H., Tian X.P., Qi S.H., Luo X.M., Wang P., Zhang S. (2010). Antibacterial and antilarval compounds from marine gorgonian-associated bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SCSIO 00856. *The Journal of Antibiotics*, 63 : 191-193.

Gobert S. (2019). *Marine ecology : Mediterranean Sea*. Université de Liège.

Goh N.K.C. & Ming Chou L. (1998). Bioactivity screening of Singapore gorgonians : Antimicrobial activity, toxicity to *Artemia salina* and efficacy against *Plasmodium berghei*. *Zoological Science*, 15 : 805 – 812.

Gokulan K., Khare S., Cerniglia C. (2014). Metabolic Pathways: Production of Secondary Metabolites of Bacteria. *Encyclopedia of Food Microbiology, volume 2* (pp. 561 – 569). Jefferson (USA) : Elsevier Ltd, Academic Press.

Gomez G. (2021). *Spectroscopie RMN*. Académie de Montpellier. <https://tice.ac-montpellier.fr/ABCDORGA/Famille/RMN.htm>

Goodrich G. (2014). *Watered Down Medicine : The Influence of Marine Organisms in Medicine*. Conservation, Oceans News. <https://sharkresearch.rsmas.miami.edu/watered-down-medicine-the-influence-of-marine-organisms-in-medicine/>

Gori A., Bramanti L., Lopez-Gonzalez P., Thoma J.N., Gili J-M., Grinyo J., Uceira V., Rossi S. (2012). Characterization of the zooxanthellate and azooxanthellate morphotypes of the Mediterranean gorgonian *Eunicella singularis*. *Marine Biology*, 159 : 1485 – 1496.

Guezennec J. & Debitus C. (2006). Les ressources marines en Polynésie française : applications en matière de biotechnologie. *Substances naturelles en Polynésie française* (p. 37 – 75). Paris : IRD éditions.

Guide de la spectroscopie Raman (n.d.). *Bruker*. <https://www.bruker.com/fr/products-and-solutions/infrared-and-raman/raman-spectrometers/what-is-raman-spectroscopy.html>

Guillaume G. (2017). *La chromatographie en phase gazeuse : principe*. Culture Sciences Chimie. <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/chromatographie/la-chromatographie-en-phase-gazeuse-principe>

Guillot G. (2016). *Gorgone verruqueuse : un avenir incertain*. ZoomNature. <https://www.zoom-nature.fr/gorgone-verruqueuse-un-avenir-incertain/>

Hall-Spencer J.M., Pike J., Munn C.B. (2007). Diseases affect cold-water coral too : *Eunicella verrucosa* (Cnidaria : Gorgonacea) necrosis in SW England. *Diseases of aquatic organisms*, 76 : 87 – 97.

Hereu B., Capdevila P., Aspillaga E., Casado C., Canals E., Linares C. (2014). Etat des populations de la gorgone blanche *Eunicella singularis* dans le Parc national de Port-Cros dans le cadre de l'Observatoire de la Biodiversité et des Usages Marins Littoraux. Rapport final. *Contrat Parc national de Port-Cros et Universidad de Barcelona*, 47pp.

Ho C.S., Lam C.W.K., Chan M.H.M., Cheung R.C.K., Law L.K., Lit L.C.W., Ng K.F., Suen M.W.N., Tai H.L. (2003). Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clinic Biochemical Review*, 24 : 12 pp.

Ioannou E., Abdel-Razik A.F, Alexi X., Vagias C., Alexis M.N., Roussis V. (2008). Pregnanes with antiproliferative activity from the gorgonian *Eunicella cavolini*. *Tetrahedron*, 64 : 11797-11801.

Ioannou E., Abdel-Razik A.F., Zervou M., Christofidis D., Alexi X., Vagias C., Alexis M.N., Roussis V. (2009). $5\alpha,8\alpha$ – epidioxysterios from the gorgonian *Eunicella cavolini* and the ascidian *Trididemnum inarmatum*: isolation and evaluation of their antiproliferative activity. *Steroids*, 74 : 73-80.

Ioannou E., Abdel-Razik A.F., Alexi X., Vagias C., Alexis M.N., Roussis V. (2009b) . $9,11$ -secosterols with antiproliferative activity from the gorgonian *Eunicella cavolini*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 17 : 4537-4541.

Issaris Y (n.d.). *Eunicella singularis*. Cigesmed pour les plongeurs. <http://cs.cigesmed.eu/fr/taxonomy/term/33>

IUCN (2021). *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021 – 1*. <https://www.iucnredlist.org>

Jensen P.R., Harvell C.D., Wirtz K., Fenical W. (1996). Antimicrobial activity of extracts of Caribbean gorgonian corals. *Marine Biology*, 125 : 411 – 419.

Jousseume M., Abadie A., Binard M., Biondo R., Borges A., Collignon A., Champenois W., Chéry A., Diaz D., Donnay A., Fréjefond C., Gobert S., Goffart A., Hecq J.-H., Lepoint G., Michel L., Pelaprat C., Pere A., Sirjacobs D., Thomé J.-P., Volpon A., Lejeune P. (2014). STARE-CAPMED (STation of Reference and rEsearch on Change of local and global Anthropogenic Pressures on Mediterranean Ecosystems Drifts) : Rapport d'activité – Année 2013. *Rapport de recherches, STARESO*, 147 pp.

Joy (2020). *L'étude des spectres RMN du proton*. Superprof. <https://www.superprof.fr/ressources/scolaire/physique-chimie/terminale-s/la-spectroscopie/spectre-vrmn.html>

Kashman Y. & Green D. (1991). Verrucoside, a new cytotoxic pregnane glycoside from a gorgonian *Eunicella verrucosa*. *Journal of Natural Products*, 54 (6) : 1651 – 1655.

Karamizadeh S., Abdullah S.M., Manaf A.A. Zamani M., Hooman A. (2013). An Overview of Principal Component Analysis. *Journal of Signal and Information Processing*, 4 : 173 – 175.

Kornprobst J.-M. (2005). *Substances naturelles d'origine marine* (Editions TEC & DOC). Montpellier : Lavoisier.

- Kurita T. (2020). Principal Component Analysis (PCA). *Computer Vision*, 4pp.
- Lajili S., Deghrigue M., Abdelhamid A., Bjelogric S., Muller C.D., D'auria M.V., Bouraoui A. (2017). Anticancer activity of diterpenes and steroids from *Eunicella singularis* against two- and three-dimensional breast cancer cell models. *Journal of Coastal Life Medicine*, 5 : 531 – 539.
- Lecointre, G. & Le Guyader H. (2013). *Classification phylogénétique du vivant : tome 2*. (Editions Belin). Paris.
- Lewis J.C. & Von Wallis E. (1991). The Function of Surface Sclerites in Gorgonians. *Biological Bulletin*, 181 (2) : 275-288.
- Linares C., Coma R., Garrabou J., Diaz D., Zabala M. (2008). Size distribution, density and disturbance in two Mediterranean gorgonians : *Paramuricea clavata* and *Eunicella singularis*. *Journal of Applied Ecology*, 45 : 688 : 699.
- Malve A. (2016). Exploring the ocean for new drug developments : Marine pharmacology. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 8 (2) : 83 – 91.
- Mancini I., Guella G., Zibrowius H., Laurent D., Pietra D. (1999). A novel type of a second epoxy bridge in eunicellane diterpenes : isolation and characterization of massileunicellins A-C from the gorgonian *Eunicella cavolini*. *Helvetica Chimica Acta*, 82 : 1681 – 1689.
- Mancini I., Guella G., Zibrowius H., Pietra F. (2000). Configuration, conformation and reactivity of highly functionalized eunicellane diterpenes isolated from the gorgonians *Eunicella cavolini* and *Eunicella singularis* from Marseille. *Helvetica Chimica Acta*, 83 : 1561 – 1575.
- Martin Y., Bonnefont J.L., Chancerelle L. (2001). Gorgonians mass mortality during 1999 late summer in French Mediterranean coastal waters: the bacterial hypothesis. *Water Research*, 36 : 779 – 782.
- Matulja D., Kolypadi Markovic M., Ambrozic G., Laclef S., Kraljevic Pavelic S., Markovic D. (2020). Secondary metabolites from Gorgonian corals of the genus *Eunicella*: structural characterizations, biological activities, and synthetic approaches. *Molecules*, 25 (129): 26p.
- Réaliser une chromatographie sur couche mince (n.d.). Maxicours.
<https://www.maxicours.com/se/cours/realiser-une-chromatographie-sur-couche-mince/>
- McCauley M., Jackson C.R., Goulet T.L. (2020). Microbiomes of Caribbean Octocorals vary over time but are resistant to environmental change. *Frontiers in Microbiology*, 11 : 16 pp.
- Munari C., Serafin G., Mistri M. (2013). Structure, growth and secondary production of two Tyrrhenian populations of the white gorgonian *Eunicella singularis*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 119 : 162-166.
- Nguyen T. (2018). La spectroscopie Raman : une loupe sur le monde infiniment petit. *Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal*, 4pp.

OBIS (2021). *Oceano Biodiversity Information System. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.* www.obis.org.

O'Brien J. & Wright G.D. (2011). An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Current Opinon in Biotechnology*, 22 : 552-558.

Oceans and Seas of the World (2021). SeaTemperature.org. <https://www.seatemperature.org/oceans-seas>

Ortega M.J., Zubia E., He H., Salva J. (1993). New Eunicellin-Based Diterpenoids from the Gorgonian *Eunicella verrucosa*. *Tetrahedron*, 49 (35) : 7823 – 7828.

Ortega M.J., Zubia E., Salva J. (1994). Structure and absolute configuration of palmonine F, a new eunicelline-based diterpene from the gorgonian *Eunicella verrucosa*. *Journal of Natural Products*, 57 (11) : 1584 – 1586.

Pey A., Catanéo J., Forcioli D., Merle P.-L. (2013). Thermal threshold and sensitivity of the only symbiotic Mediterranean gorgonian *Eunicelle singularis* by morphometric and genotypic analyses. *Compte Rendus Biologies*, 336 : 331 – 341.

Poulicek M., Desormeaux C., Plaza S., Gobert S. (2007). Suivi de l'état de quatre espèces de gorgones (région de Calvi, Méditerranée Occidentale) entre 1998 et 2006. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit*, 38 : 575.

Poulicek M., Desormeaux C., Decloux N., Gobert S. (2007b) . Suive de la cinétique de colonisation secondaire post nécrose des axes de quatre espèces de gorgones (région de Calvi, Corse, Méditerranée Occidentale) entre 1998 et 2006. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit*, 38 : 574.

Poulicek Mathieu (2020). *Ecology of Coral Reef*. Université de Liège.

Pregnane. (2020, 27 novembre). Wikipédia. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Prégnane>

Priyadarshini K. & Keerthi Aparajitha U. (2012). Paclitaxel against Cancer : A Short Review. *Medecinal Chemistry*, 2 (7) : 131 – 141.

Qi S.-H., Zhang S., Yang L.H., Qian P.Y. (2008). Antifouling and antibacterial compounds from the gorgonians *Subergorgia suberosa* and *Scripearia gracillis*. *Natural Product Research*, 13pp.

Qi S.-H. (2012). Bioactive Compounds from Marine Gorgonian Corals. *Studies in Natural Products Chemistry*, 38 : 325 – 351.

Raimundo, I., Silva, S.G., Costa, R., Keller-Costa, T. (2018). Bioactive Secondary Metabolites from Octocoral-Associated Microbes—New Chances for Blue Growth. *Mar. Drugs*, 16 : 485.

Ransome E., Rowley S.J., Thomas S., Tait K., Munn C.B. (2014). Disturbance to conserved bacterial communities in the cold-water gorgonian coral *Eunicella verrucosa*. *Federation of European Microbiological Societies*, 90 : 404 – 416.

Rocha, J., Peixe, L., Gomes, N.C.M., Calado, R. (2011). Cnidarians as a source of new marine bioactive ^{SEP}compounds—An overview of the last decade and future steps for bioprospecting.

Marine Drugs, 9 : 1860–1886. [SEP]

Russo A.R. (1985). Ecological observations in the gorgonian sea fan *Eunicella cavolini* in the Bay of Naples. *Marine Ecology Progress Series*, 24 : 155 – 159.

Sakalli A. (2017). Sea surface temperature change in the Mediterranean Sea under climate change: a linear model for simulation of the sea surface temperature up to 2100. *Applied ecology and environmental research*, 15 (1) : 707 – 716.

Salomidi M., Smith C., Katsanevakis S., Panayotidis P., Papathanassiou V. (2009). Some Observations on the structure and distribution of gorgonian assemblages in the Eastern Mediterranean Sea. *Actes du 1er Symposium sur la conservation du Coralligène et autres bio concretions de la Méditerranée*, 242 – 245.

Sammarco P.W. & Coll J.C. (1992). Chemical adaptations in the Octocorallia : evolutionary considerations. *Marine Ecology Progress Series*, 88 : 93 – 104.

Sartoretto S. & Francour P. (2012). Bathymetric distribution and growth rates of *Eunicella verrucosa* (Cnidaria : Gorgoniidae) populations along the Marseilles coast (France). *Scientia Marina*, 76 (2) : 349 – 355.

Satheesh S., Ba-akdah M.A., Al-Sofyani A.A. (2016). Natural antifouling compound production by microbes associated with marine macroorganisms – A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21 : 26 – 35.

Shao C.H., Xu R.F., Wang C.Y., Qian P.Y., Wang K.L., Wei M.Y. (2015). Potent antifouling marine Dihydroquinolin-2(1H)-one-containing alkaloids from the Gorgonian Coral-derived Fungus *Scopulariopsis* sp. *Marine Biotechnology*, 17 : 408 – 415. [SEP]

Sini M., Kipson S., Koutsoubas D., Garrabou J. (2015). The Yellow gorgonian *Eunicella cavolini* : demography and disturbance levels across the Mediterranean sea. *PLoS ONE*, 10 (5).

Skoufas G., Poulicek M., Chintiroglou C.C. (2000). Growth variation of *Eunicella singularis* (Esper, 1974) (Gorgonacea, anthozoa). *Belgian Journal of Zoology*, 130 : 121 – 124.

Skoufas G. (2006). Comparative biometry of *Eunicella singularis* (Gorgonian) sclerites at East Mediterranean Sea (North Aegean Sea, Greece). *Marine Biology*, 146: 1365-1370.

Spectre RMN du proton (n.d.). Maxicours. <https://www.maxicours.com/se/cours/spectre-rmn-du-proton/>

Taylor M.W., Radax R., Steger D., Wagner M. (2007). Sponge-associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71 (2) : 295 – 347.

Velimerov B. (1973). Orientation in the sea fan *Eunicella cavolini* related to water movement. *Helgolander wiss. Meeresunters*, 24 : 163-173.

Weinbauer M.G. & Velimirov B. (1995). Morphological variations in the Mediterranean sea fan *Eunicella cavolini* in relation to exposure, colony size and colony region. *Bulletin of marine Science*, 56 (1) : 283-295.

Weinbauer M.G. & Velimirov B. (1996). Relative habitat suitability and stability of the mediterranean gorgonian coral *Eunicella cavolini*. *Bulletin of marine Science*, 58 (3).

Weinbauer M.G. & Velimirov B. (1996b). Population dynamics and overgrowth of the sea fan *Eunicella cavolini*. *Estuarine, coastal and shelf science*, 42 : 583-595.

Weinbauer M.G. & Velimirov B. (1998). Comparative morphometry of fan-like colonies of three mediterranean gorgonians. *Cahiers de Biologie Marine*, 39 : 41-49.

WoRMS Editorial Board (2021). *World Register of Marine Species*.
<http://www.marinespecies.org>

Yang W., Chen X., Li Y., Guo S., Wang Z., Yu X. (2020). Advances in Pharmacological Activities of Terpenoids. *Bioactive Natural Products from Terrestrial and Marine Resources*, 15 (3) : 1-13.

Zhang X.Y. & Qi S.H. (2019). Chapter 6 : Microbes in Gorgonian and Soft Corals. *Symbiotic microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals*, pp 69-79.

9. Annexes

Annexe 1 : formation du squelette cembrane et cladielline

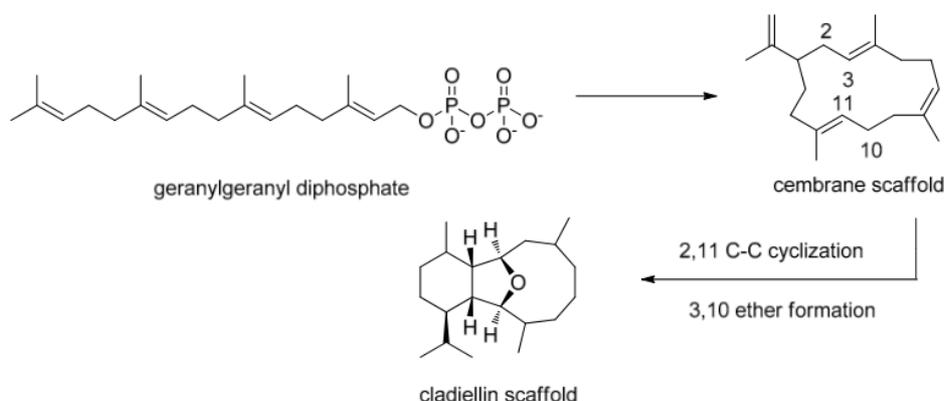


Figure 32 : voies biosynthétiques pour former le squelette cembrane et cladielline (Matulja D. et al., 2020)

Les molécules de type eunicelline sont formées à partir du géranylgeranyl diphosphate (GGDP), la molécule de base pour tous les diterpènes. Ensuite, ce précurseur se cyclise pour former le squelette cembrane et enfin le squelette cladielline (figure 33), qui est la base de la structure des eunicellines (Matulja D. et al, 2020). A partir de ce squelette de base, plusieurs molécules peuvent être formées dans les 3 espèces étudiées.

Annexe 2 : récapitulatif des sites d'échantillonnage

Abréviation du site de récolte	Localisation	Espèce	Profondeur	Date de récolte
ME – Site 1	Baie de Porto Koufo, Chalkidiki	<i>Eunicella singularis</i>	27-32 m	2018
ME – Site 2	Ile d'Arethoussa	<i>Eunicella singularis</i>	5 – 8 m	Octobre 2020
ME – Site 3	Ile d'Arethoussa	<i>Eunicella singularis</i>	11 – 13 m	Octobre 2020
ME – Site 4	Ile de Phidonissi	<i>Eunicella singularis</i>	5 – 10 m	Octobre 2020
ME – Site 5	Ile de Phidonissi	<i>Eunicella singularis</i>	11 – 13 m	Octobre 2020
ME – Site 6	Ile de Phidonissi	<i>Eunicella singularis</i>	11 – 13 m	Octobre 2020
ME – Site 7	Ile de Phidonissi	<i>Eunicella singularis</i>	11 – 13 m	Octobre 2020
CO – Site 1	Pointe de Saint-François	<i>Eunicella cavolini</i>	20 – 24 m	5/03/2021

CO – Site 2	Pointe de Saint-François	<i>Eunicella singularis</i>	20 – 24 m	5/03/2021
CO – Site 3	Pointe de Spano	<i>Eunicella cavolini</i>	20 – 24 m	5/03/2021
CO – Site 4	Pointe de Spano	<i>Eunicella singularis</i>	20 – 24 m	5/03/2021
RO – Site 1	Roche d’Astan	<i>Eunicella singularis</i>	27 m	9/03/2021
RO – Site 2	Roche d’Astan	<i>Eunicella verrucosa</i>	27 m	9/03/2021
HE – Site 1	Site gorgones blanches	<i>Eunicella cavolini</i>	18 m	5/05/2021
HE – Site 2	Site gorgones blanches	<i>Eunicella verrucosa</i>	18 m	5/05/2021
AQ – Site 1	/	<i>Eunicella singularis</i>	/	14/04/2021
AQ – Site 2	/	<i>Eunicella cavolini</i>	/	14/04/2021

Tableau 10 : récapitulatif des sites d’échantillonnage

Annexe 3 : pesée des échantillons non broyés

Site d’échantillonnage	Pesée (g)
ME – Site 1	34,64
ME – Site 2	4,22
ME – Site 3	7,42
ME – Site 4	5,16
ME – Site 5	13,1
ME – Site 6	9,51
ME – Site 7	1,59
CO – Site 1	2,85
CO – Site 2	6,32
CO – Site 3	3,19
CO – Site 4	3,34
RO – Site 1	7,91
RO – Site 2	12,28

HE – Site 1	1,98
HE – Site 2	3,44
AQ – Site 1	2,05
AQ – Site 2	3,92

Tableau 11 : pesée des échantillons non broyés de *Eunicella singularis*, *Eunicella cavolini* et *Eunicella verrucosa*

Annexe 4 : explication des méthodes spectroscopiques

1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Pour rappel, cette technique permet d'avoir une idée de la diversité des molécules présente dans les extraits ainsi que leurs intensités. Les composés vont être entraînés par une phase mobile liquide apolaire, appelée éluant, le long d'une phase stationnaire de silice grâce au phénomène de capillarité. En fonction de leurs affinités pour cette phase de silice polaire, de leurs affinités pour la phase mobile apolaire, et de leurs vitesses d'élution, ils vont s'adsorber sur la phase polaire et migrer à une plus ou moins grande distance du dépôt de l'échantillon. Différentes classes de molécules peuvent donc être identifiées grâce à cette technique. Les molécules d'intérêt étant des terpènes et des stéroïdes apolaires, elles vont être emportées par la phase mobile apolaire le long de la plaque de silice.

La figure 33 permet d'illustrer ce phénomène. L'échantillon est déposé sur la plaque chromatographique de silice au niveau de la ligne de base. Ensuite, cette plaque est placée dans une cuve chromatographique où se trouve l'éluant. Celui-ci va monter par capillarité le long de la plaque et emmener les composés d'intérêt. En fonction des affinités et des vitesses d'élutions, les composés pourront être séparés sous forme de taches sur la plaque chromatographique.

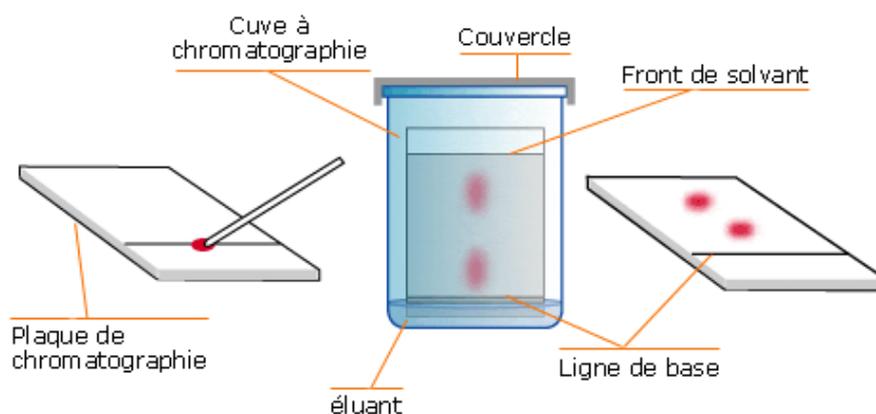


Figure 33 : principe d'une chromatographie sur couche mince (« Réaliser une chromatographie sur couche mince »)

2. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire et analyse PCA

Pour rappel, la spectroscopie RMN se base sur les propriétés magnétiques des noyaux et permet de caractériser la structure d'une molécule. Certains noyaux possèdent des spins nucléaires, correspondant à la rotation de la charge d'une particule sur elle-même. Ceux-ci peuvent s'orienter selon un niveau de basse énergie ou de haute énergie. Lors de cette analyse, les molécules sont placées dans un champ magnétique. La transition entre le niveau de basse énergie et de haute énergie des spins nucléaires a lieu grâce à une modification du champ extérieur appliqué. Grâce à celui-ci, les particules sont capables d'absorber une radiation électromagnétique d'une fréquence de résonance f pour passer d'un niveau à un autre, c'est le phénomène de résonance. La fréquence de résonance de chaque particule possédant un spin dépend des liaisons et des atomes voisins, c'est cette caractéristique de chaque atome qui permet de déterminer la structure d'une molécule (Gomez G., 2021 ; Joy, 2020 ; « Spectre RMN du proton »).

A la fin de l'analyse, un spectre RMN est obtenu. Celui-ci est caractérisé par des pics classés en fonction du déplacement chimique. Le déplacement chimique, calculé en parties par millions (ppm), correspond au décalage entre la fréquence de résonance des atomes de la molécule étudiée et une fréquence de résonance prise comme référence. En fonction de l'environnement de l'atome étudié, la fréquence de résonance sera différente et donc le déplacement chimique aussi. Des tables récapitulatives permettent de retrouver l'atome étudié à partir du déplacement chimique grâce à la fréquence de résonance et des environnements différents. Lorsque les liaisons et les atomes voisins sont identiques pour plusieurs atomes, ils sont dits équivalents et forment alors un seul signal sur le spectre RMN. En fonction de la hauteur du pic, le nombre d'atomes équivalents peut être retrouvé (Gomez G., 2021 ; Joy, 2020 ; « Spectre RMN du proton »).

Cette méthode peut s'appliquer à toutes les molécules possédant un spin nucléaire, comme par exemple le carbone 13. Cette analyse des spectres protons RMN ne permet pas de déterminer la structure exacte d'une molécule car l'extrait brut est analysé. Pour pouvoir déterminer une structure, il faudrait faire des fractionnements d'extrait avec d'autres méthodes et isoler des composés purs.

L'analyse PCA se définit comme « une analyse statistique utilisée pour diminuer la dimension des données tout en conservant les informations importantes. Elle convertit un ensemble de données corrélées en un set de valeurs de variables non-corrélées linéairement

(Karamizadeh S. *et al.*, 2013). » Elle permet de révéler de nouvelles variables corrélées entre les données ainsi que de réduire les variables inutiles sur base de composantes déterminées par le logiciel (Karamizadeh S. *et al.*, 2013 ; Kurita T., 2020). Si des regroupements se font sur le graphique de nuage de points obtenus, alors ils sont corrélés par une variable.

3. Spectroscopie de masse

Pour cette technique, les molécules sont transformées en phase gazeuse et ionisées en charge positive ou négative (Ho C.S. *et al.*, 2003). Elles passent ensuite dans un champ magnétique et arrivent sur différentes parties du détecteur en fonction du rapport entre la masse et la charge (m/z) (Banerjee S. & Mazumdar S., 2012).

4. Spectroscopie Raman

Afin de réaliser une analyse Raman, une lumière émanant d'un laser à une longueur d'onde précise est envoyée à sur l'échantillon. Cette lumière va exciter les électrons des liaisons moléculaires par diffusion inélastique et des photons vont être émis à différentes énergies et donc différentes fréquences. La signature des composés organiques peut être retrouvée en fonction de ces fréquences et en les comparant à l'énergie et la fréquence des photons incidents sur un spectre Raman (« Guide de la spectroscopie Raman » ; Nguyen T., 2018).

Annexe 5 : assemblage des spectres en fonction des espèces et de la profondeur

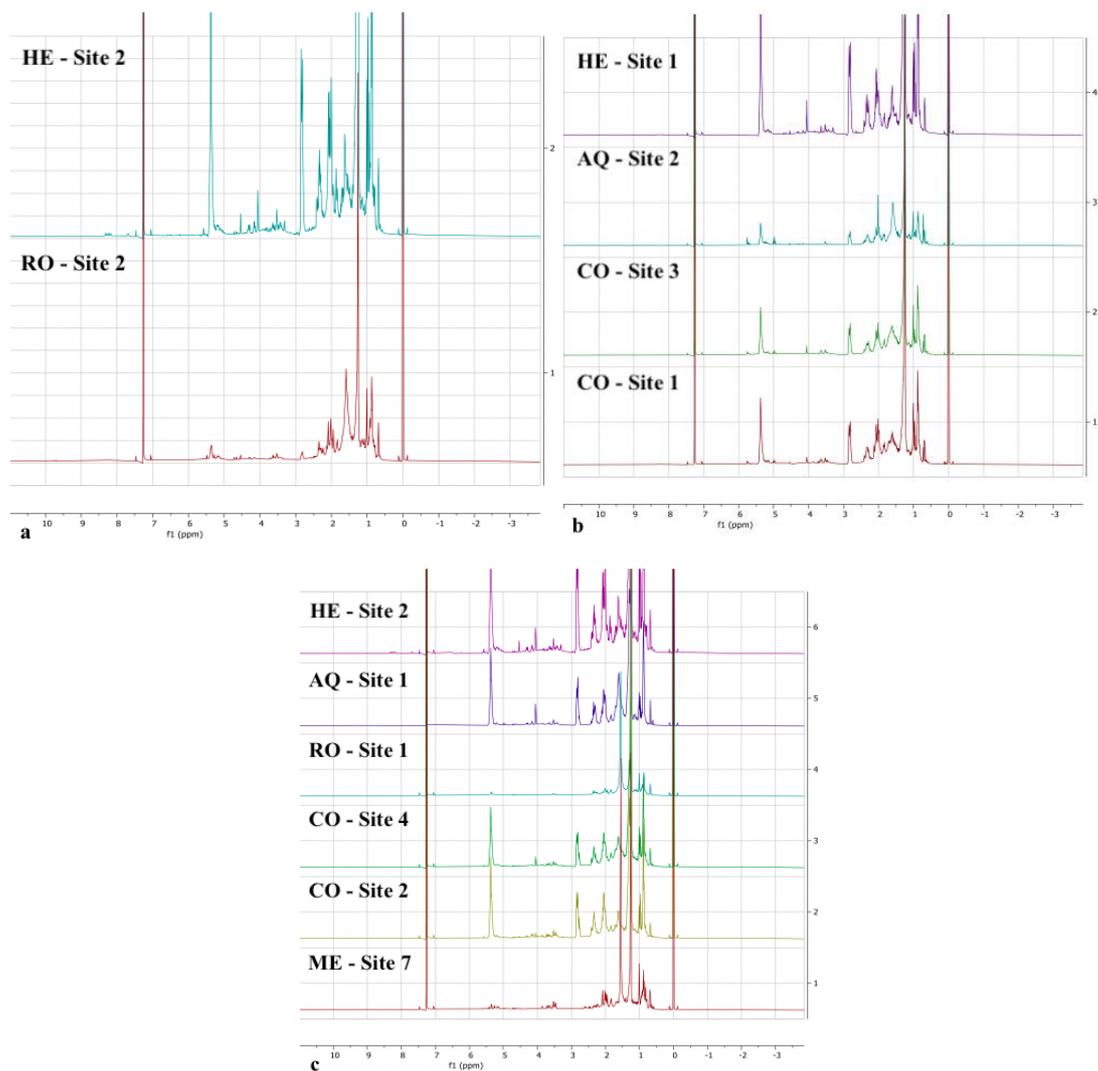


Figure 34 : spectre protons RMN des sites d'échantillonnage en fonction des espèces
a : *Eunicella verrucosa*, b : *Eunicella cavolini*, c : *Eunicella singularis*

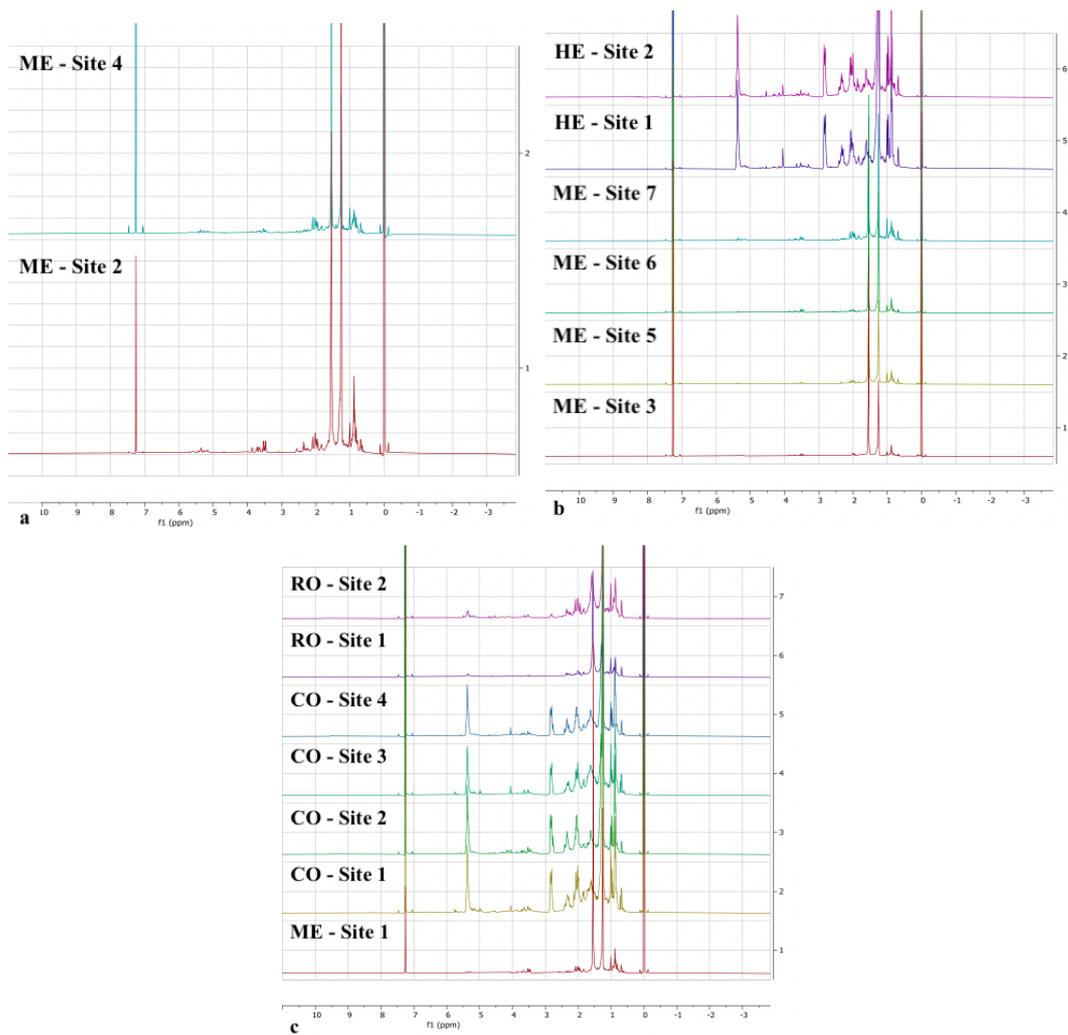


Figure 35 : spectre protons RMN des sites d'échantillonnage en fonction de la profondeur
a : 5 - 10 m, b : 10 - 20 m, c : 20 - 30 m