

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences de l'Ingénieur**  
Département de Chimie Industrielle

# **THESE DE DOCTORAT D'ETAT**

Spécialité : Génie des procédés

**CONTRIBUTION A L'ETUDE CHIMIQUE DES EXTRAITS  
LIPIDIQUES ET HUILES ESSENTIELLES D'ALGUES  
MEDITERRANEENNES ET DE L'OCEAN ATLANTIQUE :  
ISOLEMENT, DETERMINATION STRUCTURALE DE  
NOUVEAUX METABOLITES ET MODELISATION  
MATHEMATIQUE DES PROCEDES D'EXTRACTION**

Par

**EL HATTAB Mohamed**

Devant le Jury composé de

N. MIMOUNE	Professeur	U. Blida	Président
B. AZZOUT	Professeur	INA	Examineur
M. BEZZINA	Professeur	U. Blida	Examineur
M.H. GUERMOUCHE	Professeur	USTHB	Examineur
C.E. CHITOUR	Professeur	E. N. P.	Directeur de thèse
L. PIOVETTI	Professeur	Université de Toulon	Codirecteur de thèse

Blida, Nov. 2005

## ملخص

### مساهمة في دراسة المستخلصات الدهنية و الزيوت العطرية لطحالب المتوسط و المحيط الأطلسي : عزل ، تحديد البنية الكيميائية لميتابولات جديدة و كتابة نموذج رياضي لطرق الاستخلاص

هذه المذكورة خصصت للدراسة الكيميائية لأربعة أنواع من الطحالب البنية ثلاثة مأخوذة من البحر الأبيض المتوسط و واحدة من المحيط الأطلسي . الجزء الأول يهدف إلى حوصلة معطيات المراجع فيما يخص التركيب الكيميائي و الخواص البيولوجية لهذه الأنواع المدروسة . يشمل أيضا وصف نظري و تطبيقي لطريقتين جديدتين للاستخلاص التي تم تطبيقها في هذه الدراسة على الطحالب البحرية .

الجزئين الثاني و الثالث يخصان العمل التجريبي و يشملان :

1- دراسة المستخلصات الدهنية للطحالب البنية المستخرجين من البحر الابيض المتوسط كلادوستيفيس ايرستيس و زوناريا تورنפורتي و تلك المستخرجة من المحيط الأطلسي بفيركاريا بفيركاتا .

2- دراسة الكسور الطيارة للطحلب البني ديكتيوبتريس ممبرنسيا .

الدراسة الأولى مكنت من تنقية و تحديد الصفات البنوية لمطبوليات ثانوية جديدة . يتعلق الأمر بمشتقات البنية للفيكوقزونتين بالنسبة لكلادوستيفيس ايرستيس و اثنين من ثنائي التربينات خطي ثلاث هيدروكسيلي بالنسبة لبفيركاريا بفيركاتا . ومن جهته تم العثور على أربعة مشتقات الفلوروقليسينول في النوع زوناريا تورنפורتي التي ذكرت في معطيات المراجع .

الدراسة الثانية تخص النواتج الطيارة لطحلب البحر الأبيض المتوسط ديكتيوبتريس ممبرنسيا و البحث عن الظروف المثالية لتنمية تقنيات الاستخلاص المستخدمة . الكسور الطيارة تم تحضيرها عن طريق ثلاث تقنيات مختلفة . التقطير البخاري بالماء و التقطير بواسطة الموجات الميكرومترية الموجهة و الاستخلاص بواسطة ثنائي أكسيد الكربون في الحالة فوق الحرجة . التعبير الكمي للكسور الطيارة المتحصل عليها تم بواسطة الكروماتوغرافية الغازية المزوجة مع مطيافية الكتلة . باستعمال المعيارية الداخلية بغرض تحديد التركيب الكيميائية : أيضا دراسة حركية الاستخلاص بواسطة ثنائي أكسيد الكربون في الحالة فوق الحرجة شكلت محور لتطوير نموذج رياضي .

## ABSTRACT

### **Contribution to chemical study of the lipidic extracts and essential oils of the Mediterranean and Atlantic Ocean algae : isolation, structural characterization and mathematical modelisation of extraction process**

This thesis is devoted to the chemical study of four brown algae species (three from the Mediterranean sea and the fourth one from Atlantic Ocean). The first part is a bibliographic study on the chemical composition and biology of the studied species. This part takes also on a theoretical and experimental description of two new extraction methods which we applied to marine algae in our experimental work. The two other parts concern the experimental work and consist of two distinct studies: (1) the study of the lipid extracts of the Mediterranean algae *Cladostephus hirsutus* and *Zonaria tournefortii* and the one of the Atlantic alga *Bifurcaria Bifurcata*, (2) the study of the volatile fractions of the Mediterranean species *Dictyopteris membranacea*. The first study has allowed the isolation and characterisation of new secondary metabolites. One allenic derivative from fucoxanthin was isolated from *Cladostephus hirsutus* and two tri-hydroxylated linear diterpenes from *Bifurcaria Bifurcata*. From the species *Zonaria tournefortii*, four phloroglucinol-derived phenolic metabolites previously described have been isolated. The second study is devoted to the volatiles compounds of the Mediterranean species *Dictyopteris membranacea* and to the optimization of the extraction methods used. The volatiles fractions have been obtained by three methods : steam hydrodistillation, focused micro-wave assisted hydrodistillation and supercritical fluid extraction. The quantitative analysis of the three fractions has been realized with the GS/MS coupling, by using the internal standard method, with the aim to compare their chemical composition. A mathematical modelisation has been done on the kinetic data of the supercritical fluid extraction.

## RESUME

Ce mémoire est consacré à l'étude chimique de quatre espèces d'algues brunes (trois méditerranéennes et une de l'océan atlantique). La première partie a pour objet la synthèse des données bibliographiques sur la composition chimique et les caractéristiques biologiques des espèces étudiées. Elle comprend, également, une description théorique et expérimentale de deux nouvelles techniques d'extraction que nous avons appliquées dans notre travail de thèse aux algues marines. Les deux autres parties du mémoire correspondent à l'ensemble du travail expérimental effectué et portent sur : (1) l'étude des extraits lipidiques des algues brunes méditerranéennes *Cladostephus hirsutus* et *Zonaria tournefortii* et de celle de l'océan atlantique *Bifurcaria bifurcata*, (2) l'étude des fractions volatiles de l'algue brune méditerranéenne *Dictyopteris membranacea*. La première étude a conduit à la purification et à la caractérisation structurale de nouveaux métabolites secondaires. Il s'agit, notamment, d'un dérivé allénique de la fucoxanthine pour *Cladostephus hirsutus* et de deux diterpènes linéaires trihydroxylés pour *Bifurcaria bifurcata*. Pour sa part, l'étude de l'espèce *Zonaria tournefortii* a permis de mettre en évidence quatre dérivés du phloroglucinol déjà décrits dans la littérature. La deuxième étude est réservée aux produits volatils de l'espèce méditerranéenne *Dictyopteris membranacea* et à l'optimisation des techniques d'extraction utilisées. Les fractions volatiles ont été préparées par trois techniques différentes : hydrodistillation à la vapeur d'eau, hydrodistillation assistée aux micro-ondes focalisées et extraction par le dioxyde de carbone à l'état supercritique. L'analyse quantitative des trois fractions volatiles obtenues a été réalisée par couplage CG/SM, en utilisant la méthode de l'étalonnage interne, afin de comparer leur composition chimique. De plus, les données cinétiques de l'extraction par le dioxyde de carbone supercritique ont fait l'objet d'une modélisation mathématique.

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus vifs remerciements à Madame la Présidente ainsi qu'à Messieurs les membres de Jury :

Madame Nadia MIMOUNE, Professeur à L'Université SAAD DAHLAB de Blida

Monsieur Moulay Hassan GUERMOUCHE, Professeur à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumedienne (USTHB)

Monsieur Belkacem AZZOUT, Professeur à l'Institut National d'Agronomie (I.N.A.)

Monsieur Mohamed BEZZINA, Professeur à l'Université SAAD DAHLAB de Blida

Monsieur Chems Eddine CHITOUR, Professeur à l'Ecole Nationale Poltechnique (E.N.P.)

Monsieur Louis PIOVETTI, Professeur à l'Université du Sud Toulon-Var, Laboratoire LPCM3/Equipe produits naturels marins,

Qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Ce travail a été effectué au sein des laboratoires LPCM3 / Equipe produits naturels marins, sous la direction du Professeur Semche Eddine Chitour et le Professeur Louis Pioveti. Je voudrais leur exprimer ici ma profonde gratitude pour les nombreux conseils qu'ils m'ont prodigués, leur aide permanente, leur disponibilité et leurs encouragements. Qu'ils soient assurés de mon amitié respectueuse et de ma profonde reconnaissance.

Qu'il me soit permis également, de remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont facilité la réalisation de ce travail, en particulier :

Monsieur Lakhdar Lachemat, Vice Recteur chargé de la planification à l'Université de Blida, pour son aide, sa sympathie et son amitié.

Madame Yasmina Daghbouche Maître de conférences à l'Université de Blida, pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail, ses encouragements et son amitié.

Monsieur Slim Ouzzane, Chargé de cours à l'Université de Blida, pour son aide dans la partie modélisation mathématique, sa grande sympathie ainsi que pour sa disponibilité.

Monsieur André Margailan, Professeur à l'Institut Supérieur d'Ingénieurs de Toulon et du Var, qui m'a initié à l'utilisation de la RMN, et qui m'a facilité l'accès aux équipements de son laboratoire.

Monsieur Robert Valls, Professeur à l'Université d'Aix Marseille pour ses encouragements ainsi que pour les analyses de Résonance Magnétique Nucléaire.

Monsieur Jean Michel Kornprobst, Professeur émérite, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail, ses conseils et pour le précieux livre sur les algues du golfe qu'il m'a offert.

Monsieur Gérard Culioli, Maître de conférences à l'Université du Sud Toulon Var pour son esprit scientifique et sa fructueuse collaboration, c'est en le côtoyant au moment où il préparait sa thèse que j'ai appris à faire mes premières manipulations sur la HPLC. Qu'il soit assuré de ma reconnaissance, mon amitié et mon admiration.

Madame Christine Bressy, Maître de conférences pour sa gentillesse, sa disponibilité et pour son aide dans la réalisation du travail effectué en CG-SM. Je la remercie particulièrement pour la colonne de CPG qu'elle a mis à ma disposition pour le dosage des fractions volatiles.

Monsieur Ali Khefif, chercheur au laboratoire MEDIMAT de l'Université Paris VI, pour l'excellent travail qu'il a effectué sur l'étude de la stabilité des modèles mathématiques

proposés, la programmation et surtout pour sa patience dans le calcul. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Madame Halima Seridi pour le travail d'identification des algues ainsi que pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Monsieur Francis Montanos, ingénieur de la société CEM  $\mu$ -Waves pour le four à micro-ondes focalisées qu'il a mis à ma disposition.

Monsieur Robert Faure et Madame Rosy Rosas du service de résonance magnétique nucléaire du Spectropole de l'Université Aix-Marseille pour la formation qu'ils m'ont dispensée sur l'utilisation de la RMN.

Monsieur, J.Y. Benaim, Professeur émérite et ex-Directeur du laboratoire RCMO pour m'avoir accueilli dans son équipe en 2001.

Le Doyen de la Faculté des sciences ainsi que tous les membres de la faculté des sciences en particulier le personnel du département de chimie.

Messieurs bilel Alitouche et aissa Guerrouffe pour leur précieuse aide dans la récolte des algues, les moments de détente passés ensemble sont inoubliables. Dans le même contexte, je remercie les membres de la protection civile de Tipaza pour leur collaboration dans la récolte des algues.

Madame Marthe Piovetti et Jean Serge Piovetti pour leur amitié, sympathie, gentillesse et pour leur soutien indéfectible durant mon séjour en France.

A

*mes parents*

*ma femme*

*mes filles : Nooha, fatima Zohra et Kawther*

*A tous ceux qui me sont chers*

## TABLE DES MATIERES

RESUME	2
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	8
Liste des figures, Planches et Tableaux	9
Liste des abréviations	14
INTRODUCTION	16
1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	22
1.1 Aspect Biologique des Algues Étudiées	24
1.2 Composition Chimique des Algues Brunes	30
1.3 Techniques d'Obtention des Produits Volatils	71
2. ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION STRUCTURALE DES MÉTABOLITES SECONDAIRES DES ALGUES BRUNES <i>CLADOSTEPHUS HIRSUTUS</i> , <i>ZONARIA TOURNEFORTII</i> ET <i>BIFURCARIA BIFURCATA</i>	90
2.1 Isolement des Métabolites Secondaires	90
2.2 Analyse Qualitative des Extraits Bruts et Caractérisation Structurale des Composés Isolés	95
3. PRODUITS VOLATILS DE <i>DICTYOPTERIS MEMBRANACEA</i>	155
3.1 Étude des Différentes Techniques d'Extraction Utilisées : Description et Modélisation	156
3.2 Étude Analytique des Différentes Fractions Volatiles	184
CONCLUSION	216
APPENDICES	220
Appendice A	220
Appendice B	242
Appendice C	262
Appendice D	275
Appendice E	291
Appendice F	292
Appendice G	297
REFERENCES	299

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

### LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Cladostephus hirsutus Linnaeus	26
Figure 1.2	Zonaria tournefortii Lamouroux	26
Figure 1.3	Bifurcaria bifurcata (Velley) Ross	28
Figure 1.4	Dictyopteris membranacea (Stackhouse)	28
Figure 1.5	Biosynthèse du Pyrophosphate d'isopentenyle	31
Figure 1.6	Biosynthèse des terpenoïdes à partir de l'IPP	33
Figure 1.7	Biosynthèse des terpènes par le métabolisme glucidique	34
Figure 1.8	Répartition des diterpènes dans les macroalgues	35
Figure 1.9	Biosynthèse des caroténoïdes à partir du lycopène	42
Figure 1.10	(a) Obtention de la cétone allénique N1 à partir du $\beta$ -ionol (b) Obtention des caroténoïdes alléniques à partir de la zéaxanthine	46
Figure 1.11	Voies de biosynthèse de l'allène 6'R à partir de la zéaxanthine	47
Figure 1.12	Diagramme de phases pression –température d'un corps pur	73
Figure 1.13	Diagramme de phases pression- température-masse volumique d'un corps pur	73
Figure 1.14	Extracteur analytique au fluide supercritique	74
Figure 1.15	a :Piège en phase liquide	77
Figure 1.15	b :Extracteur Dionex	77
Figure 1.16	a :système à micro-ondes focalisées (monomode)	83
Figure 1.16	b :système à micro-ondes diffuses (multimode)	83
Figure 1.17	Evolution des nombres de publications en chimie organique et inorganique	83
Figure 1.18	a :Spectre électromagnétique	86
Figure 1.18	b :Interaction du spectre électromagnétique avec l'atome et la molécule	86
Figure 1.19	Mécanisme de chauffage classique et micro-ondes	87
Figure 1.20	Différents schémas d'extraction	87
Figure 1.21	Système d'extraction atmosphérique à micro-ondes focalisées (système ouvert)	88
Figure 2.1	Lieux de récolte des différentes espèces d'algues	91
Figure 2.2	Extraction et traitement de l'extrait de <i>Cladostephus hirsutus</i> et <i>Bifurcaria bifurcata</i>	93
Figure 2.3	Extraction et traitement de l'extrait de <i>Zonaria tournefortii</i> et <i>Cladostephus hirsutus</i>	94
Figure 2.4	Chromatogramme en CLHP de la phase apolaire	96
Figure 2.5	Chromatogramme en CGL sur colonne capillaire de la fraction apolaire	97
Figure 2.6	Purification des produits H1, H2 et H3 par CLHP en phase normale	97
Figure 2.7	Fragmentation du produit H <sub>1</sub> par impact électronique	99
Figure 2.8	Spectre RMN HMBC à 500 MHz dans CDCl <sub>3</sub> du produit H1	104
Figure 2.9	Fragmentation du produit H2 par impact électronique	105

Figure 2.10	Spectre RMN HMBC à 500 MHz dans CDCl <sub>3</sub> du produit H2	107
Figure 2.11	Fragmentation par impact électronique du composé H3	110
Figure 2.12	Spectre RMN HMBC à 500 MHz dans CDCl <sub>3</sub> du produit H3	113
Figure 2.13	Chromatogramme en CLHP des fractions F3 et F4	114
Figure 2.14	Chromatogramme en CGL sur colonne capillaire du mélange obtenu à partir de la sous-fraction C	114
Figure 2.15	Fragmentation par impact électronique des composés H4 et H5	115
Figure 2.16	Chromatogramme en CLHP de la phase TMP (phase étherée) de <i>Zonaria tournefortii</i>	119
Figure 2.17	Fragmentation du phytol (composé Z1) par impact électronique	119
Figure 2.18	Chromatogramme en CLHP de la fraction phénolique	121
Figure 2.19	a : Chromatogramme en CLHP de la fraction 5	138
Figure 2.19	b : Chromatogramme en CLHP de la fraction 5 acétylée	138
Figure 2.20	Chromatogramme en CLHP de la fraction 6	139
Figure 2.21	Chromatogramme en CLHP du mélange de produits X	139
Figure 2.22	Fragmentation du composé B3 par impact électronique	141
Figure 2.23	a : Spectre RMN COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H à 250 MHz dans CDCl <sub>3</sub> du produit B3	146
Figure 2.23	b : Spectre RMN HMBC à 400 MHz dans CDCl <sub>3</sub> du produit B3	147
Figure 2.24	Fragmentation du composé B4 par impact électronique	148
Figure 2.25	Spectre RMN HMBC à 400 MHz dans CDCl <sub>3</sub> du produit B4	154
Figure 3.1	a : Cartouche d'extraction	156
	b : Piège collecteur	
Figure 3.2	Observation microscopique de l'extrait étheré de <i>Dictyopteris membranacea</i>	157
Figure 3.3	Représentation schématique de l'extracteur	158
Figure 3.4	Variation du rendement en fonction du temps d'équilibre	165
Figure 3.5	Variation du rendement en fonction de la pression	165
Figure 3.6	Variation du rendement en fonction du temps (P = 104 bars)	167
Figure 3.7	Variation du rendement en fonction du temps (P = 104 bars)	167
Figure 3.8	Variation de e en fonction de q (P = 104 bars)	168
Figure 3.9	Variation de y en fonction de t (P = 104 bars et débit = 1 ml/min)	170
Figure 3.10	Variation de y en fonction de t (P = 104 bars et débit = 1,5 ml/min)	170
Figure 3.11	Variation de y en fonction de t (P = 104 bars et débit = 0,5 ml/min)	171
Figure 3.12	Profil de y en fonction de Z à différents instants (P = 104 bars – débit = 1ml/min - Modèle proposé)	171
Figure 3.13	Profil de y en fonction de Z à différents instants (P = 104 bars – débit = 1ml/min -Modèle de Cygnarowicz)	172
Figure 3.14	Profil de y en fonction de Z à différents instants (P = 104 bars – débit = 1,5 ml/min - Modèle proposé)	172
Figure 3.15	Profil de y en fonction de Z à différents instants (P = 104 bars – débit = 1,5 ml/min - Modèle de Cygnarowicz)	173
Figure 3.16	Profil de y en fonction de Z à différents instants (P = 104 bars – débit = 0,5 ml/min - Modèle proposé)	173
Figure 3.17	Profil de y en fonction de Z à différents instants (P = 104 bars – débit = 0,5 ml/min - Modèle de Cygnarowicz)	174
Figure 3.18	Variation de e en fonction de q (P = 104 bars, debit (CO <sub>2</sub> ) = 1 ml/min)	177
Figure 3.19	Variation de e en fonction de q (P = 104 bars, debit (CO <sub>2</sub> ) = 0,5 ml/min)	178
Figure 3.20	Variation de e en fonction de q (P = 104 bars, debit (CO <sub>2</sub> ) = 1,5 ml/min)	178

Figure 3.21	Système d'hydrodistillation assistée aux micro-ondes	181
Figure 3.22	Variation du rendement en fonction du temps (simulation par le modèle empirique)	182
Figure 3.23	Montage utilisé dans l'hydrodistillation	183
Figure 3.24	a : Chromatogramme de la fraction volatile de <i>Dictyopteris membranacea</i> sans étalon interne. b : Chromatogramme avec étalon interne	187
Figure 3.25	Profil chromatographique de la fraction volatile obtenue par : a : hydrodistillation et par le dioxyde de carbone supercritique b : hydrodistillation assistée aux micro-ondes	189
Figure 3.26	Produits soufrés et leurs dérivés obtenus en CG/SM	191
Figure 3.27	Evolution de la teneur massique des principaux produits de la fraction volatile en fonction du temps – P = 91 bars	205
Figure 3.28	Evolution de la teneur massique des principaux produits de la fraction volatile en fonction du temps – P = 104 bars	206
Figure 3.29	Evolution de la teneur massique des principaux produits de la fraction volatile en fonction du temps – P = 115 bars	207
Figure 3.30	Evolution de la teneur massique des principaux produits de la fraction volatile obtenue par hydrodistillation assistée par micro-ondes en fonction du temps	208
Figure 3.31	Four à microondes focalisées (soxwave 3)	210
LISTE DES PLANCHES		
Planche 1.1	Classifications des espèces d'algues	29
Planche 1.2	Diterpènes linéaires isolés à partir de <i>Bifurcaria bifurcata</i>	36
Planche 1.3	Molécules originales isolées de <i>Bifurcaria bifurcata</i>	37
Planche 1.4	Molécules connues isolées de <i>Bifurcaria bifurcata</i>	37
Planche 1.5	Diterpènes trihydroxylés isolés de <i>Bifurcaria bifurcata</i> (Oualidia)	38
Planche 1.6	Révision de la configuration du C-12 pour les diterpènes isolés de <i>B. bifurcata</i> (Oualidia)	38
Planche 1.7	Caroténoïdes des algues brunes (Phéophycées)	41
Planche 1.8	Structure de la fucoxanthine, de la néoxanthine et des produits d'oxydation de la fucoxanthine (F1, F2 et F3) et de N1, cétone allénique isolée à partir de <i>Romalea microptera</i>	43
Planche 1.9	Rappel théorique sur la stéréochimie des allènes	44
Planche 1.10	Cycle xanthophylle de la néoxanthine	47
Planche 1.11	Dégradation de la fucoxanthine et de la zéaxanthine en loliolide et en isololiolide	48
Planche 1.12	Nouveaux loliolides isolés de <i>Undaria pinnatifida</i>	49
Planche 1.13	Exemples de fucols	51
Planche 1.14	Exemples de phlorethols	51
Planche 1.15	Exemples de fucophlorethols	52
Planche 1.16	Exemples de fuhalols	52
Planche 1.17	Exemples d'Eckols	53
Planche 1.18	Dérivés du phloroglucinol à partir des espèces <i>Zonaria farwolii</i> et <i>Zonaria diesingiana</i>	54
Planche 1.19	Dérivés du phloroglucinol à partir de l'espèce <i>Lobophora papenfussii</i>	54
Planche 1.20	Dérivés du phloroglucinol de l'espèce <i>Zonaria tournefortii</i>	54
Planche 1.21	Phéromones identifiées dans les algues brunes	56
Planche 1.22	a : Biosynthèse des hydrocarbures en C11 dans <i>Senecio isatideus</i>	60
Planche 1.22	b : Biosynthèse des hydrocarbures en C11 d' <i>Ectocarpus siliculosus</i>	61

Planche 1.23	Biosynthèse de l'ectocarpène à partir de l'acide eicosapentaénoïque	62
Planche 1.24	Biosynthèse des C11 à partir du dictyoprolénone et du neodictyoprolénone	63
Planche 1.25	a : Produits soufrés identifiés dans le genre <i>Dictyopteris</i>	64
Planche 1.25	b : Biosynthèse des produits soufrés	63
Planche 1.26	Polyènes odorants en C-11 des espèces Hawaïennes du genre <i>Dictyopteris</i>	66
Planche 1.27	Dihydrotropones des espèces Hawaïennes ( <i>D. plagiogramma</i> et <i>D. australis</i> )	66
Planche 1.28	Polyènes en C-11 de <i>Dictyopteris acrostichoides</i>	67
Planche 1.29	Sesquiterpènes de <i>Dictyopteris divaricata</i>	68
Planche 1.30	Sesquiterpènes et mérosesquiterpènes de <i>Dictyopteris undulata</i>	69
Planche 1.31	Polyène en C-11 et dérivés de <i>Dictyopteris membranacea</i>	70
Planche 2.1	Produits isolés à partir de la fraction phénolique	123
Planche 2.2	Biosynthèse des acides gras saturés	132
Planche 2.3	Passage de l'acide palmitique à l'acide stéarique	133
Planche 2.4	Voies de biosynthèse des acides gras insaturés	133
Planche 2.5	Biosynthèse de l'acide shikimique	134
Planche 2.6	Proposition de biosynthèse des produits Z1 et Z6	136
Planche 2.7	Proposition de biosynthèse de l'unité dihydrochromanone de Z3 et Z4	136
Planche 2.8	Diterpènes de <i>Bifurcaria bifurcata</i> B0, B1, B2 et B5 : structures connues B3 et B4 : structures originales	140
Planche 3.1	Structure chimique de produits identifiés dans la fraction volatile obtenue par hydrodistillation et par le dioxyde de carbone	192
Planche 3.2	Structure chimique de produits identifiés dans la fraction volatile obtenue par hydrodistillation assistée aux micro-ondes	195
Planche 3.3	Interprétation de la fragmentation des principaux C-11	212
LISTE DES TABLEAUX		
Tableau 1.1	Phéromones isolés à partir des algues brunes	58
Tableau 1.2	Propriétés critiques de produits utilisés comme fluide supercritique	72
Tableau 1.3	Comparaison des propriétés de transport des gaz, des liquides et des fluides supercritiques	73
Tableau 1.4	Valeurs des constantes diélectriques et de l'angle de perte de quelques solvants	85
Tableau 2.1	Données de RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du composé H1	103
Tableau 2.2	Données de RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du composé H2	108
Tableau 2.3	Données de RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du composé H3	112
Tableau 2.4	Données de RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du phytol (Z1)	120
Tableau 2.5	Données de RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du produit Z2	123
Tableau 2.6	Données de RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du produit Z3	125
Tableau 2.7	Données de RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du produit Z4	126
Tableau 2.8	Données de RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du produit Z5	128
Tableau 2.9	Données de RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du produit Z6	130
Tableau 2.10	Données de RMN <sup>1</sup> H des composés B0, B2 et B3	144
Tableau 2.11	Données de RMN <sup>13</sup> C des composés B0, B2 et B3	145
Tableau 2.12	Données de RMN <sup>13</sup> C des composés B4, B2 et B5	150
Tableau 2.13	Données de RMN <sup>1</sup> H des composés B4, B2 et B5	151
Tableau 3.1	Principaux paramètres expérimentaux des différents modèles	168

Tableau 3.2	Valeurs optimales des paramètres du modèle de Cygnarowicz et proposé	169
Tableau 3.3	Déviatiion relative entre valeurs expérimentales et celles des modèles de Cygnarowicz et proposé	173
Tableau 3.4	Paramètres optimisés du modèle SM1	176
Tableau 3.5	Paramètres optimisés du modèle SM2	176
Tableau 3.6	Paramètres optimisés du modèle SM3	177
Tableau 3.7	Paramètres optimisés du modèle SME	177
Tableau 3.8	Déviatiion des différents modèles par rapport aux valeurs expérimentales	179
Tableau 3.9	Paramètres du modèle empirique	182
Tableau 3.10	Standards utilisés et produits à doser	186
Tableau 3.11	Analyse qualitative des fractions volatiles obtenues par hydrodistillation et par le dioxyde de carbone supercritique	190
Tableau 3.12	Analyse qualitative de la fraction volatile obtenue par hydrodistillation assistée aux micro-ondes	193
Tableau 3.13	Droites d'étalonnage, déviatiion relative standard et limite de détection des différents standards	196
Tableau 3.14	Analyse quantitative des fractions volatiles obtenues hydrodistillation (FVH) et par le dioxyde de carbone supercritique (SFCD)	198
Tableau 3.15	Analyse quantitative de la fraction volatile obtenue par hydrodistillation assistée aux micro-ondes (FMAH)	199
Tableau 3.16	Coefficients de réponse des standards externe	203
Tableau 3.17	Analyse qualitative de la fraction volatile obtenue par hydrodistillation (FVH) et par hydrodistillation assistée aux microondes (FMAH)	211

## LISTE DES ABREVIATIONS

ATP : adénosine triphosphate  
ACP : 4-phosphopantotheine  
ADP : adénosine diphosphate  
CCM : chromatographie sur couche mince  
CLHP : chromatographie liquide haute performance  
CHCl<sub>3</sub> : chloroforme  
CG-SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse  
DMAPP : Dimethylallylpyrophosphate  
FMAH : fraction volatile obtenue par hydrodistillation assistée aux microondes  
FVH : fraction volatile obtenue par hydrodistillation classique  
GAP : Glyceraldehyde-3-phosphate  
IPP : Pyrophosphate d'isopentyle  
IRTF : infrarouge à transformée de fourier  
IDP : Isopentyle diphosphate  
MeOH : méthanol  
NADHP : Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate  
RMN : résonance magnétique nucléaire  
SM : spectrométrie de masse  
SMN : simulation mathématique numérique  
SM1 : modèle mathématique simplifié 1  
SM2 : modèle mathématique simplifié 2  
SM3 : modèle mathématique simplifié 3  
SME : modèle mathématique empirique  
SFCD : fraction volatile obtenue par le dioxyde de carbone supercritique  
TPP : triamine diphosphate  
TMP : triméthyl pentane

A<sub>st</sub> : aire du standard  
A<sub>ei</sub> : aire de l'étalon interne  
a<sub>p</sub> : surface spécifique (m<sup>-1</sup>)  
D<sub>L</sub> : coefficient de dispersion axiale (m<sup>2</sup>/s)  
C<sub>st</sub> : concentration du standard  
C<sub>ei</sub> : concentration de l'étalon interne  
J : flux de transfert de matière (kg/m<sup>3</sup>s)  
K<sub>rep</sub> : coefficient de réponse  
k<sub>f</sub> : coefficient de transfert de matière en phase fluide (m/s)  
m<sub>e</sub> : masse d'huile extraite (g)  
m<sub>0</sub> : masse initiale de concrète (g)  
m<sub>e</sub> : masse de soluté extraite (g)  
m<sub>e∞</sub> : masse extraite à un temps infini (g)  
m<sub>s</sub> : masse de solvant utilisé (g)  
P<sub>c</sub> : pression critique

$q$  : masse de solvant /masse de concrète insoluble (g/g)

$t$  : temps (s)

$T_c$  : température critique

$u$  : vitesse linéaire du fluide supercritique (m/s)

$x$  : concentration du soluté dans la concrète (phase solide) (g soluté / g concrète non soluble)

$x_0$  : concentration initiale du soluté dans la concrète (g soluté / g concrète non soluble)

$x^*$  : concentration de soluté dans la concrète à l'équilibre ((g soluté / g concrète non soluble)

$x_k$  : concentration de transition de régime (régime de solubilisation et régime de diffusion moléculaire)

$y$  : concentration du soluté dans la phase fluide (g soluté/g solvant)

$y^*$  : concentration de soluté en phase fluide à l'équilibre (g soluté / g solvant)

$y_0$  : concentration de soluté en phase fluide au début de l'extraction (solubilité du soluté dans le solvant) (g soluté / g solvant)

$Y$  : rendement d'extraction

$Y_\infty$  : rendement asymptotique

$z$  : axe de coordonnées (sens de déplacement du fluide)

$\varepsilon$  : fraction de volume occupée par le fluide

$\varepsilon_c$  : fraction de volume occupée par la concrète

$\rho_f$  : masse volumique du fluide( kg/m<sup>3</sup>) ou (g/l)

$\rho_s$  : masse volumique de la fraction de concrète non soluble (kg/m<sup>3</sup>) ou (g/l)

$\rho_c$  : masse volumique de la concrète.

$\rho_c$  : masse volumique de la concrète

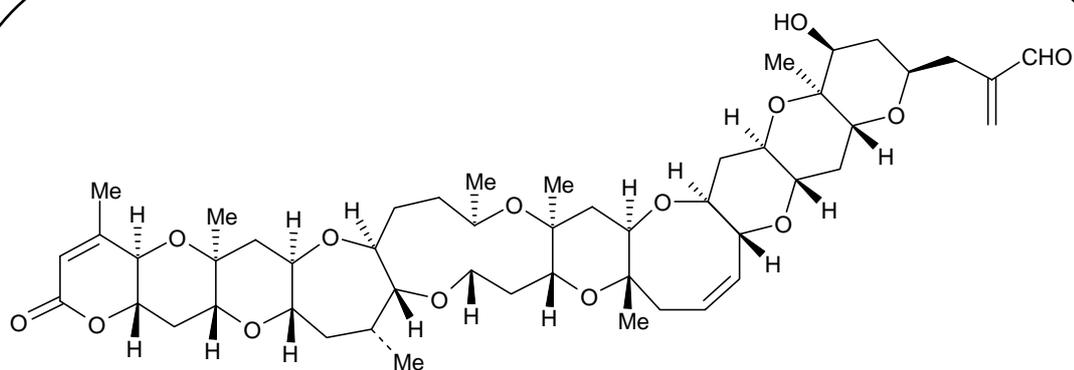
## INTRODUCTION

L'histoire de la chimie des produits naturels remonte à la plus haute antiquité avec la conception des premiers alambics, il y a de cela plus de 3500 ans. Toutefois, il a fallu attendre le seizième siècle pour assister à la distillation de l'éthanol qui fut utilisé par la suite à des fins médicales. Cette découverte a permis l'éclosion de l'aromathérapie puisque la même technologie a été utilisée pour préparer les essences naturelles qui occupaient à cette époque une place privilégiée dans la vie pratique en tant que médicaments, aromatisants, produits de beauté et aussi en tant que produits exprimant la spiritualité. Mais c'est surtout depuis deux siècles que les chercheurs commencent à s'intéresser à l'étude de la composition chimique des extraits naturels et qu'apparaissent les premières publications dans ce domaine. A cette époque, l'étude des produits naturels était focalisée principalement sur les organismes terrestres, le monde marin qui représente 70 % de la planète et renferme 90 % des espèces vivantes était complètement ignoré. Cet état de fait est lié aux faibles connaissances que nous avons du milieu marin. La curiosité de l'homme vis-à-vis du monde marin a permis la mise au point des premiers scaphandres autonomes après la seconde guerre mondiale, ce qui a contribué à mieux connaître le milieu marin. La recherche dans le domaine des produits naturels d'origine marine remonte donc à une cinquantaine d'années. Elle a enregistré un développement fulgurant à partir des années 70 et a atteint sa maturité durant les années 80. A ce jour, quatre milles métabolites secondaires\* originaux ont été caractérisés. Depuis 1975, la chimie des produits naturels marins s'est organisée en trois spécialités parallèles : la chimie des toxines, la chimie des produits biologiquement actifs et l'écologie marine.

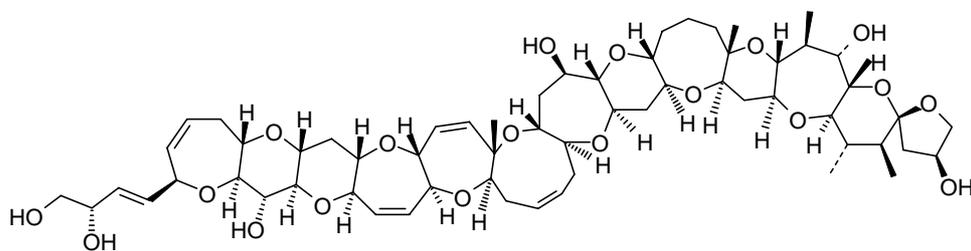
La chimie des toxines marines est dominée par les travaux de chercheurs japonais [1, 2]. Ce sont généralement des composés à structure polyéthérée dont l'élucidation structurale a été établie principalement par diffraction des rayons X.

-----

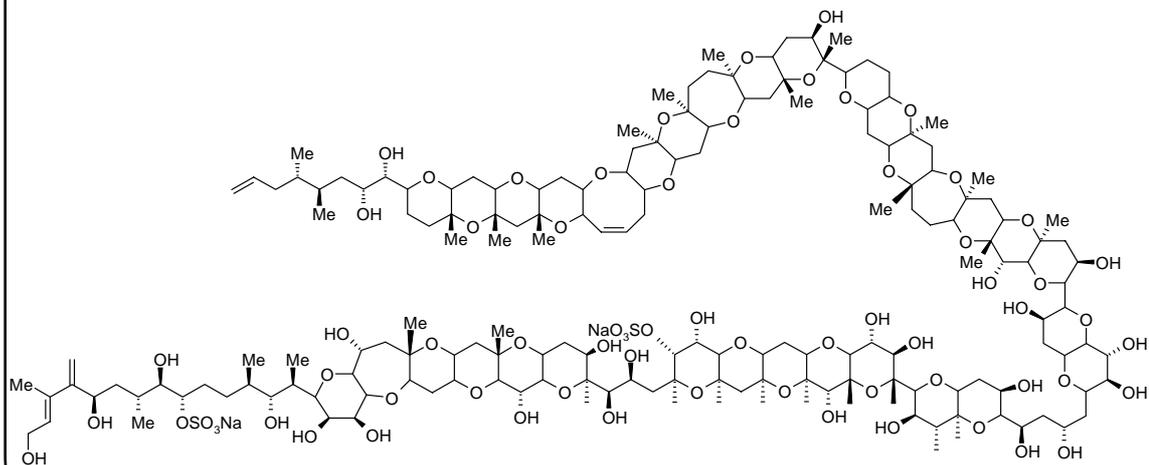
\*. Les mots indexés par un astérisque sont définis dans le glossaire (Appendice G)



Brevetoxine B



Ciguatoxine

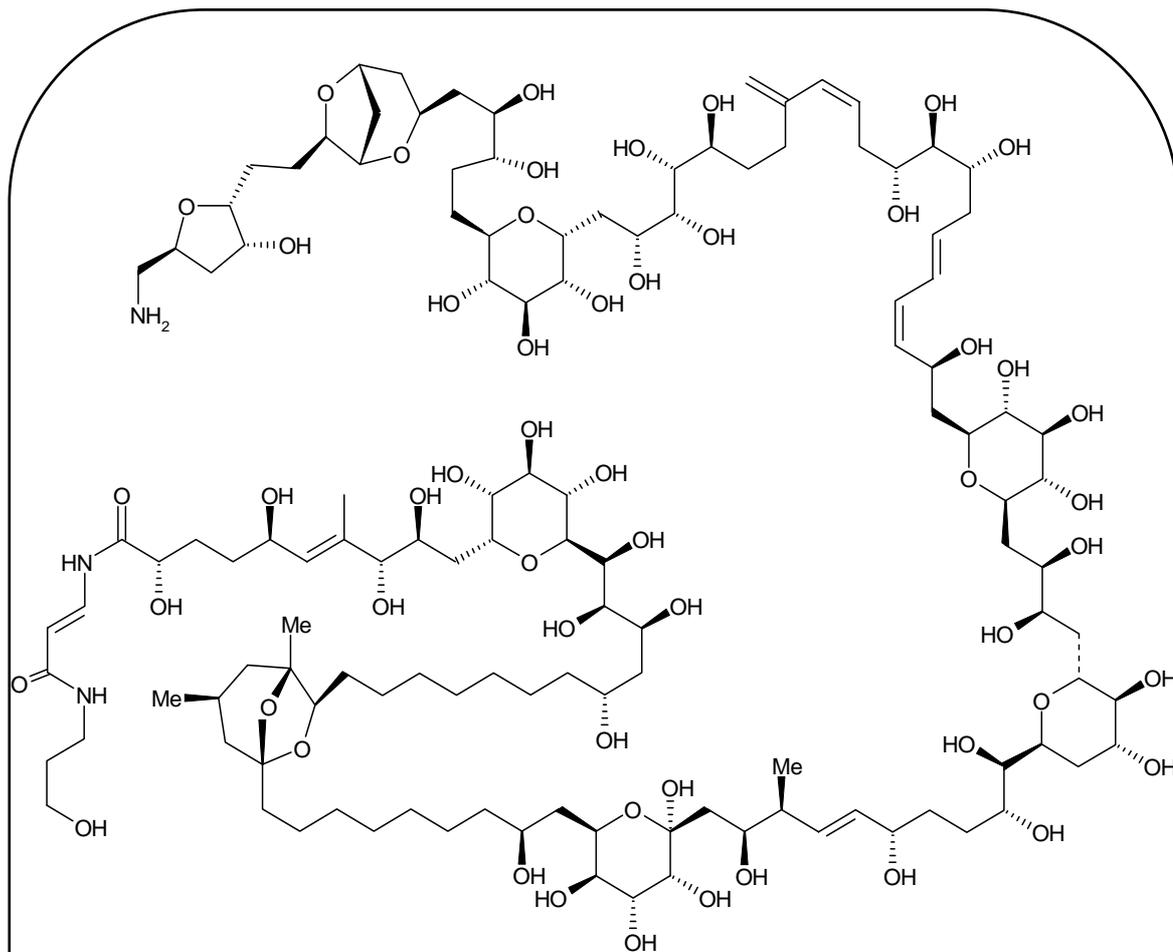


Maitotoxine

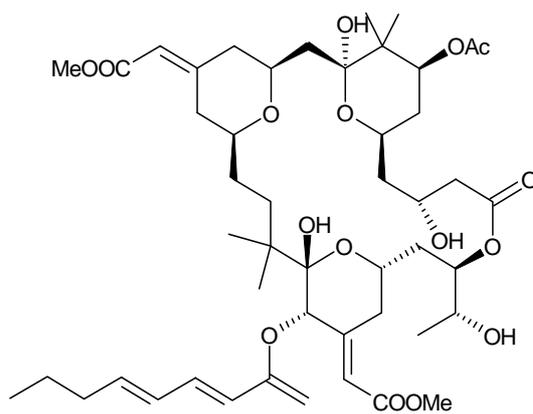
Les principales toxines sont la brevetoxine B, la ciguatoxine, la maitotoxine et la palytoxine. L'étude des produits biologiquement actifs d'origine marine est la spécialité qui a retenu le plus d'attention [3], néanmoins, les résultats obtenus, à quelques exceptions près, n'ont pas été à la hauteur des attentes. On peut citer, dans ce cadre, le cas de la bryostatine 1 obtenue à partir du bryozoaire\* *Bulgula neritina* en 1970 et dont la structure a été élucidée en 1982 par diffraction des rayons X [4], ainsi que ceux de la dehydrodidemnine B [5] et de la dolastatine 10 [6]. L'étude des activités biologiques, révèle des propriétés anticancéreuses chez les produits cités ci-dessus. Chez d'autres produits tels que les pseudopterosines A et E [7,8], on a décelé une activité anti-inflammatoire. Une application commerciale intéressante dans le domaine des cosmétiques concerne l'utilisation d'un extrait partiellement purifié du corail gorgonien *Pseudopteroergorgia elisabethae* en tant que source de pseudopterosines [9]. D'autres produits sont utilisés en biologie cellulaire, il s'agit principalement de métabolites issus des éponges [10].

L'émergence de la spécialité écologie marine est reliée à la spécificité du milieu marin. Ce dernier est caractérisé par la grande diversité des organismes vivants qui s'y développent, ce qui engendre une importante compétition interspécifique. Le phénomène de défense chimique, assuré par les métabolites secondaires\*, joue un rôle très important dans la limitation de la prédation des espèces en entraînant leur régulation naturelle dans le milieu marin. Les métabolites secondaires interviennent également dans l'inhibition des organismes responsables de la formation des salissures biologiques marines (fouling\*). Ils jouent aussi un rôle de première importance comme messagers chimiques dans un milieu où les autres voies de communication sont pratiquement absentes. Par ailleurs, ces molécules très spécifiques peuvent être considérées comme des marqueurs chimiques des espèces qui les métabolisent et servir de critère de classement dans la détermination de la position systématique de ces espèces (chimiotaxonomie\*).

L'essor rapide qu'a connu la chimie des produits naturels marins est dû, pour une bonne part, au développement des techniques de spectroscopie moléculaire, notamment la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) mono et bidimensionnelle. La sensibilité de ces techniques permet de réaliser des analyses de produits à de très faibles teneurs. Selon Faulkner [9] : " le chimiste des produits naturels marins de 2025 continuera à élucider de nouvelles structures, toutefois, des efforts considérables seront consacrés à l'ingénierie génétique afin d'orienter la biosynthèse des métabolites par l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés (OGM) ".



Palytoxine



Bryostatine 1

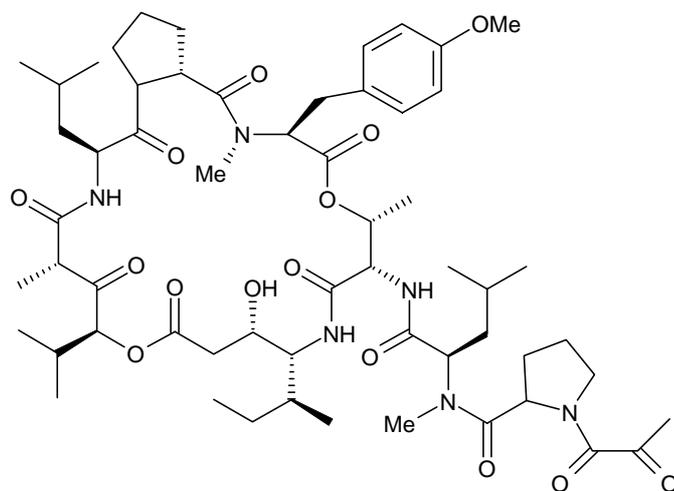
Notre travail s'intègre à ce large domaine de recherche. Il porte, d'une part, sur l'étude des métabolites secondaires de quelques algues brunes des côtes méditerranéennes et de l'océan atlantique et, d'autre part, sur la mise au point et l'optimisation de nouvelles techniques d'obtention des fractions volatiles algales appliquées à l'algue brune *Dictyopteris membranacea*.

Les objectifs de ce travail sont :

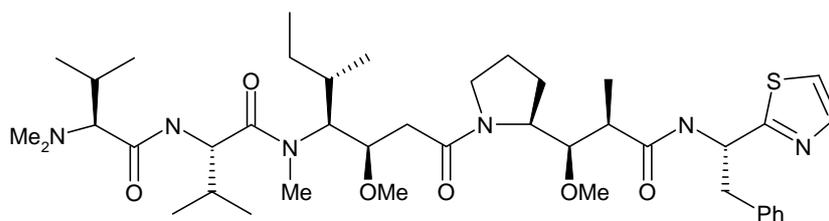
- 1- d'isoler et de déterminer la structure chimique de nouveaux métabolites secondaires susceptibles de présenter des activités biologiques spécifiques (antiallergiques, pharmacologiques,...). Cette étude a été menée sur les algues brunes *Cladostephus hirsutus*, *Zonaria tournefortii* (méditerranéennes) et *Bifurcaria bifurcata* (de l'océan atlantique).
- 2- d'étudier la fraction volatile d'une algue brune méditerranéenne : *Dictyopteris membranacea*. Le but étant, primo, de mettre au point de nouvelles techniques d'obtention des fractions volatiles, telles que l'extraction par les fluides à l'état supercritique et l'hydrodistillation assistée aux micro-ondes focalisées et, secundo, d'effectuer une étude analytique comparative des différentes fractions volatiles obtenues.

Ce mémoire comprend trois chapitres :

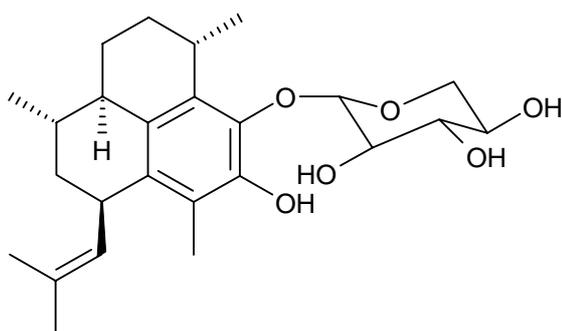
- ✚ Le premier est consacré à une synthèse bibliographique portant sur les algues étudiées (caractéristiques biologiques et travaux de nature chimique déjà effectués) ainsi que sur les techniques d'extraction des produits volatils, telles que l'extraction par le dioxyde de carbone supercritique et l'hydrodistillation assistée aux micro-ondes.
- ✚ Le second est réservé à l'étude chimique des algues brunes *Cladostephus hirsutus*, *Zonaria tournefortii* et *Bifurcaria bifurcata*. Elle porte sur l'isolement et la caractérisation structurale des métabolites secondaires.
- ✚ Le troisième est axé sur l'étude analytique des fractions volatiles obtenues à partir de l'extrait éthéré de *Dictyopteris membranacea* par trois techniques différentes. Des modèles mathématiques développés sur la base des lois de transfert de matière sont appliqués pour simuler les données cinétiques d'extraction, en vue d'optimiser les conditions opératoires d'obtention des produits volatils.



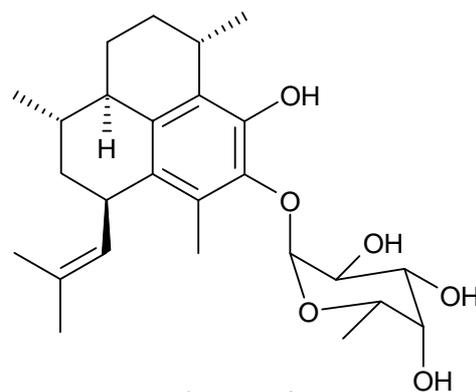
Dehydrodidemnine B



Dolastatin 10



Pseudopterosine A



Pseudopterosine E

## **CHAPITRE 1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

### 1.1 ASPECT BIOLOGIQUE DES ALGUES ETUDIÉES

#### 1.1.1 Généralités

La grande majorité des algues vit en milieu aquatique bien qu'on en rencontre aussi en milieu aérien (sur les sols, les rochers, les arbres, dans la terre, dans la neige..). Parmi les algues qui vivent dans l'eau, certaines flottent ou sont en suspension dans l'eau; elles se laissent le plus souvent entraîner passivement par les courants (bien que parfois capables de mobilité). Les algues poussent sous plusieurs formes, certaines sont microscopiques et d'autres mesurent plusieurs mètres de long. Les variétés microscopiques, qui sont unicellulaires, s'appellent le phytoplancton (dérivé de mots grecs signifiant « plantes » et « errant »). D'autres de plus grande taille, parfois flottantes mais le plus souvent fixées sur le fond ou sur d'autres organismes eux mêmes fixés, constituent le phytobenthos [11,12].

Les algues, comme les autres organismes marins sont soumises à des facteurs physiques, chimiques, biologiques et énergétiques qui constituent leur environnement : facteurs chimiques (eau, salinité, substances polluantes,..), facteurs physiques (lumière, température, hydrodynamisme,...) et facteurs biotiques (bactéries, phytoplancton,...) [13]. Il faut préciser également que les algues se reproduisent selon deux modes : la reproduction asexuée (le plus fréquent) et la reproduction sexuée. Comme tous les êtres vivants, les algues respirent, Le glucose est le substrat respiratoire essentiel, présent dans la cellule sous forme de glucose-phosphate. La respiration est un transfert d'énergie appartenant à tout un processus : le catabolisme [14, 15].

Les algues sont des végétaux photosynthétiques qui réalisent, en présence de lumière, la fabrication (ou synthèse) des substances organiques nécessaires à leur vie à partir de substances inorganiques prélevées dans le milieu comme l'eau, les sels minéraux et le dioxyde de carbone. On les dit autotrophes\* par photosynthèse [15].

Le caractère cytologique\* des algues est remarquable, leur appareil végétatif est un thalle\* et elles sont constituées de une ou plusieurs cellules. Le thalle, appareil végétatif des

algues est dépourvu de tissus et d'organes spécialisés (ni de vraies racines, ni de tiges, ni de feuilles et de vaisseaux). La partie dressée et l'organe de fixation des algues sont de formes diverses : crampons (ou haptères\* chez les grandes algues brunes), ventouses, disque, rhizoïdes (cellules allongées). Les macroalgues benthiques\* ont un thalle pluricellulaire qui présente une grande diversité de formes. On distinguera les thalles prostrés ou encroûtants\* et les thalles dressés ou érigés [11].

### 1.1.2 Classification des algues

C'est le botaniste français Joseph Pitton de Tournefort (1656-1708) qui a réuni les espèces en genres puis le naturaliste suédois Carl Von Linné (1707-1778), fondateur de la Systématique (ou Taxonomie), qui a classé les organismes en groupes de plus en plus larges : espèces, genres, familles, ordres, classes, embranchements (ou phylums) et règnes.

Les algues, selon Feldmann et Chadefaud [16, 17], sont classées en six embranchements différenciés par la nature des pigments, la nature et la situation des réserves glucidiques et la présence ou l'absence, le nombre et la disposition des flagelles\* :

- ✚ Pyrrophytophyta : algues unicellulaires\* marines ou d'eau douce,
- ✚ Euglenophycophyta : algues unicellulaires des eaux douces riches en matières organiques,
- ✚ Chrysophycophyta : la plupart sont unicellulaires. Eau douce, eau de mer,
- ✚ Chlorophycophyta : algues vertes. Unicellulaires ou pluricellulaires. Marines, eaux douces, milieux terrestres,
- ✚ Phæophycophyta : algues brunes. Toujours pluricellulaires, presque toutes marines,
- ✚ Rhodophycophyta : algues rouges. Surtout pluricellulaires et en grande majorité marines.

### 1.1.3 Position systématique, Description, Biologie et Ecologie des Espèces Etudiées

#### 1.1.3.1 L'espèce *Cladostephus hirsutus*

Systématique : Actuellement le nom de cette espèce est *Cladostephus hirsutus* (linnaeus) [18-20], elle peut être citée sous les appellations : *Fucus hirsutus* (linnaeus) et *Cladostephus verticillatus* (Lightfoot) Lyngbye.

Cette espèce appartient à :

- Embranchement : Phæophycophyta (Chromophytes). Classe : Phéophycées.
- Ordre : Sphacélariales. Famille : Cladostéphacées ou Fucophycées.

- Genre : *Cladostephus*. Espèce : *hirsutus* (Linnaeus).

Description [12] (figure 1.1) : Algue rappelant un petit goupillon noir. Les thalles forment des touffes molles, dressées de 10 à 25 cm de haut, brun foncé presque noir, fixés sur un disque basal. Les axes cylindriques portent des petits rameaux ramifiés qui sont insérés en cercle au même niveau autour de l'axe (verticillés\*); les rameaux les plus vieux, situés à la base de l'axe tombent et sont remplacés par de jeunes rameaux qui naissent au sommet. L'espèce voisine est le *Cladostephus spongiosus* Agardh au thalle plus mou et spongieux.

Biologie : C'est une algue pérennante\* (vit plusieurs années) subsistant à la mauvaise saison par son seul disque basal qui fixait le thalle au rocher et qui permettra la repousse (hémicryptophycée). Il s'agit d'un végétal autotrophe. Au cours de son cycle de développement, 2 générations semblables morphologiquement se succèdent : cycle digénétique isomorphe. Cette algue présente une multiplication végétative par l'intermédiaire de petites boutures qui apparaissent sur le thalle appelées propagules [12].

Écologie : Elle est photophile\*, espèce qui fréquente les rochers éclairés mais qui tolère très bien des habitats peu éclairés. On la rencontre dans l'étage infralittoral en milieu relativement calme, en Méditerranée et en Atlantique [12].

### 1.1.3.2 L'espèce *Zonaria tournefortii*

Systématique : Actuellement appelée *Zonaria tournefortii* (Lamouroux) Montagne [20], antérieurement, cette espèce portait l'appellation *Fucus tournefortii* Lamouroux [21], *Zonaria flava* Clément C. Agardh [22] et *Padina tournefortii* Lamouroux Montagne [22].

Cette espèce appartient à :

- Embranchement : Phæophycophyta (Cyanophytes). Classe : Phéophycées.
- Ordre : Dictyotales. Famille : Dictyotacées.
- Genre : *Zonaria*. Espèce : *turnefortii* Lamouroux.

Description (figure 1.2) [23] : L'espèce *Zonaria tournefortii* (Lamouroux) est une algue foliacée\* dichotome\* et à nervure centrale rougeâtre assez diffuse et présente seulement à la base, les extrémités consistent en des rameaux bruns jaunâtres divisés en lames lobées couvertes de stries concentriques. Elle mesure jusqu'à 20 cm de hauteur, de couleur brune jaunâtre.

Biologie : Cette algue à biotopes\* sciaphiles est présente toute l'année. Elle est gamétophyte\* et sporophyte\*, à spores\* dispersés à la surface du thalle. Elle se trouve de la surface jusqu'à une quarantaine de mètres de profondeur [23].

Ecologie : Cette algue possède une aire de répartition sur les côtes nord-est de l'océan atlantique (Afrique occidentale), dans l'atlantique nord-ouest et la méditerranée (à l'exception du golfe du lion et de l'adriatique) [23].

### 1.1.3.3 L'espèce *Bifurcaria bifurcata*

Systématique : Le nom correct de cette espèce est *Bifurcaria bifurcata* (Velley) Ross [24,25], d'autres noms ont été utilisés dans des travaux antérieurs :

*Pycnophycus tuberculatus* Kützting,

*Fucus tuberculatus*,

*Fucus bifucatus* Velley in Withering,

*Bifurcaria rotunda* (Hudson) Papenfuss,

*Bifurcaria tuberculata* (Hudson) Stackhouse.

L'espèce *Bifurcaria bifurcata* appartient à :

- Embranchement : Phæophycophyta (Chromophytes). Classe : Phéophycées
- Ordre : Fucales. Famille : Cystoseiracées.
- Genre : *Bifurcaria*. Espèce : *bifurcata* Ross.

Description (Figure 1.3) : Le thalle est formé de cordons jaunâtres simples à la base dont les ramifications alternées, cylindriques et de longueur inégale lui donnent un aspect en zig-zag. Les cordons sont larges de 3 à 4 mm pour une longueur d'environ 40 cm. Ces cordons sont ramifiés de manière dichotome\* [12,23].

Biologie : Algue autotrophe. La reproduction a lieu au printemps où l'on voit apparaître aux extrémités des renflements ou réceptacles jaunâtres renflés qui sont hermaphrodites (ils produisent des gamètes des 2 sexes). Le thalle est donc monoïque\* ou bisexué. Après libération des gamètes par les ouvertures (ostioles) des réceptacles, l'oeuf ou zygote\* donne un thalle à 2n chromosomes. Le cycle de développement ne met en jeu qu'une seule génération (le cycle est monogénétique diploïde\*) [12].



Figure 1.1 : *Cladostephus hirsutus* (Linnaeus)



Figure 1.2 : *Zonaria tournefortii* (Lamouroux)

Écologie : Algue pérennante qui se développe dans l'horizon supérieur de l'étage infralittoral\* sur les rochers semi-battus ou dans les cuvettes de niveau moyen et de bas niveau des côtes nord-est de l'Océan Atlantique, qui s'inscrit du nord de l'Irlande jusqu'au sud du Maroc avec des absences dans le golfe de Gascogne et les rives du Tage au nord du Maroc [13,26].

#### 1.1.3.4 L'espèce *Dictyopteris membranacea*

Systématique : Actuellement, cette espèce porte le nom de *Dictyopteris membranacea* (Stackhouse) Batters [11,12], d'autres appellations ont été aussi utilisées dans des travaux antérieurs :

*Fucus membranaceus* (Stackhouse) [21,22],

*Dictyopteris polypodioides* Lamouroux [21,22],

*Haliseris polypodioides* (Desfontaines) Agardh [27].

L'espèce *Dictyopteris membranacea* appartient à:

- Embranchement : Phæophycophyta (Chromophytes). Classe : Phéophycées ou Fucophycées.
- Ordre : Dictyotales. Famille : Dictyotacées.
- Genre : *Dictyopteris*. Espèce : *membranacea* Batters.

Description [12,23] (figure 1.4) : Algue brune atteignant 10 cm de hauteur dont le thalle brun jaunâtre aplati, mince se dédouble régulièrement (ramifié dichotomiquement) en lanières de 2-8 mm de large, à nervure centrale bien visible de la base au sommet.

Biologie [12,23] : Algue vivace, subsiste à la mauvaise saison par sa partie basale réduite à la nervure. Le cycle de développement voit alterner 2 générations (2 types de thalles semblables morphologiquement : cycle digénétique isomorphe\*).

Écologie [12,23] : Espèce cosmopolite qui se rencontre sur les rochers peu éclairés (espèce sciaphile\*) de l'étage infralittoral et de l'étage circalittoral\*.

#### 1.1.4 Classification des espèces étudiées

Les espèces que nous avons étudiées dans le cadre du présent travail appartiennent à l'embranchement des Phaeophycophyta (algues brunes), leur position systématique est donnée dans la planche 1.1



Figure 1.3 : *Bifurcaria bifurcata* (Velley) Ross.



Figure 1.4 : *Dictyopetris membranacea* (Stackhouse)

Phylum	Embranchement	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce
Chlorophyta	Pyrrophytophyta					
Chromophyta	Phaeophycophyta	Chlorophycées	Fucales	Dictyotaceae	Cladostephus	<i>C. hirsutus</i>
Cyanophyta	Euglenophycophyta	Phéophycées	Dictyotales	Fucaceae	Bifurcaria	<i>B. bifurcata</i>
Dinophyta	Chrysophycophyta	Rhodophycées	Sphacelariales	Cystoseiraceae	Zonaria	<i>Z. tournefortii</i>
Euglenophyta	Chlorophycophyta		Nemalionales	Hormosiraceae	Dictyopteris	<i>D. membranacea</i>
Rhodophyta	Rhodophycophyta			Sargassaceae		

*Cladostephus hirsutus* *Zonaria Tournefortii* *Bifurcaria bifurcata* *Dictyopteris membranacea*

Planche 1.1 : Position systématique des espèces étudiées

## 1.2 Composition chimique des algues brunes

### 1.2.1 – Composés terpéniques

C'est en 1879 que la chimie des terpènes a vu le jour, lorsque Wallach découvre dans un placard du laboratoire de Kekulé des flacons contenant des échantillons que celui-ci avait obtenus par distillation d'un certain nombre de plantes. Excellent expérimentateur, il parvient grâce à un travail d'une grande méticulosité, à séparer les différents constituants des huiles essentielles. Cet ensemble de produits, dont la chimie est pratiquement inconnue lorsque Wallach commence ses recherches, comprend des hydrocarbures appelés terpènes, en raison de la présence de certains d'entre eux dans l'essence de térébenthine, et des composés oxygénés apparentés aux terpènes et classés sous le nom générique de camphres.

Son travail, qui marque le début de la chimie moderne des substances naturelles, aura très vite des applications pratiques importantes dans l'industrie des huiles essentielles, en particulier celle des parfums. Il reçoit le prix Nobel de chimie 1910. En 1887, il propose pour la première fois, la notion de squelette isoprénique qui représente l'unité de base de toute structure terpénique. En fait, les terpènes sont un assemblage d'unités appelées isoprène ou méthyl-butadiène ( $C_5H_8$ ). La structure générale d'un terpène est donc  $(C_5H_8)_n$ . Les travaux de Ruzicka, par la suite, ont été d'un grand apport dans le développement de la chimie des terpénoïdes. On a montré ensuite que les terpènes sont obtenus par un couplage d'unités isopréniques ou par un assemblage de terpènes acycliques (géraniol, farnésol,..) en faisant intervenir des réactions de cyclisation et/ou des réarrangements [28].

La classe des terpénoïdes, largement répandue dans le règne végétal (supérieur et inférieur), est aussi connue chez les animaux et les micro-organismes. Au sein des différents organismes qui les produisent, les terpénoïdes jouent un rôle fonctionnel de défense et de communication. Dans la vie de l'homme, les produits terpéniques sont largement utilisés dans la parfumerie, les savons et cosmétiques et en pharmacologie.

Dans le domaine des produits naturels marins, la classe des terpénoïdes occupe une place privilégiée au regard du nombre de structures originales isolées ainsi qu'aux propriétés bioactives de ces produits. Une synthèse bibliographique complète concernant les dérivés terpéniques des algues a été déjà effectuée au sien de notre laboratoire d'accueil [29]. C'est pourquoi nous nous limiterons dans cette partie, après une discussion sur la biosynthèse

des terpènes, à l'étude des données bibliographiques concernant les diterpènes issus de l'algue brune *Bifurcaria bifurcata* et les caroténoïdes des algues brunes.

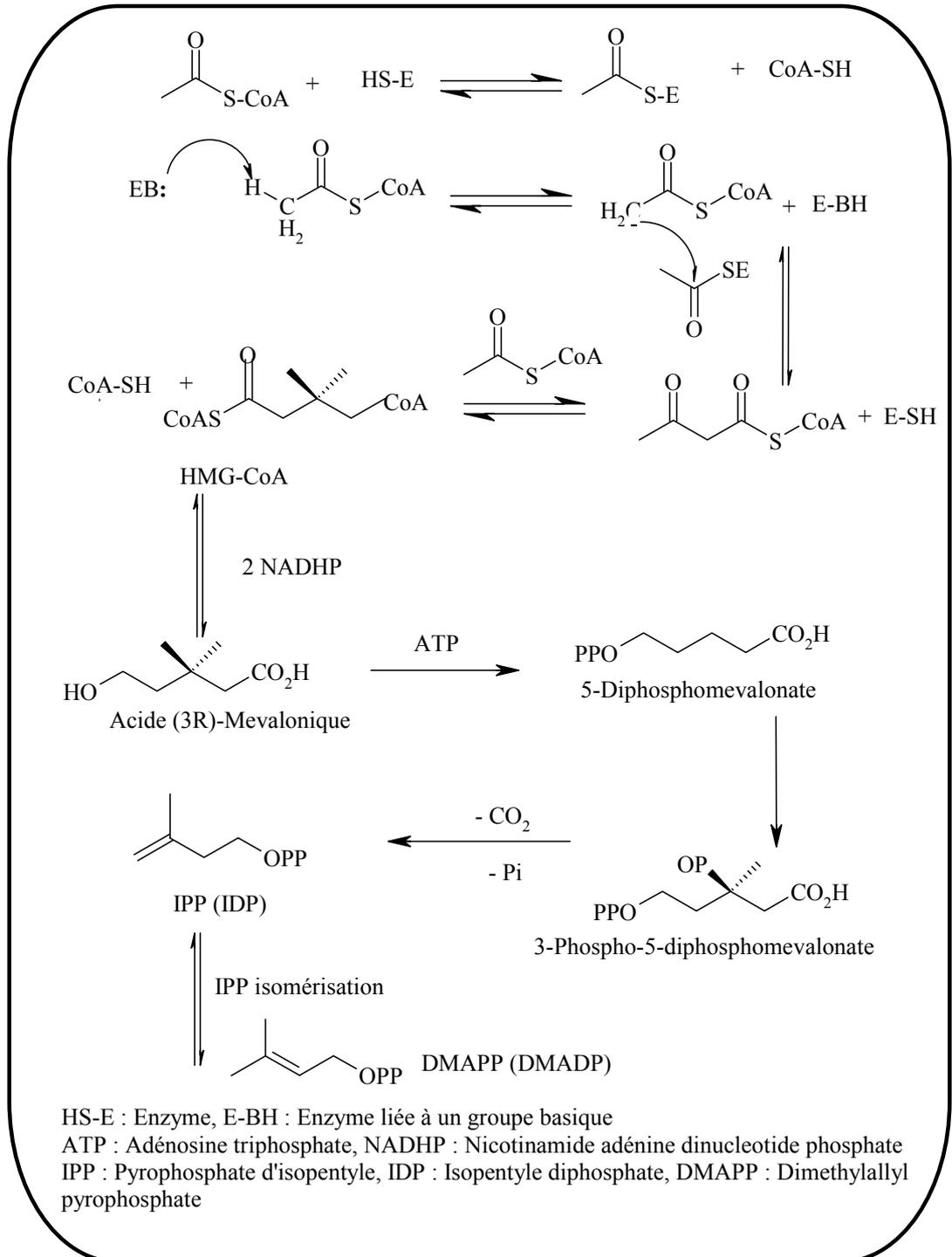


Figure 1.5 : Biosynthèse du Pyrophosphate d'isopentényle

#### 1.2.1.1.1 Biosynthèse des composés terpéniques :

L'élucidation du mécanisme biosynthétique des terpènes est reliée à deux événements : la découverte en 1951 de l'acétylcoenzyme A (acetylCoA), précurseur de l'acide mévalonique [30], d'une part, et la transformation enzymatique de l'acide mévalonique en squalène [31], d'autre part (figure 1.5). L'obtention des différentes classes de terpènes est réalisée grâce à des couplages d'unités isopréniques (figure 1.6). Le couplage régulier tête-à-queue de deux unités isopréniques permet d'obtenir un monoterpène ( $n = 2$ ), un sesquiterpène ( $n = 3$ ) ou un diterpène ( $n = 4$ ). On observe, toutefois, un couplage tête-à-tête ou queue à queue de terpènes légers pour former des terpènes de poids moléculaire élevé (sesterpènes  $n = 5$ , triterpènes  $n = 6$ , tetraterpènes ou caroténoïdes  $n = 8$ ). La voie du mévalonate utilisant l'acétate a été acceptée durant des décennies comme seule et unique voie de biosynthèse pour tous les terpénoïdes des êtres vivants. Les travaux de Rhomer ont permis de mettre en évidence une nouvelle voie métabolique et de proposer un nouveau schéma biogénétique [32]. L'élucidation complète de cette nouvelle voie biogénétique (métabolisme glucidique) a été possible par une combinaison d'incorporations de précurseurs deutériés dans les isoprénoïdes de bactéries, d'algues ou les chloroplastes de végétaux. Cela a permis de déterminer l'origine des hydrogènes des unités isopréniques et des méthodes de biologie moléculaire ont permis l'accès aux gènes et enzymes de cette voie (figure 1.7) [33].

#### 1.2.1.1.2 Diterpènes des algues marines

Au même titre que les monoterpènes et les sesquiterpènes, les composés diterpéniques constituent une grande classe de composés isopréniques chez les macroalgues, les phéophycées en renferment le pourcentage le plus élevé (figure 1.8). Les diterpènes sont bien connus dans le règne végétal (supérieur et inférieur) comme en témoigne la richesse bibliographique décrite dans ce domaine [34-39], on les rencontre aussi chez certains insectes et d'autres organismes marins tels que les éponges [40-43]. L'activité biologique fort intéressante décelée chez de nombreux diterpènes naturels [44-45] a suscité un engouement particulier chez les chimistes organiciens, qui, profitant de l'essor que connaît la synthèse organique, consacrent beaucoup de travaux à la synthèse des structures diterpéniques isolées à partir des produits naturels [46-49]. En outre, le développement croissant des techniques spectroscopiques, notamment la RMN mono et bidimensionnelle et la spectrométrie de masse associées aux techniques de séparation

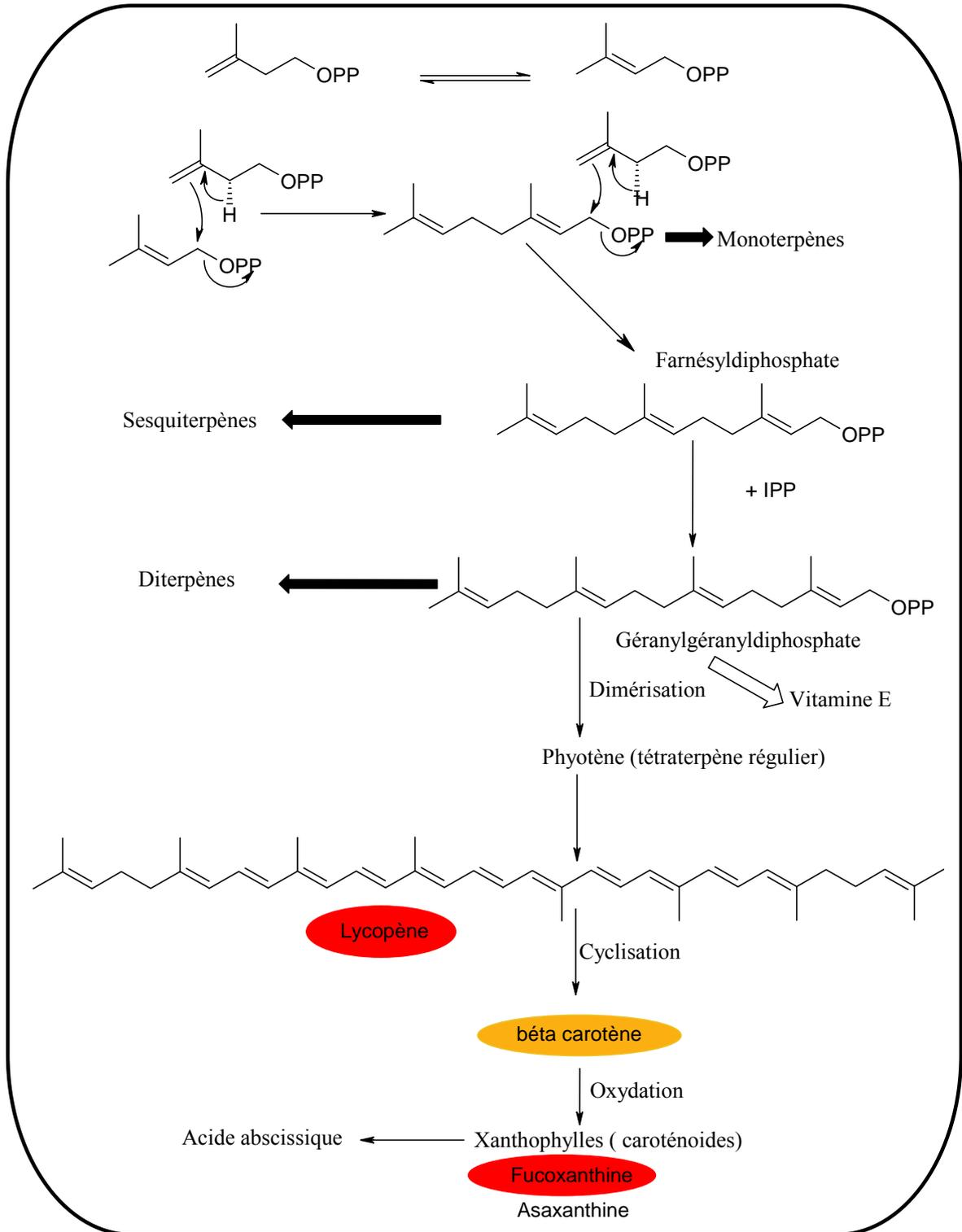


Figure 1.6 : Biosynthèse des terpénoïdes à partir de l'IPP

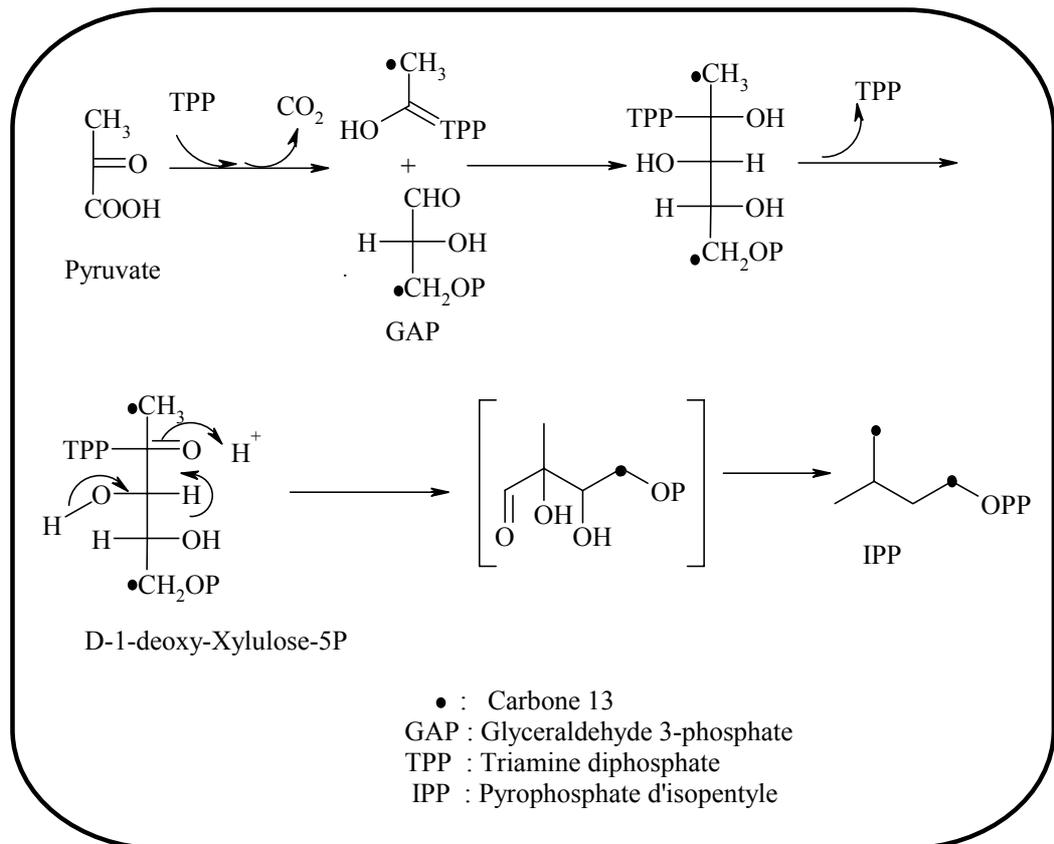


Figure 1.7 : Biosynthèse des terpènes par le métabolisme glucidique

par chromatographie, a permis de contribuer à l'identification de nouveaux squelettes diterpéniques très complexes. Ces structures peuvent être linéaires, monocycliques, bicycliques, tricycliques, tetracycliques, macrocycliques et parfois contenant un noyau indolique à structure alcaloïde [50-53]. Signalons enfin l'existence de diterpènes bromés isolés plus particulièrement des algues rouges et dotés de propriétés bioactives intéressantes, de 1971 à 2000 quatre vingts structures de ce type ont été caractérisées [54]. Les diterpènes peuvent aussi être associés à un noyau hydroquinonique en formant ce qu'on appelle les méroditerpènes, ce sont des terpènes à biogenèse mixte faisant intervenir comme précurseurs l'acide mévalonique et l'acide shikimique. Cette classe de molécules est très répandue chez les algues et un grand nombre de méroditerpènes a été isolé, tout particulièrement chez la famille des Cystoseiracées (Phéophycées).

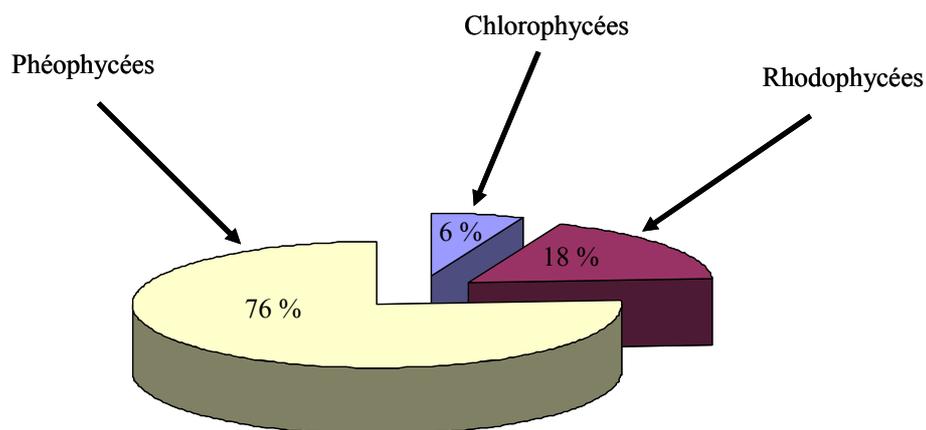


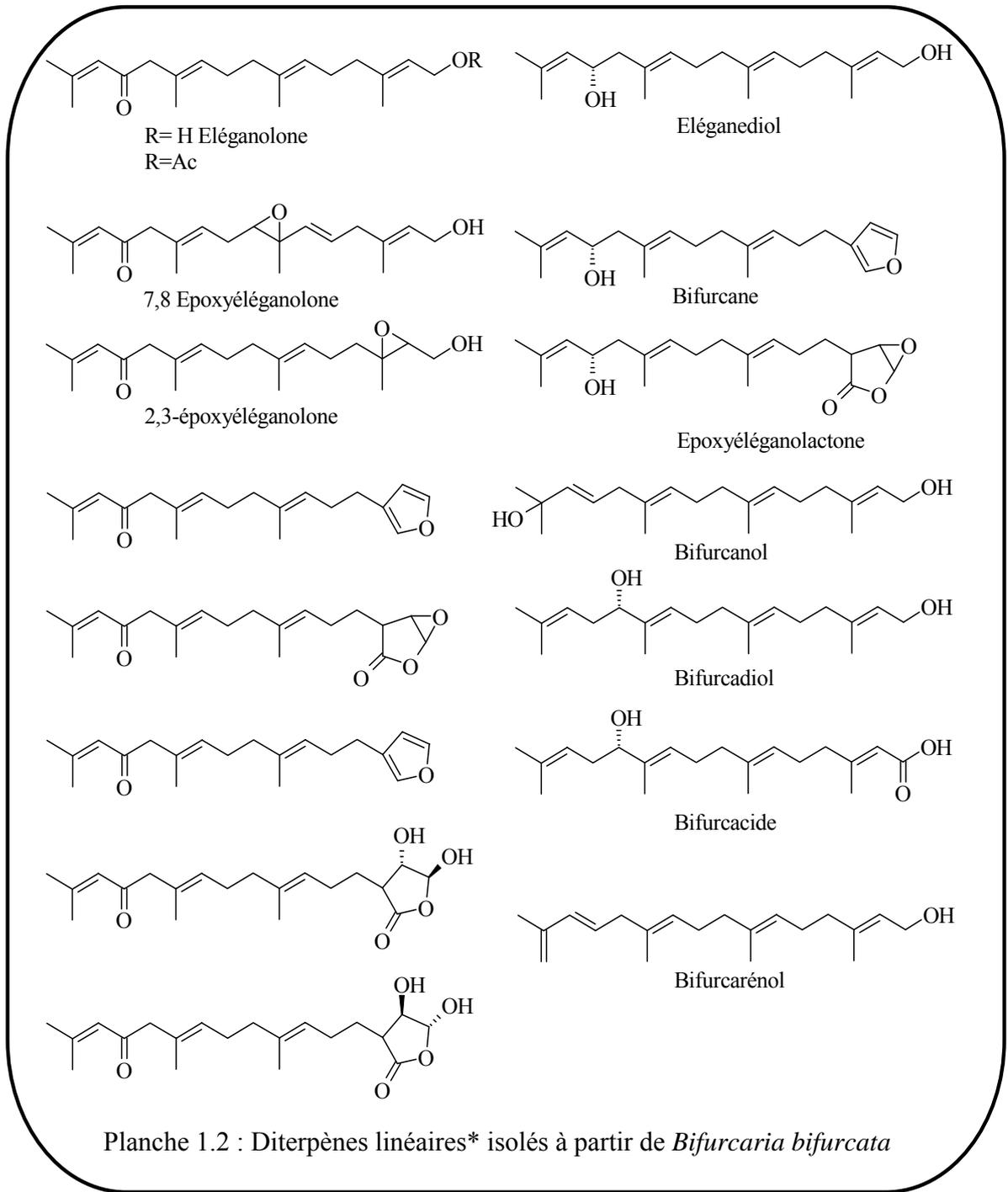
Figure 1.8 : Répartition des diterpènes dans les macroalgues

#### 1.2.1.1.3 Diterpènes de l'algue brune *Bifurcaria bifurcata*

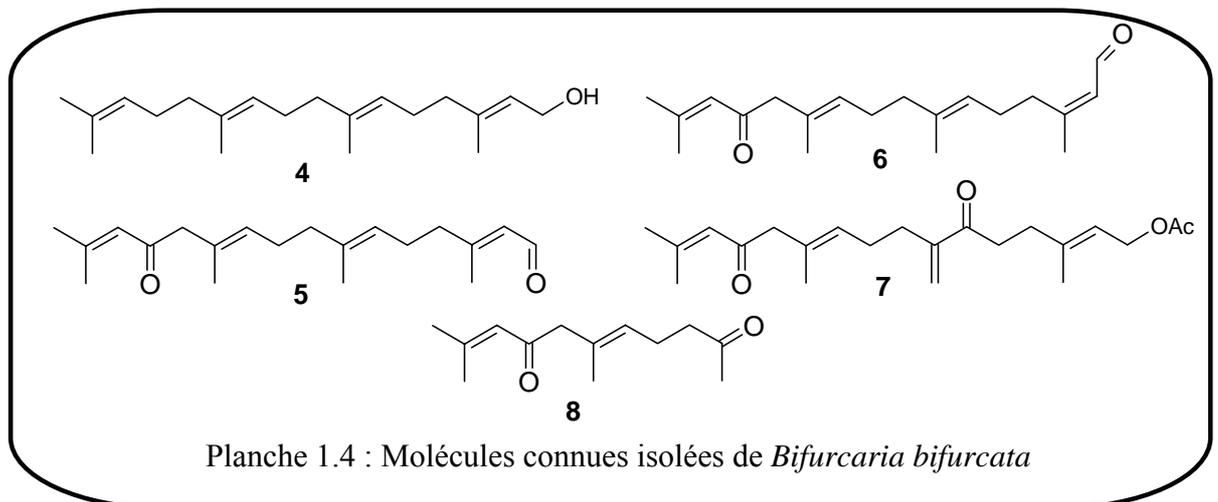
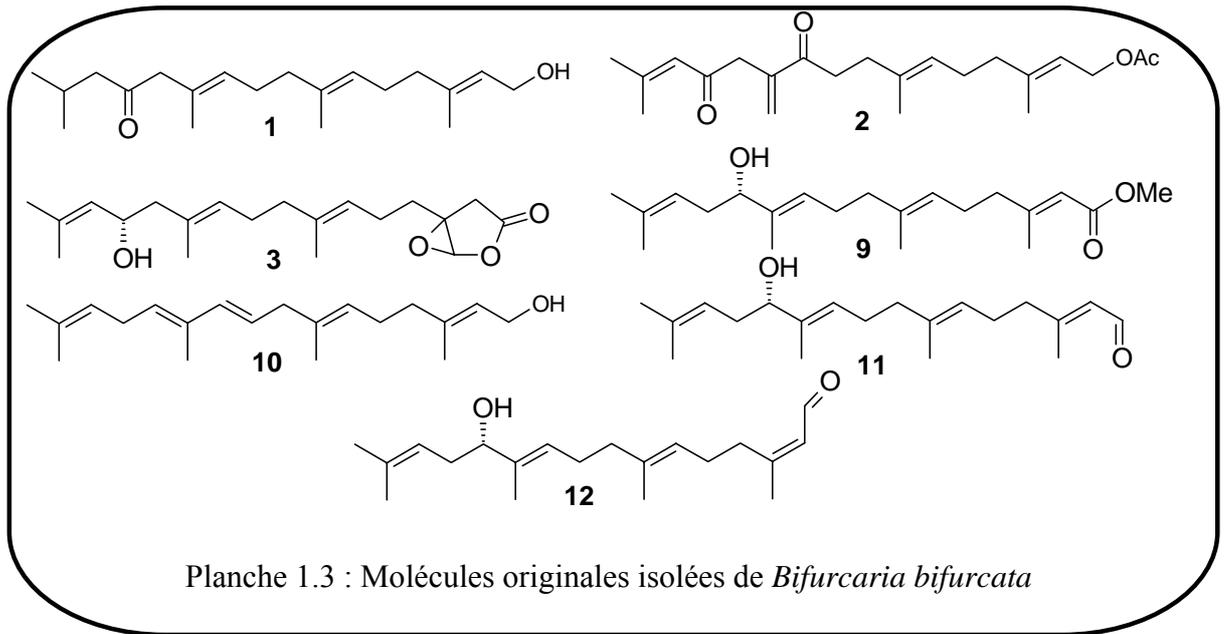
Le genre *bifurcaria* a été la source d'isolement d'un grand nombre de diterpènes de structure isoprénique acyclique souvent oxygénée. Ce sont des molécules à 20 atomes de carbone difonctionnalisées (dialcools, alcool - cétone, alcool - époxyde, alcool - acide carboxylique) ou parfois tri-fonctionnalisées [55-60]. Parmi les molécules isolées, on relève chez certains diterpènes la présence d'un noyau furanique, plus ou moins oxydé, en bout de chaîne [61, 62], ces structures sont assez rares chez les algues. Les structures diterpéniques isolées à partir de l'espèce *Bifurcaria bifurcata* sont présentées dans la planche 1.2.

Les travaux de recherche effectués au niveau de notre laboratoire d'accueil [29] sur l'espèce *Bifurcaria bifurcata* ont mené à l'isolement de nombreux nouveaux diterpènes ainsi que de diterpènes déjà connus mais rencontrés pour la première fois chez cette espèce. Dans le cadre de ces travaux, l'algue a été récoltée à Roscoff et Quiberon en Bretagne (côtes atlantiques) ainsi que sur les côtes marocaines respectivement à El Jadida et à Oualidia (côtes atlantiques).

Le fractionnement de l'extrait éthéré de *Bifurcaria bifurcata*, récoltée à Quiberon et Roscoff, par CLHP en phase normale a mené à l'isolement de trois nouveaux diterpènes (**1,2,3**) (planche 1.3) [63] et de cinq structures déjà connues mais identifiées pour la première fois chez cette espèce (**4,5,6** planche 1.4) [64] et (**7,8** planche 1.4) [65]. A partir de l'extrait éthéré de *Bifurcaria bifurcata* récoltée à Oualidia, quatre nouveaux diterpènes ont été isolés et leur structure caractérisée (**9,10,11,12** planche 1.3) [66]. L'étude de la

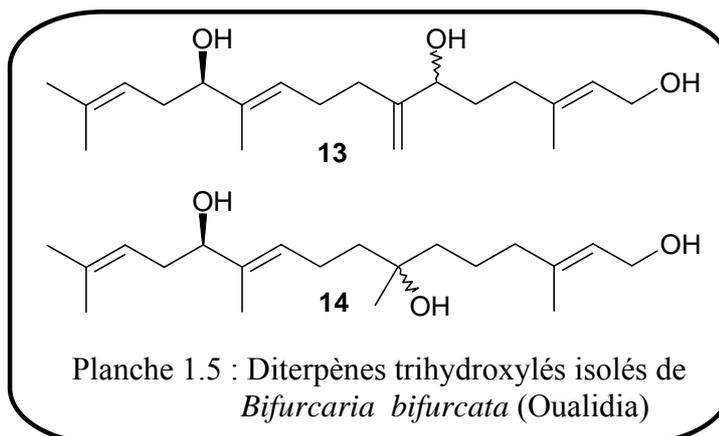


\*. Les éthers cyclisés et les lactones sont considérés comme des fonctions fixées sur le squelette diterpénique linéaire.

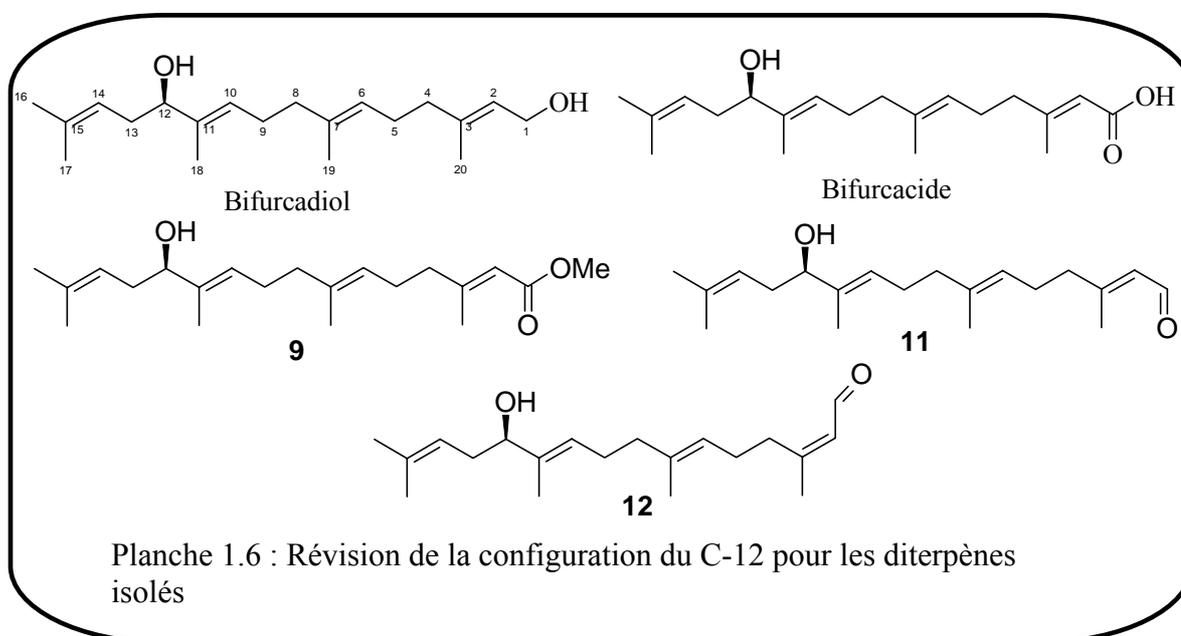


variation saisonnière de la composition en diterpènes et stérols de cette espèce a également été effectuée [67], ainsi qu'une comparaison de sa constitution en diterpènes avec deux autres espèces appartenant à la famille des Cystoseiracées [68].

La poursuite des travaux sur l'espèce *Bifurcaria bifurcata* provenant de Oualidia a été consacrée à l'étude par CLHP à polarité de phases inversée de la fraction polaire obtenue à partir de l'extrait chloroforme/méthanol (1/1). Le fractionnement de cette fraction sur colonne ouverte de silice a permis de récupérer, entre autre, deux fractions éluées respectivement avec l'acétate d'éthyle (100%) et le mélange AcOEt/MeOH (98/2). L'analyse par CLHP à polarité de phases inversée en mode isocratique a permis d'isoler deux nouvelles structures, la caractérisation structurale montre qu'il s'agit de deux diterpènes trihydroxylés [69] (**13,14** planche 1.5).



Il faut préciser que l'ensemble des diterpènes isolés de l'espèce récoltée à Oualidia possède une fonction oxygénée en C-12 (planche 1.6), alors que pour les autres lieux de récolte cette fonction est placée en C-13. A ce titre, notre laboratoire d'accueil a montré récemment [69], par application de la méthode de Mosher modifiée [70] sur le bifurcadiol et les composés **13** et **14**, que le carbone asymétrique C-12 dans la série des diterpènes isolés de l'espèce récoltée à Oualidia est de configuration *R*, au lieu de *S* comme elle était décrite jusqu'à présent sur la base d'une détermination par la méthode de Horeau [59]. Nous avons vérifié récemment que pour l'éléganediol et ses dérivés, le C-13 était également de configuration *R* au lieu de *S* comme décrit précédemment.



#### 1.2.1.1.4 Caroténoïdes des algues marines

Les caroténoïdes appartiennent à la famille des terpénoïdes (ou isoprénoïdes) : ce sont des polymères de l'isopentyl diphosphate à 40 atomes de carbone. Lorsque la molécule est un hydrocarbure, on parle alors de carotène, tandis que la présence d'oxygène sur la chaîne carbonée sous forme de groupements hydroxylés ou autres fait appel à la notion de xanthophylles. Chez les plantes, ces composés participent à la collecte de l'énergie lumineuse, ils protègent contre l'excès de lumière, ce sont les précurseurs d'une hormone végétale (l'acide abscissique) et ils confèrent leur couleur à certaines fleurs ou fruits. Chez les animaux et l'homme (qui ne les synthétisent pas), ils jouent le rôle de micronutriment avec leur activité anti-oxydante, ce sont également des pigments chez certains animaux (la couleur de la chair du saumon est attribuée à l'asaxanthine).

Environ 400 pigments caroténoïdes ont été isolés chez les végétaux [71] et plus de 100 sont d'origine marine : 60 chez les algues [72], 42 chez les éponges [73], 15 chez les mollusques dont la moule [74] et une trentaine chez les crustacés [75]. La peridinine et la fucoxanthine, qui sont des pigments exclusivement marins, sont produites en grande quantité dans la nature, les autres pigments caroténoïdes majoritaires sont le  $\beta,\beta$ -carotène, la zéaxanthine, la diatoxanthine, la violaxanthine et la néoxanthine (planche 1.7) [76].

##### 1.2.1.1.4.1 Biosynthèse des caroténoïdes

Les caroténoïdes, à l'instar des autres terpènes, sont obtenus par condensation d'unités de l'IPP (figure 1.6), le caroténoïde le plus simple est le phytène obtenu par dimérisation du géranylgeranylpyrophosphate. La déshydrogénation du phytène donne le lycopène *via* le phytofluène et le neurosporène, respectivement. Des réactions de cyclisation enzymatiques produites au sein du neurosporène suivies d'une déshydrogénation (de même pour le lycopène) mènent au  $\beta,\beta$ -carotène. L'oxydation enzymatique de ce dernier conduit aux xanthophylles (canthaxanthine, zéaxanthine et violaxanthine) (figure 1.9) [77]. L'examen de la structure chimique des différentes xanthophylles métabolisées dans la nature montre qu'elle comprend une chaîne hydrocarbonée conjuguée jouant le rôle de chromophore, reliée à ses deux extrémités à des cycles à six atomes de carbone par des liaisons simples carbone-carbone. Les cycles hexaniques portent des groupements hydroxyle, cétone et époxyde. Chez certaines xanthophylles, on remarque sur l'un des bouts de la chaîne une liaison allénique

(fucoxanthine, néoxanthine..). Nous allons présenter toutes les voies plausibles de biosynthèse de cette liaison, qui n'a pas encore été totalement élucidée [78].

#### 1.2.1.1.5 Caroténoïdes des algues brunes :

Les phéophycées possèdent les chlorophylles a, c1 et c2. La composition en carotènes se limite exclusivement au  $\beta,\beta$ -carotène, quant aux xanthophylles, la fucoxanthine est toujours majoritaire devant la violaxanthine [79]. La diatoxanthine et la diadinoxanthine, parfois présentes en très faible quantité, pourraient provenir de contaminations par des diatomées [80]. L'étude approfondie des caroténoïdes des phéophycées mène à l'identification d'autres produits mineurs tels que le fucoxanthinol et la néoxanthine (planche 1.7). Nous allons nous focaliser plus particulièrement sur le caroténoïde majoritaire, à savoir la fucoxanthine : stéréochimie, biosynthèse, réactivité et propriétés.

##### 1.2.1.1.5.1 Stéréochimie\* de la fucoxanthine :

La fucoxanthine est le caroténoïde majoritaire des algues brunes, diatomées, chrysophytes et prymnesiophytes [81]. L'isomère naturel de la fucoxanthine isolé dans les algues brunes est le *all-E* (3S,5R,6S,3'S,5'R,6'R) (planche 1.8). Cette stéréochimie a été confirmée par l'étude des algues *Fucus serratus*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata*, *Laminaria digitata* et *Laminaria saccharina* [82]. L'isomère 9'Z-6'R formé au cours de la manipulation expérimentale de l'extrait a toujours été confondu avec l'isomère *all-E*-6'S [82].

L'étude de la stéréochimie de la partie époxyde a été étudiée dans la violaxanthine, la lutéine époxyde et la néoxanthine, elle a confirmé la structure (3S,5R,6S) [83], cette même étude indique que la stéréochimie de la partie époxyde est identique chez toutes les xanthophylles. L'étude de la configuration absolue de la fucoxanthine [84] a confirmé la stéréochimie de la partie époxyde et a permis d'élucider la stéréochimie de la partie allénique.

L'étude de la stéréochimie de la néoxanthine, un autre caroténoïde allénique, a montré que l'isomère le plus abondant dans les différentes classes d'algues est celui de configuration (3S,5R,6S,3'S,5'R,6'R) [85, 86], c'est-à-dire de même stéréochimie que celle de la fucoxanthine (planche 1.8).

-----

\* : Un rappel théorique de la stéréochimie des allènes est donné dans la planche 1.9.

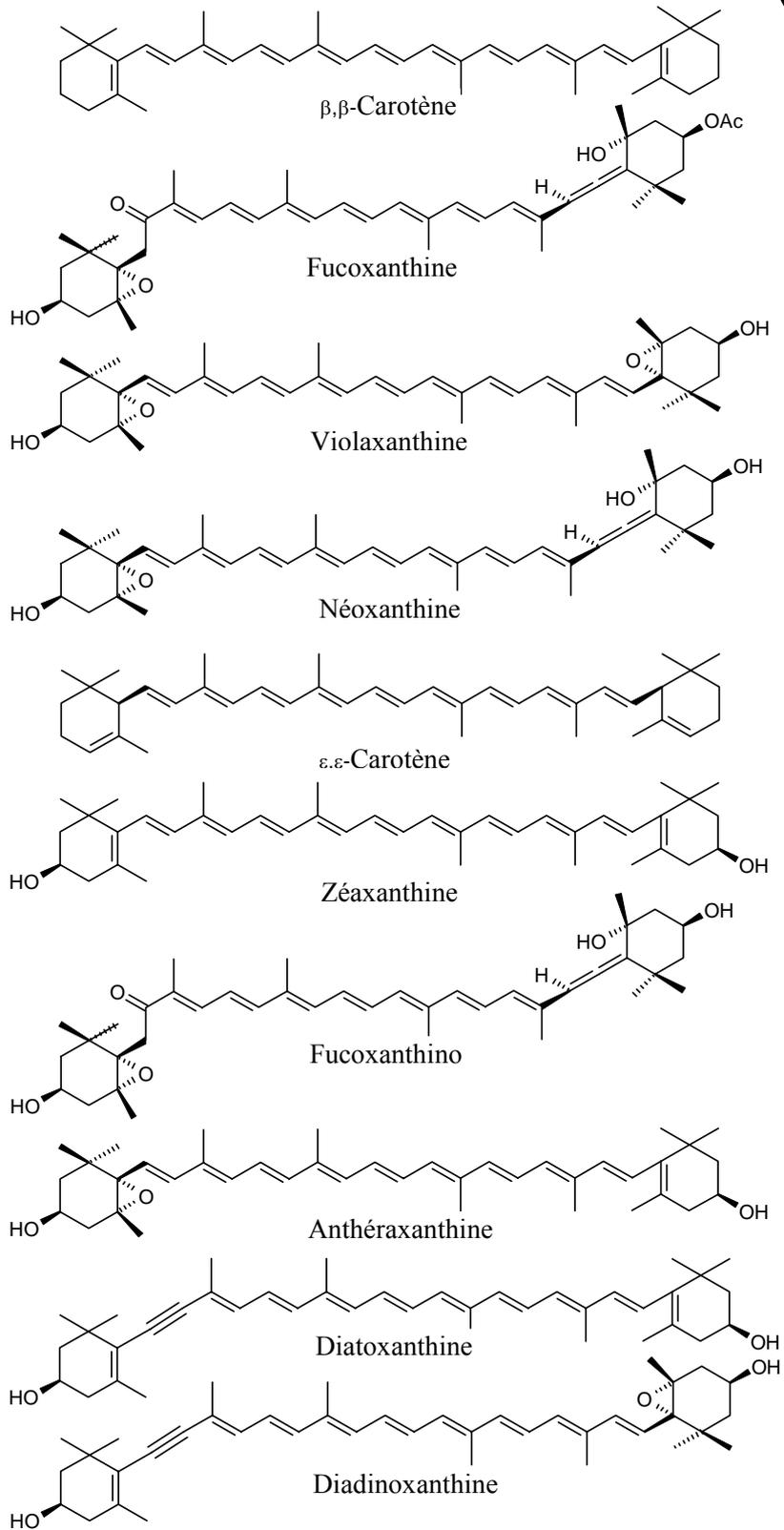


Planche 1.7 : Caroténoïdes d'algues brunes (Phéophycées)

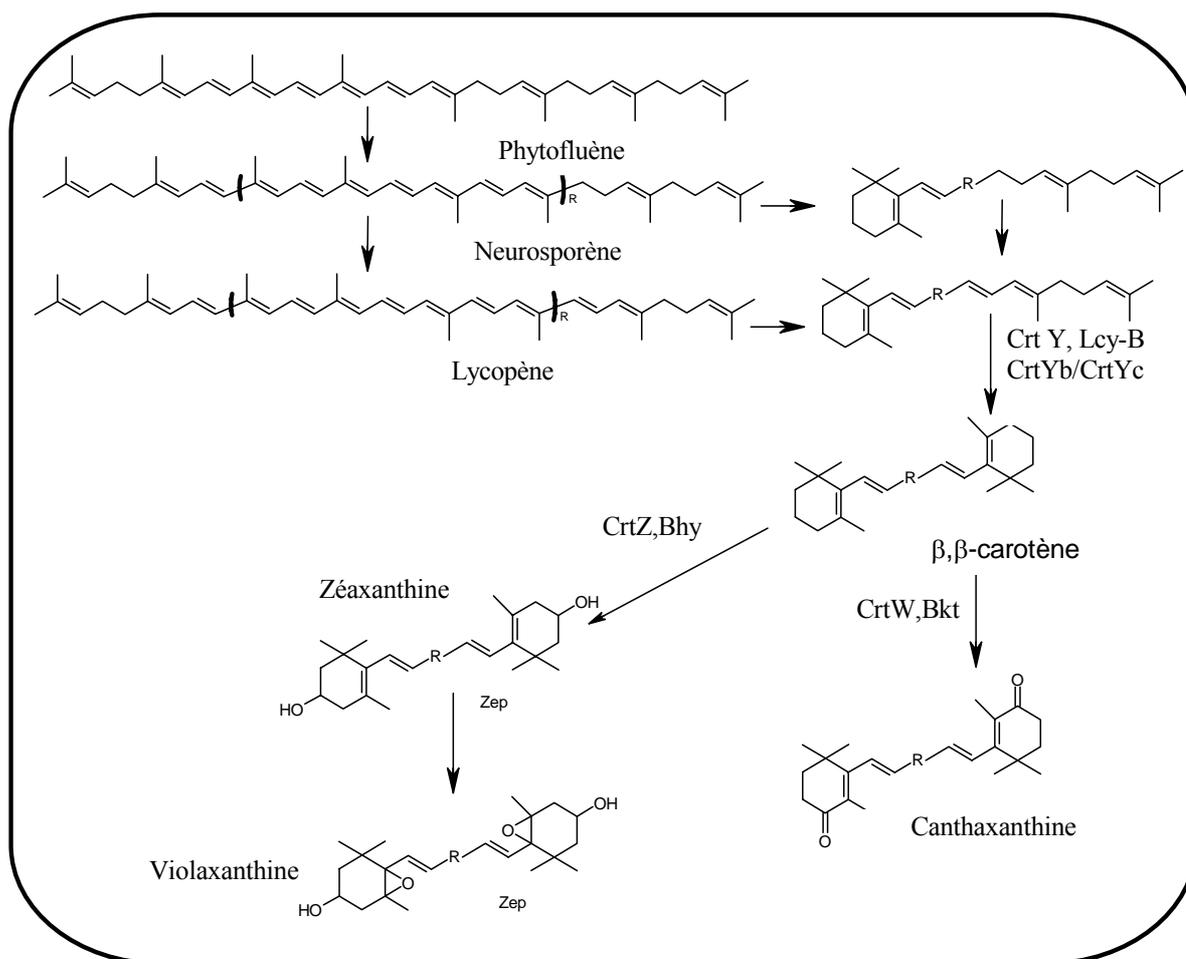
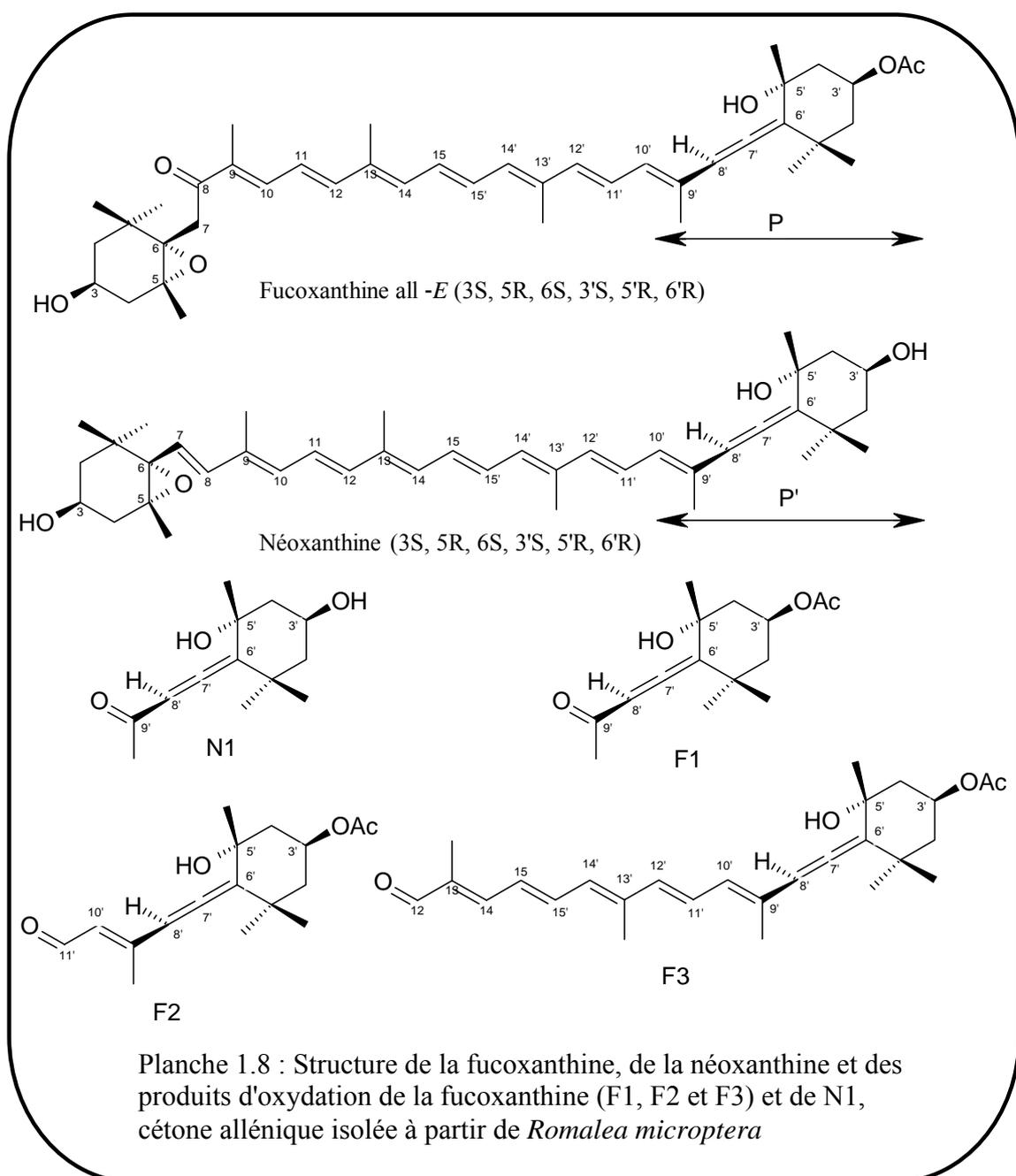


Figure 1.9 : Biosynthèse des caroténoïdes à partir du lycopène

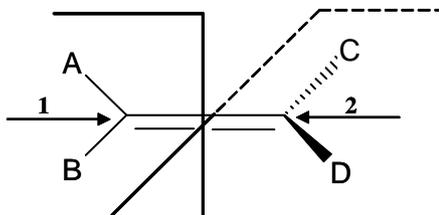
CrtY: eubacterial lycopene synthase, Lcy-B : eukaryotic lycopene cyclase, CrtYb et CrtYc: protein components of the heterodimeric lycopene cyclase from gram positive bacteria, CrtZ: bacterial  $\beta$ -carotene hydroxylase, Bhy: eukaryotic  $\beta$ -carotene

De plus l'étude des sécrétions thoraciques de la sauterelle *Romalea Microptera*, ayant un effet répellant contre les prédateurs, a permis d'isoler la cétone allénique N1 de même configuration (planche 1.8) [87]. L'oxydation de la fucoxanthine avec du permanganate donne un mélange d'aldéhydes et de cétones alléniques, la séparation de ces derniers par chromatographie montre qu'il s'agit des produits F1, F2 et F3 (planche 1.8) [88, 89]. La cétone N1 et le produit d'oxydation F1 représentent, respectivement, le bout de chaîne allénique oxydé de la néoxanthine et de la fucoxanthine (P' et P planche 1.8). L'étude de la stéréochimie des deux cétones a été réalisée par une expérience de diffraction

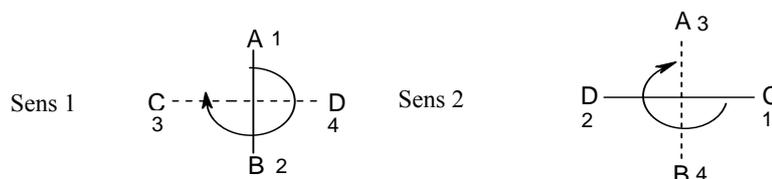
aux rayons X, les produits N1 et F1 sont transformés en cristaux sous forme de p-bromobenzoate par des réactions qui préservent la stéréochimie des trois centres asymétriques [90-92]. L'étude des spectres de rayons X des cristaux monoclinique et orthorhombique, respectivement, de N1 et de F1 comparée à celle des spectres des produits N1 et F1 synthétisés [93] a permis de confirmer la structure des deux allènes. Il est important de noter que la stéréochimie de la partie époxyde est identique pour toutes les xanthophylles, la même constatation est faite pour la stéréochimie de la partie allénique. Ces résultats permettent de conclure que la biosynthèse des xanthophylles est un processus général.



Les allènes sont des composés qui possèdent deux doubles liaisons l'une à côté de l'autre ( $C=C=C$ ), ils présentent une activité optique sans pour autant posséder de carbones asymétrique. Ils disposent d'un axe chiral (chiralité axiale selon Cahn, Ingold et Prelog). Les orbitales  $\pi$  des deux doubles liaisons ne sont pas dans le même plan, mais dans des plans perpendiculaires.

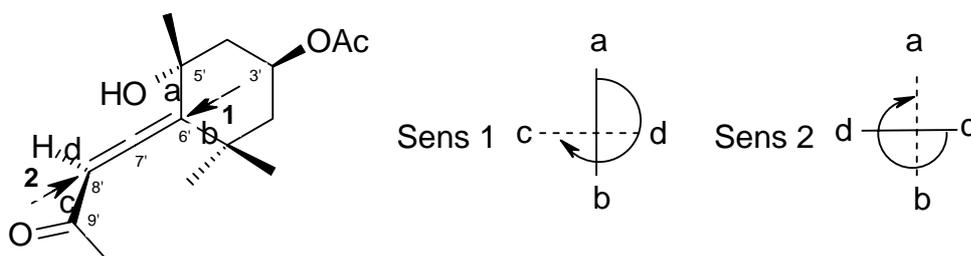


Pour déterminer la configuration absolue, on utilise les règles de priorité de Cahn-Ingold-Prelog, en ajoutant une nouvelle règle : « Les groupes les plus près sont prioritaires par rapport aux groupes les plus éloignés ». Les descripteurs  $aR$  et  $aS$  sont quelquefois utilisés pour distinguer la chiralité axiale de celle d'autres types, mais l'emploi du préfixe 'a' est optionnel [94-95]. Les molécules comportant des axes chiraux peuvent également être considérées comme des hélices et leur configuration peut être caractérisée par  $P$  ou  $M$  d'une manière analogue à celle des isomères configurationnels [96]. Ainsi, si l'on regarde dans le sens 1 ou dans le sens 2, voici ce que l'on observe :



Considérons que  $A > B$  et  $C > D$  ( $>$  : priorité). D'après la règle ci-dessus, dans le sens 1, Les groupes  $A$  et  $B$  sont prioritaires par rapport à  $C$  et  $D$ , dans le sens 2, c'est le contraire. On remarque que si l'on regarde dans le sens 1 ou dans le sens 2, on tombe sur la même configuration  $R$  ( $aR$  ou  $M$ ), ce qui montre que cette configuration s'applique à la fonction allène ( $C=C=C$ ) et non à un seul atome de carbone.

Prenons comme exemple la fucoxanthine :



Avec  $a > b$  et  $c > d$ , on remarque que la configuration est  $R$  ( $aR$  ou  $M$ ) selon que l'on regarde dans le sens 1 ou dans le sens 2 : c'est la configuration de la liaison allénique ou ( $C 6'$ ,  $C 7'$  et  $C 8'$ ). Selon Liaaen –Jensen [78], on peut se permettre de dire configuration  $6'R$  et ça sous entend la configuration de la liaison allénique.

Planche 1.9 : Rappel théorique sur la stéréochimie des allènes

#### 1.2.1.1.5.2 Biosynthèse des allènes

L'oxydation photosensibilisée du 3-hydroxy- $\beta$ -ionol [97-98] dans le méthanol en milieu alcalin et en présence de rose bengal\* produit la cétone allénique N1 (figure 1.10-a), il a été suggéré que par analogie à cette réaction, la biosynthèse des caroténoïdes alléniques peut être réalisée par oxydation similaire de la zéaxanthine qui conduit alors à l'isomère allénique (6'S) (figure 1.10-b) [94] de la néoxanthine ou de la fucoxanthine. D'autres travaux ont proposé [93, 99] l'obtention de la néoxanthine par oxydation de la violaxanthine, c'est un processus concerté dans lequel il y a élimination du proton 7' et ouverture de l'époxyde 5', 6'. Cette réaction conduit aussi à l'isomère allénique (6'S) (planche 1.10). Les hypothèses de biosynthèse des caroténoïdes alléniques développées ci-dessus ont été basées sur le fait que l'isomère allénique (6'S) est le précurseur biogénétique du (6'R) [100] et que l'isomère (6'S) existe dans la nature [101, 102]. Plus tard, il a été montré (correction de structure) que l'isomère (6'S) n'a jamais existé dans la nature [78] et que l'isomère allénique (6'S) mentionné dans certaines publications [100, 103, 104] est le résultat d'une erreur d'identification comme c'est le cas de l'isomère (9'Z, 6'R) de la fucoxanthine identifié initialement comme étant l'isomère (6'S) de la fucoxanthine [78, 82, 104]. Les travaux effectués sur l'isomérisation (réversible) R/S (S/R) [97,82] montrent qu'elle nécessite des conditions extrêmes de lumière et de grande quantité d'iode. Ceci peut être une interprétation plausible de l'absence d'isomère (6'S) dans la nature. Liaaen-Jensen et al [78] ont proposé deux alternatives de biosynthèse de l'isomère allénique (6'R) à partir de la zéaxanthine (figure 1.11) :

Voie A : une réaction péricyclique avec un oxygène singulet permettant d'obtenir l'allène (6'S), ce qui nécessite ensuite l'isomérisation en 6'R. Cette voie n'a pas beaucoup d'évidence à cause de l'absence de l'isomère (6'S) dans la nature,

Voie B : une élimination-anti menant directement à l'isomère (6'R).

En fait, jusqu'à présent ce ne sont que des hypothèses qui ont été proposées et l'élucidation définitive de la biosynthèse des caroténoïdes alléniques demeure un challenge pour les biochimistes [78].

#### 1.2.1.1.5.3 Réactions et propriétés de la fucoxanthine

Un procédé d'isolement de la fucoxanthine simple et efficace a été développé [105]. Il est basé sur la séparation par chromatographie et les propriétés de partage. La fucoxanthine avec une stéréochimie (3S, 5R, 6S, 3'S, 5'R, 6'R) subit des réactions de

stéréomutation (isomérisation) R/S en solution dans le benzène, en présence d'iode et de diphenyl-di-sélénure ( $\text{Ph}_2\text{Se}_2$ ) ou de diphenyl-di-tellure ( $\text{Ph}_2\text{Te}_2$ ) [106-107]. Pour expliquer la réaction d'isomérisation, un mécanisme d'attaque de l'iode sur la liaison allénique a été proposé [108] et conforté par des calculs de densité de charge (AM1 : Austin Model 1).

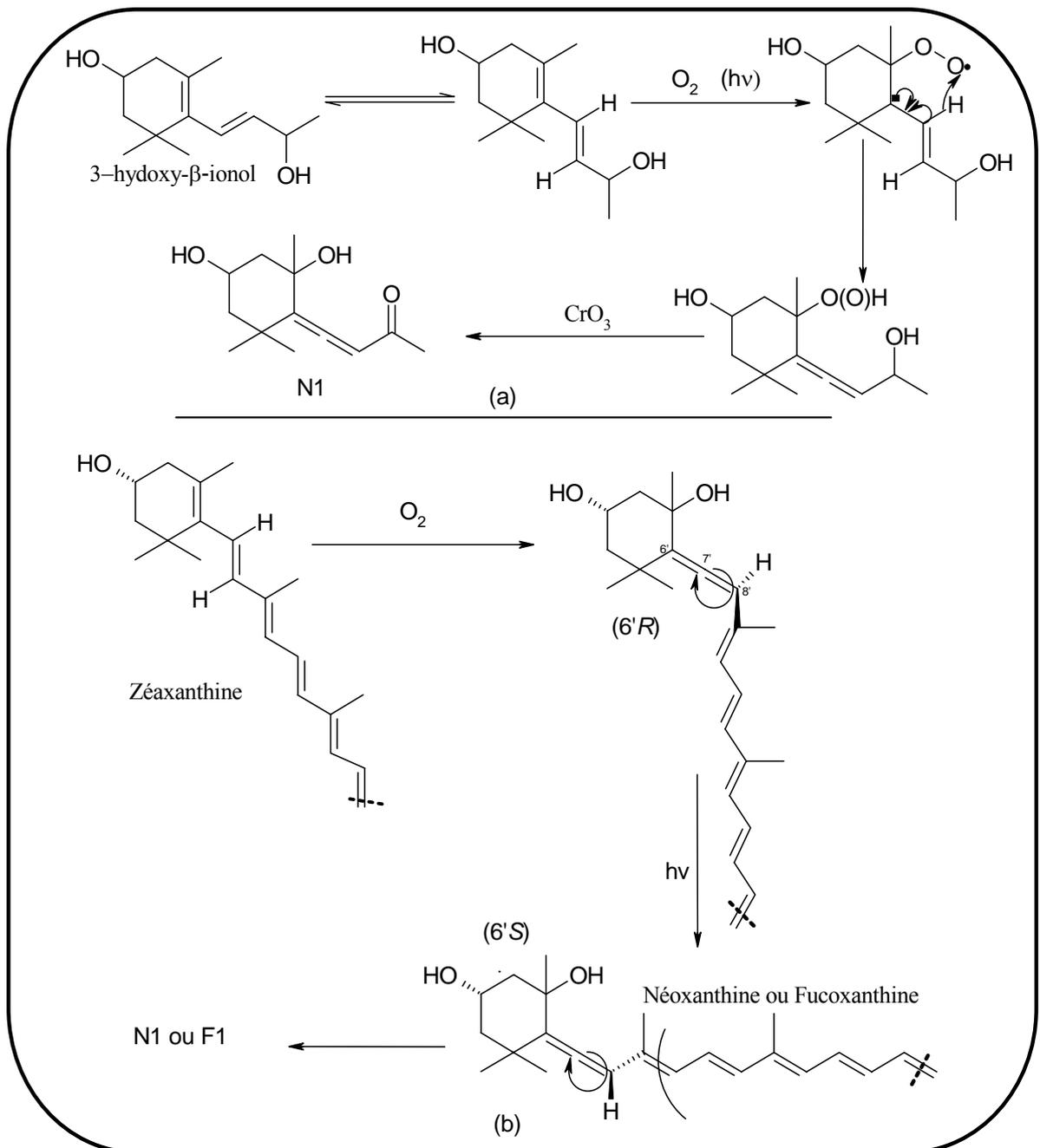


Figure 1.10 : (a) Obtention de la cétone allénique N1 à partir du  $\beta$ -ionol  
(b) Obtention des caroténoïdes alléniques à partir de la

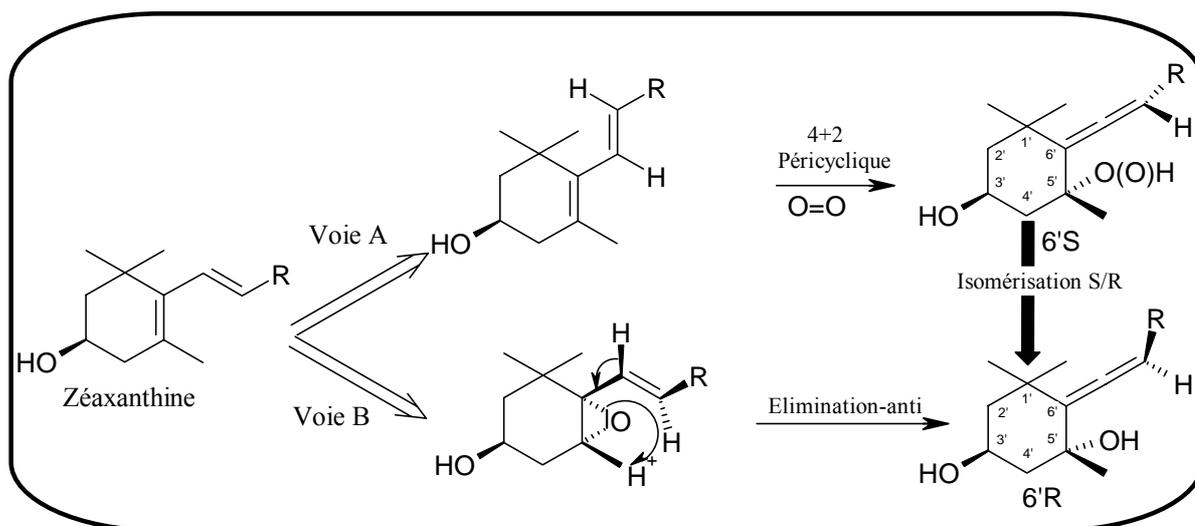
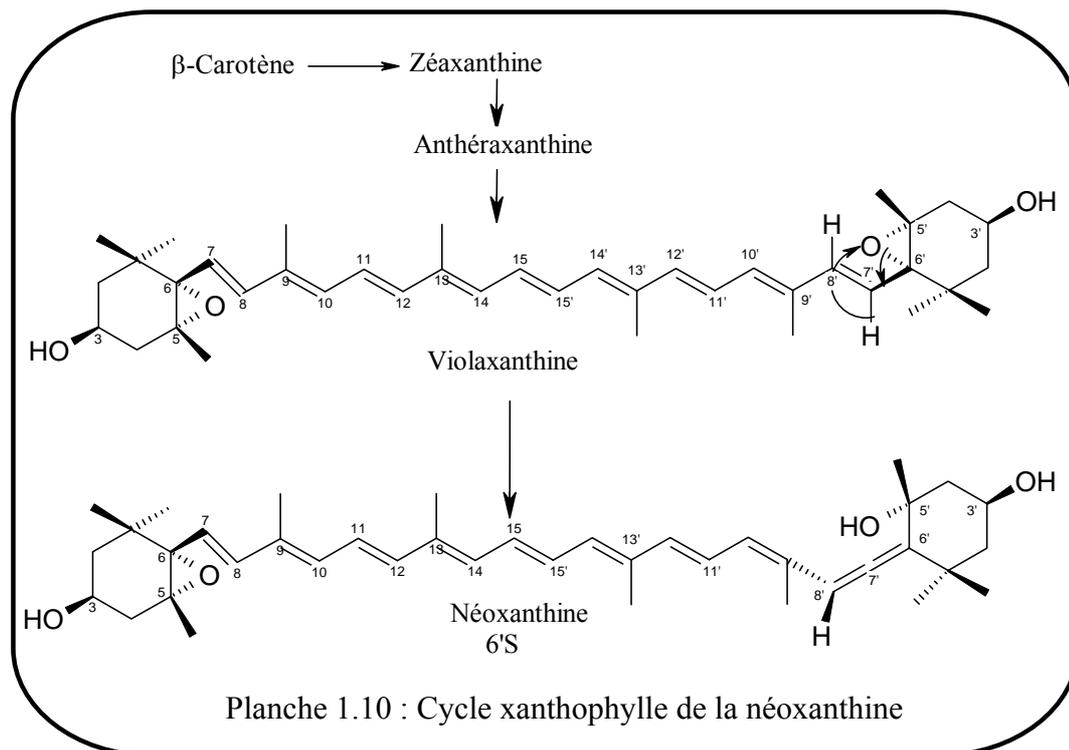


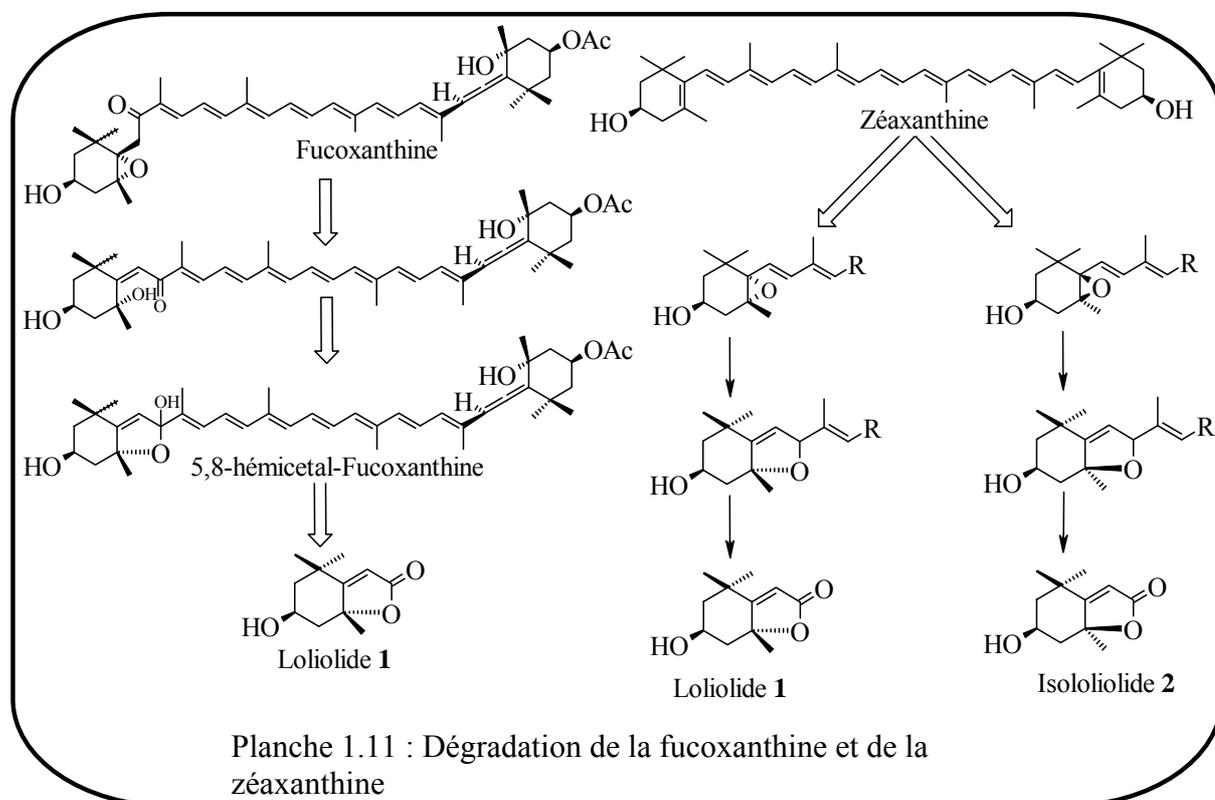
Figure 1.11: Voies de biosynthèse de l'allène 6'R à partir de la zéaxanthine

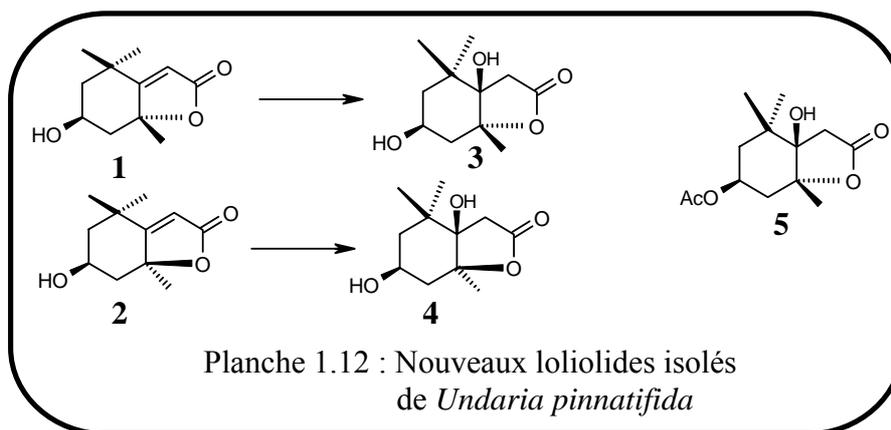
L'étude thermodynamique de la stéréoisomérisation R/S [106] avec de l'iode et du  $\text{Ph}_2\text{Se}_2$  montre qu'un quasi-équilibre est atteint pour les deux catalyseurs. De plus, le diphényldiséniure ( $\text{Ph}_2\text{Se}_2$ ) permet une conversion plus importante que l'iode et l'augmentation de l'intensité du rayonnement UV favorise la conversion R/S. La stéréomutation de la fucoxanthine en solution dans le benzène en présence de 2% d'iode et de lumière [109] a permis d'obtenir quatre isomères alléniques (6'S) : all-trans, 9'-cis, 13'-cis et 13-cis. La caractérisation de l'isomère (6'S) a été basée sur les travaux de Yamano et

al [110] pour l'isomère (6'S) de la périidine (caroténoïde allénique). D'autres travaux, ont montré que l'isomérisation catalysée par l'iode permet d'atteindre un équilibre comprenant : all-trans (42% du total), 9'-cis (20%), 13'-cis (14%), 13-cis (11%), 9', 13'-diciis (6%), 13, 9'-diciis (4%) et environ 13, 13'-diciis (3%) et 15-cis (1%).

La réaction produisant une couleur bleue des caroténoïdes 5,6 époxydes a été examinée [111] pour la néoxanthine et la violaxanthine, la couleur bleue est en fait due à un caroténoïde à ion oxonium obtenu à la suite de l'action d'un acide, le même phénomène a été constaté pour la fucoxanthine [112]. Cette dernière, en milieu alcalin produit un mélange coloré dont les produits prédominants sont un hémicétal caroténoïdique cyclique et un autre méthylcétal [113].

La fucoxanthine et d'autres caroténoïdes subissent des réactions de dégradation, dues à la formation de furanoïdes bicycliques instables [114], menant ensuite à la formation du loliolide (**1**) et de l'isololiolide (**2**) (planche 1.11). La fucoxanthine produit le (3S, 5R) loliolide, la zéaxanthine produit le (3S, 5R) loliolide et le (3S, 5S) isololiolide (**2**). Le loliolide (**1**) a été isolé à partir de plusieurs espèces végétales [115] et sa structure complètement élucidée. Récemment trois nouveaux dérivés du loliolide (**3,4,5**) ont été isolés de l'algue brune *Undaria pinnatifida* [116] (planche 1.12).





### 1.2.2 Composés phénoliques

Les dérivés phénoliques constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal (supérieur et inférieur). Ces produits sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal. Chez les algues brunes, la présence de dérivés phénoliques avec ou sans halogènes et avec ou sans groupes sulfates est sans doute la principale caractéristique de ces espèces. Une autre classe chimique très répandue dans les algues brunes est celle des méroterpènes, ces molécules à biogenèse mixte, intermédiaires entre les phénols et les terpènes, peuvent être considérées comme des dérivés phénoliques (cette classe chimique a été discutée au chapitre des terpènes).

Les produits phénoliques sont des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont issus du métabolisme de l'acide shikimique ou / et de celui d'un polyacétate [117]. Ils peuvent être des oligophénols ou des polyphénols qui sont appelés « phlorotanins », terme introduit pour la première fois par Sattler [118]. Les produits dérivant du phénol ont fait l'objet de travaux de recherche depuis le début du siècle dernier notamment par Kylin qui a regroupé ces molécules sous le nom de « fucosan » [118]. Les phlorotanins assurent probablement plusieurs fonctions biologiques, néanmoins, on considère qu'ils interviennent surtout comme antimicrobiens et antiappétants vis-à-vis des herbivores [119, 120]. Des travaux récents ont montré que des phlorotanins isolés d'algues, de cyanobactéries et d'éponges présentent aussi une activité antioxydante [121-123]. On a remarqué aussi une puissante activité algicide [123], de même qu'une activité de ce type vis-à-vis des crabes et des poissons pour le phlorofucofuroeckol isolé à partir de l'espèce *Ecklonia kurome* [124].

#### 1.2.2.1 Extraction, purification et analyse

Les phlorotanins sont obtenus par extraction à l'alcool aqueux ou à l'acétone à partir de la matière végétale fraîche ou congelée. Elle est réalisée de préférence sous une atmosphère inerte et sous faible luminosité (lumière réduite). L'extraction avec l'acide sulfurique dilué ou l'acide oxalique est aussi efficace, toutefois, cette technique nécessite un traitement en aval (post-extraction) très complexe.

Les extraits à l'alcool ou à l'acétone, après distillation sous vide sont séparés par filtration ou par extraction à l'hexane ou au chloroforme. Les polyphénols sont récupérés par extraction à l'acétate d'éthyle. Il faut rappeler que les phlorotanins sont très sensibles à l'oxydation à l'air, c'est ce qui explique leur acétylation préalable à toute étude. Les phlorotanins acétylés sont purifiés par chromatographie en phase liquide (CLHP) et par chromatographie sur couche mince (CCM). La méthylation des phlorotanins de faible poids moléculaire permet d'éviter les réactions d'hydrolyse intervenant lors de la purification par chromatographie liquide en phase inverse. La caractérisation structurale est réalisée grâce aux techniques spectrométriques classiques (SM, RMN, FTIR et UV-Visible). Les rayons X ont été sollicités une fois dans l'élucidation structurale d'un phlorotanin (peracétate) [125].

#### 1.2.2.2 Structure chimique et origine

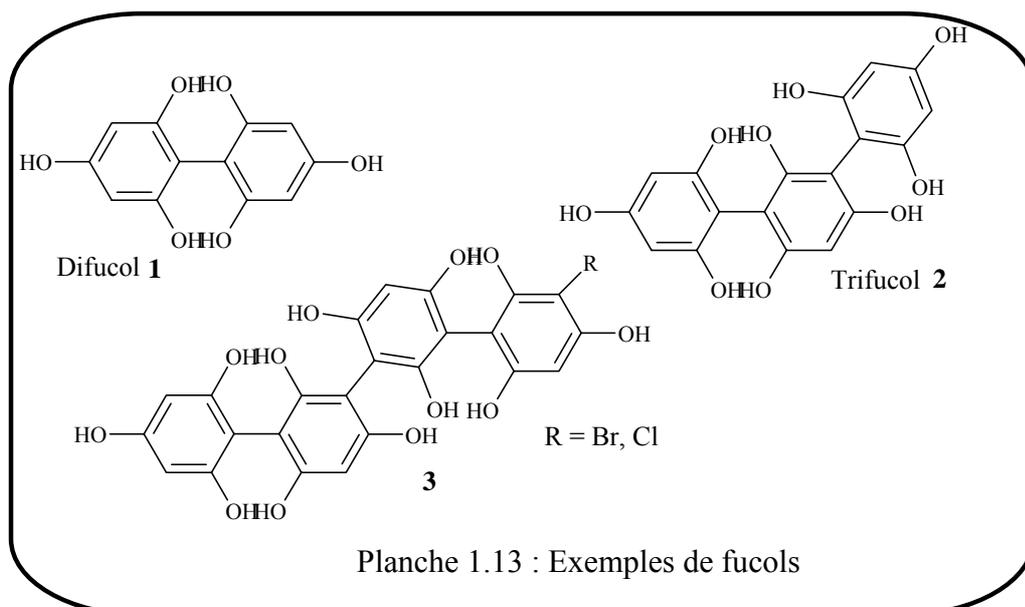
La majorité des dérivés phénoliques des algues brunes sont des molécules provenant de couplages radicalaires, carbone - carbone ou carbone - oxygène à partir du phloroglucinol. Les phlorotanins sont divisés en 5 groupes.

##### 1.2.2.2.1 Fucols

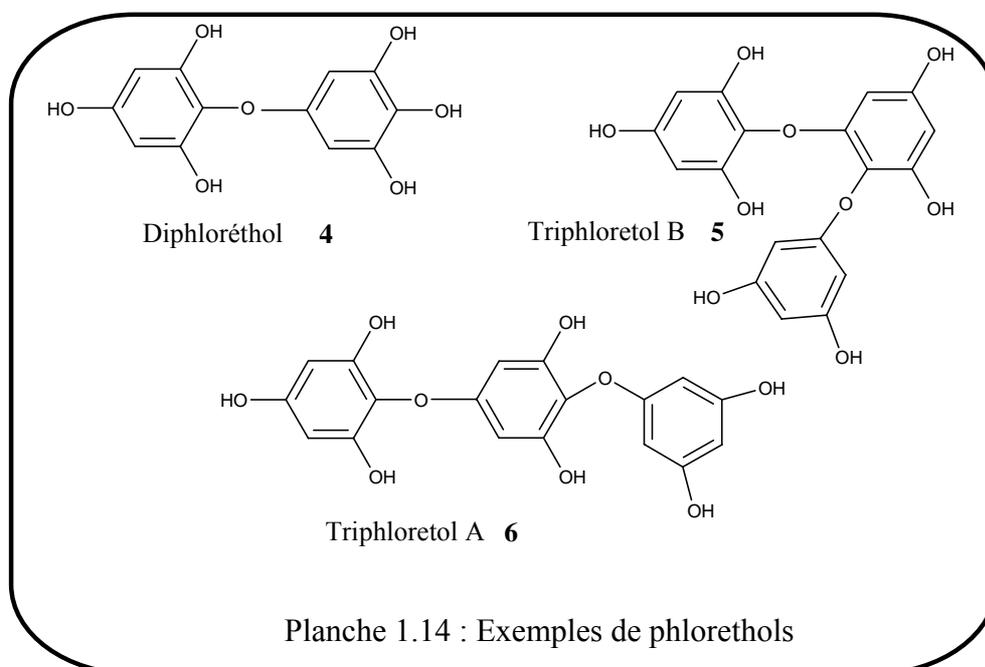
Ce sont des dehydroooligomères simples du phloroglucinol. Ils sont obtenus par des liaisons aryl-aryl de phloroglucinol. Des exemples de Fucols sont décrits dans la planche 1.13. Il convient de citer le difucol (**1**) isolé de *Fucus vesiculosus*, le trifucol (**2**) de *Fucus spiralis* [118]. Des fucols dont le noyau phloroglucinol est halogéné (**3**) ont été aussi décrits dans *Analipus japonicus* [126].

##### 1.2.2.2.2 Phlorethols

Ce sont des dehydroooligomères obtenus par couplage radicalaire carbone – oxygène (deux ou plusieurs noyaux phloroglucinol sont couplés par des fonctions éther). Le nom dérive donc de " **PHLOR**oglucinol" et de " **ETH**ers". Les possibilités de couplages

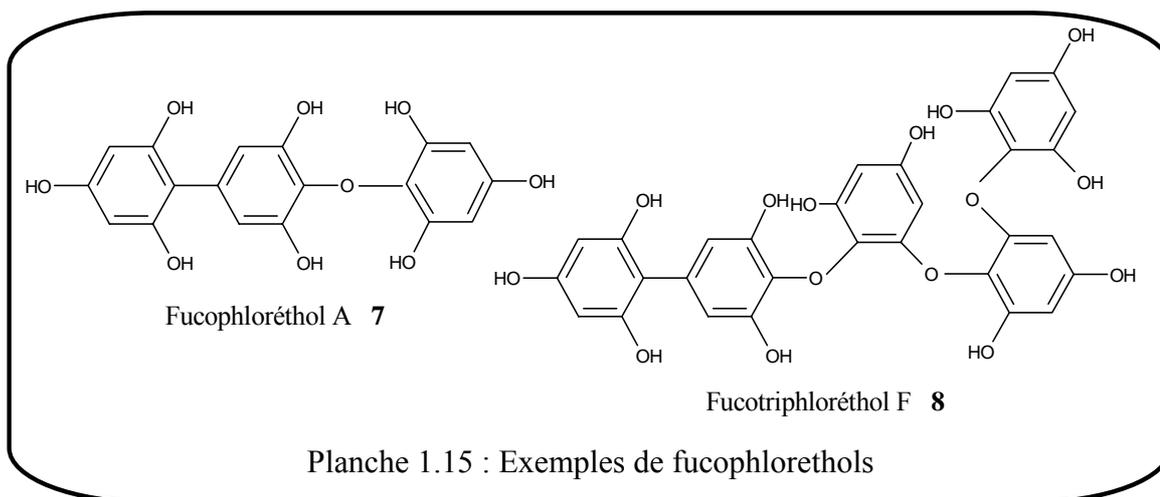


radicalaires sur les positions *ortho* et *para* conduit rapidement à un très grand nombre de structures dès que le nombre de noyaux phloroglucinol augmente (planche 1.14). Un système de nomenclature particulier permet de repérer les positions ortho et para des cycles consécutifs les uns par rapport aux autres [118]. Nous donnerons comme exemples : le diphloréthol (**4**) isolé de *Bifurcaria bifurcata*, le triphloréthol A (**5**) de *Cystophora congesta* et le triphloréthol B (**6**) de *Cystophora granulata*.



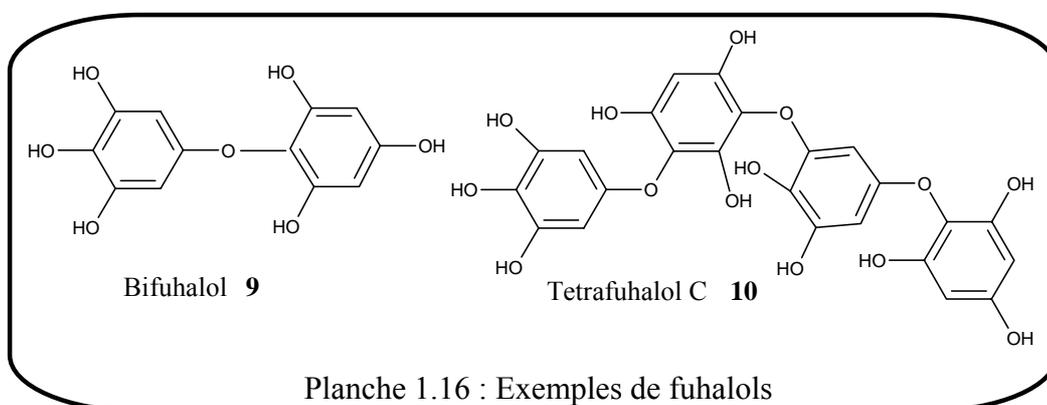
### 1.2.2.2.3 Fucophlorethols

Cette classe de produits est une forme mixte entre les fucols et les phloréthols, les fucophloréthols sont obtenus par couplages C-C et C-O. Le fucophloréthol le plus simple contient trois unités de phloroglucinol. Deux exemples sont donnés dans la planche 1.15 : le fucophloréthol A (**7**) (*Fucus vesiculosus*) et le fucotriphloréthol F (**8**) (*Durvillea antarctica*) [118].



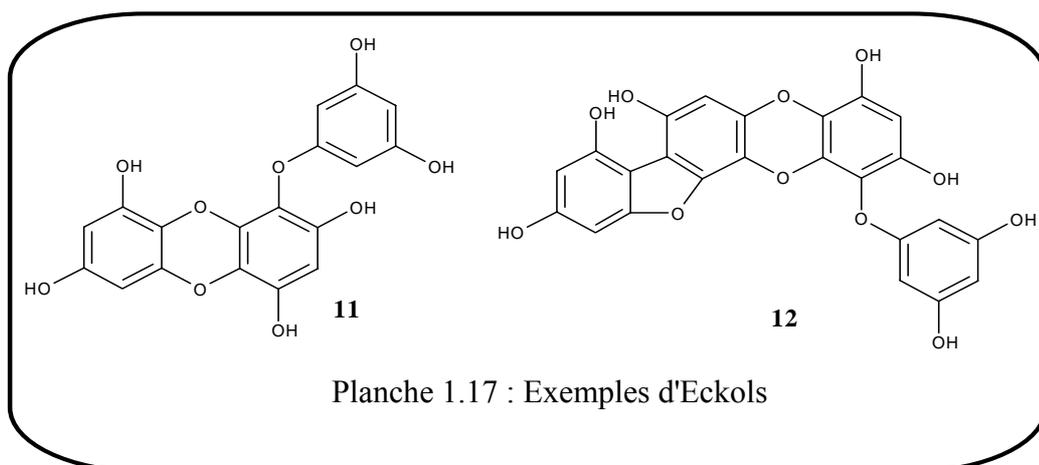
### 1.2.2.2.4 Fuhalols

Cette classe de produits fait référence à des phloréthols possédant un ou plusieurs groupes hydroxyles supplémentaires sur les unités du phloroglucinol. Dans la majorité des cas, l'unité trihydroxylée porte la liaison éther en position *ortho*. Le composé le plus simple est le bifuhalol isolé à la fois dans *Bifurcaria bifurcata* [127] et dans *Halidrys siliquosa* [128]. On a isolé aussi le tétrafuhalol C isolé de *Cystoseira baccata* [129] (planche 1.16).



### 1.2.2.2.5 Eckols

Ce sont des dehydrooligomères d'au moins trois unités de phloroglucinols, dans lesquels il y a formation, par cyclisation interne, du dibenzo-[1,4] dioxane et de furanes. Ces produits ont été isolés dans deux genres *Ecklonia* et *Eisenia* (ordre Laminariales, famille des Alariacées). Deux exemples d'eckols sont donnés dans la planche 1.17. Il s'agit de l'Eckol (*Ecklonia kurome*) (**11**) et d'un autre eckol (**12**) isolé de *Eisenia arbora* [130] (planche 1.17).



### 1.2.2.3 Autres dérivés du phloroglucinol : Etat des connaissances sur la composition chimique des genres *zonaria* et *lobophora*

L'étude des métabolites secondaires de certaines espèces des genres *Zonaria* et *Lobophora* a permis d'isoler des dérivés du phloroglucinol. Il s'agit en fait d'un couple radicalaire C-C simple entre le phloroglucinol et une chaîne carbonée portant une fonction cétone et/ou alcool.

Les travaux de W.Gerwick et al [131] sur les espèces *Zonaria farwolii* (Setchell and Gardner) récoltée sur les côtes sud de la Californie et *Zonaria diesingiana* (J.Agardh) de l'herbier Fukuoka du Japon, ont permis d'isoler trois nouveaux produits (**13-15**) (planche 1.18). Deux autres dérivés du phloroglucinol (**16** et **17**) ont été isolés à partir de l'espèce *Lobophora papenfussii* récoltée sur les côtes nord ouest de l'Islande [131] (planche 1.19). L'espèce *Zonaria* de Méditerranée appelée *Zonaria tournefortii* (Lamouroux) a fait l'objet de travaux de la part de V. Amico [132, 133] et C.Tringalli [134, 135]. L'algue fraîche a été récoltée au Nord – Est de la Méditerranée, à Catane en Sicile. Ces travaux ont permis d'isoler six nouveaux dérivés du phloroglucinol (**18-23**) à partir de l'extrait lipidique traité par la soude (planche 1.20). Ce traitement permet de concentrer les phénols.

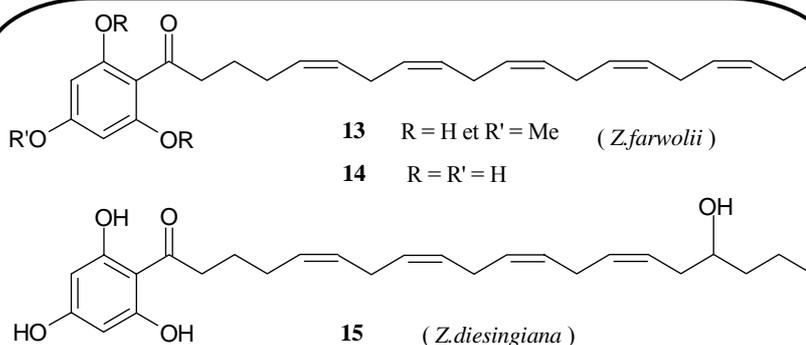


Planche 1.18 : Dérivés du phloroglucinol à partir des espèces

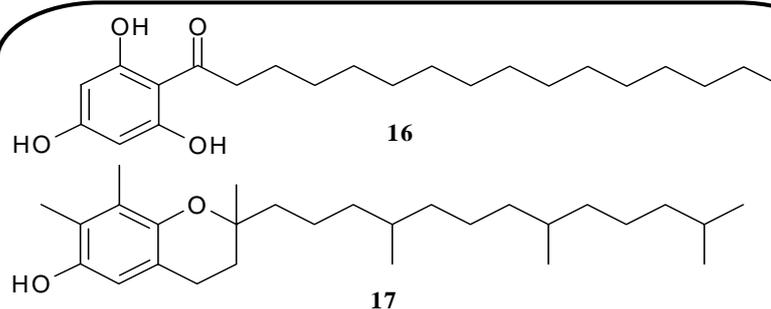
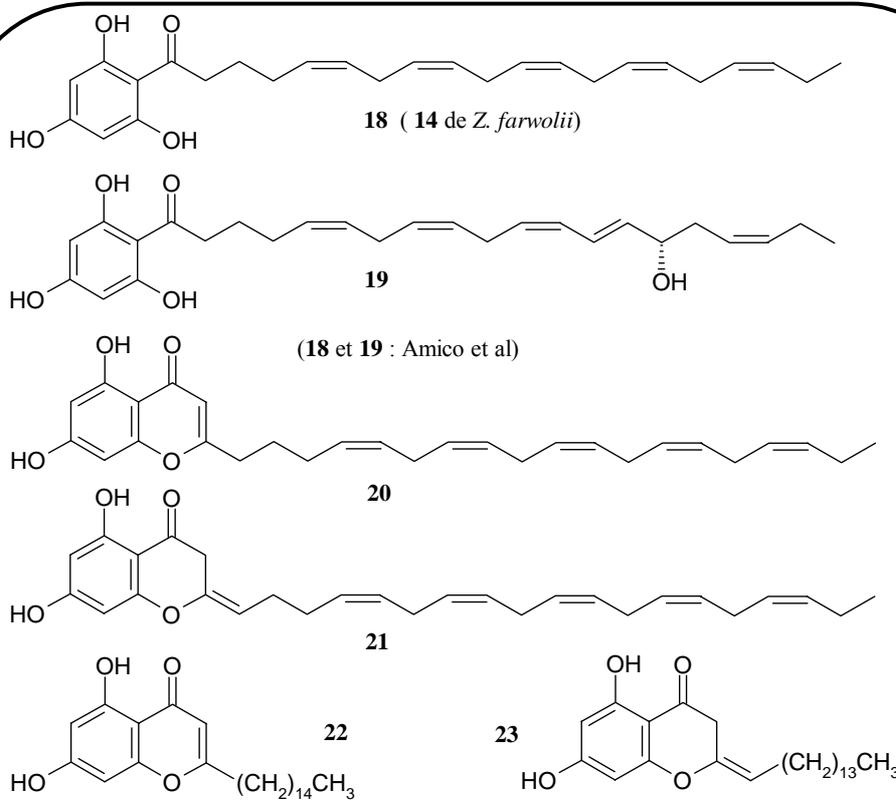


Planche 1.19 : Dérivés du phloroglucinol à partir de l'espèce *Lobophora papenfussii*



(20-23 : Tringali et al)

Planche 1.20 : Dérivés du phloroglucinol de l'espèce *Zonaria tournefortii*

### 1.2.3 Composés volatils

Thuret en 1854 [136] : « Il est difficile, quand on observe ces phénomènes avec attention, de ne pas se laisser aller à croire qu'une impulsion particulière dirige les anthérozoïdes vers les corps qu'ils doivent féconder » (« During observation of these phenomena it is difficult to not believe in a particular matter that leads the antherozoids to the bodies they have to fertilise »).

#### Introduction

Les algues brunes produisent des dérivés volatils dont la nature chimique et la fonction biologique sont différentes de celles des algues rouges. Ce sont des hydrocarbures à 11 atomes de carbone sans halogènes qu'on peut classer selon leur structure chimique en quatre groupes [137] : (a) dérivés du cyclopropane, (b) dérivés du cyclopentène, (c) dérivés du cycloheptadiène et (d) les oléfines acycliques. Le seul hydrocarbure volatil à huit atomes de carbone identifié dans les algues brunes est le fucoserratene. Ces produits qui sont connus chez toutes les espèces des phéophycées ne sont pas spécifiques d'un ordre ou d'une famille. Ils interviennent dans le processus de reproduction de l'algue, ce sont des phéromones sexuelles.

Chaque hydrocarbure en C-11 a trois fonctions biologiques principales [138] :

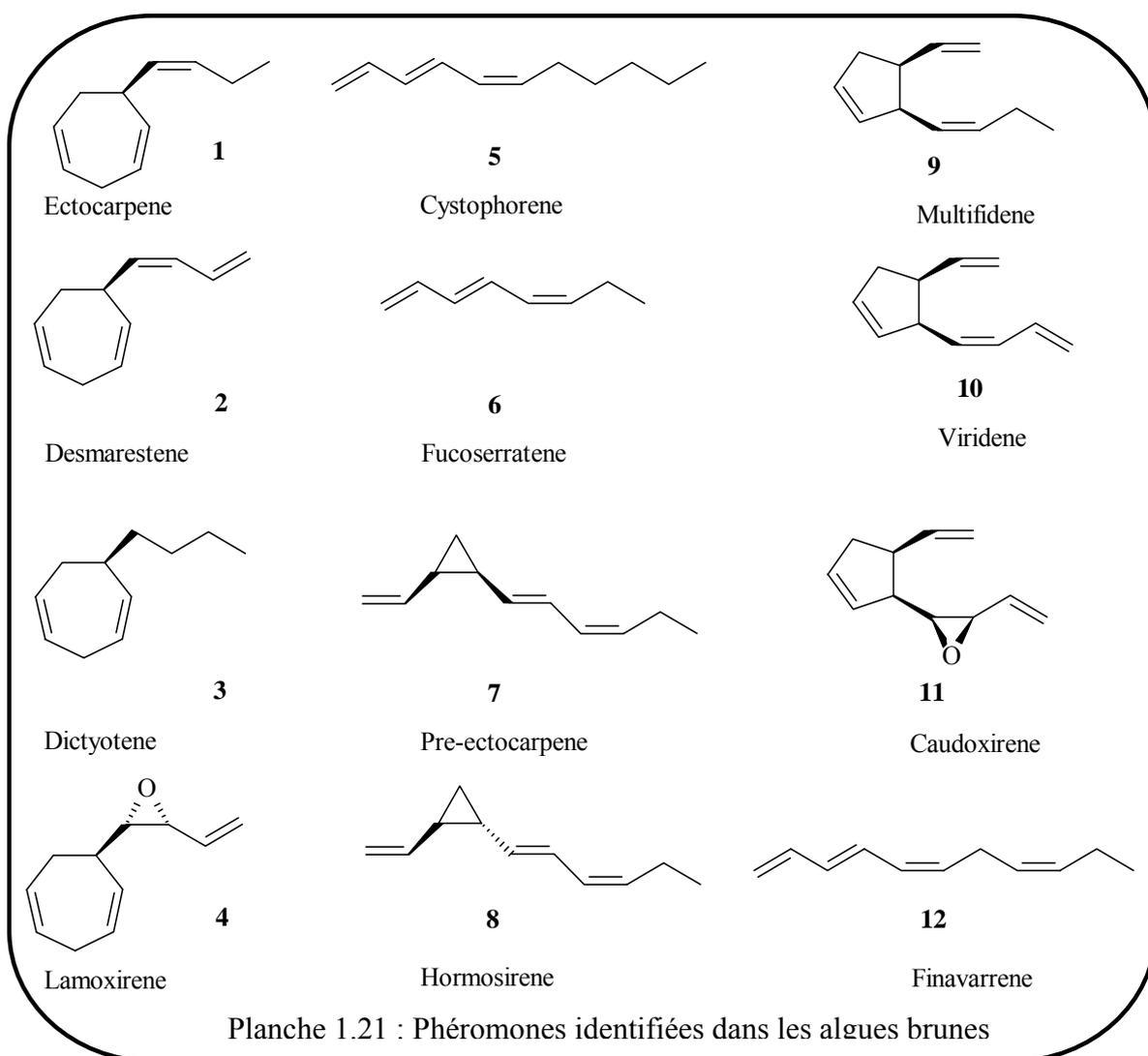
- synchronisation de l'accouplement des cellules mâles – femelles par contrôle des spermatozoïdes mâles,
- augmentation de l'efficacité de l'accouplement par attraction,
- défense chimique de la plante due à la présence de grandes quantités de phéromones libérées par les thalles dans l'environnement.

L'attraction mâle – femelle se fait par trois modes de contact : l'isogamie<sup>\*</sup>, l'anisogamie et l'oogamie<sup>\*</sup>. Dans l'isogamie les deux gamètes sont mobiles et de morphologie identique, dans l'anisogamie les deux gamètes sont toujours mobiles mais le gamète femelle est de plus grande taille que le gamète mâle. Les phéromones mises en jeu sont essentiellement les hydrocarbures à 11 atomes de carbone. Le troisième mode est le plus évolué : le gamète mâle est de petite taille et de forme différente de celle du gamète femelle, ce mode n'est observé que dans l'ordre des fucales, ou dans les ordres des fucales et des durvilléales depuis la promotion de la famille des durvilléacées en ordre. Le fucoserratene est l'une de ces phéromones sexuelles mise en jeu dans ce troisième mode de contact.

Après l'observation faite par Thuret en 1854, il a fallu attendre 120 ans pour voir des travaux de recherche se concrétiser par l'identification de la première phéromone sexuelle chez les algues brunes : l'ectocarpène. La difficulté de cette recherche réside dans les

faibles concentrations émises par les gamètes [138]. Le développement actuel des techniques chromatographiques et du couplage chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse a permis l'avancement des recherches dans ce domaine.

Actuellement 12 phéromones (planche 1.21) et plus de 50 stéréoisomères sont connus dans plus de 100 espèces d'algues brunes [138-140]. La biogénèse des hydrocarbures en C-11 est également connue chez les diatomées [141, 142] et les microalgues [143]. Ces mêmes hydrocarbures en C-11 sont aussi métabolisés chez les végétaux supérieurs, toutefois, la biosynthèse suit une voie différente de celle des algues [144].

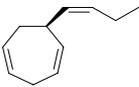
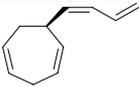
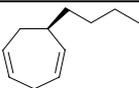
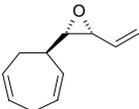
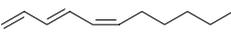
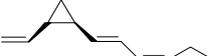
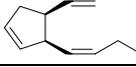
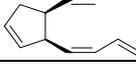
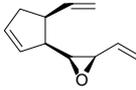


### 1.2.3.1 Les phéromones des algues brunes

### 1.2.3.1.1 Etude Descriptive

Les gamètes femelles sécrètent un mélange de produits et non pas une seule phéromone. Toutefois, il a été vérifié que l'activité biologique est associée à un seul constituant qui peut ne pas être le produit majeur. Ces sous-produits jouent quelquefois un rôle de modulateur de réponse des gamètes et en général, ils n'ont pas une fonction biologique déterminée [137]. Ils appartiennent à la même classe chimique que le produit biologiquement actif avec des insaturations variables. L'utilisation des différents stéréoisomères des phéromones augmente la diversité des signaux moléculaires. Pour les dérivés du cyclopentène, seul l'énantiomère pur libéré par les gamètes femelles réagit avec les gamètes mâles, dans la classe des dérivés du cyclopropane et du cycloheptadiène, les phéromones sont souvent libérées sous forme de mélange d'énantiomères. Ce phénomène très ordonné, représente l'une des opérations signal/réponse les plus rapides dans le règne végétal, citons comme exemple le cas de la macroalgue *Laminaria digitata* où le gamète mâle est libéré 8 à 12 s après la réception du signal, à une concentration de 50 pmol/l [139]. Depuis l'isolement de l'ectocarpène en 1971 par Müller, Jaenicke et al [145], à partir d'une culture de laboratoire de l'algue brune *Ectocarpus siliculosus*, 11 autres phéromones ont été isolées dans les vingt années qui ont suivi. Le tableau 1.1 regroupe les phéromones isolées, les espèces d'algues dans lesquelles elles ont été identifiées, ainsi que leur activité d'attraction (**A**) ou d'émission (**E**). Une étude plus approfondie de la reproduction sexuelle chez l'algue brune *Ectocarpus siliculosus*, en utilisant des phéromones synthétiques, a révélé que la véritable phéromone d'attraction utilisée par le gamète femelle est le pre-ectocarpène (**7**) (cette dernière à un temps de demi-vie  $t_{1/2} = 21$  min à 18 °C en Méditerranée et  $t_{1/2} = 1$  heure à 8°C en arctique) qui subit le réarrangement de Cope et se transforme en ectocarpène (**1**) [146]. Le temps de demi-vie dépend de la température mais aussi de la chaîne alkylée liée au cycle propanique [140]. En fait, l'algue produit l'ectocarpène qui se transforme en pre-ectocarpène, le réarrangement de Cope intervient alors entre le temps d'émission et de réception de la phéromone. La transformation sigmatropique de Cope sert de mécanisme de contrôle naturel de désactivation de la phéromone [146]. A l'exception de l'ectocarpène et du pre-ectocarpène, l'élucidation structurale de la majorité des phéromones et sous-produits a été effectuée par CG-SM en utilisant des échantillons de référence (synthèse enzymatique et stéréosélective) [140, 146, 147].

Tableau 1.1: Phéromones isolés à partir des algues brunes

N°	Nom de la phéromone	Structure chimique	Attraction/ Emission A/E	Espèces d'algues
1	Ectocarpene		A	<i>Scytosiphon</i> sp., <i>Ectocarpus fasciculatus</i> , <i>Adenocystis tricularis</i> , <i>Sphacelaria rigidula</i>
2	Desmarestene		A/E A	<i>Desmarestia acculeata</i> (6R), <i>D. viridis</i> , <i>Cladostephus spongiosus</i> (6R), <i>D. firma</i> (6R)
3	Dictyotene		A A	<i>Dictyota dichotoma</i> , <i>Dictyota diemensis</i> , <i>Dictyota prolifera</i> .
4	Lamoxirene		A/E	<i>Laminaria angustata</i> , <i>L. sinclari</i> , <i>L. japonica</i> , <i>L. digitata</i> , <i>L. hyperborea</i> , <i>L. sacharina</i> , <i>Pleurophytus</i> , <i>Alaria classiforia</i> , <i>A. esculenta</i> , <i>A. marginata</i> , <i>Ecklonia radiata</i> , <i>Eisenia arborea</i> , <i>Pterygophora californica</i> , <i>Undaria pinnatifida</i> , <i>Dictyoneuropsis reticulata</i> , <i>Lessonia variegata</i> , <i>Lessoniopsis littoralis</i> , <i>Macrocystis integrifolia</i> , <i>Macrocystis pyrifera</i> , <i>Nereocystis luetkeana</i> , <i>Pelagophycus porra</i> , <i>Agarum cribrosum</i> , <i>Cymmathere triplicata</i> , <i>Hedophyllum sessile</i> , <i>Kjellmaniella gyrata</i> ,
5	Cystophorene		A	<i>Cystophora siliquosa</i> .
6	Fucoserratene		A	<i>Fucus serratus</i> , <i>F. spiralis</i> , <i>F. vesiculosus</i> .
7	Pre-ectocarpene			<i>Ectocarpus siliculosus</i> .
8	Hormosirene		A	<i>Hormosira banksii</i> , <i>Xiphophora chondrophylla</i> , <i>X. gladiata</i> , <i>Durvillaea antarctica</i> , <i>D. potatorum</i> , <i>D. willana</i> , <i>Colpomenia peregrina</i> , <i>C. bullosa</i> , <i>Ascoseira mirabilis</i> , <i>Myelophycus simplex</i> , <i>Scytosiphon lomentaria</i> .
9	Multifidene		A/E	<i>Cutleria multifida</i> , <i>Zonaria angustata</i> , <i>Chorda tomentosa</i> .
10	Viridene		A/E	<i>Syringoderma phinneyi</i> , <i>Syringoderma</i> sp
11	Caudoxirene		E	<i>Perithalia caudata</i> , <i>Dictyosiphon foeniculaceus</i> .

### 1.2.3.2 Extraction, biosynthèse et biodégradation

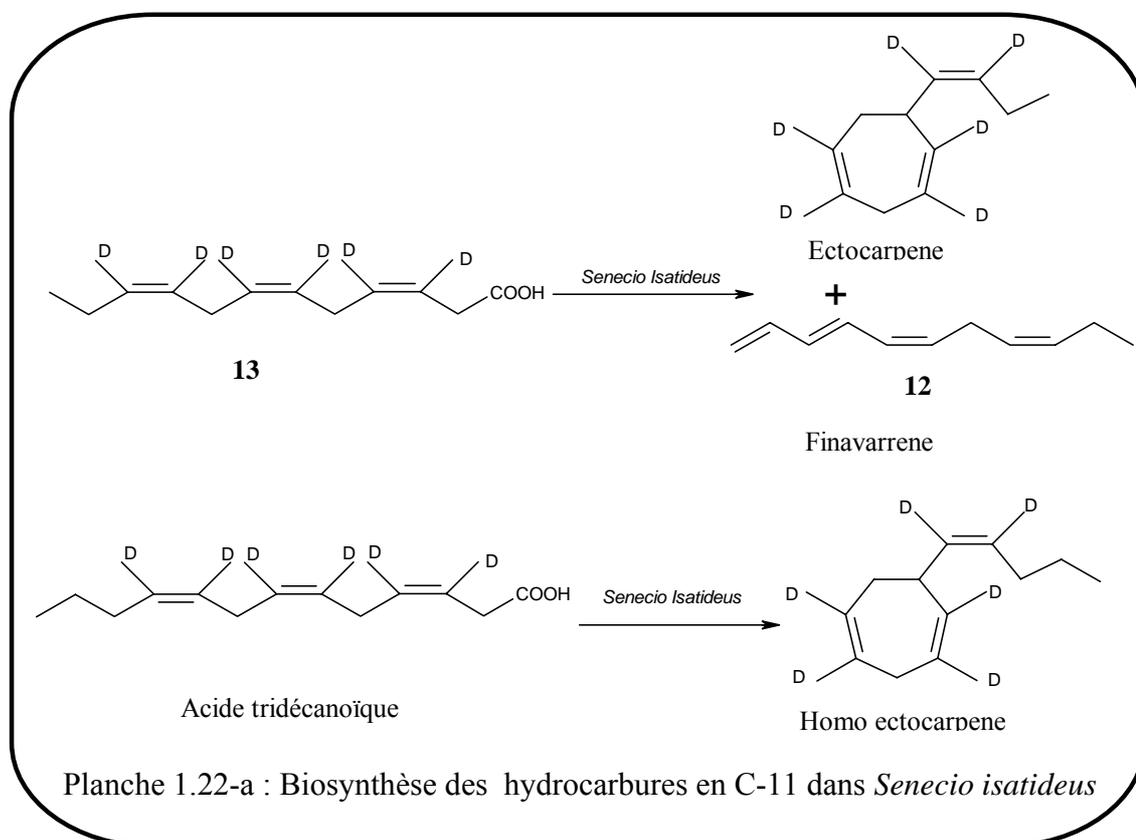
#### 1.2.3.2.1 Extraction

La méthode traditionnelle du piège froid « cold trap » a été remplacée par une autre technique appelée la boucle de stripage fermée « closed loop stripping » développée et appliquée pour l'analyse des produits volatils dans l'eau [148], pour celle des produits halogénés dans l'eau potable [149] et pour l'analyse des produits musqués dans les tissus de poissons [150]. Les phéromones volatiles sont enrichies par la circulation d'air à travers le milieu de culture, suivie d'un passage à travers un petit lit de charbon actif (1,5 à 5 mg) qui joue le rôle de piège. L'opération de stripage dure 4 h pour les produits légers et 24 h pour les produits lourds. Les phéromones volatiles sont ensuite extraites du charbon actif par extraction avec le dichlorométhane ou le sulfure de carbone. La microextraction en phase solide (SPME) a été aussi utilisée pour récupérer les phéromones volatiles, elle présente l'avantage de réduire le temps de piégeage et celui d'analyse [151-153].

#### 1.2.3.2.2 Biosynthèse des hydrocarbures en C-11

L'étude de la biosynthèse des hydrocarbures en C-11 intervenant dans le processus de reproduction des algues est ardue du fait des faibles quantités de phéromones libérées, c'est la raison qui a poussé les chercheurs à trouver d'autres sources de ces phéromones. Des travaux effectués sur les produits volatils des plantes terrestres ont montré que certaines huiles essentielles contiennent les hydrocarbures en C-11, c'est le cas de l'ectocarpène (**1**) et du pre-ectocarpène (**7**) qui ont été identifiés dans l'huile essentielle d'ananas [154]. Dans ce cadre, la plante terrestre *senecio isatideus*, appartenant à la classe des Asteraceae et dont le métabolite majeur est l'ectocarpène [144], a été la première espèce à être utilisée dans l'étude de la biosynthèse des phéromones d'algues. L'examen du squelette chimique des phéromones, en particulier les structures **5**, **6** et **12**, révèle l'absence de groupements méthyles et la présence de doubles liaisons souvent conjuguées. Cette constatation a permis d'émettre l'hypothèse que les acides gras peuvent être les précurseurs des polyènes en C-11. Lors du premier travail de biosynthèse effectué sur l'espèce *senecio isatideus*, l'utilisation de l'acide linoléique marqué au deutérium comme précurseur a mené à un résultat négatif [138]. Cependant l'utilisation de l'acide [3,4,6,7,9,10 <sup>2</sup>H<sub>6</sub>] dodeca-3,6,9-trièneïque (**13**) a permis une transformation rapide en ectocarpène (**1**) et en finavarrene (**12**). Dans ce cas, les atomes de deutérium se retrouvent

dans le squelette chimique de l'ectocarpene [155] (planche 1.22-a). Notons que l'acide dodéca-triénoïque dérive de l'acide linoléïque *via* trois  $\beta$ -oxydations, mais ce type de transformation connu chez les plantes terrestres reste non identifié chez les algues [155, 156].

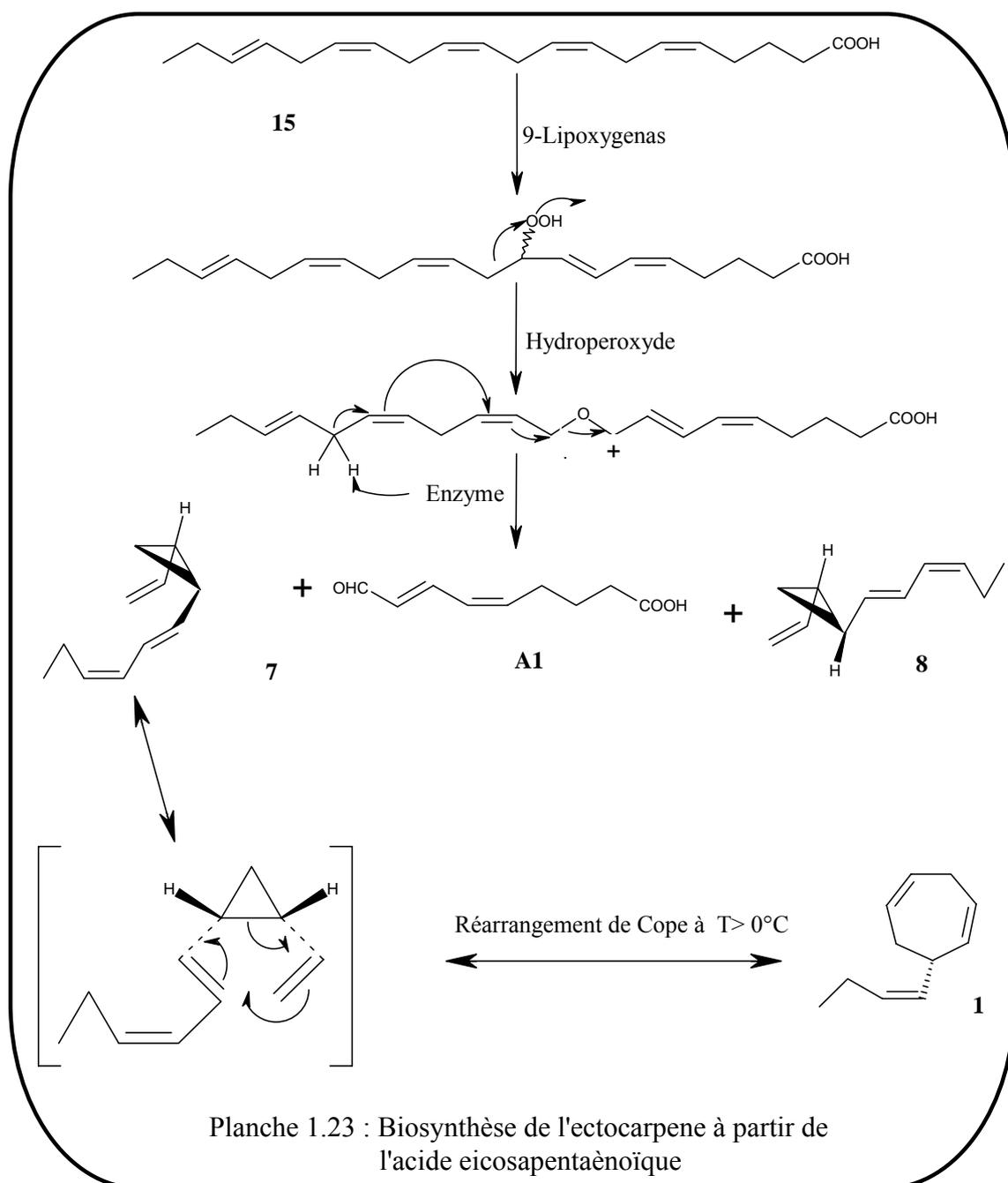


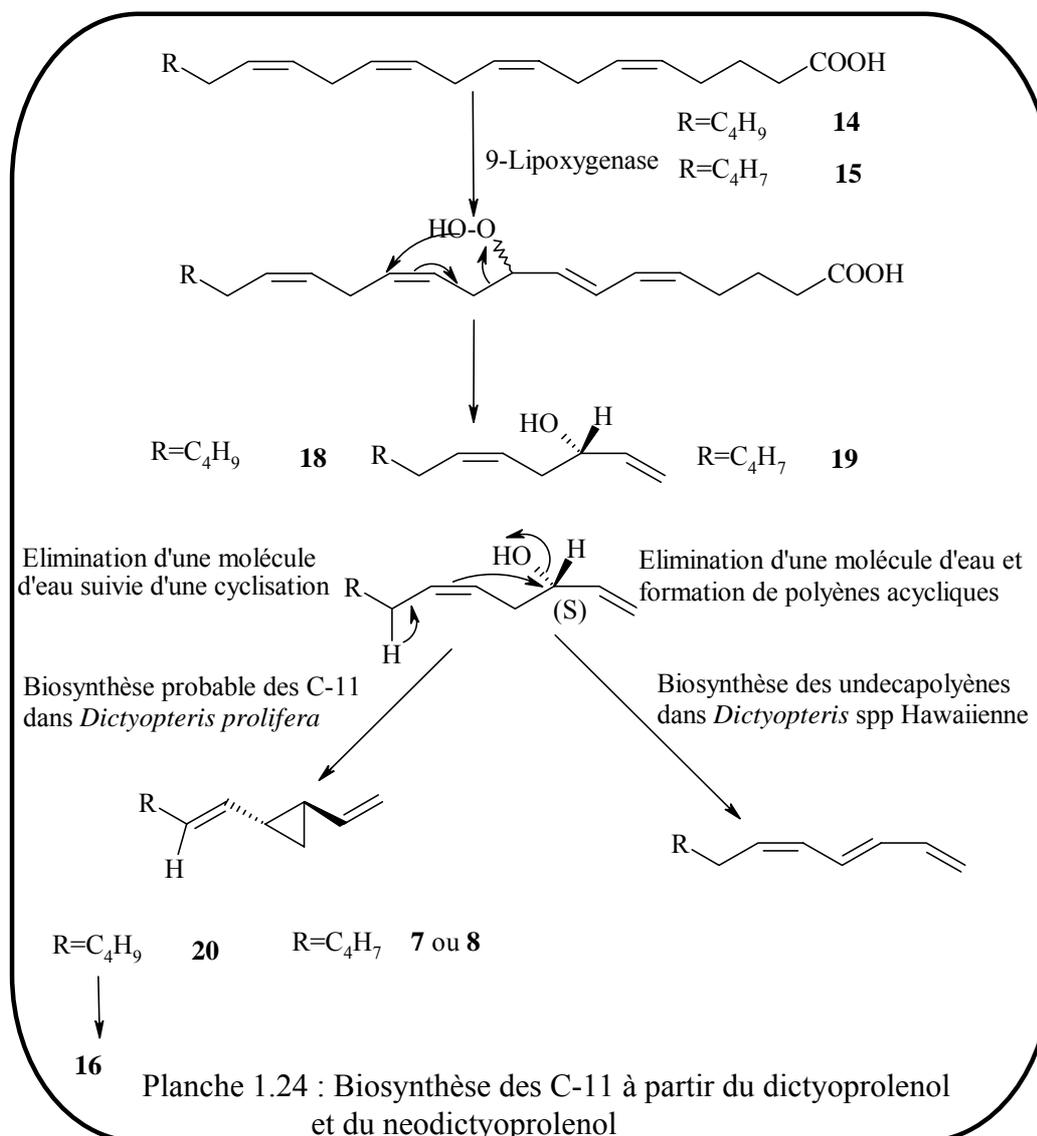
Ce qui est surprenant, c'est que la même expérience de biogénèse appliquée à l'algue *Ectocarpus siliculosus* a échoué [138,140]. Il faut donc envisager une autre voie de biosynthèse justifiant la formation de l'ectocarpene dans *Ectocarpus siliculosus*. Des études ultérieures ont montré que les véritables précurseurs sont les deux acides eicosanoïques : l'acide eicosatétraénoïque (arachidonique) (14) et l'acide eicosapentaénoïque (15). Lorsque

l'acide arachidonique marqué par 6 atomes de deutérium a été administré en tant que précurseur dans les espèces *Ectocarpus siliculosus* et *Sphacelaria rigidula*, on a constaté une transformation rapide en dictyotene (16) et en undéca(1,3E,5Z)-triène [138,140] (17) (planche 1.22-b). Au cours de la biosynthèse des C-11 dans les algues à partir des acides eicosanoïques, le mécanisme d'activation et de clivage de ces derniers s'effectue par le couple d'enzymes lipoxygénase/hydroperoxyde lyase. La formation de l'ectocarpene à partir de l'acide eicosapentaénoïque est présentée dans la planche 1.23.



retrouve dans différentes huiles essentielles des espèces du genre *Dictyoferis* [159]. Ces alcools (l'énantiomère S) ont déjà été considérés comme précurseurs des hydrocarbures en C-11 par Moore [160] et Yamada [161] (planche 1.24). L'administration d'un mélange racémique de (18) et (19) dans *D. prolifera* révèle une chute de la teneur des énantiomères S des deux alcools. Toutefois l'utilisation de cette voie de biosynthèse dans *Ectocarpus siliculosus* a échoué dans l'obtention des hydrocarbures en C-11 [162].



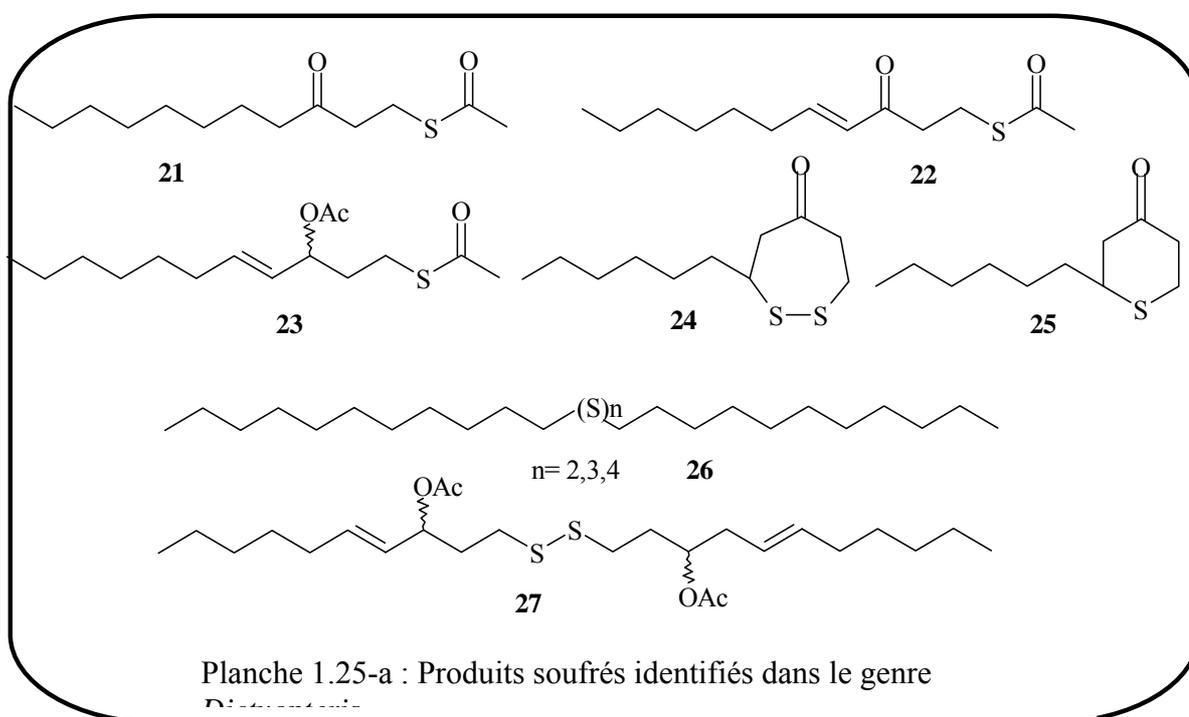


#### 1.2.3.2.3 Biodégradation des phéromones d'algues

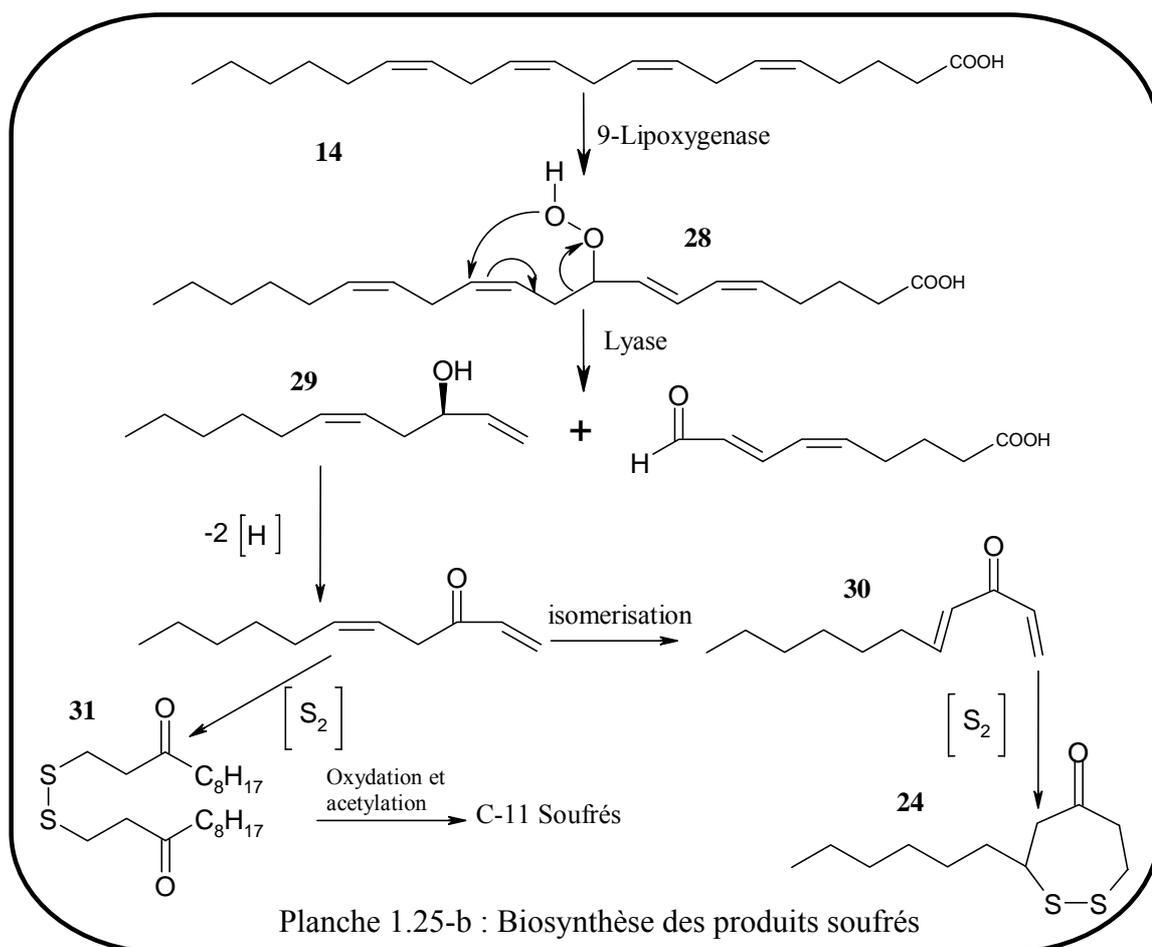
Les hydrocarbures en C-11 ne s'accumulent pas dans l'environnement car leur degré d'insaturation élevé provoque des réactions d'oxydation assez faciles. Beaucoup de travaux ont été consacrés à l'étude de la dégradation des phéromones en C-11 provenant d'espèces diverses [138, 163]. Notons que la majeure partie des produits de biodégradation (> 70%) sont des isomères d'époxycétone, certains de ces produits d'oxydation agissent en tant que répellants vis-à-vis de certains prédateurs comme les oursins [138, 158].

### 1.2.3.3 Hydrocarbures soufrés à partir du genre *Dictyopteris*

Les espèces du genre *Dictyopteris* renferment une grande quantité d'hydrocarbures soufrés en C-11 [164, 165], l'espèce *Dictyopteris membranacea* de méditerranée renferme jusqu'à 0,1 % de produits soufrés / masse d'algue sèche. La biosynthèse des hydrocarbures soufrés utilise, comme dans le cas des hydrocarbures en C-11, l'acide arachidonique comme précurseur. Nous présentons dans la planche 1.25-a les principaux produits soufrés identifiés dans le genre *Dictyopteris* (**21-27**).



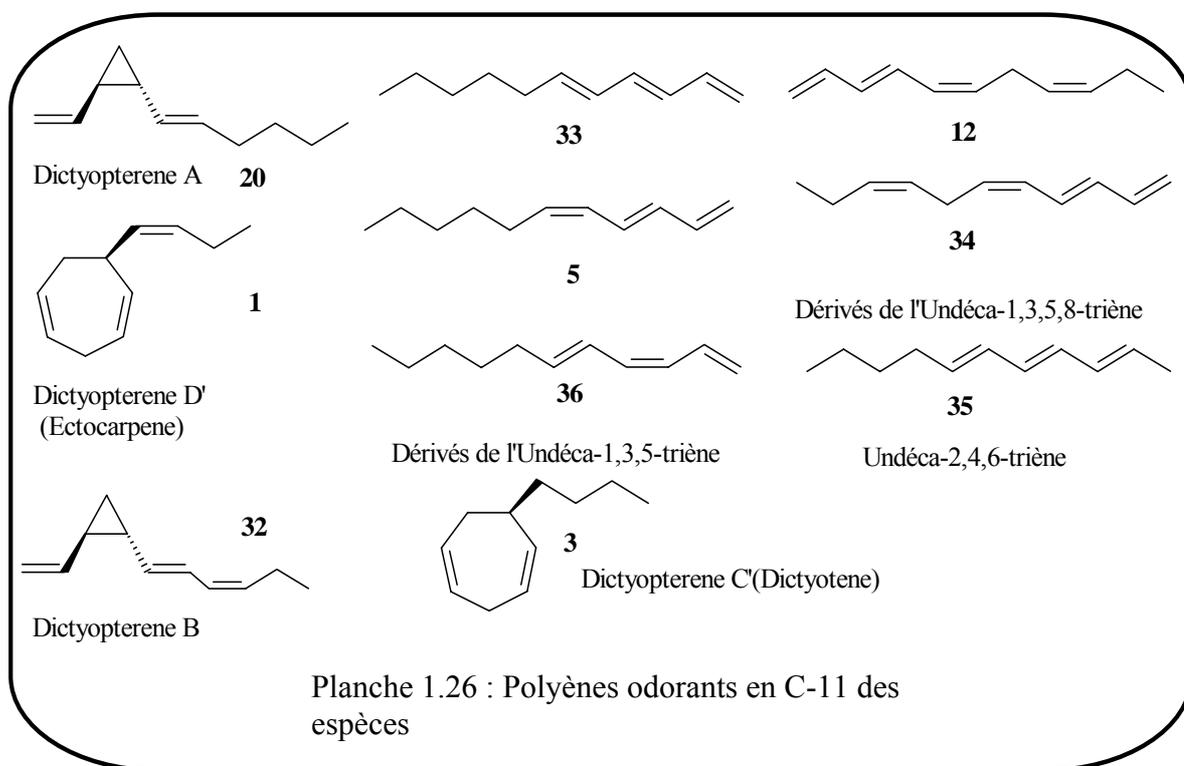
Au cours de la biosynthèse des hydrocarbures soufrés [140, 166], le peroxyde de l'acide arachidonique (**28**), suite à une réaction d'oxydation, se clive en undec-1-en-3-ol (**29**). Ce dernier, suite à une réduction oxydative et une isomérisation se transforme en une cétone conjuguée (**30**). L'introduction du soufre au niveau de la cétone (**30**) par un processus non encore bien maîtrisé permet l'obtention de la 3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone (**24**). La di-cétone (**31**) obtenue à partir de l'alcool (**29**) se transforme par oxydation et/ou par acétylation en produits soufrés (**21-27**) (planche 1.25-b).



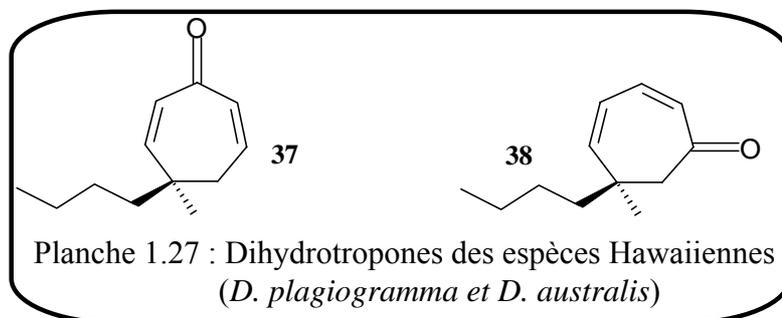
#### 1.2.3.4 Etat des connaissances sur la composition chimique des espèces du genre *Dictyopteris*

La littérature fait état de la présence d'une grande variété de composés non-isopréniques et isopréniques dans les espèces du genre *Dictyopteris*. En ce qui concerne les substances non-isopréniques, Moore [167, 168] a mis en évidence chez les espèces Hawaïennes (*D. plagiogramma* et *D. australis*) une série de composés soufrés dont le 3-oxoundécylthioacétate (**21**) et ses dérivés polysoufrés (planche 1.25-a). Toujours à partir de ces espèces, il a isolé des polyènes à 11 atomes de carbone très odorants [169-171]. Il s'agit des dictyopterènes A (**20**), B (**32**), C' (dictyotène) (**3**), D' (ectocarpène) (**1**) (planche 1.26), ainsi qu'en plus faible quantité des isomères de l'undéca-1,3,5-triène et de l'undéca-1,3,5,8-tétraène. Soulignons que les undécatriènes sont très appréciés en parfumerie pour leur odeur 'verte' caractéristique. Ce sont les constituants majeurs de l'essence de

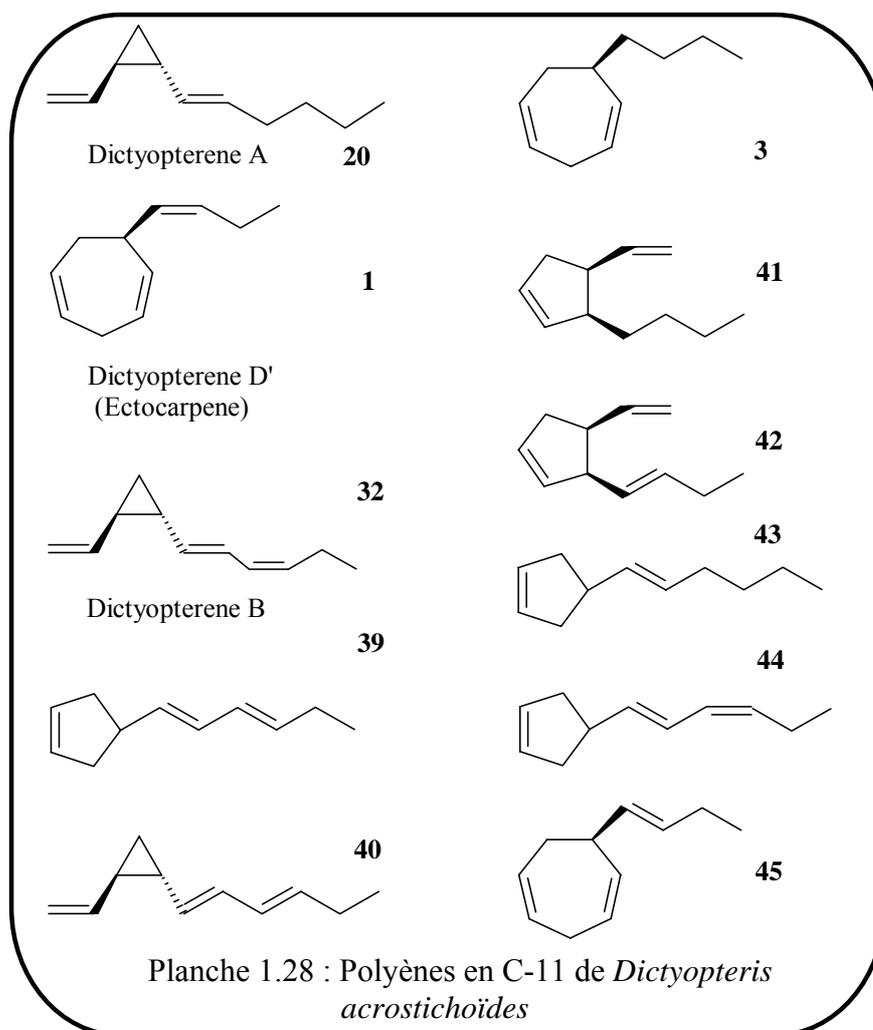
*galbanum*, qui par ses propriétés olfactives est à l'origine des parfums actuels à note verte [172].



En plus de leur odeur très intéressante, certains de ces hydrocarbures sont des phéromones sexuelles émises par les gamètes femelles pour attirer les gamètes mâles des espèces considérées. Les deux cétones odorantes (dihydrotropones) (37) et (38) ont également été isolées des espèces Hawaïennes (*D. plagiogramma* et *D. australis*) [173], elles dérivent du dictyoptérène C' (planche 1.27).

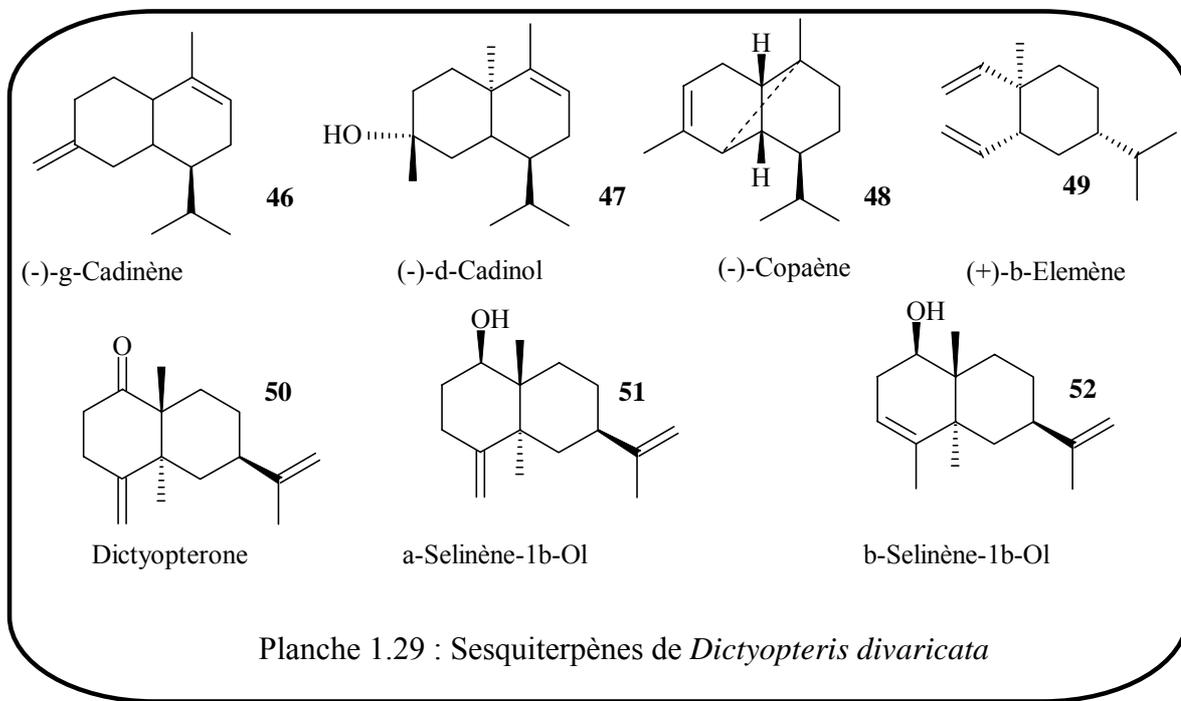


Signalons également l'existence de nombreux polyènes cycliques en C-11 chez *Dictyopteris acrostichoides* [174], une algue brune endémique\* du sud de l'Australie (planche 1.28).



Chez d'autres espèces du genre *Dictyopteris*, des composés isopréniques remplacent les polyènes en C-11. Par exemple, Irie [175,176] et Fenical [177-179] ont isolés des sesquiterpènes intéressants, respectivement de *Dictyopteris divaricata* et de *Dictyopteris undulata* (anciennement appelé *D. zonaroides*). Certains d'entre eux sont présents dans les végétaux terrestres, tels les (-)  $\gamma$ -cadinène, (-)-copaène, (-)- $\delta$ -cadinol (planche 1.29). Pour le (+)- $\beta$ -élémente, il est intéressant de noter qu'il s'agit de l'antipode optique du  $\beta$ -élémente d'origine terrestre. Ce phénomène d'inversion du pouvoir rotatoire se rencontre assez fréquemment chez les organismes marins. Les autres sesquiterpènes sont spécifiques des

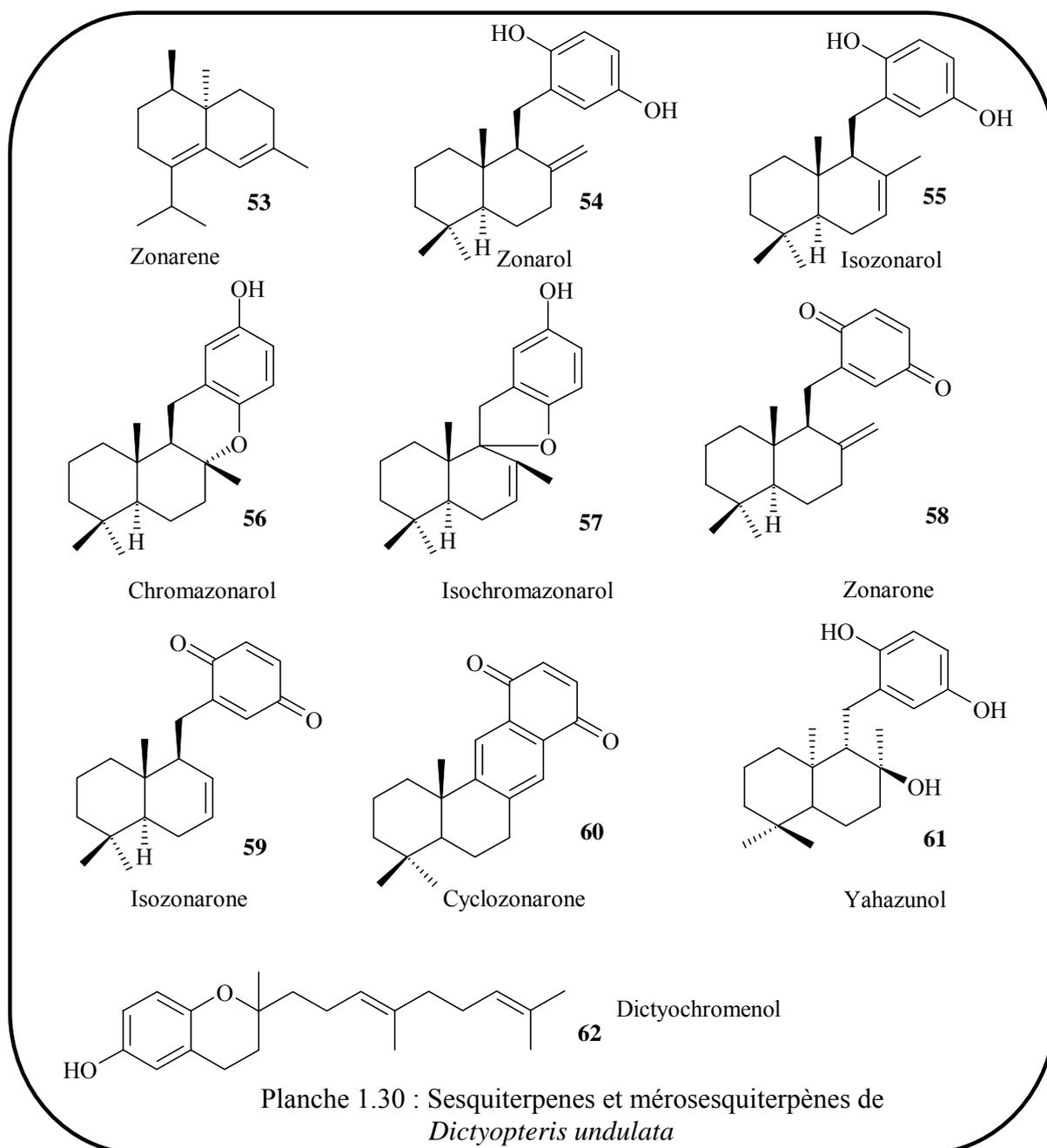
espèces étudiées. Ce sont pour *Dictyopteris divaricata* : la dictyopterone (**50**) et les deux alcools dérivés respectivement de l' $\alpha$ - et du  $\beta$ -sélinène (**51,52**).



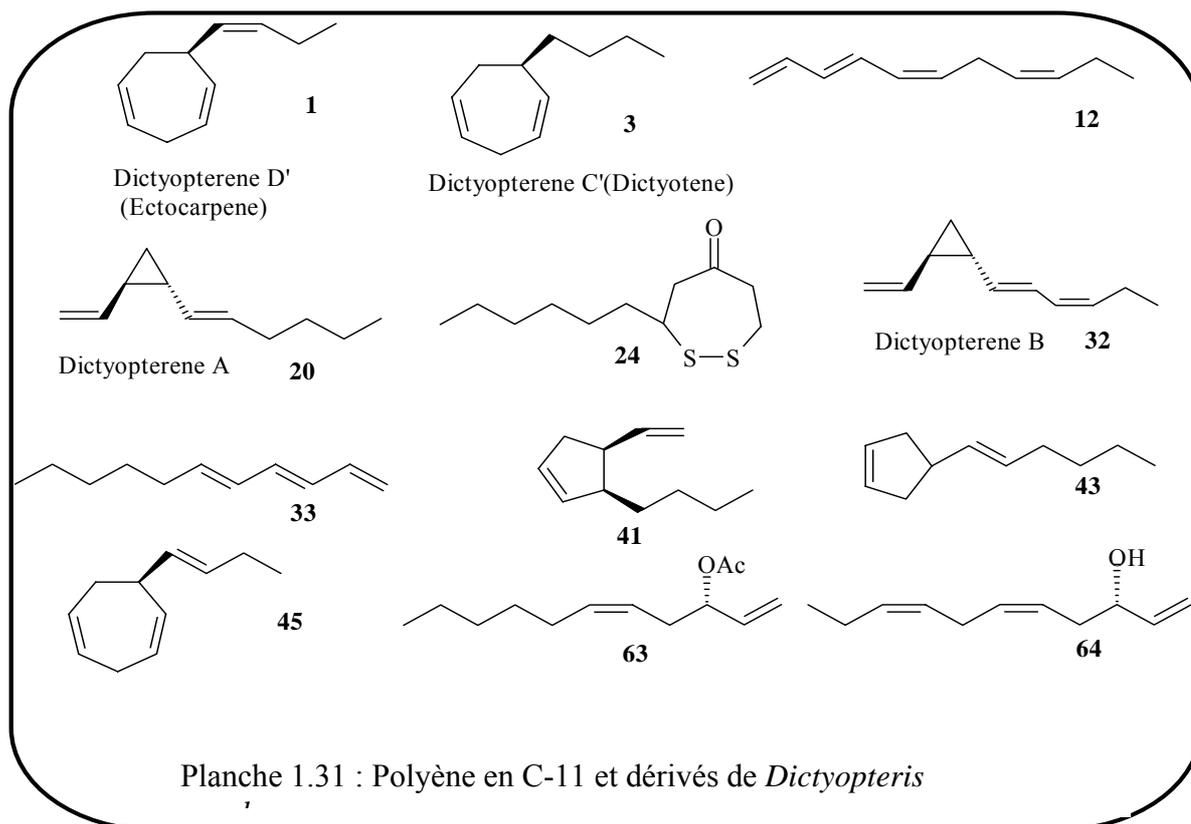
Dans le cas de *Dictyopteris undulata*, il s'agit du zonarene (**53**), sesquiterpène à squelette cadinane, ainsi que du zonarol (**54**), mérosesquiterpène, et ses dérivés (**55-61**) (planche 1.30). Signalons également la présence de sesquiterpénoïdes dérivés de l'épicubebol [180] et du germacrène A [181] chez *Dictyopteris divaricata*, ainsi que de mérosesquiterpènes chez *Dictyopteris undulata* [182-185]. Une étude des substances volatiles de trois algues japonaises *Dictyopteris prolifera*, *D. Undulata* et *D. divaricata* [186] a montré que la première ne contenait que des polyènes en C-11, la deuxième, un mélange de polyènes et de sesquiterpènes alors que la troisième ne renfermait que des sesquiterpènes à squelette cadinène. Cela suggère que la différence des constituants (non-isoprénoïdes et sesquiterpènes) entre les espèces du genre *Dictyopteris* peut dépendre de variations saisonnières et/ou géographiques [187].

En ce qui concerne *Dictyopteris membranacea*, l'étude des substances volatiles de l'algue récoltée en Méditerranée [187, 188] a montré que cette dernière renfermait des polyènes en C-11 et leurs dérivés. Les seuls autres composés décrits de cette espèce sont des acides

gras dont les principaux sont l'acide palmitique (C16 :0), l'acide oléique (C18 :1) et l'acide miristique (C14 :0) [189-191].



Une étude plus récente [166] de l'espèce *Dictyopteris membranacea* récoltée sur les côtes méditerranéennes Françaises (Ville-Franche sur mer) a montré que l'extrait obtenu par extraction au mélange de solvants méthanol-chloroforme (1/1, v/v) contient, outre les polyènes et acides gras déjà décrits, une grande quantité d'un produit soufré, la 3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone (**24**) (planche 1.31).



### Conclusion

Les hydrocarbures en C-11 sont des phéromones jouant un rôle important dans le processus de reproduction des algues brunes. Ils constituent une partie de la fraction volatile de ces algues et leur biosynthèse fait intervenir l'acide eicosapentaénoïque et l'acide arachidonique. Dans le genre *Dictyopteris* on retrouve cette classe d'hydrocarbures en C-11 avec comme constituant majoritaire le dictyopterene A (**20**). L'espèce méditerranéenne *Dictyopteris membranacea* renferme, en plus des hydrocarbures en C-11, une classe de produits soufrés caractérisée par le 3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone (**24**). On a isolé également des dihydrotropones (**37** et **38**) dans les espèces Hawaïennes (*D. plagiogramma* et *D. australis*). En ce qui concerne l'étude des espèces du genre *dictyopteris* récoltées sur les côtes japonaises, il est surprenant de constater la présence de familles structurales différentes pour chacune des trois espèces étudiées sur le plan de leur constitution en produits volatils : uniquement hydrocarbures en C-11 et dérivés ; uniquement sesquiterpènes et mérosesquiterpènes ; mélange hydrocarbures en C-11 et sesquiterpènes. Il serait intéressant d'effectuer des études complémentaires pour vérifier si ses différences proviennent de variations géographiques ou saisonnières ou tout simplement des conditions opératoires d'extraction.

### 1.3 Techniques d'obtention des produits volatils

#### 1.3.1 Extraction par les fluides à l'état supercritique

##### 1.3.1.1 Introduction

Nous entamons cette partie par un aperçu historique de la technique ainsi que son développement au cours du temps [192-194]. Le point critique a été découvert pour la première fois en 1822 par le baron Charles Cagniard, il faudra ensuite attendre les années 1870 pour que l'état supercritique soit décrit par Thomas Andrews. Dans les années 1920, des études d'application sont menées dans le domaine de la pétrochimie puis dans les années 1960 Kurt Zosel développe l'extraction des produits naturels par le CO<sub>2</sub> supercritique. Avec la décaféination du café, le CO<sub>2</sub> supercritique trouve sa première application industrielle à la fin des années 70. Les procédés d'extraction du houblon et de décaféination du thé sont mis au point durant la même période. Durant les années 1990, la construction d'unités d'extraction témoigne du développement de nouveaux marchés et de nouvelles applications. Il faut noter que sur le plan pratique, il y a deux applications majeures des fluides à l'état supercritique : l'extraction (SFE) et la chromatographie (SFC). L'extraction par les fluides à l'état supercritique est une technique très attractive dans le domaine des produits naturels, elle offre beaucoup d'avantages par rapport aux techniques classiques (entraînement à la vapeur et extraction aux solvants) [195]. Le fluide à l'état supercritique a un pouvoir solvant très élevé. Il est sensible aux changements de conditions opératoires, ce qui permet de choisir les propriétés du solvant selon la nature chimique du soluté à extraire. Beaucoup de produits (tableau 1.2) peuvent être utilisés à leur état supercritique, toutefois, le dioxyde de carbone est le solvant le plus communément utilisé car ses propriétés physico-chimiques lui confèrent un domaine d'application très large. C'est un solvant très économique, ininflammable, inerte vis-à-vis des réactifs et non toxique. Cette dernière propriété a fait du dioxyde de carbone un solvant de choix dans les industries alimentaire, pharmaceutique et des produits naturels (absence de traces résiduelles de solvant) [196, 197]. De plus, les conditions opératoires (température et pression) sont assez faciles à atteindre, ce qui facilite sa mise en œuvre pratique et rend la technique très attractive pour les produits fragiles. Outre son utilisation comme solvant d'extraction, le fluide supercritique se comporte comme un bon éluant (fluide vecteur) de chromatographie, d'où le succès de cette technique dans le domaine analytique où les performances se trouvent comprises entre celles de la CLHP et celles de la CPG [198, 199].

Tableau 1.2 : Propriétés critiques de produits utilisés comme fluide supercritique

Produit	T <sub>C</sub> (°C) Température critique	P <sub>C</sub> (atm.) Pression critique	d <sub>C</sub> (10 <sup>3</sup> kg /m <sup>3</sup> ) Densité critique
CO <sub>2</sub>	31,3	72,9	0,47
N <sub>2</sub> O	36,5	72,5	0,45
SF <sub>6</sub>	45,5	37,1	0,74
NH <sub>3</sub>	132,5	112,5	0,24
H <sub>2</sub> O	374,2	227	0,34
n-C <sub>4</sub> H <sub>10</sub>	152,0	37,5	0,23
n-C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>	197,0	33,3	0,23
Xe	16,6	58,4	1,10
CCl <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	112,0	40,7	0,56
CHF <sub>3</sub>	25,9	46,9	0,52

### 1.3.1.2 Principe de base et avantage de l'extraction par les fluides supercritiques

Un fluide supercritique est un gaz ou un liquide qui est à une pression et une température supérieures aux valeurs critiques (figure 1.12 et 1.13). Au point critique C, le fluide est dans un état intermédiaire entre le gaz et le liquide. Quand la pression et la température augmentent le fluide se trouve alors à l'état supercritique. Si l'un des paramètres (T ou P) diminue alors que l'autre reste supérieur à la valeur critique, le fluide se trouve alors à l'état subcritique. A l'état supercritique, le fluide ne peut plus être condensé à l'état liquide par augmentation de pression et les molécules se comportent indépendamment les unes des autres [200].

Dans le domaine supercritique, le fluide a les propriétés d'un liquide et d'un gaz en même temps. Le fluide supercritique a une densité voisine de celle des liquides, une viscosité proche de celle des gaz et une diffusivité très grande par rapport à celle des liquides (tableau 1.3). L'originalité des fluides supercritiques est liée au fait qu'il est facile de mettre en œuvre une variation continue de leur pouvoir solvant. Ils sont « modulables », ce qui permet de réaliser des opérations de fractionnement très complexes : ainsi, on peut utiliser la variation de la solubilité des produits dans le solvant supercritique en fonction de la température à pression constante au sein du contacteur et en fonction de la pression à température constante lors de la décompression. Ceci permet d'avoir la sélectivité voulue

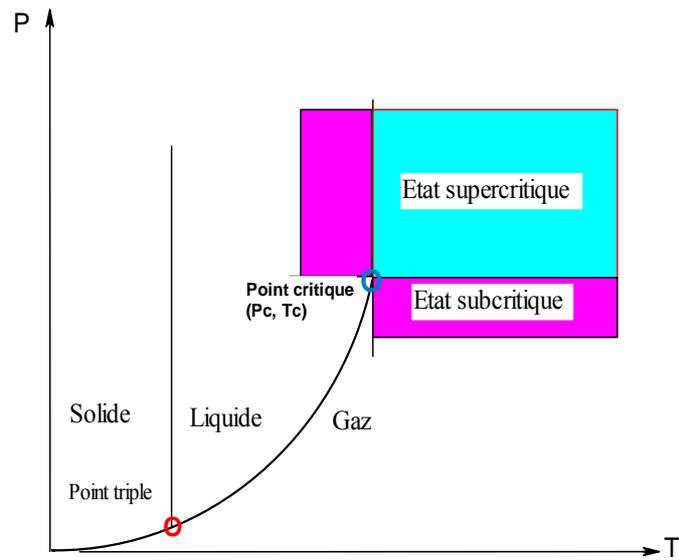


Figure 1.12 : Diagramme de phases pression – température

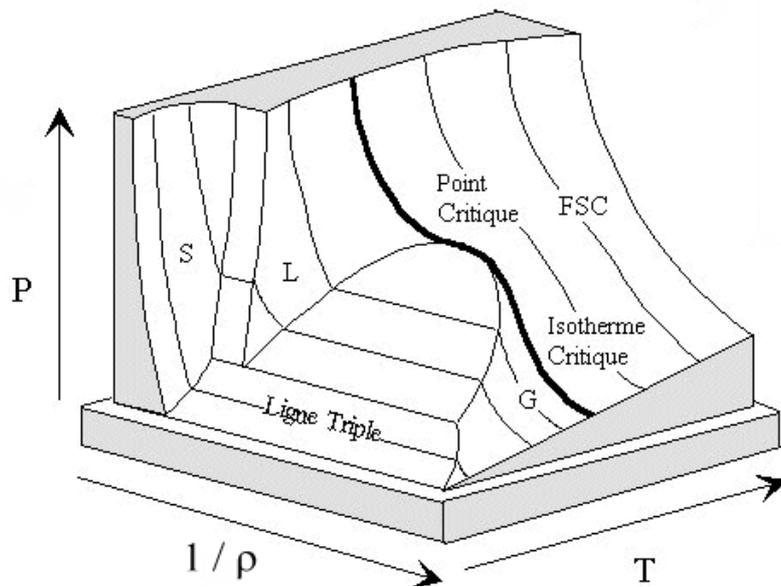


Figure 1.13 : Diagramme de phases pression- température- masse volumique d'un corps pur

Tableau 1.3 : Comparaison des propriétés de transport des gaz, des liquides et des fluides supercritiques

Etat du fluide	Densité (g/ml)	Viscosité (cP)	Diffusivité (cm <sup>2</sup> /s)
Gaz	~ 0,001	0,005-0,035	0,01-1,0
Fluide Supercritique	0,2-0,9	0,02-0,1	(0,1-3,3) x10 <sup>-4</sup>
Liquide	0,8-1,0	0,3-2,4	(0,5-2,0) x10 <sup>-5</sup>

en fonction du produit à extraire. Un bon exemple est l'extraction sélective de la vendoline ( $C_{25}H_{32}N_2O_6$ ) parmi 100 constituants de l'extrait de *Catharanthus roseus* [201]. La technique peut être étendue au fractionnement des mélanges (décompression en plusieurs étapes). La récupération des produits se fait plus facilement par décompression ou par piégeage à basse température. Ceci permet d'éviter, d'une part, la dégradation des produits au cours des processus de concentration et, d'autre part, la perte en produits volatils [202]. De plus, la technique opère à basses températures, ce qui est idéal pour les produits thermolabiles [203] et permet d'éviter les réactions d'oxydation, d'hydrolyse et de réarrangement des produits extraits. La faible viscosité du fluide supercritique combinée à une grande diffusivité facilite le transfert de matière, donc une accélération du processus d'extraction. C'est ce qui explique, en partie, le temps relativement court des opérations d'extraction.

### 1.3.1.3 Etude descriptive du processus d'extraction

L'opération de l'extraction par les fluides supercritiques renferme trois étapes (figure 1.14) :

- Préparation du fluide à l'état supercritique : Chauffage et compression du fluide jusqu'aux conditions supercritiques ( $T > T_c$  et  $P > P_c$ )
- Extraction : Contact solide – fluide supercritique
- Séparation du soluté par un procédé très simple.

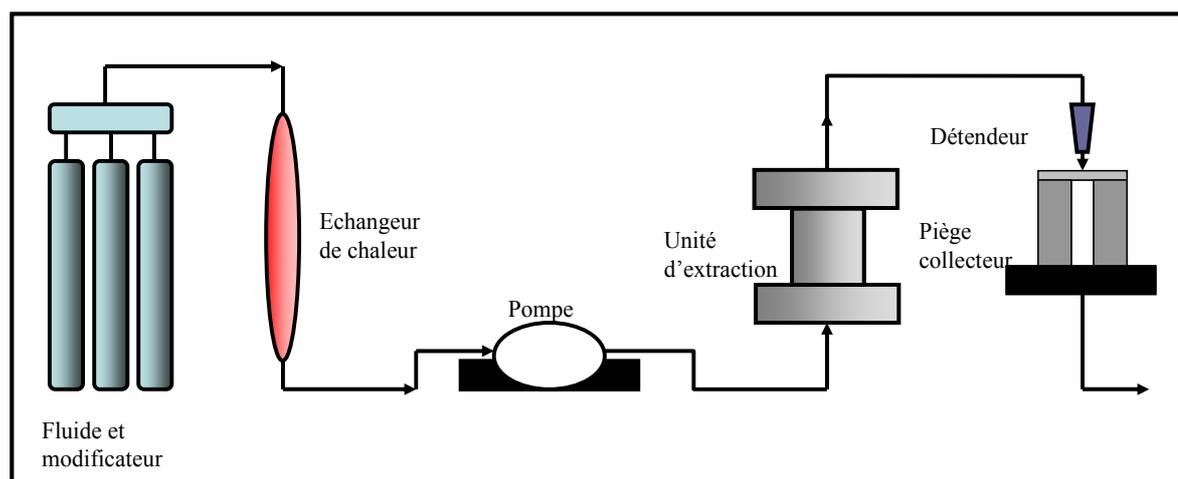


Figure 1.14 : Extracteur analytique au fluide supercritique

#### 1.3.1.3.1 Nature du fluide supercritique : utilisation des modificateurs

Parmi tous les fluides utilisés dans l'extraction supercritique, le dioxyde de carbone demeure le solvant de choix analytique ou industriel pour les raisons déjà citées. Il montre

cependant un pouvoir solvant relativement faible envers les produits polaires. Deux solvants, le Fréon-22 (chlorodifluoromethane) et le protoxyde d'azote ( $N_2O$ ), ont été utilisés avec succès dans l'extraction des produits naturels [204-206], cependant, le protoxyde d'azote peut causer une explosion et le fréon-22 est nuisible pour l'environnement. L'eau, solvant très polaire, a été utilisée à l'état supercritique comme milieu réactionnel [207]. L'eau surchauffée ( $T < T_c$ ) a été utilisée dans l'extraction de produits naturels [208], elle présente l'inconvénient d'extraire les produits très polaires et surtout ne convient pas pour les produits thermolabiles. Pour pallier ces inconvénients, l'alternative d'utiliser le dioxyde de carbone modifié a été appliquée avec succès, la technique consiste à ajouter un solvant (appelé co-solvant) assez polaire et en très faible quantité afin de modifier la polarité du système. Pas moins de 17 modificateurs ont été testés [209], parmi ceux-ci, le méthanol est le plus couramment utilisé pour sa polarité et sa grande solubilité dans le dioxyde de carbone (20%). L'éthanol a aussi été utilisé comme modificateur avec succès dans l'extraction des produits naturels [204,210]. Sur le plan mécanisme d'action, le modificateur crée des interactions dipôle - dipôle, dipôle - dipôle induit et des ponts hydrogènes. Ces interactions sont modélisées par des équations d'état telle que l'équation de Peng-Robinson [211].

#### 1.3.1.3.2 Extraction

La réussite de l'opération d'extraction par les fluides à l'état supercritique dépend de la maîtrise de différents paramètres : la méthode de préparation de l'échantillon, la nature du fluide et du modificateur et les conditions d'extraction telles que la pression, la température, le débit et le temps. Beaucoup de travaux ont été consacrés à l'optimisation des conditions opératoires [212-215]. L'étude cinétique permet d'élucider l'étape limitante du processus d'extraction qui est souvent la diffusion du soluté de l'intérieur du solide vers l'extérieur. La solubilité des produits est contrôlée par deux facteurs : la volatilité qui est fonction de la température et le pouvoir solvant directement lié à la densité (fonction de la pression d'extraction) [209]. La densité du fluide supercritique est sans aucun doute le paramètre le plus important dans l'extraction car la composition chimique de l'extrait final y est intimement liée. Le contrôle de la densité au cours de l'extraction permet de réaliser le fractionnement de l'extrait [216]. Citons comme exemples la déterpénération des essences d'agrumes [217] et le fractionnement des oléorésines [218]. L'extraction des produits naturels par les fluides supercritiques a fait l'objet de divers travaux, particulièrement sur les produits volatils [219-222] ainsi que sur la production d'antioxydants [216]. Des études

ont passé en revue les données d'équilibre [223] et de solubilité [224] de certains monoterpènes, la solubilité des esters [225], des acides gras [226] et la modélisation empirique de la solubilité dans le dioxyde de carbone supercritique [227].

### II.1.3.3 Techniques de collection

En quittant l'enceinte d'extraction, le fluide supercritique subit une expansion provoquant ainsi une diminution de pression. Afin de séparer le soluté, différentes techniques de piégeage ont été développées.

#### 1.3.1.3.3.1 Piégeage en phase liquide

L'opération consiste à piéger le courant de fluide supercritique (figure 1.15-a) dans un solvant tel que le dichlorométhane, ou l'acétate d'éthyle [228] ou d'autres solvants comme l'hexane et le méthanol. Le piégeage se fait le plus souvent à une température inférieure à 0°C et rarement à la température ambiante [229]. Un autre système légèrement différent, le Dionex 703 (figure 1.15-b) a été utilisé. Il permet la précipitation des produits lourds le long d'un tube alors que les produits volatils sont directement piégés dans le liquide [230]. L'optimisation des conditions opératoires a fait l'objet d'un certain nombre de travaux [231, 232].

#### 1.3.1.3.3.2 Piégeage en phase solide

C'est la technique la plus communément utilisée, elle consiste à adapter à la sortie du détendeur une cartouche (inox en général) garnie de phase solide inerte telle que des billes de verre ou une phase stationnaire de chromatographie telle que l'octadecylsilice (ODS), le porapak ou le tenax [230]. L'optimisation des conditions opératoires, telles que la nature de la phase ainsi que l'ajout de modificateurs au dioxyde de carbone a été étudiée [233, 234], il a été montré que l'utilisation d'un mélange 50/50 de porapak – billes de verre et l'ajout de modificateurs au CO<sub>2</sub> [235] contribuent à l'augmentation de l'efficacité du piégeage.

#### 1.3.1.3.4 Développement de nouvelles techniques

Afin d'augmenter l'efficacité de piégeage et d'adaptation, de nouvelles techniques ont été récemment développées. Il s'avère qu'un couplage en « off-line\* » SFE/GC est une bonne

alternative pour les composés très volatils [236]. Une autre étude [237] a recommandé l'ajout de vapeur de produits organiques au dioxyde de carbone après son expansion.

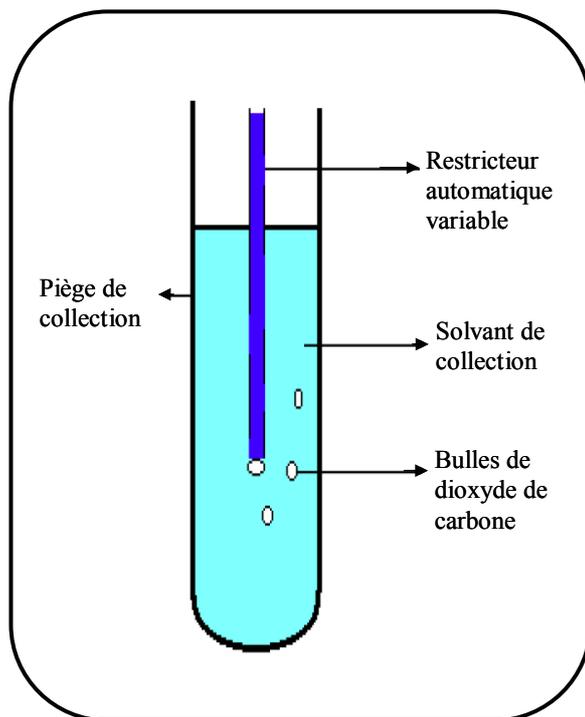


Figure 1.15-a : Piège en phase liquide

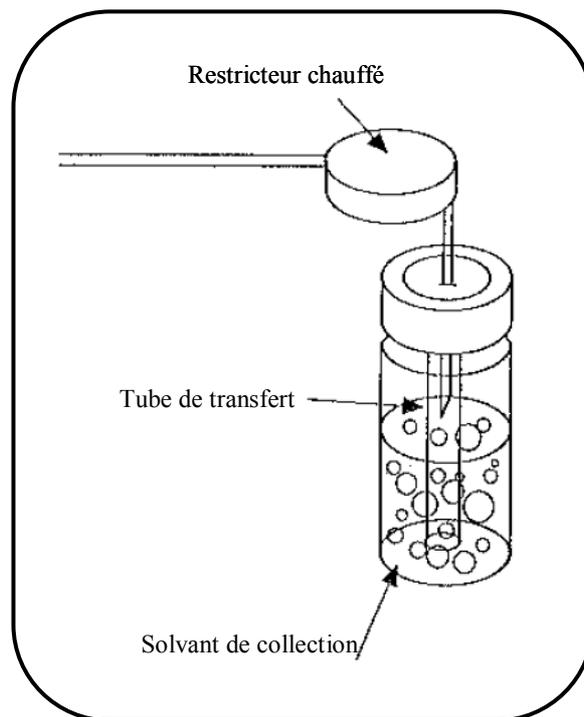


Figure 1.15-b : Extracteur Dionex

#### 1.3.1.4 Extraction subcritique

L'état subcritique est frontalier de l'état supercritique. Quand l'un des paramètres : pression ou température est inférieur à la valeur critique (figure 1.12) on retrouve alors le domaine du subcritique. Tous les solvants utilisés à l'état supercritique peuvent être utilisés à l'état subcritique [238], toutefois l'eau subcritique (SWE) à une température entre 100 et 374 °C et à une pression suffisamment élevée pour maintenir l'état liquide est de loin la technique la plus employée actuellement [239-241]. De nombreux travaux montrent que cette technique représente un outil très puissant dans le domaine de l'extraction des huiles essentielles. L'intérêt de cette technique est sa simplicité, un coût très bas, aucun danger pour l'environnement et la réalisation de l'extraction en un temps très court. Un autre avantage de la technique est sa sélectivité en fonction des conditions opératoires [242, 243], elle a été utilisée, par exemple, dans la séparation des anti-oxydants [244].

#### 1.3.1.5 Modélisation de l'extraction par les fluides supercritiques

La modélisation de l'extraction par les fluides supercritiques permet de comprendre le mécanisme de l'extraction et par conséquent l'optimisation des conditions. Le choix d'un modèle dépend de la distribution initiale des produits extractibles dans la phase solide, ils peuvent se trouver à l'état libre ou adsorbé. Les résultats expérimentaux contribuent aussi au choix du modèle en indiquant les différentes étapes du transfert de matière. L'établissement de modèles mathématiques permet de généraliser les résultats expérimentaux et de les appliquer à d'autres matériaux. La littérature, dans ce domaine, fait état d'un nombre impressionnant de références bibliographiques consacrées à la modélisation de l'extraction d'huiles essentielles [245-257], du fractionnement des huiles essentielles et concrètes [258-260] et à l'estimation de coefficients de transfert de matière et de diffusion [261, 262]. Trois approches ont été proposées pour la modélisation de l'extraction par les fluides supercritiques [263] :

- Modèles empiriques

L'extraction de certains produits naturels [264] a été décrite par une équation similaire au modèle de Langmuir pour l'adsorption monocouches des gaz. Le rendement d'extraction est représenté par l'équation I.

$$Y = \frac{Y_{\infty} t}{B + t} \quad \text{Eq.I}$$

Où  $Y_{\infty}$  est le rendement à un temps infini et  $Y$  le rendement exprimé en % (masse/masse).

Un autre modèle empirique [265] appliqué à l'extraction de l'oléorésine de vanille, considère l'extraction comme une réaction chimique du premier ordre. La vitesse d'extraction est proportionnelle à la concentration  $q_s$  et l'équation du modèle s'écrit :

$$\frac{dq_s}{dt} = -kq_s \quad \text{Eq.II}$$

Où  $k$  est la constante cinétique, la forme intégrée de cette équation, en considérant les conditions initiales  $t = 0, q_s = q_{s0}$  s'écrit :

$$q_s = q_{s0} \exp(-kt) \quad \text{Eq.III}$$

Selon ces auteurs, si la diffusion interne est l'étape limitante, il est possible de poser :

$k = DA/Vz$ , où  $A/V$  est le rapport de la surface sur le volume et  $z$  est la longueur de diffusion.

- Modèles basés sur l'analogie avec le transfert de chaleur

Dans ce cas, l'extraction par les fluides à l'état supercritique est traitée de façon analogue au transfert de chaleur, chaque unité solide (considérée comme une sphère) de matière végétale est considérée comme un ballon chaud en refroidissement dans un milieu uniforme. La forme intégrée de la seconde loi de Fick est donnée par l'équation IV [266] :

$$\frac{q}{q_0} = \left( \frac{6}{\pi^2} \right) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left( -\frac{n^2 \pi^2 D t}{r^2} \right) \quad \text{Eq.IV}$$

$n$  est un entier,  $r$  est le rayon de la sphère (m),  $D$  est le coefficient de diffusion du soluté ( $\text{m}^2/\text{s}$ ),  $t$  le temps d'extraction (s),  $q$  est la concentration de soluté restant dans la sphère ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ) et  $q_0$  la concentration initiale de la matière extractible.

- Modèles basés sur le bilan de matière différentiel

La majorité des modèles mathématiques ont été développés avec l'hypothèse d'une dispersion axiale négligeable, une densité de solvant constante et la composition globale de l'huile essentielle considérée comme un constituant pur. Dans un élément de volume de l'extracteur de hauteur  $dh$ , le bilan de matière s'écrit :

$$uV \frac{\partial c}{\partial h} + \varepsilon V \frac{\partial c}{\partial t} + (1-\varepsilon) V \frac{\partial q}{\partial t} = 0 \quad \text{Eq.V}$$

$$(1-\varepsilon) V \frac{\partial q}{\partial t} = -A_p K (q - q^*) \quad \text{Eq.VI}$$

Où  $\varepsilon$  est la porosité du lit,  $V$  le volume de l'extracteur ( $\text{m}^3$ ),  $c$  la concentration de l'extrait dans la phase fluide ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ),  $q$  la concentration de l'extrait dans la phase solide ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ),  $u$  la vitesse superficielle du solvant (m/s),  $A_p$  la surface totale des particules ( $\text{m}^2$ ),  $q^*$  la concentration d'équilibre à l'interface solide/fluide ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ),  $h$  est la coordonnée spatiale le long du lit (m),  $t$  le temps d'extraction (s),  $q_0$  la concentration initiale dans la phase solide ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ),  $K$  (m/s) le coefficient de transfert de matière interne.

Le bilan de matière dans la phase solide s'écrit :

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{D_e}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial q}{\partial r} \right) \quad \text{Eq.VII}$$

Où,  $r$  (m) est le rayon de la particule solide,  $D_e$  le coefficient de diffusion effectif à l'intérieur de la particule ( $\text{m}^2/\text{s}$ ).

L'utilisation des équations V et VI pour modéliser le procédé d'extraction dans les conditions initiales et aux limites appropriées nécessite la connaissance de la concentration d'équilibre  $q^*$ . Une relation linéaire (Eq.VIII) est souvent appliquée.

$$c = k_p q^* \quad \text{Eq.VIII}$$

Où  $k_p$  est le coefficient de partage volumétrique entre la phase solide et la phase fluide à l'équilibre.

En considérant la condition initiale suivante à  $t = 0$ ,  $c = 0$  et  $q = 0$  et la condition aux limites à  $h = 0$ ,  $c(0, t) = 0$ , l'équation VII peut être résolue numériquement en utilisant la méthode des caractéristiques.

Dans l'équation VI, le terme  $A_p K / (1-\varepsilon)V$  a la dimension de l'inverse du temps (1/s). Il est donc possible de définir un temps de diffusion interne comme étant :  $t_i = (1-\varepsilon)V/A_p K$ , où  $t_i$  est un temps caractéristique dans le processus d'extraction.

L'équation VI devient alors :

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -\frac{1}{t_i} (q - q^*) \quad \text{Eq.IX}$$

Si l'extraction est uniforme le long du lit ( $\frac{\partial c}{\partial h}$  est constante), les équations V et IX peuvent s'écrire :

$$\left( \frac{W}{\rho} \right) c + \varepsilon V \frac{dc}{dt} + (1-\varepsilon) V \frac{dq}{dt} = 0 \quad \text{Eq.X}$$

$$\frac{dq}{dt} = -\frac{1}{t_i} (q - q^*) \quad \text{Eq.XI}$$

Où  $W$  est le débit massique du solvant ( $\text{kg/s}$ ) et  $\rho$  la densité du solvant ( $\text{kg/m}^3$ ).

La majorité des modèles sont basés sur les mêmes équations de bilan (Eq.V et VI) en les adaptant aux conditions expérimentales réelles. Citons, par exemple, le cas du modèle

développé par Sovovà pour un broyage fin [255] et l'équation bilan développée dans le cas d'un feuillet [267].

#### 1.3.1.6 Développement futur de l'extraction par les fluides supercritiques

L'utilisation des fluides à l'état supercritique, soit dans l'extraction ou dans la séparation (chromatographie) est très prometteuse. L'intérêt de la technique dans le domaine de l'extraction réside dans le fait que : (1) la toxicité des fluides (le CO<sub>2</sub> en général) est faible, (2) les propriétés dissolvantes sont "modulables", (3) le solvant est totalement éliminé de l'extrait final [268].

Mais incontestablement, les développements les plus prometteurs concernent, actuellement, les applications pharmaceutiques : extraction de principes actifs à partir des plantes médicinales, élimination des solvants résiduels, purification de principes actifs, obtention de produits antibactériens et/ou antioxydants et les biomatériaux. Nous citerons, également, le traitement de polymères à l'état solide en vue de l'élaboration de matériaux poreux par extraction d'agents de perforation ou des chaînes « courtes » : polypropylène, polyimide, polyamide, polysulfone.

Toutefois, la technique souffre de la compétition avec d'autres procédés (par exemple l'extraction en phase solide (SPE)), de l'automatisation et plus particulièrement de ses limites dans l'extraction des produits polaires, malgré l'utilisation d'une panoplie de modificateurs (co-solvants) [268].

### 1.3.2 Extraction assistée aux micro-ondes

#### 1.3.2.1 Introduction

L'extraction au soxhlet est une technique très utilisée depuis longtemps, elle est devenue une technique de référence à laquelle sont comparées les autres techniques d'extraction solide - liquide. L'intérêt de la technique est la possibilité d'effectuer une série de lavages du solide avec un solvant frais, ce qui permet de déplacer l'équilibre d'extraction et d'atteindre l'épuisement du solide. Il s'agit d'une technique simple et facile à mettre en œuvre, cependant, l'extraction s'effectue sans agitation et sur une période assez longue l'extrait obtenu se trouve à la température d'ébullition du solvant, ce qui peut provoquer des réactions de décomposition des produits thermolabiles [269].

La technique d'extraction au soxhlet a été perfectionnée en adaptant un mode de chauffage plus élaboré. Dans ce contexte, une extraction assistée aux ultrasons a été utilisée. La

technique consomme autant de solvant que celle d'une extraction au soxhlet classique, toutefois, elle a été appliquée en mode discontinu "batch\*" et dans ce cas la durée d'extraction est brève. Il a été montré, d'une part, que l'extraction assistée aux ultrasons est bien adaptée aux produits thermolabiles [270] et d'autre part, que des co-solvants peuvent être ajoutés afin d'augmenter la polarité du solvant d'extraction [271]. Cependant, des études comparatives ont montré que l'extraction au soxhlet classique est plus reproductible [272] et efficace [273] que l'extraction assistée aux ultrasons.

Récemment, une technique d'extraction efficace, rapide et nécessitant une quantité faible de solvant a été développée en utilisant le chauffage micro-onde [274]. L'utilisation des micro-ondes remonte à 1975 [275] dans le séchage des cendres, toutefois, il a fallu plus de dix ans pour assister à l'apparition de la première étude sur l'efficacité des micro-ondes dans l'extraction des produits polaires [276]. Il faut noter que la synthèse organique, effectuée tout d'abord dans des fours domestiques [277], a été la spécialité ayant bénéficié le plus de cette technologie, comme en témoigne le nombre de travaux publiés [278-282]. La plupart des expériences ont été effectuées dans des fours micro-ondes domestiques en multimode (ondes diffuses). Les principaux résultats obtenus concernent la cinétique des réactions : le temps de réaction est considérablement réduit [283], la sélectivité et le rendement de la réaction sont quelquefois influencés [284]. Le début des années 1990 a été marqué par la mise en œuvre d'un matériel plus sophistiqué permettant un réglage plus précis de la puissance. Cependant, la conception de fours micro-ondes focalisées (monomode) est l'invention qui a révolutionné la technologie des micro-ondes. Dans un four à micro-ondes focalisées, l'échantillon est soumis à un rayonnement focalisé grâce à un guide d'onde. Dans ces conditions, la puissance fournie par le magnétron est directement guidée sur l'échantillon, ce qui entraîne une bonne reproductibilité de l'expérience et la puissance de chauffe absorbée reste constante en cours de manipulation (figure 1.16-a). Dans le cas du multimode (système fermé), il se produit un phénomène de cavité (figure 1.16-b). Depuis l'avènement du four micro-ondes focalisées, l'extraction a connu un nouvel essor caractérisé par la publication de beaucoup de travaux [285-290] (figure 1.17). D'une manière générale, le chauffage par radiation micro-ondes a constitué une nouvelle alternative de chauffage en chimie organique et en chimie inorganique [291].

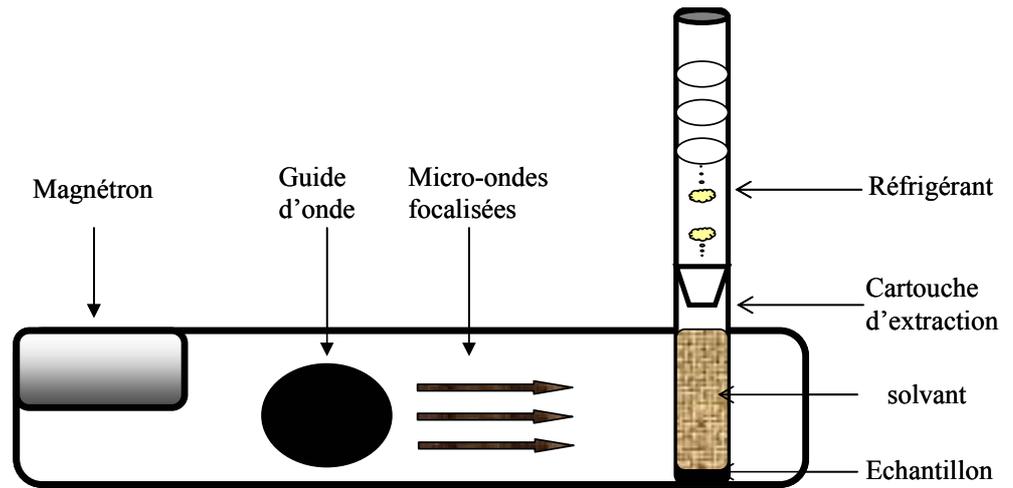


Figure 1.16-a : système à micro-ondes focalisées (monomode)

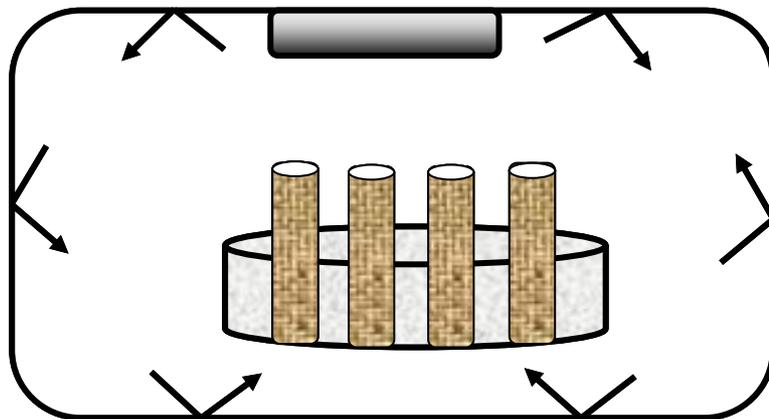


Figure 1.16-b : système à micro-ondes diffuses (multimode)

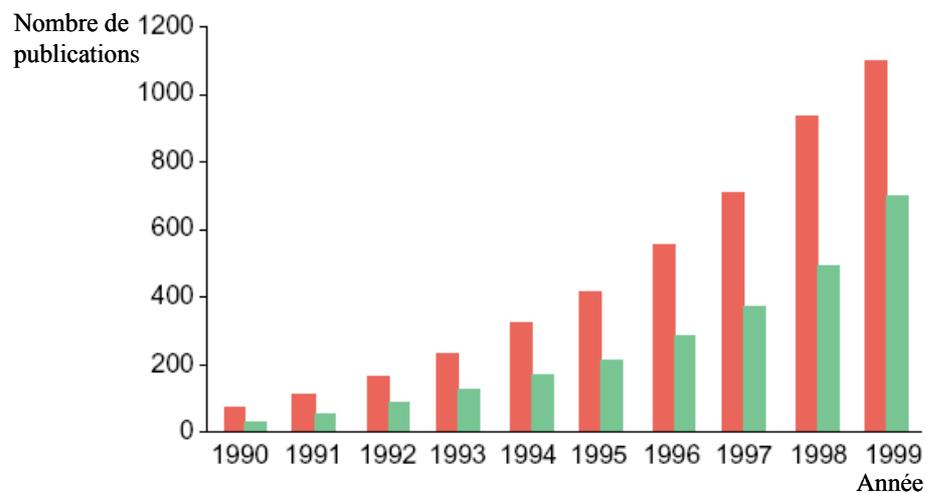


Figure 1.17 : Evolution du nombre de publications en chimie organique et inorganique

- Rouge: Nombre global de publications
- Vert: nombre de publications en chimie organique

### 1.3.2.2 Etude descriptive

Les micro-ondes sont des radiations non ionisantes s'étalant dans le spectre électromagnétique de 0,3 à 300 GHz correspondant à une longueur d'onde de 1 mm à 1m (figure 1.18-a) et provoquant à l'échelle élémentaire des rotations moléculaires (figure 1.18-b). Les fours micro-ondes domestiques ou commerciaux ont été autorisés à utiliser une fréquence de 2,45 GHz (longueur d'onde de 12,2 cm). Le chauffage micro-ondes utilise l'aptitude que possède un liquide ou un solide à transformer la radiation micro-onde en chaleur, une condition nécessaire est que la matrice contienne des espèces polaires ou ioniques. Sous l'effet du champ électrique, les molécules possédant un moment dipolaire permanent (et/ou induit) s'orientent dans le sens du champ, cette opération provoque une libération d'énergie sous forme de chaleur, due à la friction moléculaire [291]. Les espèces ioniques interagissent plus rapidement avec la radiation micro-onde et, par conséquent elles chauffent plus, en comparaison aux molécules polaires. C'est ce qui explique leur utilisation dans les milieux non polaires pour véhiculer la chaleur libérée par un chauffage micro-ondes. En fait pour comparer l'aptitude d'un solvant à interagir avec une radiation micro-onde, il faut prendre en considération deux paramètres [291] : (i) l'aptitude du solvant à absorber l'énergie micro-onde caractérisée par la constante diélectrique ( $\epsilon'$ ), (ii) l'aptitude du solvant à transformer l'énergie en chaleur, caractérisée par le facteur de perte (ou constante diélectrique de perte  $\epsilon''$ ). Afin de prendre en considération ces deux paramètres on fait appel au facteur de dissipation appelé aussi angle ou tangente de perte défini par  $\tan \delta = \epsilon''/\epsilon'$ . Les valeurs des constantes diélectriques et de l'angle de perte, des solvants les plus communément utilisés sont données dans le tableau 1.4. Les solvants ayant un angle de perte presque nul sont appelés solvants transparents.

Le chauffage micro-ondes est homogène et rapide car il s'effectue directement dans le cœur du système. Par opposition, le chauffage classique se fait par conduction ou par convection, à partir de l'extérieur vers l'intérieur (figure 1.19).

Tableau 1.4 : Valeurs de la constante diélectrique et de l'angle de perte de quelques solvants

Solvant	Constante diélectrique	Angle de perte
Hexane	1,9	-
Benzène	2,3	-
Tétrachlorure de carbone	2,2	-
Chloroforme	4,8	0,091
Acide acétique	6,1	0,174
Acétate d'éthyle	6,2	0,059
Tétrahydrofurane	7,6	0,047
Chlorure de méthylène	9,1	0,042
Acétone	20,6	0,054
Ethanol	24,6	0,941
Méthanol	32,7	0,659
Acétonitrile	36,0	0,062
Diméthylformamide	36,7	0,161
Diméthylsulfoxyde	47,0	0,825
Acide formique	36,7	0,161
Eau	58,0	0,722

Dans le domaine de l'innovation, deux types de fours micro-ondes ont été développés : des systèmes ouverts à la pression atmosphérique et des systèmes fermés sous contrôle de la température et de la pression [292, 293]. Dans les systèmes fermés, le solvant est chauffé à une température supérieure à son point d'ébullition normal, la pression augmente (d'où l'utilisation de réacteurs résistant à la pression en polytétrafluorethylène), ce qui a pour effet de provoquer une augmentation de la vitesse et de l'efficacité d'extraction. Afin d'homogénéiser le champ électrique dans la cavité, l'enceinte d'extraction est placée sur un plateau tournant. Dans les systèmes ouverts, l'extraction est effectuée sous pression atmosphérique, la température maximale atteinte est la température d'ébullition normale du solvant. Les systèmes ouverts utilisent plus particulièrement les micro-ondes focalisées. L'extraction est réalisée sous agitation dans un tube de verre (protégé par un tube de quartz) surmonté d'un réfrigérant permettant de condenser les vapeurs. Dans le domaine de l'extraction, les systèmes ouverts sont souvent préférés aux systèmes fermés.

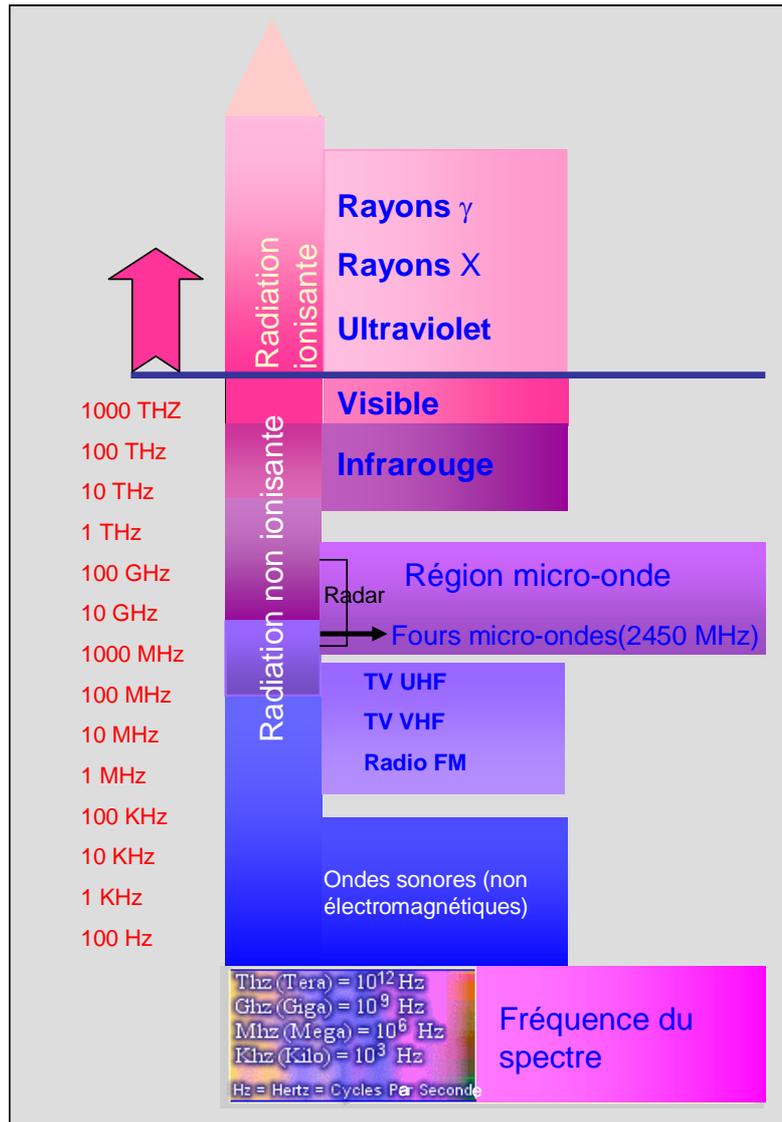


Figure 1.18-a : Spectre électromagnétique

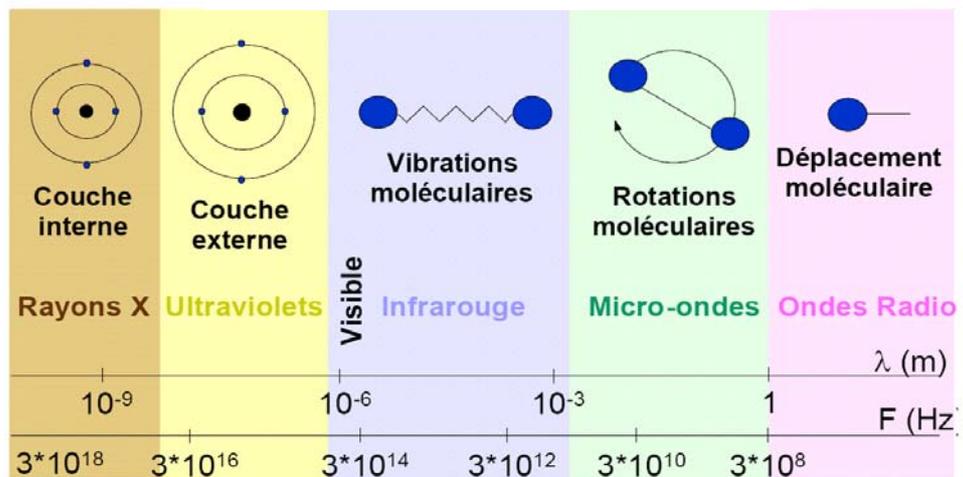


Figure 1.18-b : Interaction du spectre électromagnétique avec l'atome et la molécule

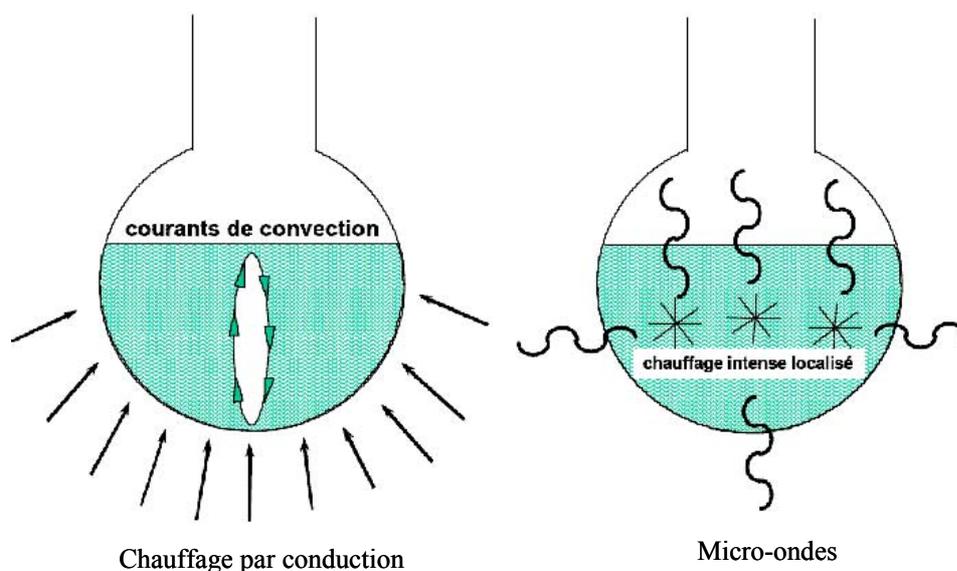


Figure 1.19 : Mécanisme de chauffage classique et micro-ondes

### 1.3.2.3 Extraction des produits naturels assistée aux micro-ondes

Le chauffage micro-ondes a été largement utilisé dans le domaine de l'extraction des produits naturels. Le mécanisme d'extraction illustré dans la figure 1.20 montre qu'on se retrouve dans trois situations : Un solvant absorbant et un échantillon absorbant, un solvant transparent et un échantillon absorbant, un échantillon réhydraté et extraction par un solvant absorbant ou transparent.

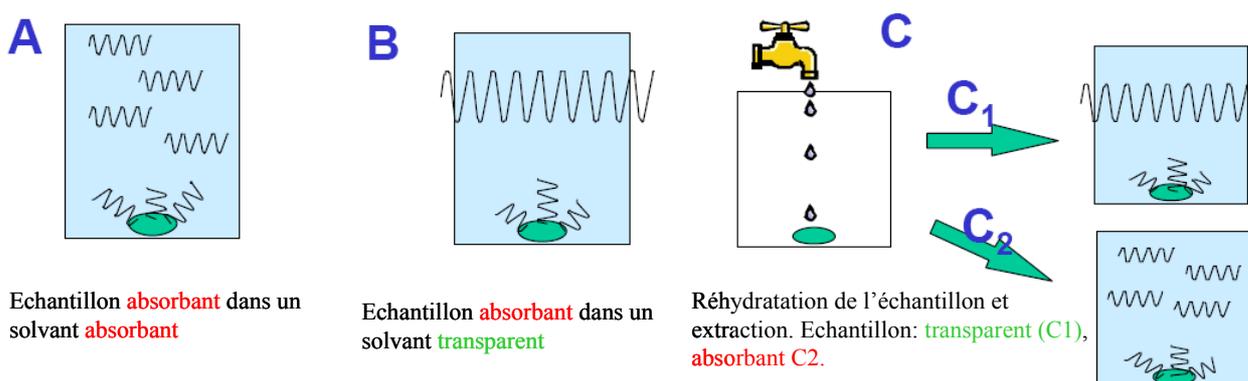


Figure 1.20 : Différents schémas d'extraction

Des travaux menés sur l'extraction assistée aux micro-ondes des produits naturels ont utilisé des systèmes fermés (cavité) [294, 295], mais ce sont les fours à micro-ondes

focalisées en systèmes ouverts qui ont été le plus souvent employés [296-300] (figure 1.21). Concernant les systèmes à micro-ondes focalisées, différentes approches ont été adoptées [301] : une approche standard, une approche inverse, une approche couplée et une approche automatique. Dans l'approche standard, le montage de la figure 1.21 peut être modifié au niveau de l'enceinte d'extraction. Cette dernière est reliée en continu avec un système de distillation, après évaporation du solvant il est condensé au dessus de l'enceinte d'extraction, ce qui permet d'effectuer le lavage en continu de la matrice végétale (contenue dans une cartouche) avec du solvant frais. L'approche inverse est bien adaptée aux extractions acides où la cartouche d'extraction peut être endommagée. Dans l'approche couplée, l'objectif est d'inclure une interface qui permet de connecter l'extracteur à micro-ondes focalisées à d'autres appareils [302]. L'approche automatique ressemble en grande partie à l'approche couplée, elle consiste à automatiser un système d'extraction avec toute la régulation nécessaire.

Certaines études ont été consacrées à l'optimisation des différents paramètres (puissance, temps et nature du solvant) [303-305]. La description mathématique des résultats obtenus a été limitée à l'utilisation de la technique du plan factoriel [298,306]. Ceci est dû à l'absence d'un fondement théorique qui permettrait de décrire le phénomène de transfert. Dans le cadre de la présente étude, nous avons développé une technique d'hydrodistillation assistée aux micro-ondes focalisées [307], l'expérience est réalisée dans un Soxwave 3 (Prolabo) fonctionnant sous pression atmosphérique (système ouvert).

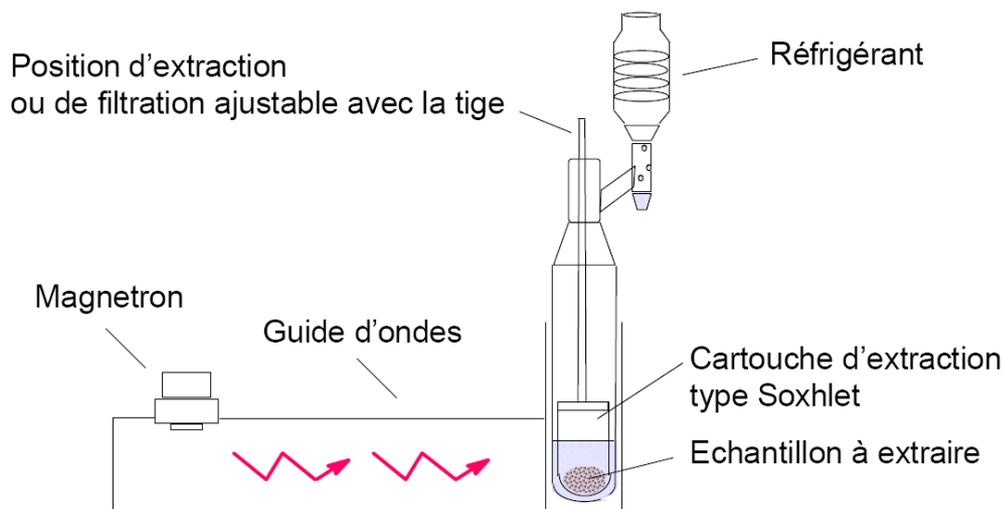


Figure 1.21: Système d'extraction atmosphérique à micro-ondes focalisées (système ouvert)

#### 1.3.2.4 Perspectives

Les perspectives concernent, plus particulièrement, les extracteurs à micro-ondes focalisées, les objectifs étant axés sur : l'automatisation qui comprend une interface de contrôle et l'adaptation en continu d'un système de distillation avec l'extracteur [301]. Concernant les fours actuellement sur le marché, les modifications à apporter visent la minimisation des volumes morts, le compactage de l'unité d'extraction et l'adaptation de nouveaux systèmes de contrôle [301].

**CHAPITRE 2**  
**ISOLEMENT ET CARACTERISATION STRUCTURALE DES METABOLITES**  
**SECONDAIRES**  
**DES ALGUES BRUNES *CLADOSTEPHUS HIRSUTUS*, *ZONARIA***  
***TOURNEFORTII* ET *BIFURCARIA BIFURCATA***

« It is not exaggerating to state that, very frequently, the success or failure of studies with bioactive factors depends solely on whether one succeeds in the isolation; especially when the factors exists in minute quantities or is labile. ...Structural elucidation allows us to advance towards clarification of mode of action, etc.»  
 (K. Nakanishi, in Preparative Chromatographic Techniques, Springer-Verlag, 1986).

Ce chapitre est réservé à l'étude des extraits lipidiques de trois espèces d'algues brunes décrites sur le plan biologique dans le premier chapitre du mémoire : *Cladostephus hirsutus*, *Zonaria tournefortii* et *Bifurcaria bifurcata*. Nous décrivons dans un premier sous chapitre les méthodes d'obtention et de traitement de l'extrait brut de chacune de ces algues ainsi que les techniques et conditions de purification des métabolites secondaires. Le second sous chapitre est consacré à l'analyse qualitative des extraits et à la caractérisation structurale des produits isolés.

## 2.1 Isolement des metabolites secondaires

### 2.1.1 Récolte et traitement du matériel végétal

Les espèces d'algues étudiées au cours de ce travail, à savoir : *Cladostephus hirsutus*, *Zonaria tournefortii* et *Bifurcaria bifurcata*, ont été récoltées sur les côtes méditerranéennes algériennes, au niveau du complexe touristique "la Corne d'Or "à Tipaza, pour les deux premières (figure 2.1) et sur les côtes atlantiques marocaines, à Oualidia, pour la troisième (figure 2.1). Concernant les deux premières espèces, nous avons procédé nous-mêmes à leur récolte à une profondeur de 2 à 3 mètres. Des échantillons d'algues récoltées ont été conservés dans une solution de formol à 5% et identifiés au laboratoire de Biologie marine de l'Université des Sciences et de la Technologie d'Alger, par le Dr. H.Seridi (algologue). Pour *Cladostephus hirsutus*, le travail expérimental a été effectué sur deux échantillons récoltés respectivement en mai 2001 et en septembre 2002, quant à l'espèce *Zonaria tournefortii*, elle a été récoltée en mai

2001. L'espèce *Bifurcaria bifurcata* a été récoltée à Oualidia (Maroc) au mois de septembre 2002 et identifiée par le laboratoire de chimie organique et bioorganique de l'Université d'El Jadida. L'étude de cette espèce entre dans le cadre de la collaboration qui existe entre notre laboratoire d'accueil et celui d'El Jadida qui s'est concrétisée par la soutenance de deux thèses de doctorat [29, 308] et la publication de structures chimiques originales [63-69].

Le matériel végétal est soumis, après récolte, à un triage manuel afin d'éliminer les épiphytes et autres organismes susceptibles de contaminer la nature chimique de l'extrait, il est suivi d'un rinçage à l'eau douce et d'un séchage à l'air, à l'abri de la lumière.

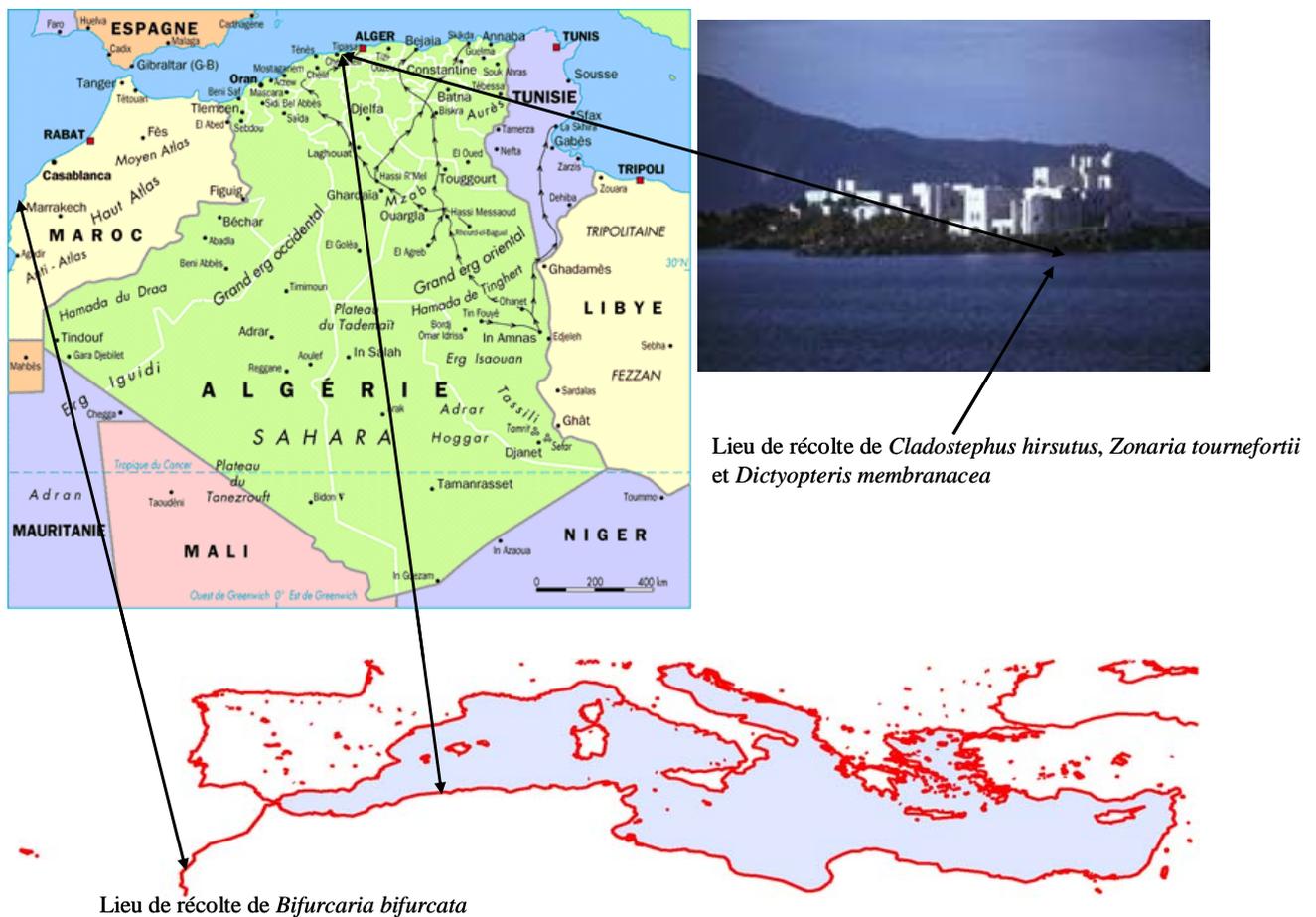


Figure 2.1 : Lieux de récolte des différentes espèces d'algues

### 2.1.2 Extraction

Deux procédés d'extraction et de traitement de l'extrait ont été appliqués. Le premier procédé (figure 2.2), appliqué aux espèces *Cladostephus hirsutus* et *Bifurcaria bifurcata* consiste à effectuer une extraction en mode statique (« batch\* ») à l'aide du mélange CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1/1 : v/v) suivie d'une filtration sous vide et de l'évaporation du solvant, on obtient alors un résidu sirupeux que l'on appelle : extrait brut. L'extraction peut être effectuée plusieurs fois jusqu'à épuisement de la matière végétale. Le traitement de l'extrait brut avec un mélange de solvants non miscibles TMP/MeOH permet l'obtention de deux phases :

- une phase isooctane (TMP) supérieure constituée principalement des produits apolaires et faiblement polaires,
- une phase méthanolique inférieure formée de produits polaires

Le traitement ci-dessus permet d'effectuer une séparation grossière de l'extrait en fractions polaire et apolaire, il permet également de concentrer les produits mineurs afin de les mettre en évidence dans l'extrait.

Le second procédé (figure 2.3) a été appliqué à l'espèce *Zonaria tournefortii*, son choix est directement relié à la nature de la composition chimique de l'extrait qui contient principalement des produits phénoliques dérivés du phloroglucinol [132-135]. Il consiste d'abord à préparer un extrait brut par le mélange de solvants CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1/1 : v/v). L'extrait brut, solubilisé dans l'éther, est ensuite neutralisé avec une solution aqueuse de potasse 0,5 N. Deux phases se mettent en équilibre : une phase aqueuse contenant les produits phénoliques sous forme de phénates et des acides gras, et une phase étherée renfermant tous les produits non neutralisés par la potasse. La phase aqueuse est traitée par une solution d'acide sulfurique 0,5 N, puis extraite à l'éther. La phase étherée obtenue est lavée à l'eau jusqu'à pH neutre puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et le solvant évaporé, conduisant à un extrait contenant des acides carboxyliques et phénols que nous avons appelé " fraction phénolique". Le rendement d'extraction est défini comme étant le rapport de masse de d'extrait obtenu sur la masse d'algue sèche.

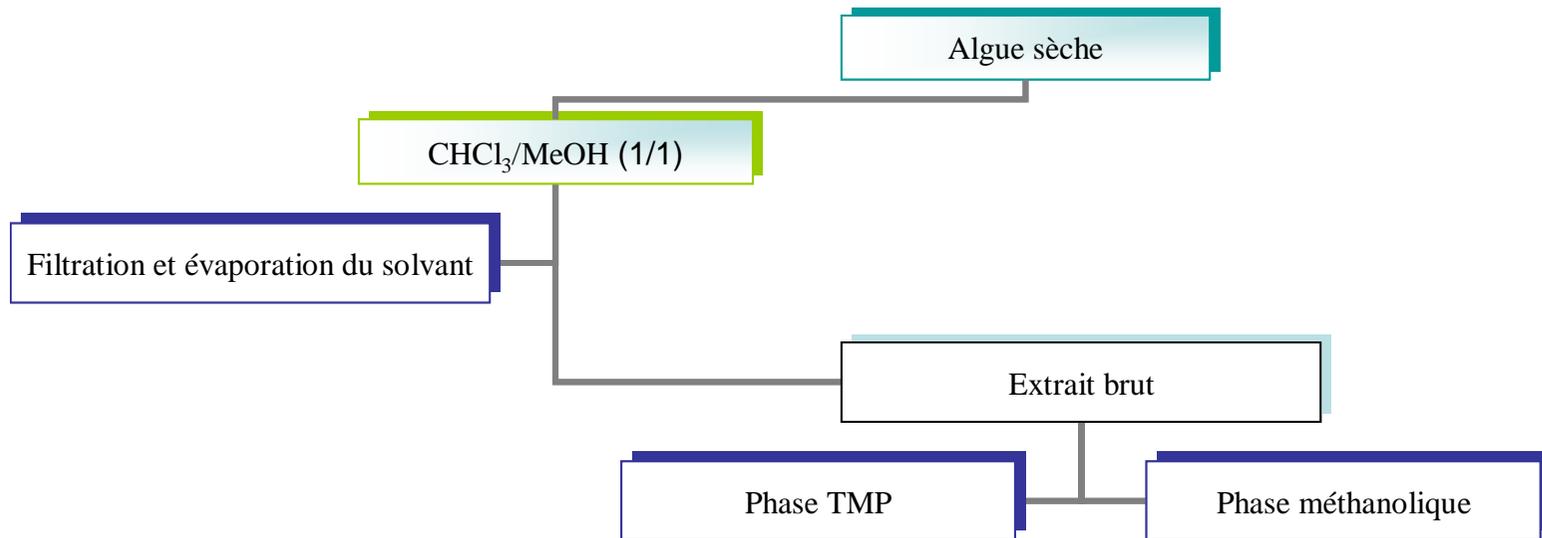


Figure 2.2 : Extraction et traitement de l'extrait de *Cladostephus hirsutus*

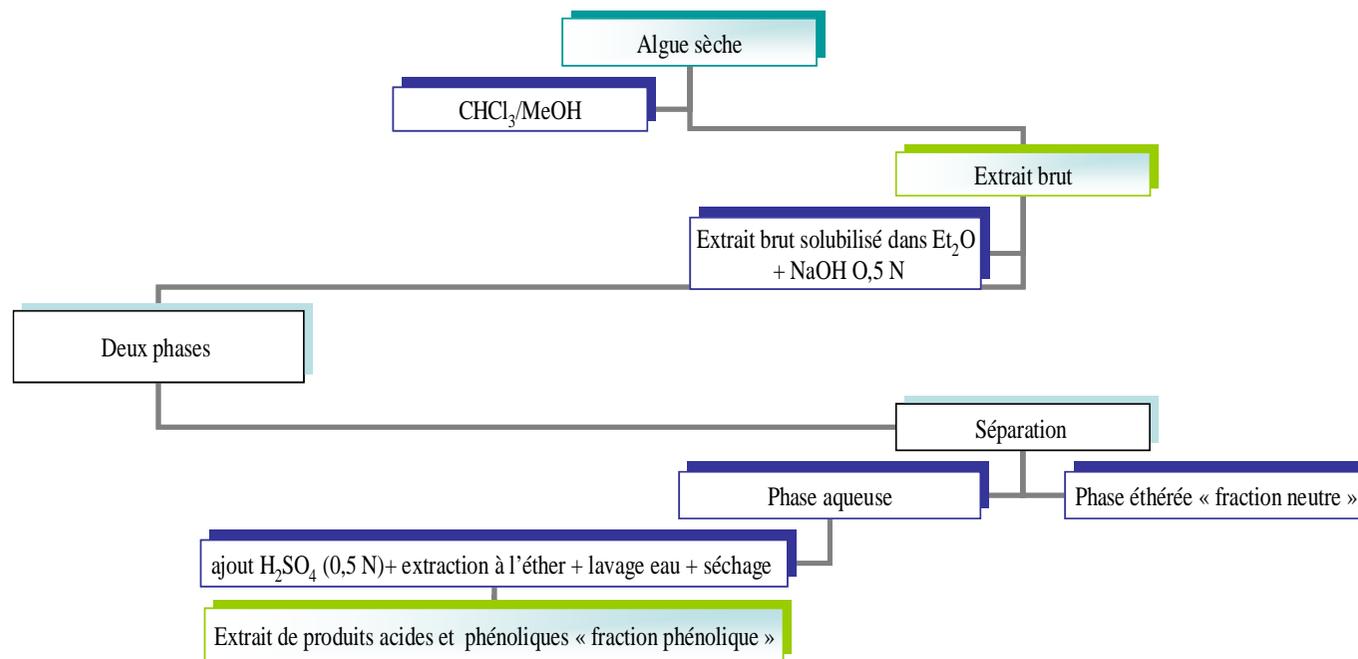


Figure 2.3 : Extraction et traitement de l'extrait de *Zonaria tournefortii*

### 2.1.3 Purification des composés

Le travail analytique comporte deux étapes :

- Un fractionnement grossier sur colonne ouverte de silice conduisant à des fractions de polarité croissante au fur et à mesure qu'on augmente la polarité de l'éluant. Des tests analytiques par CCM permettent d'avoir une idée préliminaire des différentes fractions obtenues et d'établir les conditions de purification.
- L'isolement des métabolites secondaires par CLHP à polarité de phases normale pour les fractions faiblement polaires. L'éluant utilisé est un mélange d'AcOEt/TMP en mode isocratique. Les fractions plus polaires sont étudiées par CLHP à polarité de phases inversée.

### 2.2 Analyse qualitative des extraits bruts et caractérisation structurale des composés isolés

L'étude entreprise dans le cadre du présent travail porte sur les espèces d'algues brunes *Cladostephus hirsutus*, *Zonaria tournefortii* et *Bifurcaria bifurcata*. A notre connaissance, la première espèce n'a jusqu'ici fait l'objet d'aucun travail de nature chimique. Concernant l'espèce *Zonaria tournefortii*, la bibliographie fait état de travaux effectués par les équipes italiennes de V. Amico [132, 133] et C. Tringalli [134, 135] qui ont mené à l'isolement de produits dérivés du phloroglucinol. Dans ce cas, L'objectif de notre travail a été de vérifier l'influence du changement de lieu de récolte de l'algue sur la structure chimique de cette famille de composés. L'étude de l'espèce *Bifurcaria bifurcata* entre dans le cadre de la poursuite de travaux entrepris depuis plusieurs années dans notre laboratoire d'accueil. Ces travaux ont porté essentiellement sur les produits peu et moyennement polaires, alors que ceux des composés polaires n'ont été que succinctement abordés, c'est la raison pour laquelle nous nous sommes axés sur l'étude des fractions polaires par CLHP à polarité de phases inversée. L'étude menant à l'identification de produits purs comporte deux étapes. La première concerne la mise au point et l'application des conditions opératoires de séparation par chromatographie en phase liquide et la seconde porte sur la caractérisation structurale du composé obtenu en faisant appel aux techniques spectroscopiques classiques : Spectrophotométries ultraviolette - visible (UV-Visible), infrarouge (FTIR), spectrométrie de masse basse résolution (CG-SM) et haute résolution (SM-HR), résonance magnétique nucléaire unidimensionnelle du proton (RMN  $^1\text{H}$ ) et du carbone (RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT), auxquelles sont associées des techniques de RMN

bidimensionnelle homonucléaires ( COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) et hétéronucléaires (COSY  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ , HMQC ou HSQC et HMBC) (voir appendice F). Les spectres RMN sont réalisés sur des échantillons en solution dans le chloroforme deutérié ( $\text{CDCl}_3$ ) ou, plus rarement, dans l'acétone deutériée ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) en utilisant des appareils à haut champ (400 ou 500 MHz pour le proton, 100 ou 125 MHz pour le carbone 13). Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm (la référence interne utilisée étant le tétraméthylsilane (TMS)) et les constantes de couplage en Hertz.

### 2.2.1 Etude chimique de *Cladostephus hirsutus* Linnaeus

L'étude chimique a été effectuée sur deux échantillons récoltés en Algérie (figure 2.1) à deux périodes différentes : mai 2001 (**échantillon 1**) et septembre 2002 (**échantillon 2**).

L'extrait brut est obtenu avec le mélange de solvants  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (v/v : 1/1) avec un rendement de 0,7 %, il est ensuite fractionné en phases polaire et apolaire (figure 2.2) avec un rendement respectif de 33,5 % et de 66,5%.

#### 2.2.1.1 Etude chimique de la fraction apolaire

Le profil chromatographique réalisé par CLHP analytique en phase normale (figure 2.4) est identique pour les échantillons 1 et 2, il montre que cette fraction contient des pigments, des composés volatils ( $t_r = 5,81$  min), des acides gras ( $t_r = 11$  min) et une fraction stérolique ( $t_r = 15$  min) (repérée en utilisant un témoin de cholestérol commercial).

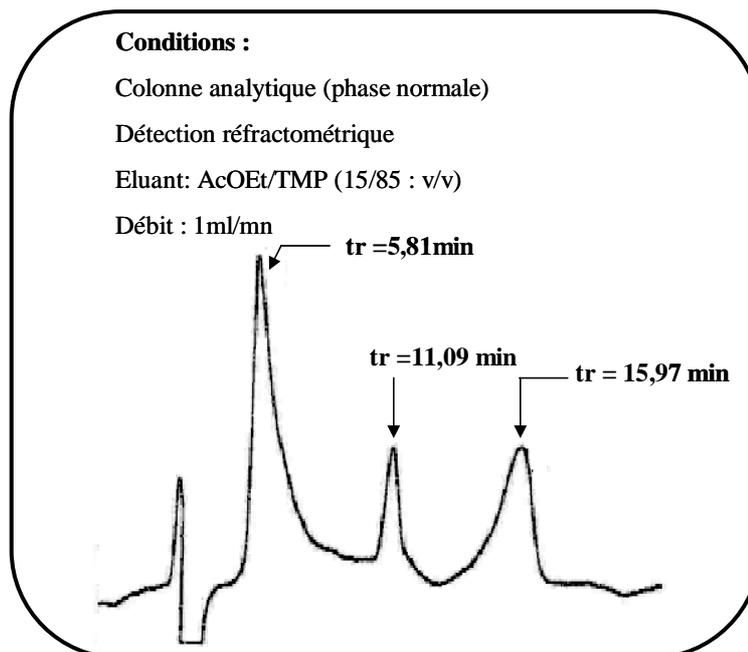


Figure 2.4 : Chromatogramme en CLHP de la phase apolaire de *Cladostephus hirsutus*

L'étude analytique de la fraction apolaire par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) permet d'avoir un aperçu de sa composition chimique (figure 2.5). En particulier, aucun composé de nature terpénique n'est mis en évidence. C'est la raison pour laquelle nous avons plus insisté sur l'étude de la fraction polaire.

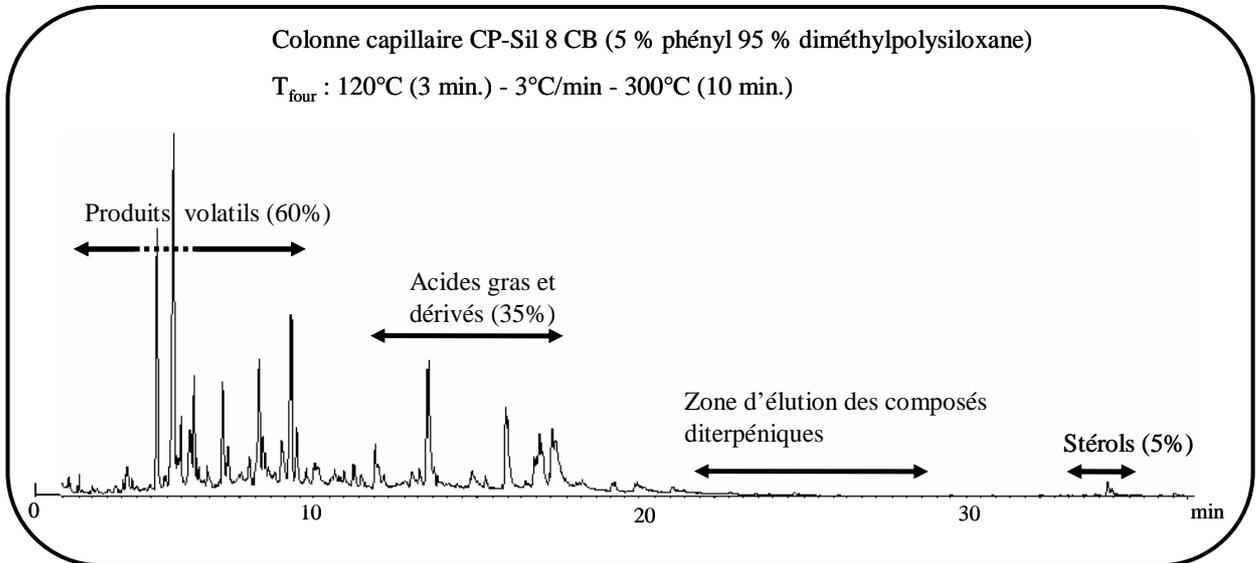


Figure 2.5 : Chromatogramme en CGL sur colonne capillaire de la fraction apolaire

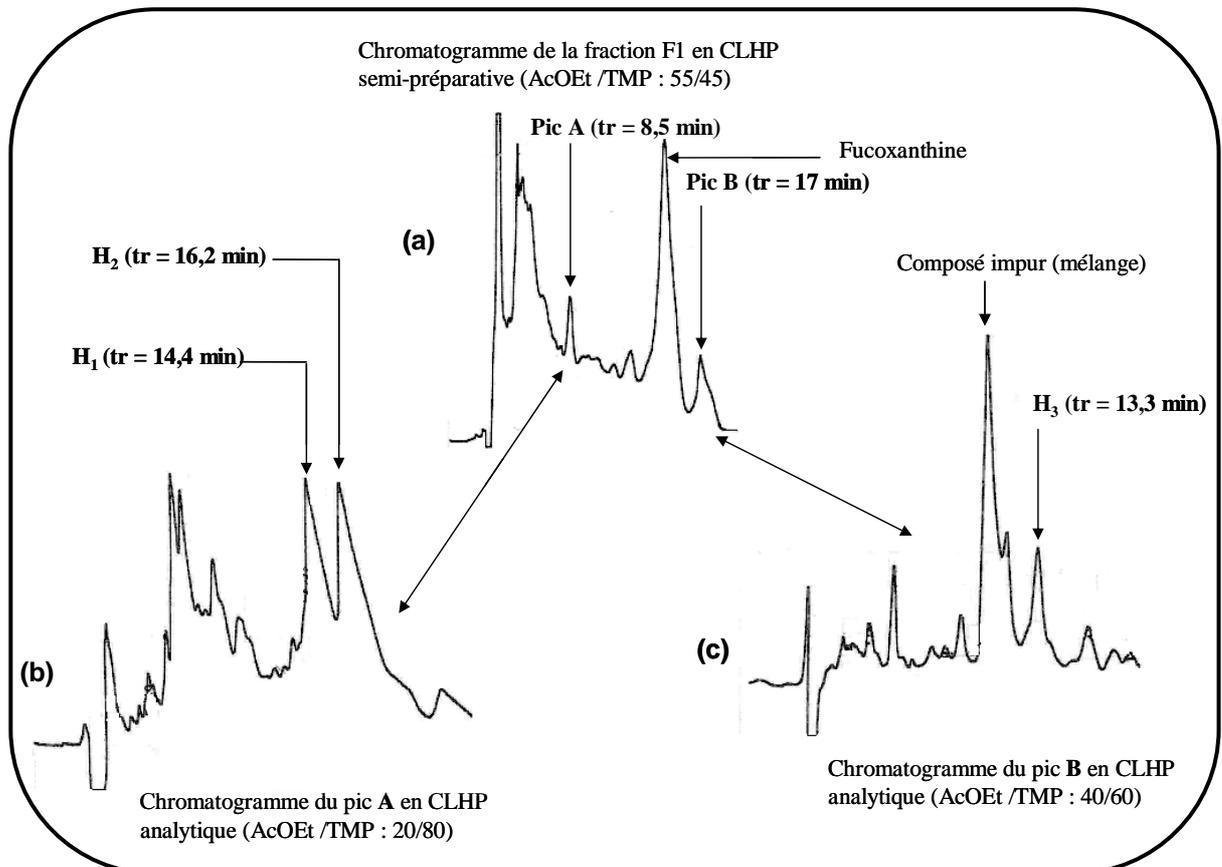


Figure 2.6 : Purification des produits **H1**, **H2** et **H3** par CLHP en phase normale (échantillon 1)

### 2.2.1.2 Etude chimique de la fraction polaire

#### 2.2.1.2.1 Echantillon 1

Une masse de 13,2 g de fraction polaire de l'échantillon **1**, obtenue à partir de l'extrait brut selon le protocole de la figure 2.2, a été fractionnée sur colonne ouverte de silice. Sur la base d'informations obtenues à partir de la CCM, deux fractions **F<sub>1</sub>** et **F<sub>2</sub>** de masses respectives 601 (4,5 % de la fraction polaire) et 693 mg (5,2% de la fraction polaire) obtenues avec l'éluant AcOEt/TMP : 55/45, ont retenu notre attention.

L'étude de ces deux fractions par CLHP en phase normale a été effectuée en deux étapes : (1) fractionnement sur colonne semi-préparative, (2) purification des produits sur colonne analytique.

A partir du profil chromatographique de la fraction **F<sub>1</sub>** obtenu sur colonne semi-préparative avec le système d'élution AcOEt/TMP : 55/45 (figure 2.6-a), deux sous-fractions représentées par les pics **A** et **B** ont été récupérées. Le profil chromatographique de la fraction **F<sub>2</sub>** est pratiquement identique à celui de la fraction **F<sub>1</sub>**, avec une intensité plus importante de fucoxanthine et du pic **B**. Le traitement de la sous-fraction **A** par CLHP analytique avec le système d'élution AcOEt/TMP : 20/80 a permis de purifier 16,13 mg de produit **H1** et 27,64 mg de produit **H2** (figure 2.6-b). La purification de la sous-fraction **B** avec le système d'élution AcOEt/TMP : 40/60 a mené à l'isolement de 8mg de produit **H3** (figure 2.6-c).

#### 2.2.1.2.1.1 Etude structurale du produit H1

Ce produit qui se présente sous la forme d'une huile brune a fait l'objet d'une étude structurale complète par spectroscopie moléculaire (IR, UV, SM, RMN mono - et bidimensionnelle) car nous pensions qu'il s'agissait d'une molécule non encore décrite. Ce n'est qu'une fois sa structure établie que nous avons constaté qu'elle avait déjà été obtenue par oxydation de la fucoxanthine (cf. F1 de la planche 1.8 dans la chapitre I du mémoire) et que sa structure et sa stéréochimie avaient été déterminées par une expérience de diffraction des RX sur un monocristal de son p-bromobenzoate [91,93]. Cependant, ses caractéristiques spectroscopiques n'étant pratiquement pas précisées dans la littérature, nous pensons que notre étude devrait amener un complément d'informations sur les spécificités structurales de cette molécule et d'autres dérivés de la fucoxanthine. Ces

considérations nous ont conduit à conserver pour le produit **H1** la nomenclature et la stéréochimie de l'extrémité allénique de la fucoxanthine.

- Analyse par spectrométrie de masse (Appendice A)

L'analyse du composé **H1** à l'aide d'un spectromètre de masse haute résolution conduit à la formule brute  $C_{15}H_{22}O_4$  qui correspond à une molécule de masse molaire  $266 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  avec un degré d'insaturation D.I. = 5. La fragmentation de la molécule a été étudiée ensuite par impact électronique, ce qui permet d'observer un pic de masse à  $m/z = 266$  avec une intensité relative faible (0,09 %) et un pic à  $m/z = 206$  (2,85%) correspondant à  $M - 60$  (AcOH) qui indique que la molécule contient un groupement acétate. Le pic de base à  $m/z = 43$  correspond au départ d'un groupement acyle ( $CH_3CO$ ). On note aussi la présence d'un pic très important à  $m/z = 123$  (37,21 %) correspondant au départ d'un groupement acétate, du groupement acyle, d'un groupement méthyle et d'une partie du groupement allénique (sous la forme  $\cdot C\equiv CH$ ). La fragmentation observée peut être résumée ainsi : 266 ( $M^+$ ), 251 (M-15), 206 (M-60), 191 (M-60-15), 163 (M-60-43), 123 (M-60-43-40) et 43 (M-223, 100 %) (figure 2.7).

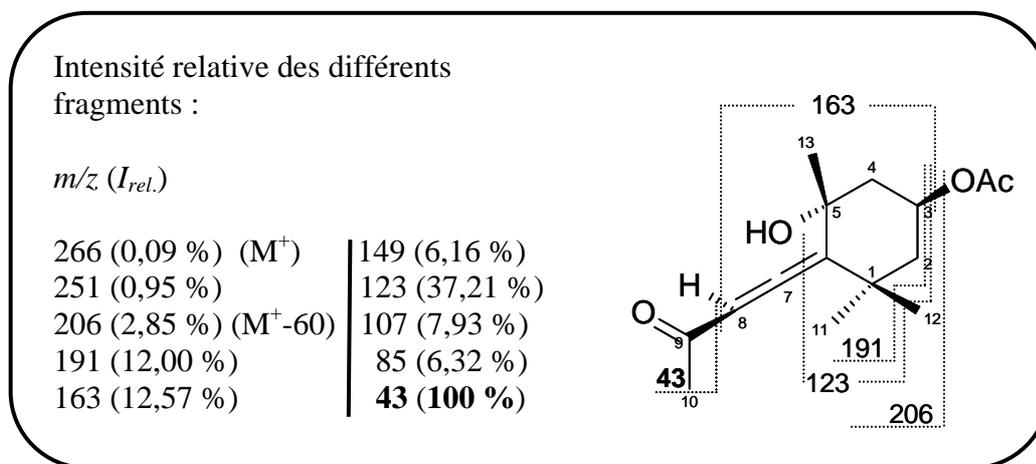


Figure 2.7 : Fragmentation du produit **H1** par impact électronique

- Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Appendice A)

L'examen du spectre infrarouge du composé **H1** révèle l'existence d'une bande fine, due à une vibration d'élongation, très caractéristique ( $1938 \text{ cm}^{-1}$ ) d'un groupement allénique non terminal (on voit apparaître deux bandes quand-il s'agit d'un allène terminal). On note aussi sur le spectre la présence d'une fonction alcool à  $3439 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{O-H}$ ) et  $1031 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{C-O}$ ), d'une fonction ester (acétate) à  $1734 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{C=O}$ ) et  $1245 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{C-O}$ ) et d'une fonction cétone  $\alpha,\beta$ -insaturée à  $1676 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{C=O}$ ).

- Analyse par spectroscopie UV

Le spectre du composé **H1** enregistré dans le dichlorométhane présente une bande d'absorption maximale à 229 nm ( $\epsilon = 26600$ ) qui confirme la présence du groupement allénique [87].

- Détermination du pouvoir rotatoire

Le composé H1 est une huile optiquement active de pouvoir rotatoire négatif. La valeur de son pouvoir rotatoire spécifique mesuré dans le dichlorométhane, à 589 nm (raie D du sodium) est la suivante :  $[\alpha]_D^{20} = -11,1^\circ$  (C = 0,02, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

- Analyse par spectroscopie de RMN (Appendice A)

Les spectres de RMN unidimensionnelle du carbone 13 (RMN <sup>13</sup>C et expériences DEPT) enregistrés dans CDCl<sub>3</sub> donnent les informations suivantes (tableau 5) :

❖ Le composé **H1** renferme 15 atomes de carbone :

- 5 carbones primaires (-CH<sub>3</sub>),
- 2 carbones secondaires hybridés sp<sup>3</sup> (-CH<sub>2</sub>-),
- 2 carbones tertiaires dont un est hybridé sp<sup>3</sup> et l'autre sp<sup>2</sup>,
- 6 carbones quaternaires dont deux sont hybridés sp<sup>3</sup>, trois sont hybridés sp<sup>2</sup> et un est hybridé sp.

❖ Le groupement acétate est identifié par le signal du carbone quaternaire à  $\delta$  170,4 ppm (C-14) et du carbone primaire à  $\delta$  21,3 ppm (C-15),

❖ La présence d'un groupement carbonyle correspondant à une fonction cétone conjuguée est révélée par le signal du carbone quaternaire à  $\delta$  198,1 ppm,

❖ Dans la même région du spectre, le signal à  $\delta$  209,5 ppm (C quaternaire sp : C-7) confirme la présence du groupement allénique mis en évidence par IR, de plus cette confirmation permet d'attribuer les signaux des deux carbones sp<sup>2</sup> restant à identifier ( $\delta$  100,9 et  $\delta$  118,4 ppm) aux deux autres atomes de carbone de ce groupement, respectivement, C-8 et C-6.

❖ Les deux signaux à  $\delta$  72,0 ppm (C sp<sup>3</sup> quaternaire) et  $\delta$  67,4 ppm (C sp<sup>3</sup> tertiaire) confirme la présence d'une fonction alcool tertiaire et d'un groupement acétate fixés, respectivement, sur les carbones 5 et 3.

L'interprétation du spectre de RMN  $^1\text{H}$  (tableau 2.1) a permis de confirmer la présence du proton fixé sur le carbone allénique (C-8) à  $\delta$  5,86 ppm (1H, s, H-8) et de celui fixé sur le carbone 3 (1H, tt, H-3). Des expériences de RMN bidimensionnelle COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  ont permis de distinguer nettement les protons des deux méthylènes cyclohexaniques situés en C-2 et C-4. On remarque qu'ici les protons en position équatoriale ( $\text{H}_{2\text{eq}}$  et  $\text{H}_{4\text{eq}}$ ) sont déblindés d'environ 0,6 à 0,8 ppm par rapport à ceux qui sont en position axiale (ils se trouvent dans le cône de déblindage dû aux liaisons C-C du cycle situées en  $\alpha,\beta$  de l'atome de carbone qui les porte). Les protons  $\text{H}_{2\text{eq}}$  et  $\text{H}_{2\text{ax}}$  qui résonnent respectivement à  $\delta$  2,00 et  $\delta$  1,40 ppm constituent la partie AB d'un système ABX, de même pour les protons  $\text{H}_{4\text{eq}}$  et  $\text{H}_{4\text{ax}}$  qui résonnent à  $\delta$  2,31 et  $\delta$  1,50 ppm (dans le premier cas, la figure de couplage est perturbée par la présence des signaux des méthyles à  $\delta$  2,03 et  $\delta$  1,42 ppm). La COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  montre que la partie X est commune à ces deux systèmes de couplage et qu'elle correspond au proton 3 (H-3 est couplé à la fois aux protons 2 et aux protons 4). Ce proton résonne sous forme d'un triplet de triplets (tt) au lieu d'un dddd (doublet de doublets de doublets de doublets) car les deux constantes de couplage  $J_{(\text{ax-ax})}$  sont identiques entre H-3/H-2 et H-3/H-4, de même pour les deux constantes de couplage  $J_{(\text{ax-eq})}$ . De plus, le fait d'avoir obtenu la valeur de 11,5 Hz pour l'une des deux constantes de couplage - correspondant à un couplage axial-axial entre H-3 et un proton vicinal - confirme que H-3 est en position axiale dans le cycle cyclohexanique.

L'ensemble des attributions des signaux de RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  indiqués dans le tableau 2.1 a été possible grâce à l'utilisation des expériences de RMN bidimensionnelle (COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , COSY  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  et HMBC). En particulier, l'enchaînement carboné de la molécule a été déterminé avec précision, de même que la position des groupements méthyles, de la fonction acétate et de la fonction cétone, à l'aide des corrélations longues distances  $^2J_{\text{C-H}}$  et  $^3J_{\text{C-H}}$ , obtenues grâce à la séquence HMBC (figure 2.8). En particulier, la chaîne acétoxyallénique (C-6 à C-10) est confirmée par les corrélations : C-6/H-8, C-7/H-8, C-8/H-10, C-9/H-8, C-9/H-10 et C-10/H-8 qui permettent, par ailleurs, de positionner de façon précise la fonction carbonyle en C-9. Cette partie de molécule renferme 3 centres d'insaturation, le quatrième étant dû au groupement acétate identifié par IR et RMN  $^{13}\text{C}$ . Sachant qu'il ne reste que huit atomes de carbone  $\text{sp}^3$  à utiliser, dont trois correspondant à des groupements méthyles, le cinquième degré d'insaturation (DI) ne peut être qu'un cycle dont la meilleure hypothèse semble être un cycle à six atomes de carbone comprenant le carbone allénique terminal C-6. Cette hypothèse est confirmée par les corrélations  $^2J$  et

$^3J_{C-H}$  suivantes : C-6/H-2, C-6/H-4, C-2/H-3, C-2/H-4, C-4/H-3, C-4/H-2, C-3/H-4, C-3/H-2, C-5/H-4 ainsi que par les corrélations  $^4J_{C-H}$  entre C-5/H-8 et C-1/H-8 (ces  $^4J_{C-H}$  sont possibles au travers du groupement allénique). La présence du groupement acétate est confirmée par la tache de corrélation  $^2J_{C-H}$  entre C-14/H-15 et sa position sur le C-3 par la  $^3J_{C-H}$  entre C-14/H-3. La position du groupement méthyle-13 est précisée en C-5 (carbone dont on sait par RMN  $^{13}C$  qu'il porte une fonction alcool tertiaire) par les corrélations C-5/H-13, C-6/H-13 et C-4/H-13. De même, celle des deux groupements méthyles -11 et 12 (d'un groupement gem-diméthyle) est attribuée avec précision en C-1 grâce aux taches de corrélation  $^2J$  et  $^3J_{C-H}$  entre C-1/H-11, C-1/H-12, C-2/H-11, C-2/H-12, C-6/H-11, C-6/H-12, C-11/H-12 et C-12/H-11. Ces deux méthyles se distinguent nettement en RMN  $^1H$  ( $\delta$  1,14 ppm pour CH<sub>3</sub>-12 et  $\delta$  1,42 ppm pour CH<sub>3</sub>-11) car, comme dans les familles des stéroïdes et des triterpènes [83], l'hydroxyle fixé en -  $\gamma$  (C-5) déblinde le CH<sub>3</sub>-11 d'environ 0,3 ppm. Cela suppose que ces deux groupements sont tous deux en position axiale et situés du même côté du plan moyen du cycle. La séquence NOESY  $^1H$ - $^1H$  est en accord avec cet état de fait et confirme de façon précise la stéréochimie relative de la molécule avec les taches de corrélation des interactions spatiales entre H-3/H-11 et H-8/H-11 qui montrent que les protons H-3, H-8 et le groupement méthyle - 11 sont situés du même côté du plan moyen du cycle. De plus, la tache de corrélation H-8/H-10 indique que la conformation "S - *cis*" de la cétone conjuguée en C-9 est privilégiée.

Cette étude structurale du composé **H1** est effectuée pour la première fois à partir des données de spectroscopie moléculaire. Les résultats obtenus (attribution des signaux de RMN et stéréochimie) sont en accord avec les données de la littérature concernant la fucoxanthine [309].

#### 2.2.1.2.1.2 Etude structurale du produit H2

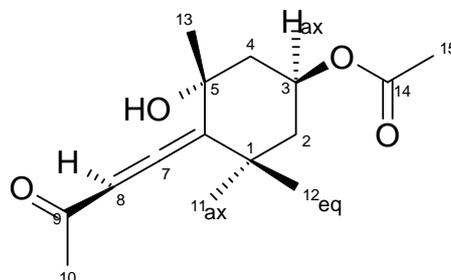
Il s'agit d'un nouveau produit non encore décrit dans la littérature qui se présente sous la forme d'une huile brune. Sa structure a été établie par spectroscopie moléculaire en comparaison avec celle de **H1** et les données de la littérature concernant la fucoxanthine.

- Analyse par spectrométrie de masse (Appendice A)

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution montre que le composé **H2** a la formule brute C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub> qui correspond à une molécule de masse molaire 332 g.mol<sup>-1</sup> avec

un degré d'insaturation D.I.= 7. La fragmentation réalisée par impact électronique (figure 2.9) montre un pic de masse à  $m/z = 332$  et un pic à  $m/z = 272$  correspondant à  $M^+ - \text{AcOH}$ ,

Tableau 2.1 : Données de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **H1**



N° <b>H et C</b>	$^1\text{H}$ $\text{CDCl}_3$ 500 MHz	$^{13}\text{C}$ $\text{CDCl}_3$ 125 MHz	Multiplicité
	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	DEPT
1		36,0	C
2	$2_{\text{ax}} = 1,40$ m $2_{\text{eq}} = 2,00$ m	45,0	$\text{CH}_2$
3	5,37 tt (11,5 ; 4,2)	67,4	CH
4	$4_{\text{ax}} = 1,50$ dd (12,7 ; 11,5) $4_{\text{eq}} = 2,31$ ddd (12,8 ; 4,2 ; 2,2)	45,0	$\text{CH}_2$
5		72,0	C
6		118,4	C
7		209,5	C
8	5,86 s	100,9	CH
9		198,1	C
10	2,17 s	26,4	$\text{CH}_3$
11 <sub>ax</sub>	1,42 s	28,9	$\text{CH}_3$
12 <sub>eq</sub>	1,14 s	31,6	$\text{CH}_3$
13	1,42 s	30,8	$\text{CH}_3$
14		170,4	C
15	2,03 s	21,3	$\text{CH}_3$

Les constantes de couplages entre parenthèses sont exprimées en Hz (RMN  $^1\text{H}$ ).

Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS.

m : multiplet ; s : singulet ; dd : doublet de doublets ; ddd : doublet de doublets de doublets.

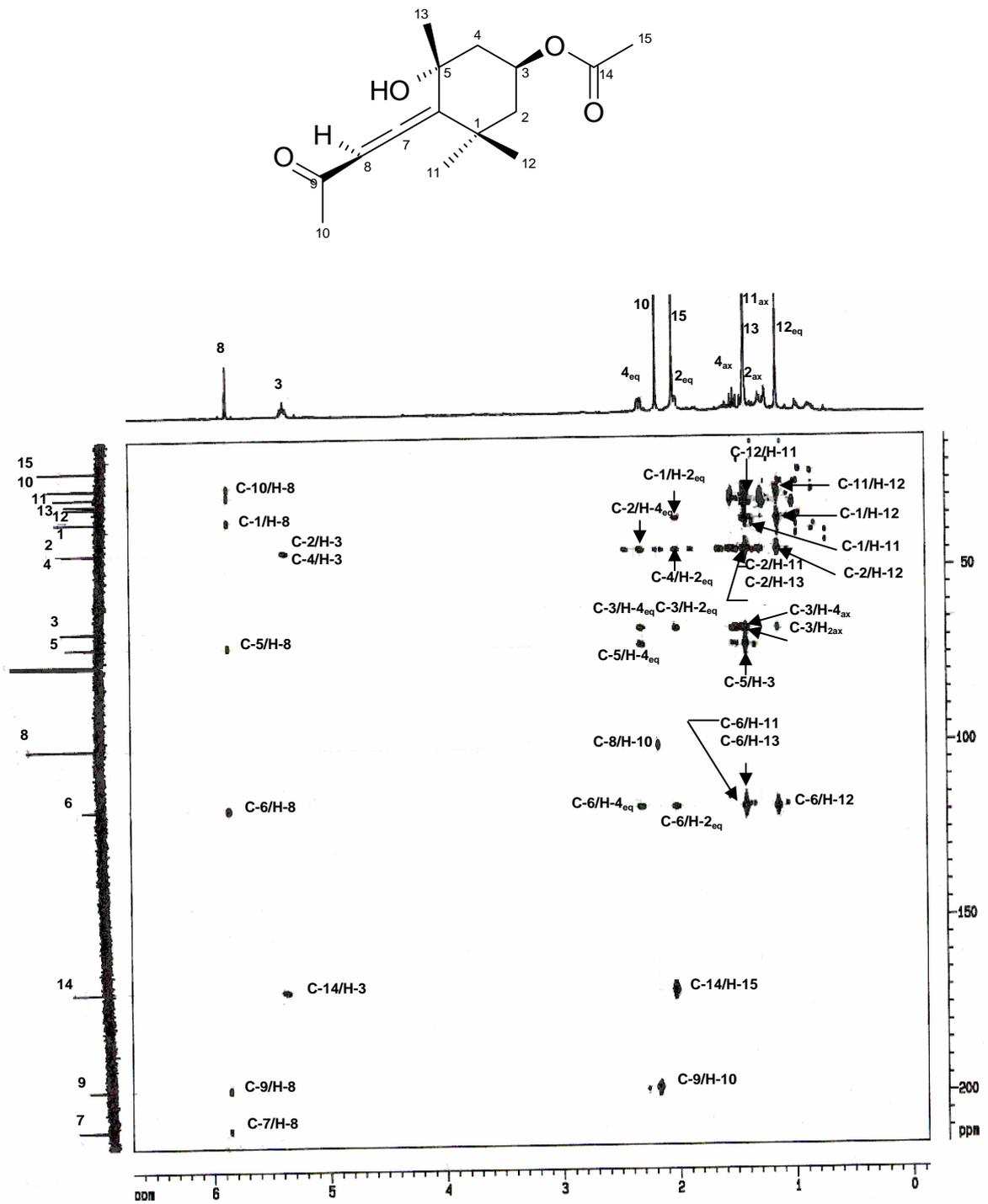


Figure 2.8 : Spectre RMN HMBC à 500 MHz dans CDCl<sub>3</sub> du produit **H1**

ce qui atteste la présence d'une fonction acétate. Le spectre est caractérisé, aussi, par le pic à  $m/z = 197$  obtenu par élimination de l'acétate, d'une molécule d'eau, du groupement acyle ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) et d'un groupement méthyle. Un fragment très important (24,58 %) est obtenu à  $m/z = 109$ , il correspond au système conjugué  $\text{C}_7\text{H}_9\text{O}$ , présent en bout de chaîne, qui est fortement stabilisé par mésomérie. Comme pour le composé **H1**, on retrouve le pic de base à  $m/z = 43$  correspondant au départ du groupement acyle ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

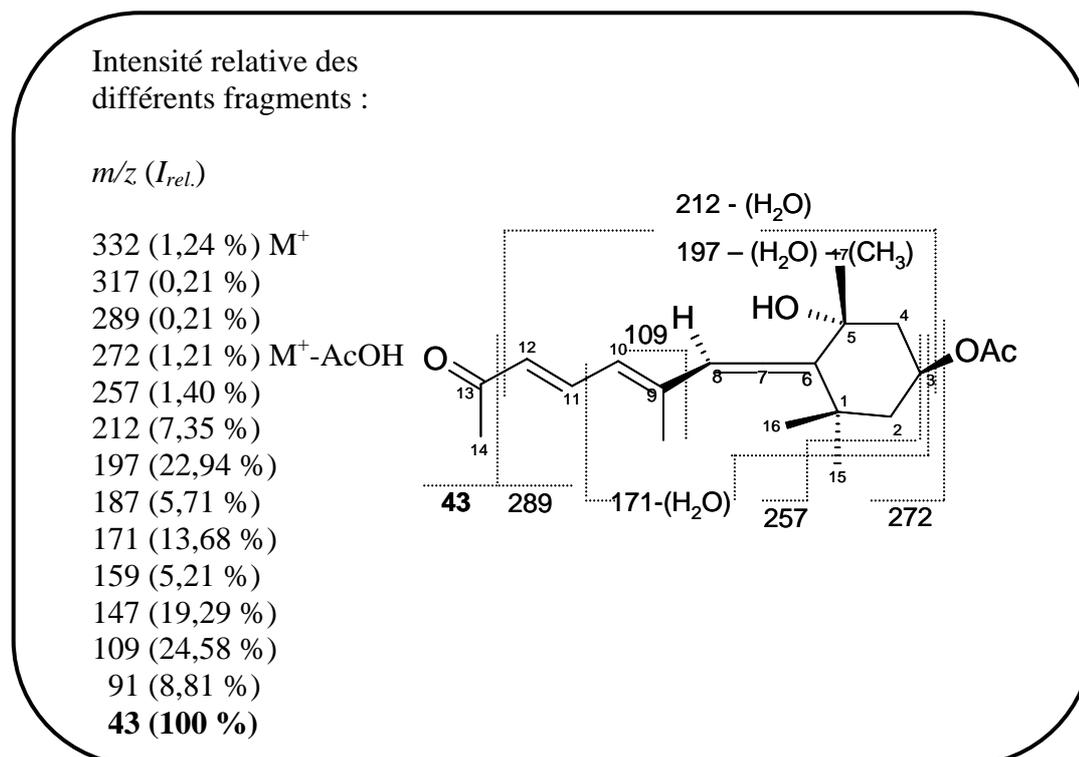


Figure 2.9 : Fragmentation du produit **H2** par impact

- Analyse par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (Appendice A)

De même que pour le produit **H1**, on constate, sur le spectre infrarouge du produit **H2**, l'apparition d'une bande d'absorption à  $1933\text{cm}^{-1}$  caractéristique d'un allène non terminal. Le spectre montre aussi une bande à  $3429\text{cm}^{-1}$  caractéristique d'une vibration d'élongation d'une fonction alcool ( $\nu_{\text{O-H}}$ ). La bande d'absorption à  $1666\text{cm}^{-1}$  atteste la présence d'une cétone  $\alpha,\beta$ -insaturée ( $\nu_{\text{C=O}}$ ) et le système de doubles liaisons conjuguées en  $\alpha$  et  $\gamma$  de la fonction cétone est caractérisé par une bande triple autour de  $1600\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=C}}$ ). On constate également sur le spectre une bande d'absorption à  $1735\text{cm}^{-1}$  correspondant à la fonction acétate ( $\nu_{\text{C=O}}$ ).

- Analyse par spectroscopie UV

Le spectre du composé **H2** enregistré dans le dichlorométhane présente une bande d'absorption maximale à 229 nm ( $\epsilon = 26600$ ) qui confirme la présence de diènes (doubles liaisons conjuguées et allène).

- Détermination du pouvoir rotatoire

Le composé **H2** est une huile optiquement active de pouvoir rotatoire négatif. La valeur de son pouvoir rotatoire spécifique mesuré dans le dichlorométhane à 589 nm (raie D du sodium) est la suivante :  $[\alpha]_D^{20} = -59,0^\circ$  ( $C = 0,02$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

- Analyse par spectroscopie de RMN (Appendice A)

Les spectres de RMN monodimensionnelle du carbone 13 (RMN  $^{13}\text{C}$  et expériences DEPT) enregistrés dans  $\text{CDCl}_3$  donnent les informations suivantes (tableau 2.2) :

- ❖ Le composé **H2** renferme 20 atomes de carbone :
  - 6 carbones primaires ( $-\text{CH}_3$ )
  - 2 carbones secondaires hybridés  $\text{sp}^3$  ( $-\text{CH}_2-$ ),
  - 5 carbones tertiaires dont un est hybridé  $\text{sp}^3$  et les 4 autres  $\text{sp}^2$ ,
  - 7 carbones quaternaires dont deux sont hybridés  $\text{sp}^3$ , quatre sont hybridés  $\text{sp}^2$  et un est hybridé  $\text{sp}$ .

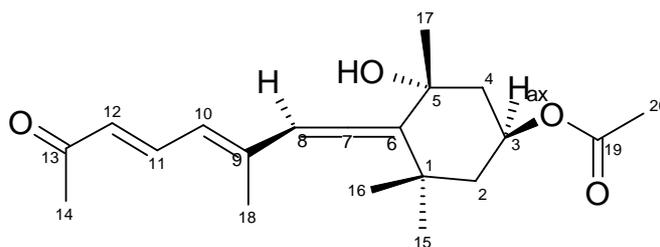
La comparaison des signaux avec ceux du composé **H1** montre une grande similitude de structure avec celui-ci. On retrouve en effet les quinze signaux des atomes de carbone de **H1** avec seulement un déplacement relativement important pour : le groupement méthyle de l'acétoxy ( $\Delta\delta = 1,8$  ppm), l'atome de carbone  $\text{sp}^2$  allénique 8 ( $\Delta\delta = 2,3$  ppm) et l'atome de carbone  $\text{sp}$  allénique 7 ( $\Delta\delta = 5,5$  ppm). Il apparaît cinq nouveaux signaux par rapport à **H1**, ceux : d'un groupement méthyle à  $\delta$  14,8 ppm, d'un carbone quaternaire  $\text{sp}^2$  à  $\delta$  142,8 ppm et de trois  $-\text{CH}$   $\text{sp}^2$ , respectivement, à  $\delta$  126,1,  $\delta$  129,8 et  $\delta$  139,4 ppm.

La RMN  $^1\text{H}$  confirme cette similitude avec **H1** (tableau 2.2). On remarque également la présence supplémentaire d'un groupement méthyle sur double liaison carbone - carbone à  $\delta$  1,89 ppm et de trois protons éthyléniques sur doubles liaisons conjuguées à  $\delta$  6,13,  $\delta$  6,18 et  $\delta$  7,48 ppm. Ces constatations nous ont permis d'émettre l'hypothèse que **H2** possède la structure de **H1** à laquelle il faut intercaler entre le groupement allénique et le groupement acyle de la méthyl cétone terminale, une chaîne carbonée (5C) comprenant deux doubles liaisons conjuguées et un groupement méthyle.

La partie structurale identique à **H1** est parfaitement bien mise en évidence par les expériences de RMN bidimensionnelle du même type que celles décrites dans le paragraphe 2.1.1.2.1.1. Ces expériences (COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , COSY  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  et HMBC) nous ont permis, également, de confirmer la structure et la position de la chaîne diénique supplémentaire à 5 atomes de carbone. D'abord la COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  montre que le proton H-11 est couplé aux protons H-10 et H-12 et que ces derniers sont couplés à longue distance (au travers de deux doubles liaisons) aux protons H-18 d'un groupement méthyle. Simultanément, la COSY  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  a permis de préciser les attributions des déplacements chimiques des carbones et des protons 10, 11, 12 et 18. Les corrélations longues distances  $^2\text{J}_{\text{C-H}}$  et  $^3\text{J}_{\text{C-H}}$  obtenues grâce à la séquence HMBC (figure 2.10) ont, ensuite, permis d'établir avec précision, à la fois, l'enchaînement carboné et son imbrication dans la molécule. En particulier, la chaîne diénique est confirmée par les corrélations entre C-9/H-10, C-9/H-11, C-10/H-11, C-10/H-12, C-11/H-10, C-11/H-12, C-12/H-11 et C-12/H-10, de même que la position du groupement méthyle 18 avec les corrélations entre C-9/H-18 et C-10/H-18. La fixation de cette chaîne au groupement allénique est C-8 est clairement indiquée par les taches de corrélation : C-9/H-8, C-10/H-8 et C-8/H-18, de même que la fixation à la fonction méthyl cétone terminale avec les taches : C-13/H-12, C-13/H-11, C-12/H-14 et C-13/H-14.

En ce qui concerne la stéréochimie de la chaîne diénique conjuguée, le spectre de RMN  $^1\text{H}$  permet de préciser que la configuration de la double liaison en C-11 est *E* car la constante de couplage du proton H-12 (qui n'est couplé qu'avec H-11) est de 15 Hz (couplage trans entre deux protons éthyléniques vicinaux). Pour la double liaison en C-9, la valeur du glissement chimique du proton allénique (H-8) :  $\delta$  6,08 ppm atteste qu'il s'agit également d'une configuration *E* car une étude de RMN 1D et 2D sur les caroténoïdes alléniques de la famille de la fucoxanthine a montré que pour l'ensemble des dérivés *trans*, la valeur moyenne était de  $\delta$  6,06 ppm pour ce proton alors qu'elle passait à  $\delta$  6,53 ppm pour les isomères 9'-*cis* [309]. Ceci est confirmé par le fait que dans cette configuration, le groupement méthyle 18 subit un effet d'écran de la part du C-H 11 situé en  $\gamma$ , ce qui porte la valeur de son glissement chimique en RMN  $^{13}\text{C}$  à  $\delta$  14,8 ppm (valeur qui serait supérieur à  $\delta$  20 ppm dans la configuration *Z*, en l'absence d'effet d'écran du C-H en  $\gamma$ ).

Pour les centres asymétriques, nous avons conservé la stéréochimie attribuée à **H1** qui correspond à celle de l'extrémité allénique de la fucoxanthine (3S, 5R, 6R).

Tableau 2.2 : Données de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **H2**

N° H et C	$^1\text{H}$ $\text{CDCl}_3$ 500 MHz $\delta$ ppm	$^{13}\text{C}$ $\text{CDCl}_3$ 125 MHz $\delta$ ppm	Multiplicité
			DEPT
1		36,2	C
2	$2_{\text{ax}} = 1,40$ m $2_{\text{eq}} = 2,00$ m	45,7	$\text{CH}_2$
3	5,37 tt (11,5 ; 4,2)	68,2	CH
4	$4_{\text{ax}} = 1,51$ dd (12,7 ; 11,5) $4_{\text{eq}} = 2,32$ ddd (12,8 ; 4,2 ; 2,2)	45,7	$\text{CH}_2$
5		72,9	C
6		118,4	C
7		204,0	C
8	6,08 s	103,2	CH
9		142,8	C
10	6,13 d (12)	126,1	CH
11	7,48 dd (15 ; 12)	139,4	CH
12	6,18 d (15)	129,8	CH
13		198,9	C
14	2,29 s	28,2	$\text{CH}_3$
15	1,39 s	29,5	$\text{CH}_3$
16	1,07 s	32,4	$\text{CH}_3$
17	1,35 s	31,5	$\text{CH}_3$
18	1,89 s	14,8	$\text{CH}_3$
19		170,9	C
20	2,03 s	21,8	$\text{CH}_3$

Les constantes de couplages entre parenthèses sont exprimées en Hz (RMN  $^1\text{H}$ ).

Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS.

s : singulet ; m : multiplet ; d : doublet ; dd : doublet de doublets, ddd : doublet de doublets de doublets ; tt : triplet de triplets.

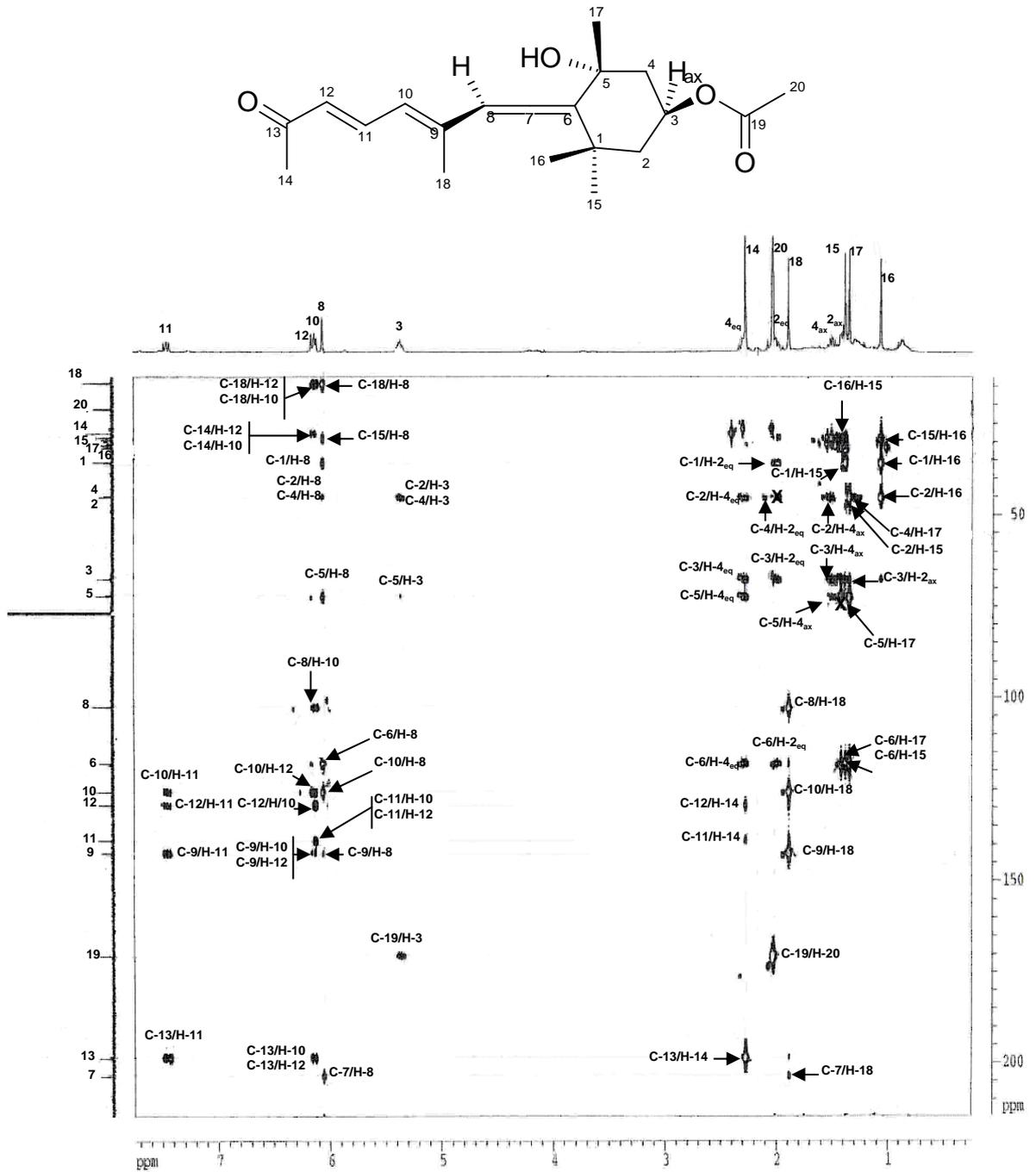


Figure 2.10 : Spectre RMN HMBC à 500 MHz dans CDCl<sub>3</sub> du produit **H2**

### 2.2.1.2.1.3 Etude structurale du produit H3

Le composé **H3** est une molécule qui a été déjà isolée dans d'autres espèces végétales (chapitre 1 & 1.2.1.1.5.3), il s'agit du loliolide. C'est un produit huileux optiquement actif, le pouvoir rotatoire spécifique mesuré dans le chloroforme est :  $[\alpha]_D^{20} = -101,2^\circ (C = 1,0 ; CHCl_3)$ , l'absorption maximale en UV est obtenue à 218 nm ( $\epsilon = 8600$ ) [115].

- Analyse par spectrométrie de masse (Appendice A)

**H3** est un composé de formule brute  $C_{11}H_{16}O_3$  de masse molaire 196 g/mol, avec un degré d'insaturation D.I. = 4. L'analyse de la fragmentation par impact électronique est donnée dans la figure 2.11, pour laquelle nous avons appliqué les règles de fragmentation spécifiques aux cycles lactoniques. Les valeurs indiquées sont compatibles avec la littérature [115].

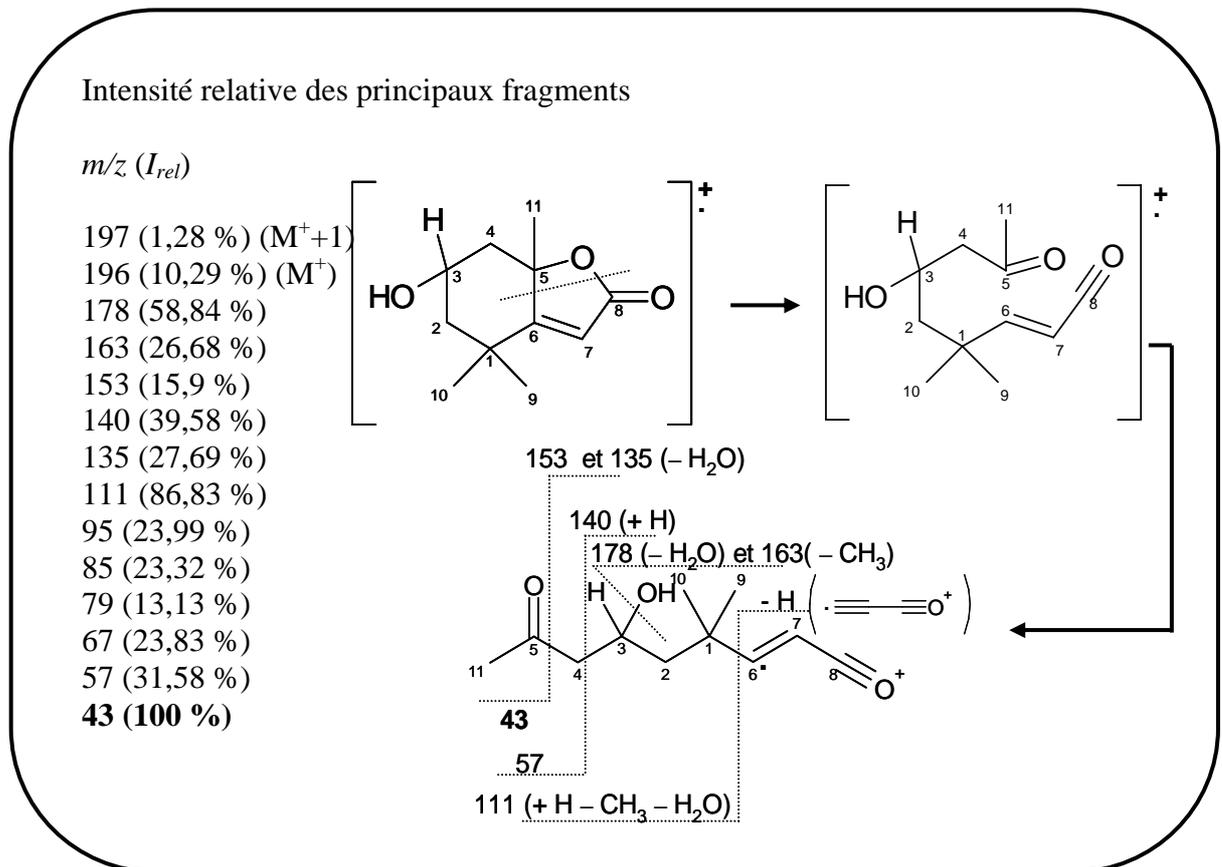


Figure 2.11 : Fragmentation par impact électronique du composé **H3**

- Analyse par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (Appendice A)

Le spectre infrarouge du composé **H3** est caractérisé par quatre bandes d'absorption à 3437 ( $\nu_{\text{O-H}}$ ), 2925 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 1731 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ) et  $1621\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=C conj.}}$ ). La bande à  $1731\text{ cm}^{-1}$  correspond à la fonction lactone.

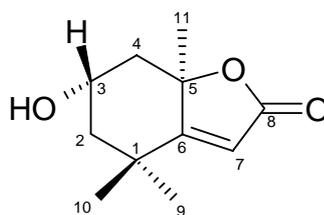
- Analyse par spectroscopie RMN (Appendice A)

Les résultats de l'analyse par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  sont reportés dans le tableau 2.3 où ils sont comparés aux données de la littérature [115,116]. Ces valeurs sont parfaitement en accord avec la structure du loliolide pour le composé **H3**. De plus, nos attributions des signaux des protons et des carbones ont été validées par les séquences habituelles de RMN 2D (HMQC et HMBC, notamment), ce qui nous a permis de corriger les attributions des signaux des atomes de carbone C-6, C-8, C-10 et C-11 de la référence bibliographique [115]. Les taches de corrélation longues distances  $^2\text{J}_{\text{C-H}}$  et  $^3\text{J}_{\text{C-H}}$  obtenues grâce à la séquence HMBC permettent de confirmer sans ambiguïté les déplacements chimiques de ces atomes de carbone (figure 2.12) :

- $\delta$  182 ppm pour C-6, avec les corrélations entre C-6/H-7, C-6/H-4<sub>eq</sub>, C-6/H-2<sub>eq</sub>, C-6/H-11, C-6/H-2<sub>ax</sub>, C-6/H-9 et C-6/H-10,
- $\delta$  172 ppm pour C-8 (C=O lactonique) avec la seule corrélation C-8/H-7,
- $\delta$  31 ppm pour C-10, avec les corrélations entre C-10/H-9, C-10/H-2<sub>ax</sub>, C-1/H-10, C-9/H-10 et C-6/H-10,
- $\delta$  27 ppm pour C-11, avec les corrélations C-11/H-4<sub>eq</sub>, C-11/H-4<sub>ax</sub>, C-4/H-11 et C-6/H-11.

#### 2.2.1.2.2 Echantillon 2

La séparation de 11,6 g de fraction polaire sur colonne ouverte de silice (**échantillon 2**) a permis de récupérer deux fractions : **F<sub>3</sub>** de masse 1,3 g (11,2 % de la fraction polaire), éluée avec le système AcOEt/TMP : 55/45 et **F<sub>4</sub>** de masse 691mg (6 % de la fraction polaire), éluée avec 100 % AcOEt. Le traitement par CLHP semi-préparative de la fraction **F<sub>3</sub>** avec l'éluant AcOEt/TMP : 50/50 a permis de récupérer les deux sous-fractions **C** et **D** (figure 2.13-a). L'analyse par CLHP analytique de la sous fraction **C** avec le système d'élution AcOEt/TMP : 25/75 a permis d'isoler un mélange de deux produits **H4**, **H5** qui sont très bien séparés sur colonne capillaire CP-Sil 8 CB (5 % phényl 95 %

Tableau 2.3 : Données de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **H3**

N <sup>0</sup> H et C	Loliolide <sup>a</sup>	<b>H3</b>	Loliolide <sup>b</sup>	<b>H3</b>	Multi- plicité
	$^1\text{H}$ $\text{CDCl}_3$ 500 MHz $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\text{CDCl}_3$ 500 MHz $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ $\text{CDCl}_3$ 90,56 MHz $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ $\text{CDCl}_3$ 100 MHz $\delta$ (ppm)	DEPT
1			35,89	36,33	C
2 <sub>ax</sub>	1,53 dd (14,7 ; 3,7)	1,53 dd (14,6 ; 3,6)	47,43	47,70	CH <sub>2</sub>
2 <sub>eq</sub>	1,97 ddd (14,5 ; 3,0 ; 2,3)	1,97 dt (14,5 ; 3,5)			
3	4,33 quint. (3,4)	4,33 quint. (3,4)	66,84	67,24	CH
4 <sub>ax</sub>	1,78 dd (13,5 ; 3,7)	1,78 dd (13,7 ; 3,6)	45,75	46,02	CH <sub>2</sub>
4 <sub>eq</sub>	2,46 ddd (14,0 ; 3,2 ; 2,3)	2,45 dt (14,0 ; 3,5)			
5			86,60	87,08	C
6			171,75 <sup>c</sup>	182,80	C
7	5,69 s	5,69 s	112,97	113,33	CH
8			182,33 <sup>c</sup>	172,30	C
9	1,47 s	1,46 s	26,58	26,88	CH <sub>3</sub>
10	1,27 s	1,27 s	27,07 <sup>d</sup>	31,06	CH <sub>3</sub>
11	1,78 s	1,78 s	30,66 <sup>d</sup>	27,40	CH <sub>3</sub>

Les constantes de couplages entre parenthèses sont exprimées en Hz (RMN  $^1\text{H}$ )

Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS.

<sup>a</sup> valeurs de RMN  $^1\text{H}$  de la ref. [116] ajoutées pour comparaison

<sup>b</sup> valeurs de RMN  $^{13}\text{C}$  de la ref. [115] ajoutées pour comparaison

<sup>c</sup> ces valeurs doivent être interchangées dans la réf. [115]

<sup>d</sup> ces valeurs doivent être interchangées dans la réf. [115]

quint. : quintuplet ; ddd : doublet de doublets de doublets ; dt : doublet de triplets ; s : singulet.

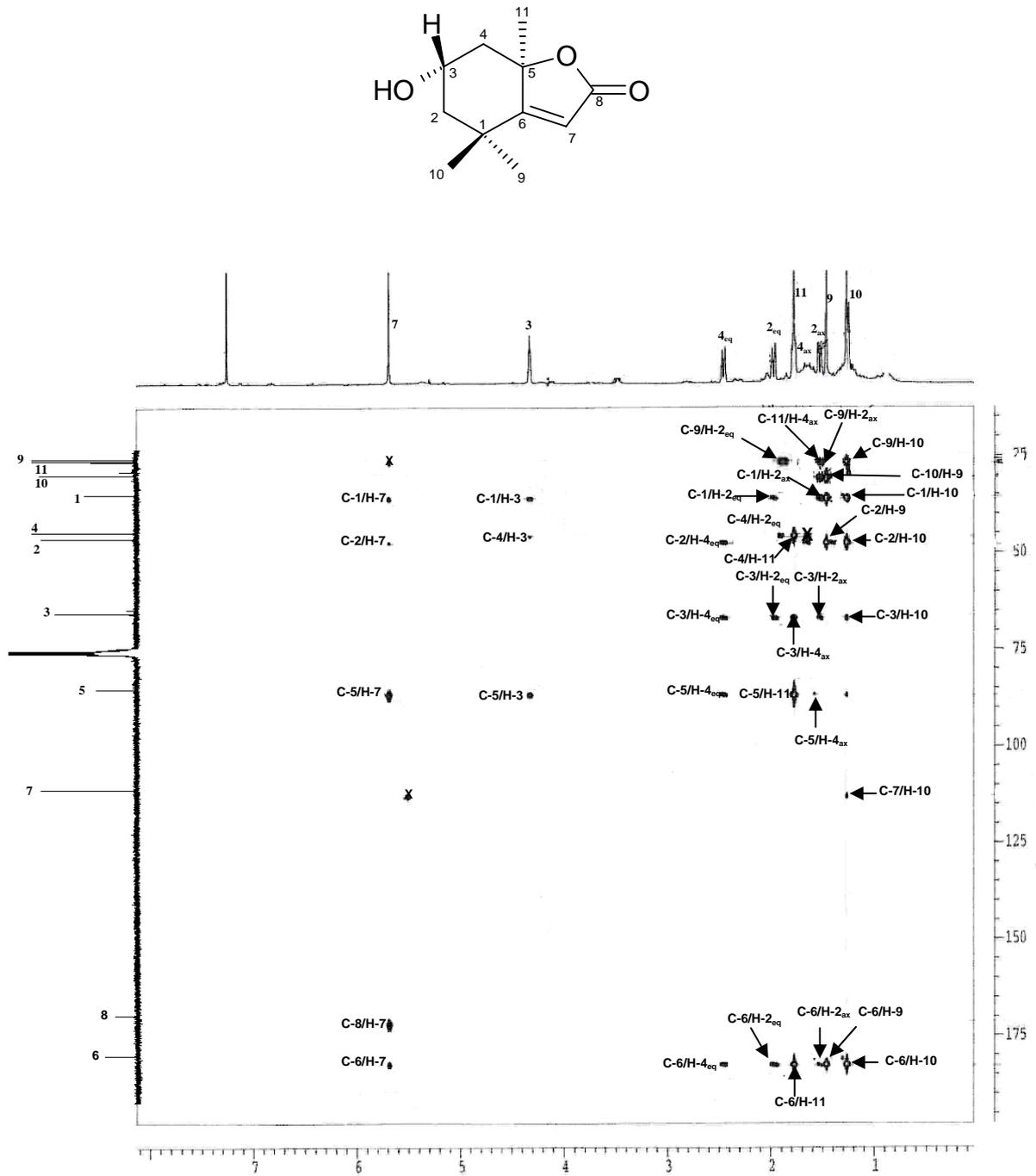


Figure 2.12 : Spectre RMN HMBC à 500 MHz dans CDCl<sub>3</sub> du produit **H3**

diméthylpolysiloxane) en chromatographie en phase gazeuse (figure 2.14). La sous-fraction **D** minoritaire contient les produits **H1** et **H2** isolés précédemment. L'étude de la fraction **F<sub>4</sub>** par CLHP semi-préparative avec le système d'éluant AcOEt/TMP : 55/45 (figure 2.13-b) a mené à l'isolement du **phloroglucinol (H6)** et à l'état minoritaire, du produit **H3**, déjà isolé dans l'échantillon 1.

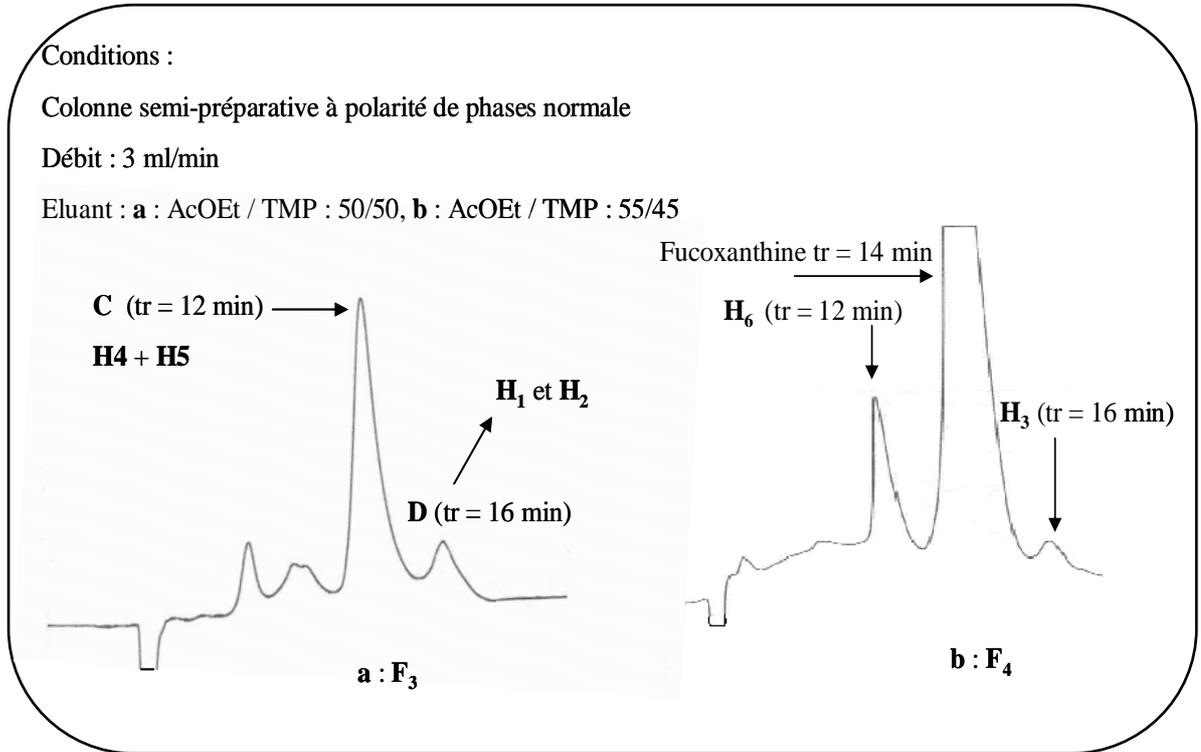


Figure 2.13 : Chromatogramme en CLHP des fractions **F3** et **F4**

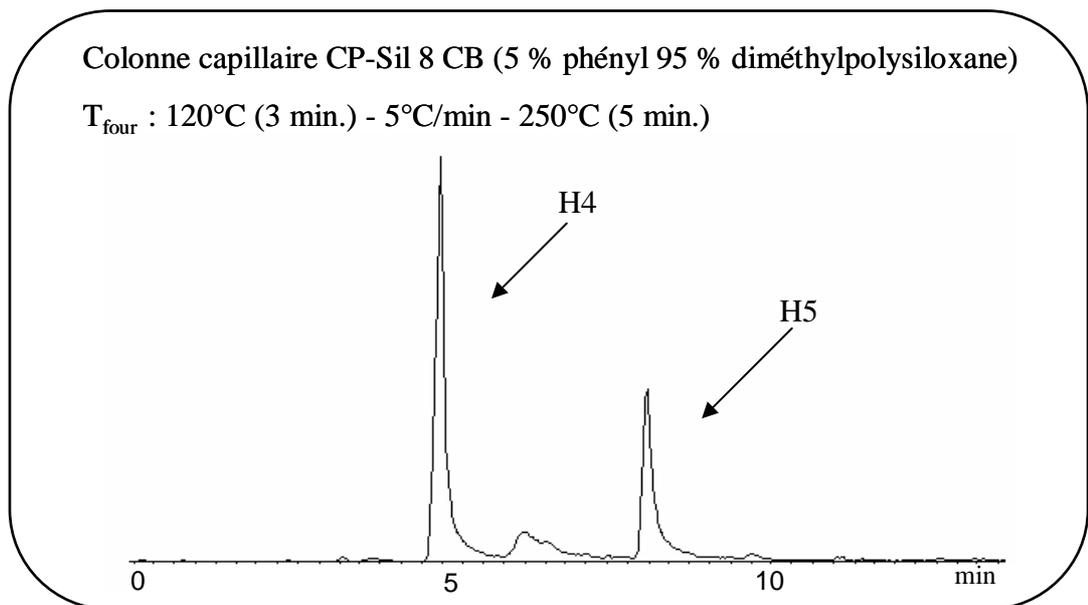


Figure 2.14 : Chromatogramme en CGL sur colonne capillaire du mélange obtenu à partir de la sous-fraction **C**

### 2.2.1.2.2.1 Etude structurale des produits H4, H5

L'étude spectroscopique d'un produit repurifié à partir de la sous fraction **C** montre qu'il s'agit d'un mélange de deux produits **H4** et **H5**.

- Analyse par spectrométrie de masse (Appendice A)

L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution indique l'existence d'un mélange de deux produits de formules brutes :  $C_6H_5O_3Cl$  (masse molaire 160 g/mol) et  $C_6H_5O_3Br$  (masse molaire 204 g/mol).

L'étude analytique par le couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse confirme également la présence sur le chromatogramme de deux pics **H4** et **H5** (figure 2.14).

Le spectre de masse de **H4** a un pic de masse à  $m/z = 160-162$  avec un amas isotopique caractéristique de la présence d'un atome de chlore (75%  $^{35}Cl$   $m/z = 160$ , 25%  $^{37}Cl$   $m/z = 162$ , c'est-à-dire un pic  $M+2$  dont l'intensité vaut un tiers de celle du pic moléculaire). Les principaux fragments (figure 2.15) correspondent aux pics à  $m/z = 160$ , 142 ( $M^+ - H_2O$ ), 131 ( $M^+ - CHO$ ), 125 ( $M^+ - Cl$ ) et à  $m/z = 97$ , 85, 69 qui sont caractéristiques de la fragmentation du phloroglucinol (**H6**).

De même, le spectre de masse du produit **H5** présente un amas isotopique caractéristique de la présence de brome, avec un pic de masse à  $m/z$  à 204-206 (50%  $^{79}Br$   $m/z = 204$ , 50%  $^{81}Br$   $m/z = 206$ ). Les principaux fragments (figure 2.15) correspondent aux pics à

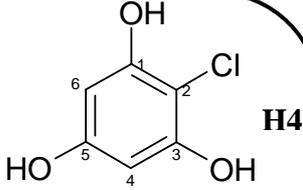
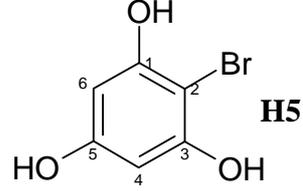
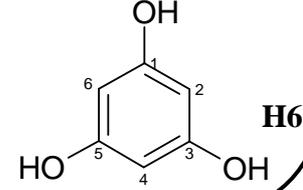
Intensité relative des principaux fragments			
$m/z$ ( $I_{rel}$ )			
<b>H4</b>	<b>H5</b>	<b>H6</b>	
<b>160 (100 %) <math>M^+</math></b>	<b>204-206 (100 %)</b>	<b>126 (100 %)</b>	
142 (8,21 %)	186 (5 %)	111 (6,76 %)	
131 (6,78 %)	126 (2,22 %)	97 (10,97 %)	
97 (16,38 %)	97 (12,97 %)	85 (23,56 %)	
85 (11,01 %)	85 (6,66 %)	69 (29,07 %)	
69 (51,92 %)	69 (64,39 %)		

Figure 2.15 : Fragmentation par impact électronique des composés **H4**, **H5** et **H6**

$m/z = 186$  ( $M^+ - H_2O$ ),  $177$  ( $M^+ - CHO$ ),  $126$  ( $M^+ - Br$ ) et à  $m/z = 97$ ,  $85$  et  $69$  qui sont caractéristiques de la fragmentation du phloroglucinol (**H6**).

- Analyse par spectrométrie de RMN (Appendice A)

L'analyse structurale de **C** par RMN  $^1H$  et  $^{13}C$ , comparée aux données bibliographiques [310] confirme qu'il s'agit bien des dérivés chloré **H4** et bromé **H5** du phloroglucinol.

On remarque, en particulier, pour **H4** les signaux de RMN  $^1H$  à  $\delta$  6,10 ppm (2H, s large, H-4, H-6),  $\delta$  8,29 ppm (1H, s, H de OH en C-5) et  $\delta$  8,41 ppm (2H, s, H de OH en C-1 et C-3), ceux de la RMN  $^{13}C$ , à  $\delta$  97,2 ppm (C-4, C-6),  $\delta$  157,3 ppm et  $\delta$  158,2 ppm (C-1, C-2, C-3 et C-5).

Pour **H5** on a les signaux suivants de RMN  $^1H$  :  $\delta$  6,08 ppm (2H, s large, H-4, H-6),  $\delta$  8,26 ppm (1H, s, H de OH en C-5) et 8,38 ppm (2H, s, H de OH en C-1 et C-3) et les signaux de RMN  $^{13}C$  à  $\delta$  97,3 ppm (C-4, C-6),  $\delta$  156,2 ppm et  $\delta$  159,7 ppm (C-1, C-2, C-3 et C-5).

#### 2.2.1.2.3 Discussion des résultats

L'étude chimique de *Cladostephus hirsutus* Linnaeus nous a permis de montrer que cette algue ne renferme pas de produits de nature terpénique (en dehors de la fucoxanthine et ses dérivés). Elle privilégie essentiellement le métabolisme des composés lipidiques (acides gras et stérols) et de la fucoxanthine. Une étude approfondie de la fraction polaire de son extrait organique nous a conduit à isoler six métabolites secondaires minoritaires dont trois dérivent de la fucoxanthine (**H1**, **H2** et **H3**) et les trois autres sont le phloroglucinol et deux de ses dérivés halogénés (**H4** et **H5**).

La présence, à l'état naturel, dans l'algue des trois produits minoritaires **H1**, **H2** et **H3** nous semble être un facteur déterminant pour la compréhension de la biogenèse de la fucoxanthine. C'est la première fois, en effet, que trois dérivés de cette xanthophylle - issus, pour deux d'entre eux, de son extrémité allénique et, pour le troisième, de son extrémité  $\beta$ -céto-époxy-cyclohexanique - sont présents simultanément dans une algue brune. **H1** est un acétoxy-monoterpène allénique qui résulte, dans l'algue, d'un clivage enzymatique oxydatif au niveau de la troisième unité isoprénique de la fucoxanthine, en partant de l'extrémité allénique. Ce composé, n'avait, jusqu'à présent, été décrit que comme un produit obtenu par oxydation au permanganate de potassium de la fucoxanthine (cf. F1 de la planche 1.8 dans le chapitre 1 du mémoire) [88, 83]. **H2** est un nouveau acétoxy-sesquiterpène allénique obtenu, dans l'algue, par un clivage enzymatique oxydatif au niveau de la quatrième unité isoprénique de la fucoxanthine, en partant de l'extrémité

allénique. Le loliolide (**H3**) est connu comme étant un produit de dégradation de la fucoxanthine et de la zéaxanthine, isolé de plusieurs espèces végétales (voir planche 1.11 chapitre 1). Il résulte de la formation de furanoïdes bicycliques instables à partir des trois premières unités isopréniques de l'extrémité  $\beta$ -céto-époxy-cyclohexanique de la fucoxanthine ou cyclohexénique de la zéaxanthine [114].

Cette analyse exhaustive des produits polaires de l'extrait organique de *Cladostephus hirsutus* nous a conduit à montrer que les seuls dérivés de la fucoxanthine présents, à l'état naturel, dans l'algue sont des produits de dégradation enzymatique de cette xanthophylle. D'autre part, aucun précurseur potentiel de la fucoxanthine n'a été mis en évidence notamment aucune structure allénique de configuration 6'S, en dehors du  $\beta$ - $\beta$ -carotène qui est présent dans toutes les espèces d'algues brunes. L'ensemble de ces constatations nous paraît constituer un élément supplémentaire en faveur de la validation de la voie B de biosynthèse de la fucoxanthine (partie allénique) proposée par Liaaen-Jensen et al (figure 1.11 du chapitre 1), [78]. En accord avec cette hypothèse, le schéma général de biosynthèse pourrait s'articuler de la façon suivante : le précurseur serait le  $\beta$ , $\beta$ -carotène qui conduirait à la fucoxanthine, via la zéaxanthine, laquelle se transformerait à l'une de ses extrémités en partie 6'R allénique (figure 1.11 du chapitre 1) et à l'autre extrémité en partie  $\beta$ -céto-époxy-cyclohexanique.

## 2.2.2 Etude chimique de *Zonaria tournefortii* Lamouroux

### 2.2.2.1 Isolement et caractérisation structurale des produits

L'algue a été récoltée en Algérie (figure 2.1) en mai 2001. Après séchage, son extraction par le mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (v/v : 1/1) a fourni un extrait brut avec un rendement de 2,5 %. Ce dernier a été séparé selon le protocole de la figure 2.3 en fractions phénolique et neutre (phase étherée) avec un rendement, respectivement, de 71,5 et 28,5 %.

#### 2.2.2.1.1 Etude chimique de la fraction neutre (phase étherée)

Le traitement de 1,47 g de la fraction neutre par le mélange TMP/MeOH a mené à la séparation de deux phases : 781 mg de phase iso-octanique (TMP) (53 % de la fraction neutre) et 689 mg de phase méthanolique (MeOH) (47 % de la fraction neutre). Cette dernière est constituée essentiellement de caroténoïdes dont le principal est la fucoxanthine. L'étude de la phase TMP par CLHP analytique en phase normale avec le

système éluant AcOEt/TMP : 35/65 a permis de récupérer 40 mg de produit **Z1** à  $t_r = 5,91$  min (figure 2.16).

#### 2.2.2.1.1.1 Etude structurale du composé **Z1** (Appendice B)

L'analyse structurale (FTIR, CG-SM et RMN) du produit comparée aux données bibliographiques concernant la RMN [311] a permis de conclure rapidement qu'il s'agit du phytol (tableau 8). C'est un diterpène linéaire de formule brute  $C_{20}H_{40}O$ , ce produit est décrit comme étant le précurseur de la chlorophylle et de la vitamine E.

L'analyse des spectres de RMN du carbone 13 (RMN  $^{13}C$  et expériences DEPT) montre que le composé possède 20 atomes de carbone, comprenant 5 carbones primaires ( $-CH_3$ ), 10 carbones secondaires, 4 carbones tertiaires et un carbone quaternaire. La structure est caractérisée par un enchaînement isoprénique régulier confirmé par le spectre de masse ayant un pic de base  $m/z = 71$  caractéristique de l'unité isoprénique saturée ( $C_5H_{11}-$ ) en bout de chaîne (figure 2.17) et au fragment résultant de la coupure en  $\alpha$  de la double liaison carbone - carbone dans la première unité isoprénique.

#### 2.2.2.1.1.2 Etude chimique de la fraction phénolique

La fraction phénolique (4,05 g) est traitée en deux étapes : un fractionnement grossier par CLHP semi-préparative à polarité de phases normale, suivi d'une purification par CLHP analytique à polarité de phases inversée. Le traitement de la fraction phénolique par CLHP semi-préparative avec l'éluant AcOEt/TMP : 30/70 (figure 2.18) a permis de récupérer cinq fractions principales. La purification de la fraction **5** (426 mg) est réalisée par CLHP analytique en phase normale (éluant AcOEt/TMP : 30/70), cette opération a abouti à l'isolement du produit **Z2** (20 mg) (planche 32). Il est décrit comme étant le produit majoritaire dans la même espèce récoltée en Sicile [132]. Dans le cadre de ce travail, on a remarqué que le produit **Z2** se trouve en mélange avec une chaîne hydrocarbonée où il est minoritaire.

L'étude des fractions **2** (109 mg), **3** (180 mg) et **4** (187 mg) a été effectuée par CLHP analytique à polarité de phases inversée. L'élution de la fraction **3** par le système ternaire MeCN/MeOH/H<sub>2</sub>O : 47/40/13 (v/v/v) a permis de séparer les produits **Z3** (40 mg) et **Z4** (36 mg) (planche 2.1). Dans les mêmes conditions, le produit **Z5** (30 mg) a été isolé à partir de la fraction **2**. L'analyse de la fraction **4** par l'éluant MeCN/H<sub>2</sub>O : 60/40 a mené à l'obtention du produit **Z6** (20 mg) (planche 32).

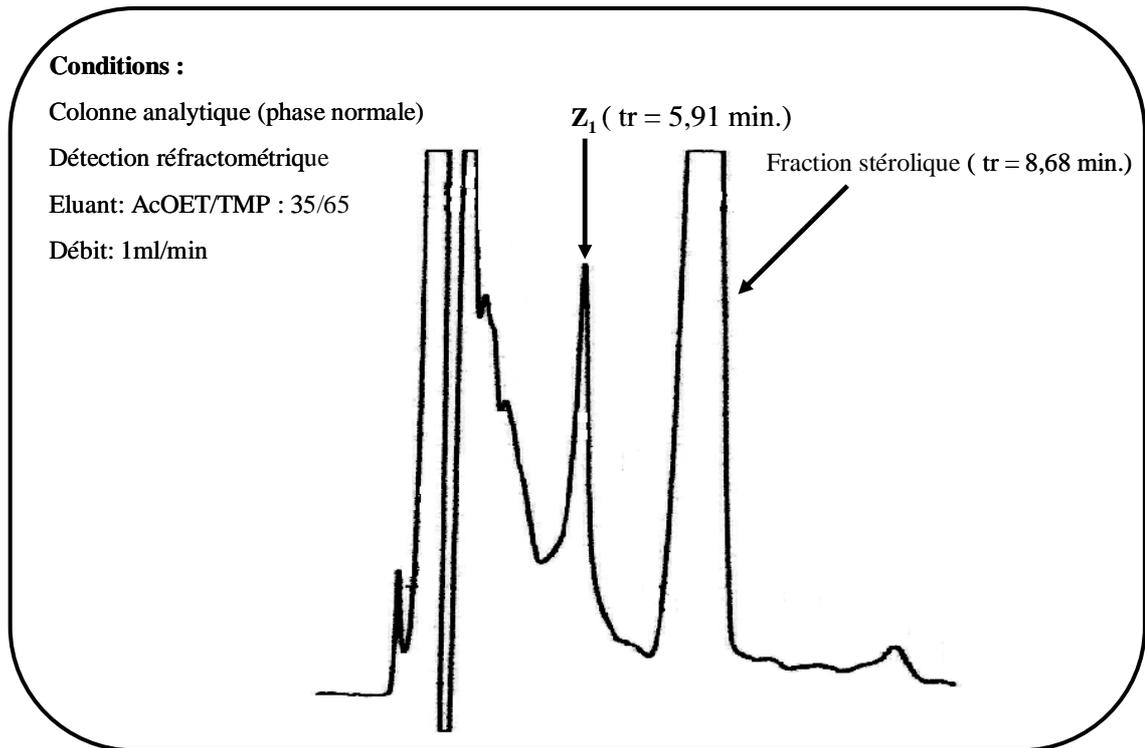


Figure 2.16 : Chromatogramme en CLHP de la phase TMP (phase étherée) de *Zonaria tournefortii*

Intensité relative des  
 principaux fragments

$m/z$  (Irel)

278 (0,67%)  $M^+ - [H_2O]$

196 (1,11%)

123 (20,61%)

111 (8,27%)

95 (13,16%)

81 (23,96%)

**71 (100 %)**

57 (37,68%)

43 (48,94%)

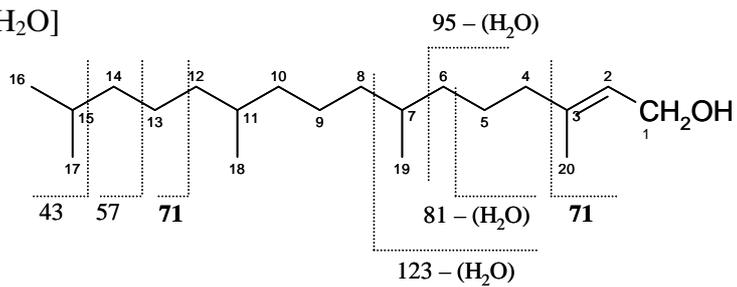
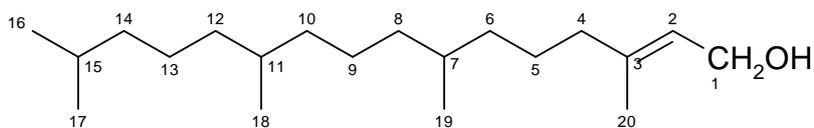


Figure 2.17 : Fragmentation du phytol (composé **Z1**) par impact électronique

Tableau 2.4 : Données de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du phytol (**Z1**)

N° H et C	<b>Z1</b>	Phytol <sup>a</sup>	<b>Z1</b>	Phytol <sup>b</sup>	Multiplicité
	$^1\text{H}$ $\text{CDCl}_3$ 400 MHz $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\text{CDCl}_3$ 400 MHz $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ $\text{CDCl}_3$ 100 MHz $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ $\text{CDCl}_3$ 25 MHz $\delta$ (ppm)	
1	4,12 d (7)	4,14 d (7)	59,80	59,35	$\text{CH}_2$
2	5,38 t (7)	5,40 t (7)	123,47	123,25	CH
3	-	-	140,67	140,05	C
4	1,96 t (7)	1,98 t (7)	40,26	39,91	$\text{CH}_2$
5	1,33 – 1,42 m	1,35 - 1,44 m	25,53	25,19	$\text{CH}_2$
6	1,00- 1,33 m	1,03 - 1,30 m	36,76	36,72	$\text{CH}_2$
7	1,33 – 1,42 m	1,35 - 1,44 m	32,82	32,82	CH
8	1,00- 1,33 m	1,03 - 1,30 m	37,41	37,41	$\text{CH}_2$
9	1,00- 1,33 m	1,03 - 1,30 m	24,50	24,50	$\text{CH}_2$
10	1,00- 1,33 m	1,03 - 1,30 m	37,46	37,46	$\text{CH}_2$
11	1,33 – 1,42 m	1,35 - 1,44 m	32,73	32,73	CH
12	1,00 – 1,33 m	1,03 - 1,30 m	37,34	37,34	$\text{CH}_2$
13	1,00 – 1,33 m	1,03 - 1,30 m	24,86	24,82	$\text{CH}_2$
14	1,00- 1,33 m	1,14 m	39,35	39,41	$\text{CH}_2$
15	1,50 hept. (7)	1,52 hept. (7)	28,00	28,00	CH
16	0,85 d (7)	0,87 d (7)	22,62	22,64	$\text{CH}_3$
17	0,85 d (7)	0,87 d (7)	22,73	22,73	$\text{CH}_3$
18	0,82 d (7)	0,85 d (7)	19,75	19,75	$\text{CH}_3$
19	0,83 d (7)	0,86 d (7)	19,75	19,75	$\text{CH}_3$
20	1,64 s	1,66 s	16,15	16,16	$\text{CH}_3$

Les constantes de couplage entre parenthèses sont exprimées en Hz (RMN  $^1\text{H}$ ).

Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS.

<sup>a</sup> : valeurs de RMN  $^1\text{H}$  de la ref. [311] ajoutées pour comparaison

<sup>b</sup> : valeurs de RMN  $^{13}\text{C}$  de la ref. [311] ajoutées pour comparaison

t : triplet ; m : multiplet ; d : doublet ; hept. : heptuplet

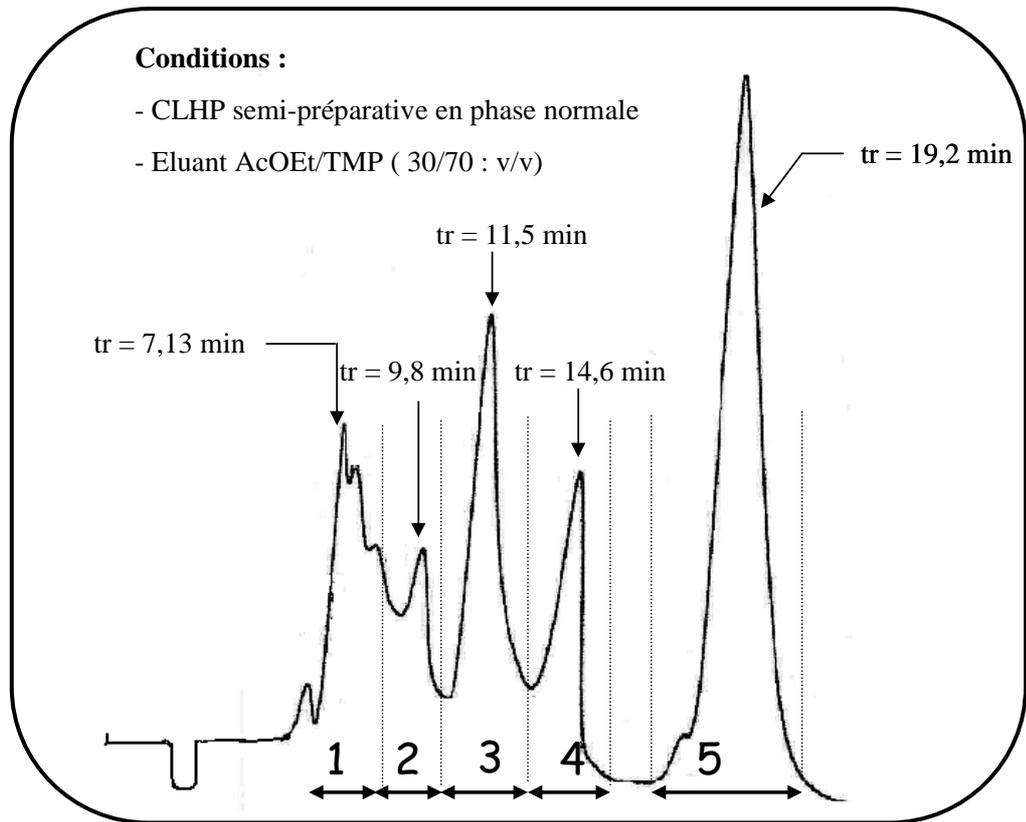


Figure 2.18 : Chromatogramme en CLHP de la fraction phénolique

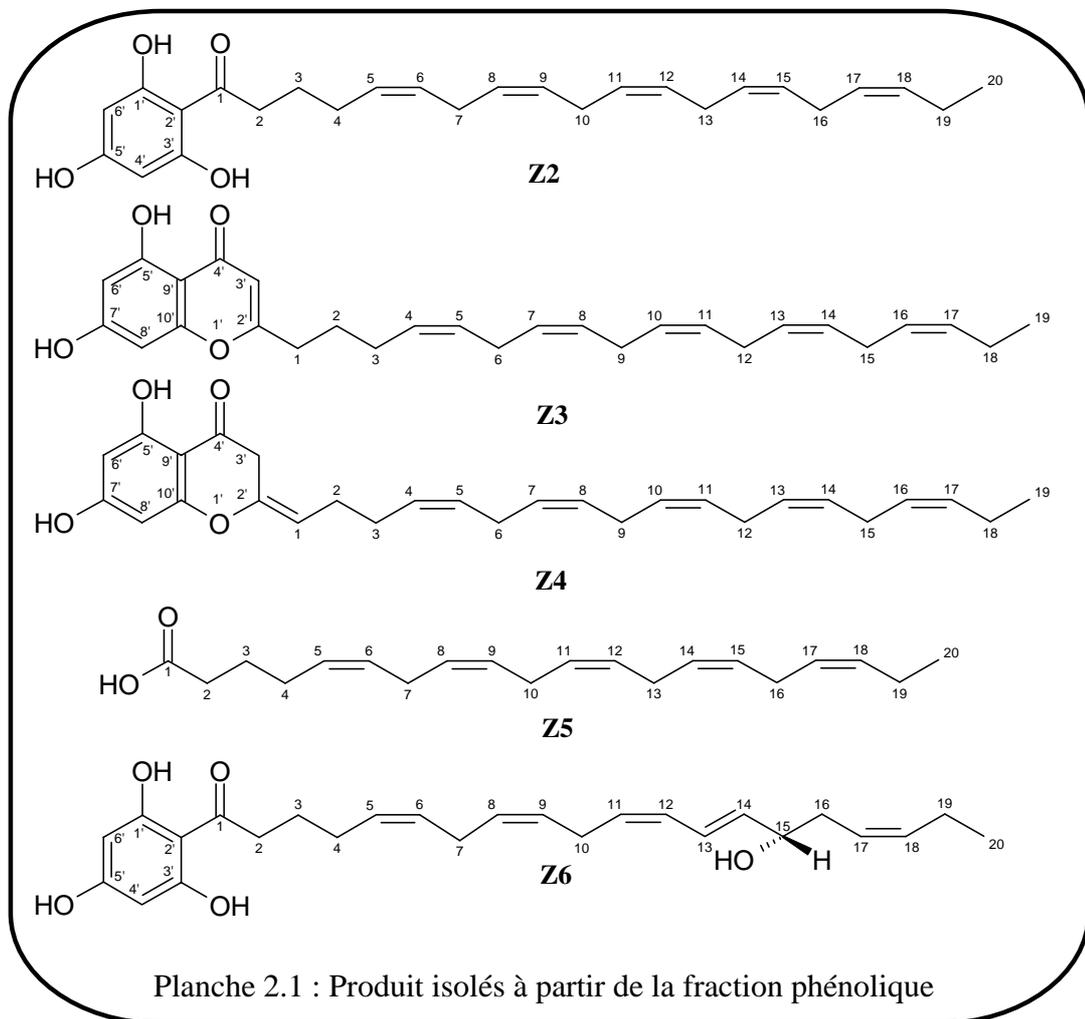


Planche 2.1 : Produit isolés à partir de la fraction phénolique

### 2.2.2.1.2.1 Etude structurale des produits Z2, Z3, Z4, Z5 et Z6

- Etude structurale du produit Z2 (Appendice B)

L'analyse structurale du produit **Z2** par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , comparée aux données bibliographiques [132], permet de conclure qu'il s'agit de l'acylphloroglucinol : (tout Z)-2'-eicosa-5,8,11,14,17-pentaénylphloroglucinol - de formule brute  $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_4$  et de masse molaire 410 g/mol - déjà décrit dans la littérature [132].

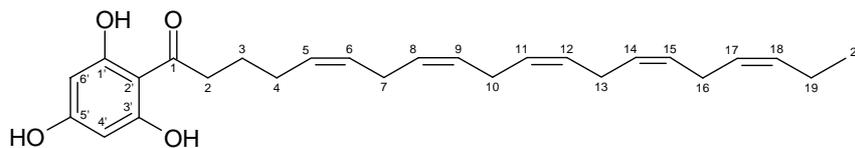
Le spectre RMN du proton (tableau 2.5) est caractérisé par :

- un singulet large à  $\delta$  5,86 ppm représentant les deux protons phénoliques H- 4' et H- 6',
- Un système pentaénique non conjugué  $[(-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-]$  sous forme de deux multiplets centrés à  $\delta$  5,35 ppm (10H, m) pour les protons éthyléniques et à  $\delta$  2,82 ppm (8H, m) pour les  $\text{CH}_2$  bis-allyliques,
- deux méthylènes allyliques à  $\delta$  2,08 ppm (2H-19, quint,  $J = 7$  Hz) et  $\delta$  2,16 ppm (2H-4, q,  $J = 7$  Hz),
- un méthylène en  $\alpha$  de C=O à  $\delta$  3,06 ppm (2H-2, t,  $J = 7$  Hz), un groupement méthylène à  $\delta$  1,76 ppm (2H-3, quint.,  $J = 7$  Hz) et un groupement méthyle à  $\delta$  0,97 ppm (3H-20, t,  $J = 7$  Hz).

La RMN du carbone (tableau 2.5) met en évidence des carbones  $\text{sp}^2$  comprenant : un signal correspondant à une fonction carbonyle à  $\delta$  205,75 ppm et des signaux à  $\delta$  161,93 (3C),  $\delta$  104,91 et  $\delta$  95,76 ppm (2C) attribués aux atomes de carbone du noyau phénolique. Les autres signaux  $\text{sp}^2$  résonnent à  $\delta$  132,13,  $\delta$  129,60,  $\delta$  128,61,  $\delta$  128,41,  $\delta$  128,22 (2C),  $\delta$  128,00(2C),  $\delta$  127,91 et  $\delta$  127,01 ppm. Huit méthylènes sont observables à  $\delta$  43,45,  $\delta$  26,85,  $\delta$  25,63 (4C),  $\delta$  24,38,  $\delta$  20,55 ppm et un groupement méthyle à  $\delta$  14,26 ppm.

La nature *Cis* (Z) des doubles liaisons de la chaîne latérale est confirmée par la valeur du glissement à  $\delta$  25,63 ppm qui est identique pour les quatre bis-méthylènes allyliques. Les mêmes groupements avec des doubles liaisons en position *trans* ou *trans/cis* résonneraient à  $\delta \geq 30$  ppm [312].

La RMN 2D (séquences HMQC et HMBC) effectuées sur l'acide eicosapentaénoïque entièrement Z (**Z5**) nous a permis de préciser les attributions des signaux des protons et des carbones répertoriés dans le tableau 9. Cela nous a conduit, notamment, à interchanger les valeurs des  $\delta$  des C-3 et C-4 dans la référence [132].

Tableau 2.5 : Données de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du produit **Z2**

N° H et C	<b>Z2</b>	Ref. [132] <sup>a</sup>	<b>Z2</b>	Ref. [132] <sup>a</sup>	Multiplicité  DEPT
	$^1\text{H}$ $\text{CDCl}_3$ 400 MHz $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}^{\text{b}}$ 270 MHz $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ $\text{CDCl}_3$ 100 MHz $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ $\text{CDCl}_3$ 20,1 MHz $\delta$ (ppm)	
1'	--	--	161,93	164,03	C
2'	--	--	104,91	104,94	C
3'	--	--	161,93	164,03	C
4'	5,86 s large	6,00 s	95,76	95,46	CH
5'	--		161,93	162,58	C
6'	5,86 s large	6,00	95,76	95,46	CH
1	--	--	205,75	206,84	C
2	3,06 t (7)	3,21 t (7)	43,45	43,35	$\text{CH}_2$
3	1,76 quint (7)	1,84 quint. (7)	24,38	26,77 <sup>c</sup>	$\text{CH}_2$
4	2,16 q (7)	2,19 q (7)	26,85	24,29 <sup>c</sup>	$\text{CH}_2$
5	5,29-5,45 m	5,35 m	129,60	129,71	CH
6	5,29-5,45 m	5,35 m	128,61	129,10	CH
7	2,76-2,88 m	2,85 m	25,63	25,56	$\text{CH}_2$
8	5,29-5,45 m	5,35 m	128,41	128,74	CH
9	5,29-5,45 m	5,35 m	127,91	128,07	CH
10	2,76-2,88 m	2,85 m	25,63	25,56	$\text{CH}_2$
11	5,29-5,45 m	5,35 m	128,23	128,56	CH
12	5,29-5,45 m	5,35 m	128,00	128,38	CH
13	2,76-2,88 m	2,85 m	25,63	25,56	$\text{CH}_2$
14	5,29-5,45 m	5,35 m	128,22	128,56	CH
15	5,29-5,45 m	5,35 m	128,00	128,38	CH
16	2,76-2,88 m	2,85 m	25,63	25,56	$\text{CH}_2$
17	5,29-5,45 m	5,35 m	127,01	127,16	CH
18	5,29-5,45 m	5,35 m	132,13	132,20	CH
19	2,08 quint. (7)	2,07 quint. (7)	20,55	20,40	$\text{CH}_2$
20	0,97 t (7)	0,97 t (7)	14,26	14,87	$\text{CH}_3$

Les constantes de couplage entre parenthèses sont exprimées en Hz (RMN  $^1\text{H}$ ).

Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS.

t : triplet ; q : quadruplet, quint. : quintuplet, m : multiplet.

<sup>a</sup> : valeurs de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la ref. [132] ajoutées pour comparaison

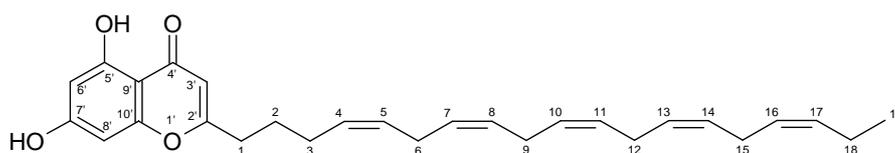
<sup>b</sup> : L'effet de solvant explique certaines différences de  $\delta$  avec **Z2**.

<sup>c</sup> : ces deux valeurs doivent être interchangées dans la ref.[132].

- Etude structurale des produits Z3 et Z4 (Appendice B)

Les deux produits **Z3** et **Z4** (planche 32) ont été déjà décrits dans *Zonaria tournefortii*, leur analyse structurale par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  comparée aux données bibliographiques [134, 135] a permis de les identifier rapidement (tableaux 10 et 11). Il s'agit dans les deux cas, d'une chaîne pentaënique à 19 atomes de carbone liée à une 5,7-dihydrochroman-4-one. La différence entre les deux structures se situe au niveau des signaux des carbones et des protons de l'enchaînement C-4' à C-2. Dans le composé **Z3**, le proton 3' forme un singulet à  $\delta$  6,04 ppm, il est fixé sur un carbone  $\text{sp}^2$  qui résonne à  $\delta$  107,80 ppm. La double liaison en C-2' est endocyclique, et dans ce cas, la conjugaison avec le carbonyle est conservée. Le composé **Z4** est caractérisé par une double liaison exocyclique en (2'-1), ce qui supprime la conjugaison avec le C=O. De ce fait, les deux protons Ha et Hb fixés en C-3' forment un système AB à  $\delta$  2,74 et 2,89 ppm et le carbone  $\text{sp}^3$  correspondant résonne à  $\delta$  44,76 ppm. La position de la double liaison en C-2' entre 2' et 3' pour **Z3** et entre 2' et 1 pour **Z4** induit des différences structurales importantes au niveau des atomes de carbone C-1 et C-2. Le carbone 1 ( $\text{sp}^3$ ) du composé **Z3** montre un signal à  $\delta$  33,64 ppm et deux protons méthyléniques qui résonnent sous forme d'un triplet à  $\delta$  2,58 ppm. Dans le composé **Z4**, le carbone 1 est  $\text{sp}^2$  avec un signal à  $\delta$  129,04 ppm, il porte un proton oléfinique qui résonne au niveau du multiplet des protons éthyléniques de la chaîne latérale à  $\delta$  5,27-5,45 ppm. La chaîne hydrocarbonée est caractérisée par un système pentaënique non conjugué  $[(-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-]$  comprenant des protons éthyléniques qui résonnent sous forme d'un multiplet centré à  $\delta$  5,41 ppm et huit protons méthyléniques de quatre méthylènes bis-allyliques qui résonnent sous forme d'un multiplet centré à 2,82 ppm. La double liaison exocyclique dans **Z4** provoque le déblindage du carbone C-2 qui passe de  $\delta$  26,64 ppm dans **Z3** à  $\delta$  40,57 ppm dans **Z4**. Comme pour **Z2**, la configuration Z de la chaîne carbonée peut être interprétée par la valeur des déplacement chimiques des carbones bis-allyliques (C6, C9, C12 et C15) qui est toujours inférieure à  $\delta$  30 ppm pour **Z3** et **Z4**.

Pour notre part, nous avons confirmé les attributions des signaux de RMN reportés dans les tableaux 10 et 11 avec les séquences de RMN bidimensionnelle (COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$  et HSQC).

Tableau 2.6 : Données de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du produit **Z3**

N° H et C	<b>Z3</b>	Ref.[134] <sup>a</sup>	<b>Z3</b>	Ref.[134] <sup>a</sup>	Multiplicité  DEPT
	$^1\text{H}$ $\text{CDCl}_3$ 400 MHz $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}^b$ 270 MHz $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ $\text{CDCl}_3$ 100 MHz $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ $\text{CDCl}_3$ 20,1 MHz $\delta$ (ppm)	
2'	--	--	170,55	171,4	C
3'	6,04	6,21 s	107,80	107,7	CH
4'	--		182,58	183,2	C
5'	--		158,29	158,9	C
6'	6,35 d (2,1)	6,68 d (2)	99,42	100,0	CH
7'	--		162,54	163,9	C
8'	6,29 d (2,1)	6,74 d (2)	94,15	94,7	CH
9'	--		105,10	105,1	C
10'	--		162,24	162,5	C
1	2,58 (t) (7)	2,51 t (7)	33,64	33,8	$\text{CH}_2$
2	1,78 (quint.) (7,3)	1,73 quint. (7)	26,64	26,8	$\text{CH}_2$
3	2,17 (q) (7)	2,17 quint. (7)	26,42	26,5	$\text{CH}_2$
4	5,31 – 5,46 (m)	5,45 m	129,31	129,7	CH
5	5,31 – 5,46 m	5,45 m	128,58	128,9	CH
6	2,79 – 2,87 m	2,94 m	25,52	25,6	$\text{CH}_2$
7	5,31 – 5,46 m	5,45 m	128,43	128,7	CH
8	5,31 – 5,46 m	5,45 m	127,97	128,3	CH
9	2,79 – 2,87 m	2,94 m	25,61	25,7	$\text{CH}_2$
10	5,31 – 5,46 m	5,45 m	128,28	128,6	CH
11	5,31 – 5,46 m	5,45 m	127,90	128,3	CH
12	2,79 – 2,87 m	2,94 m	25,63	25,7	$\text{CH}_2$
13	5,31 – 5,46 m	5,45 m	128,30	128,6	CH
14	5,31 – 5,46 m	5,45 m	127,82	128,3	CH
15	2,79 – 2,87 m	2,94 m	25,67	25,7	$\text{CH}_2$
16	5,31 – 5,46 m	5,45 m	126,96	127,3	CH
17	5,31 – 5,46 m	5,45 m	132,05	132,3	CH
18	2,06 quint. (7,2)	2,06 quint. (7)	20,54	20,6	$\text{CH}_2$
19	0,96 t (7,5 Hz)	0,94 t (7)	14,26	14,3	$\text{CH}_3$
OH	12,53 s	6,00 s			

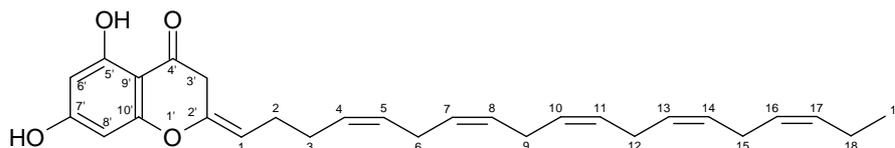
Les constantes de couplage entre parenthèses sont exprimées en Hz (RMN  $^1\text{H}$ ).

Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS.

t : triplet ; q : quadruplet ; quint. : quintuplet ; m : multiplet ; d : doublet.

<sup>a</sup> : valeurs de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la ref. [134] ajoutées pour comparaison.

<sup>b</sup> : L'effet de solvant explique certaines différences de  $\delta$  avec **Z3**.

Tableau 2.7 : Données de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du produit **Z4**

N° H et C	<b>Z4</b>	Ref.[135] <sup>c</sup>	<b>Z4</b>	Ref.[135] <sup>c</sup>	Multiplicité  DEPT
	$^1\text{H}$ $\text{CDCl}_3$ 400 MHz $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\text{C}_6\text{D}_6$ <sup>d</sup> 270 MHz $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ $\text{CDCl}_3$ 100 MHz $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ $\text{CDCl}_3$ 20,1 MHz $\delta$ (ppm)	
2'	--	--	159,98	160,4	C
3'	2,74 et 2,89 syst. AB (16,9)	2,58 et 2,44 syst AB (16)	44,76	45,1	$\text{CH}_2$
4'	--		194,95	195,4	C
5'	--		159,98	160,4	C
6'	5,90(d) (2)	5,99 d (2)	96,72	97,1	CH
7'	--		165,17	165,2	C
8'	5,95 (d) (2)	6,07 d (2)	96,18	96,4	CH
9'	--		102,25	102,9	C
10'	--		163,73	164,3	C
1	5,27-5,45 (m)	5,55 m	129,04	129,3	CH
2	1,96 q large (7,3)	1,38 q large (7)	40,57	40,7	$\text{CH}_2$
3	2,15 q (6,8)	2,02 q (7)	23,20	23,3	$\text{CH}_2$
4	5,27-5,45 (m)	5,38 m	128,86	129,3	CH
5	5,27-5,45 m	5,55 m	128,58	128,9	CH
6	2,78-2,87 m	2,97 m	26,79	26,9	$\text{CH}_2$
7	5,27-5,45 m	5,55 m	128,27	128,7	CH
8	5,27-5,45 m	5,55 m	127,82	128,2	CH
9	2,78-2,87 m	2,97 m	25,67	25,7	$\text{CH}_2$
10	5,27-5,45 m	5,55 m	128,18	128,6	CH
11	5,27-5,45 m	5,55 m	128,10	128,4	CH
12	2,78-2,87 m	2,97 m	25,64	25,7	$\text{CH}_2$
13	5,27-5,45 m	5,55 m	128,18	128,6	CH
14	5,27-5,45 m	5,55 m	128,03	128,4	CH
15	2,78-2,87 m	2,97 m	25,61	25,6	$\text{CH}_2$
16	5,27-5,45 m	5,55 m	126,96	127,3	CH
17	5,27-5,45 m	5,38 m	132,07	132,4	CH
18	2,06 quint. (7,3)	2,12 quint. (7)	20,54	20,6	$\text{CH}_2$
19	0,96 t (7,5)	1,04 t (7)	14,25	14,3	$\text{CH}_3$
OH	11,98 s				

Les constantes de couplage entre parenthèses sont exprimées en Hz (RMN  $^1\text{H}$ ).

Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS.

t : triplet ; d : doublet ; q : quadruplet ; quint. : quintuplet ; m : multiplet.

<sup>c</sup> : valeurs de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la ref. [135] ajoutées pour comparaison

<sup>d</sup> : L'effet de solvant explique certaines différences de  $\delta$  avec **Z4** (dans cette référence on peut remarquer, par exemple, que le  $\delta$  des protons méthyléniques H-2 passe de 1,38 ppm dans le  $\text{C}_6\text{D}_6$  à 2,13 ppm dans la  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

- Etude structurale du produit Z5 (Appendice B)

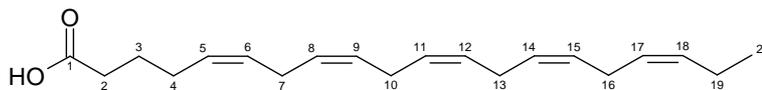
La comparaison des données spectrales de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  et de spectrométrie de masse avec celles de la bibliographie [313-315] permet de conclure rapidement qu'il s'agit de l'acide (tout *Z*)-5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque. En particulier, on retrouve à partir du carbone 3 les signaux de RMN répertoriés pour la chaîne latérale de **Z2**. Les attributions des carbones et des protons données dans le tableau 2.8 ont été confirmées par RMN bidimensionnelle (COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HMQC et HMBC). Le spectre de masse par impact électronique obtenu par CG-SM, confirme cette structure avec un pic de masse à  $m/z = 302$  et un pic de base à  $m/z = 79$  caractéristique de la fragmentation des acides gras insaturés. Dans la littérature, les attributions exactes des glissements chimiques des atomes de carbone ne sont pas précisées. Les valeurs sont données sous la forme suivante dans la référence [314] :

RMN  $^{13}\text{C}$  :  $\delta$  180,4 (C), 132,0 (CH), 129,0 (CH), 128,7 (CH), 128,5 (CH), 128,3 (CH), 128,2 (2CH), 128,1 (CH), 127,7 (CH), 127,0 (CH), 33,5 (CH<sub>2</sub>), 26,5 (CH<sub>2</sub>), 25,6 (3CH<sub>2</sub>), 25,5 (CH<sub>2</sub>), 24,5 (CH<sub>2</sub>), 20,6 (CH<sub>2</sub>), 14,3 (CH<sub>3</sub>).

- Etude structurale du produit Z6 (Appendice B)

L'analyse des données spectroscopiques de RMN du proton et du carbone du produit **Z6** comparées à celles fournies par la bibliographie [131,133] montre qu'il s'agit du (5*Z*,8*Z*,11*Z*,13*E*,17*Z*)-2'-eicosa-15(*S*)-hydroxy-5,8,11,13,17-pentaénoyl-phloroglucinol déjà décrit dans la littérature [133].

Le spectre RMN du carbone (tableau 2.9) révèle la présence d'un noyau phloroglucinol ( $\delta$  : 162,80 (2C) ; 163,82 ; 104,85 et 95,60 ppm (2C)), d'un groupe carbonyle à  $\delta$  206,38 ppm, de 10 carbones oléfiniques ( $\delta$  : 135,84 ; 134,40 ; 131,01 ; 129,65 ; 128,82 ; 128,34 ; 127,57 ; 127,16 ; 126,16 et 123,08 ppm), de 7 méthylènes ( $\delta$  : 43,21 ; 35,08 ; 26,94 ; 26,10 ; 25,52 ; 24,52 et 20,76 ppm), d'un méthyle (14,22 ppm) et d'un groupement hydroxyméthine à  $\delta$  72,49 ppm. Le spectre RMN du proton (tableau 13) comparé à celui de **Z2**, montre que les principales différences se situent au niveau de l'enchaînement C-12 à C-17. Dans cette zone, on observe un groupement hydroxyméthine qui résonne sous forme d'un quadruplet à  $\delta$  4,31 ppm (H-15). Ce proton est couplé, à la fois, aux protons méthyléniques H-16 et au proton éthylénique H-14 ( $J_{\text{H-14/H-15}} = J_{\text{H-15/H-16}} = 6,5$  Hz). H-14 est lui-même lié à un second proton éthylénique (H-13) avec une constante de couplage

Tableau 2.8 : Données de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du produit **Z5**

N° H et C	<b>Z5</b>	Ref. [314] <sup>a</sup>	<b>Z5</b>	Multiplicité
	$^1\text{H}$ CDCl <sub>3</sub> 400 MHz $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ CDCl <sub>3</sub> 300 MHz $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ CDCl <sub>3</sub> 100 MHz $\delta$ (ppm)	DEPT
1	--	--	179,04	C
2	2,36 t (7)	2,35 t (7,5)	33,24	CH <sub>2</sub>
3	1,71 quint. (7)	1,71 m	24,50	CH <sub>2</sub>
4	2,13 q (7)	2,12 m	26,45	CH <sub>2</sub>
5	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m	129,02	CH
6	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m	128,76	CH
7	2,77-2,90 m	2,72-2,89 m	25,63	CH <sub>2</sub>
8	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m	128,57	CH
9	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m	127,88	CH
10	2,77-2,90 m	2,72-2,89 m	25,63	CH <sub>2</sub>
11	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m	128.14	CH
12	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m	128.06	CH
13	2,77-2,90 m	2,72-2,89 m	25,63	CH <sub>2</sub>
14	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m	128.14	CH
15	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m	128.24	CH
16	2,77-2,90 m	2,72-2,89 m	25,63	CH <sub>2</sub>
17	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m	127,01	CH
18	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m	132,05	CH
19	2,06 quint. (7)	2,12 m	20,56	CH <sub>2</sub>
20	0,97 t (7)	0,96 t (7,5)	14,28	CH <sub>3</sub>

Les constantes de couplage entre parenthèses sont exprimées en Hz (RMN  $^1\text{H}$ ).

Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS.

t : triplet ; q : quadruplet, quint : quintuplet, m : multiplet.

<sup>a</sup>: valeurs RMN  $^1\text{H}$  de la ref.[314] ajoutées pour comparaison

$J_{H-13/H-14}$  dont la valeur de 15 Hz est caractéristique de deux protons en position *trans* sur double liaison éthylénique. On en déduit donc que la double liaison en C-13, dans cet enchaînement, est de configuration *E*. Le H-13 est couplé également au H-12 ( $J_{H-12/H-13} = 11$  Hz), ce qui entraîne un déblindage important de ce dernier ( $\delta$  5,97 ppm, 1H, t, 11 Hz) par rapport à ce qui est observé pour **Z2** ( $\delta$  5,29-5,45 ppm, 1H, m). Par ailleurs, du côté opposé à l'hydroxyméthine, on constate que le proton éthylénique H-17 est couplé, à la fois, aux protons méthyléniques H-16 ( $J_{H-16/H-17} = 6,5$  Hz) et à un second proton éthylénique (H-18), dont la valeur de la constante de couplage  $J_{H-17/H-18}$  (10,5 Hz) est caractéristique de deux protons en position *cis* sur une double liaison éthylénique. On en déduit que la double liaison en C-17 est de configuration *Z*. Ce qui est confirmé par la valeur du méthylène 19 en RMN  $^{13}C$  ( $\delta$  20,76 ppm) qui est identique à celle trouvée dans **Z2** et **Z5** où la chaîne pentaénique est entièrement *Z*.

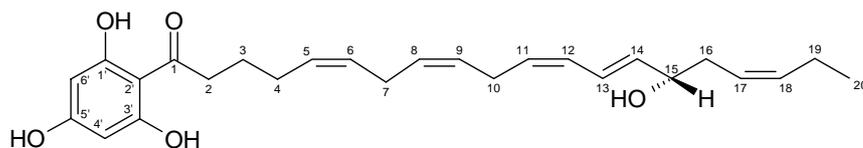
Précisons que la stéréochimie du carbone chiral en C-15 a été déterminée comme étant *S* par les auteurs de la référence [133] par isolement de l'acide *S*(-)-malique à partir des produits résultant de l'ozonolyse de ce produit.

Pour notre part, nous avons confirmé les attributions des signaux de RMN reportés dans le tableau 13 avec les séquences de RMN bidimensionnelle (HMQC et HMBC), notamment au niveau de la partie de structure qui diffère de **Z2**. Cela nous a conduit à corriger certaines attributions de la référence [133] :  $\delta$  C-3 et  $\delta$  C-4 en RMN  $^{13}C$  sont à interchanger comme pour **Z2** et **Z5**.

#### 2.2.2.2 Hypothèse de biogenèse des dérivés du phloroglucinol isolés de *Zonaria tournefortii*

L'étude chimique de la fraction phénolique de *Zonaria tournefortii* révèle que cette espèce privilégie le métabolisme des dérivés du phloroglucinol ainsi que celui des acides gras, principalement l'acide eicosapentaénoïque. Au cours de cette discussion, nous allons tenter d'expliquer ce phénomène et de proposer une hypothèse de biosynthèse des produits isolés. Nous commencerons, d'abord, par un bref rappel du rôle joué par les acides gras insaturés dans les organismes vivants et parlerons ensuite des travaux les plus récents concernant leur biosynthèse.

Les acides gras insaturés (AGI ou PUFAs : **P**oly**U**nsaturated **F**atty **A**cids) à longue chaîne sont des acides carboxyliques ayant une chaîne carbonée à 18 atomes de carbone ou plus et 3 doubles liaisons ou plus. Ils jouent un rôle très important dans la nutrition et la

Tableau 2.9 : Données de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du produit **Z6**

N° H et C	<b>Z6</b>	Ref.[133] <sup>a</sup>	<b>Z6</b>	Ref.[133] <sup>a</sup>	Multiplicité  DEPT
	$^1\text{H}$ $\text{CDCl}_3$ 400 MHz $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}^b$ 270 MHz $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ $\text{CDCl}_3$ 100 MHz $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ $\text{CDCl}_3$ 20,1 MHz $\delta$ (ppm)	
1'	--		162.80	164,21	C
2'	--		104.85	105,18	C
3'	--		162.80	164,21	C
4'	5.87 s	6,37 s	95.60	96,01	CH
5'	--		163.82	163,31	C
6'	5.87 s	6,37 s	95.60	96,01	CH
1	--		206.38	207,09	C
2	3.04 t (7)	3,37 t (7)	43.21	43,36	$\text{CH}_2$
3	1.73 quint. (7)	1,93 quint. (7)	24.52	27,02 <sup>c</sup>	$\text{CH}_2$
4	2.13 q (7)	2,21 q (7)	26.94	24,77 <sup>c</sup>	$\text{CH}_2$
5	5.29 - 5.47 m	5,35-5,44 m	129.65	129,90	CH
6	5.29 - 5.47 m	5,35-5,44 m	128.82	129,17	CH
7	2.78 t large	2,98 t large (7)	25.52	25,75	$\text{CH}_2$
8	5.29 - 5.47, m	5,35-5,44 m	128.34	128,69	CH
9	5.29 - 5.47, m	5,35-5,44 m	127.57	127,96	CH
10	2.92 q (7)	2,98 t large (7)	26.10	26,24	$\text{CH}_2$
11	5.29- 5.47 m	5,44 m	126.16	126,62	CH
12	5.97 t (11)	6,10 t (10,5 ; 16)	134.40	134,76	CH
13	6.58 dd (11 ; 15)	6,85 dd (10,5 ; 16)	123.08	123,41	CH
14	5.71 dd (6,5 ; 15)	5,97 dd (6 ; 16)	135.84	136,04	CH
15	4.31 q (6,5)	4,50 q (6)	72.48	72,82	CH
16	2.37 m	2,55 m	35.09	35,22	$\text{CH}_2$
17	5.58 dt (6,5 ; 10,5)	5,64 ddd (8)	127.16	127,60	CH
18	5.29 - 5.47 m	5,46 m	131.01	131,36	CH
19	2.05 quint. (7)	2,04 quint. (7)	20.76	20,40	$\text{CH}_2$
20	0.95 t (7)	0,91 t (7)	14.22	14,15	$\text{CH}_3$

Les constantes de couplage entre parenthèses sont exprimées en Hz (RMN  $^1\text{H}$ ).

Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS.

t : triplet ; q : quadruplet ; ddd : doublet de doublets de doublets ; dt : doublet de triplet ; quint. : quintuplet.

<sup>a</sup> : valeurs RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la ref.[133] ajoutées pour comparaison.

<sup>b</sup> : L'effet de solvant explique certaines différences de  $\delta$  avec **Z6**.

<sup>c</sup> : ces deux valeurs doivent être interchangées dans la ref.[133].

santé humaine, des études cliniques et épidémiologiques indiquent leur importance dans le développement et le fonctionnement du cerveau, de la rétine et dans la reproduction des tissus [316]. L'acide eicosapentaénoïque (20:5n-3 ou 20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$ n-3), en particulier, est impliqué comme agent de protection dans de nombreuses pathologies comme les maladies cardiovasculaires et le syndrome du métabolisme (syndrome X) [317,318]. Il joue également un rôle très important comme précurseur d'arômes volatils [319] et de phéromones d'origine végétale ou animale [320].

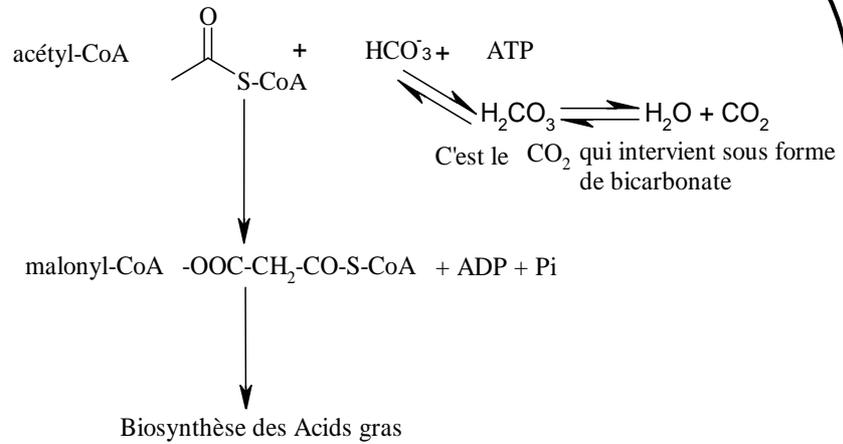
#### 2.2.2.2.1 Biosynthèse des acides gras saturés

Le précurseur unique de la chaîne carbonée des acides gras est l'acétyl CoA. Ce dernier réagit avec le dioxyde de carbone sous forme de bicarbonate en présence de l'adénosine triphosphate (ATP) pour donner le malonyl CoA [321]. Dans la mesure où il est le précurseur unique, les acides gras ont un nombre pair d'atomes de carbone. Il existe cependant des cas particuliers d'acides gras à nombre d'atomes de carbone impair, ils sont obtenus par substitution d'un atome de carbone [321]. La voie de biosynthèse des acides gras n'est pas l'inverse de la voie de dégradation : la première étape consiste en l'obtention du malonyl CoA, elle est suivie des étapes qui mènent aux différents acides gras (planche 2.2). L'augmentation de la chaîne se fait par le biais du système enzymatique RE (Enoyl Réductase) et permet l'introduction de deux atomes de carbone à la fois. Un exemple du passage du palmitate au stéarate est illustré dans la planche 2.3.

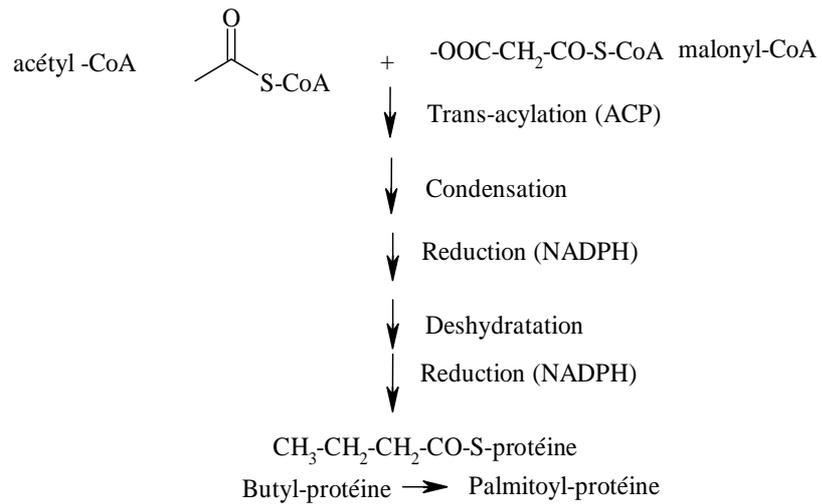
#### 2.2.2.2.2 Biosynthèse des acides gras insaturés (AGI)

A présent, différentes alternatives de biosynthèse des acides gras insaturés (AGI ou PFUAs) menant à la formation de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et de l'acide docosahexaénoïque (DHA) ont été développées et les réactions enzymatiques mises en jeu élucidées [322]. La voie de biosynthèse conventionnelle commence par une  $\Delta^6$  désaturation des deux acides 18:2 (n-6) (LA : acide linoléique) et 18:3 (n-3) (ALA : acide  $\alpha$ -linoléique) en produisant respectivement l'acide  $\gamma$ -linoléique (GLA, 18:3  $\Delta^{6,9,12}$ ) et l'acide octadecatetraénoïque (OTA, 18:4  $\Delta^{6,9,12,15}$ ). La première étape de désaturation est suivie par une réaction d'élongation spécifique  $C_2 - \Delta^6$  menant respectivement aux acides 20:3  $\Delta^{8,11,14}$  et 20:4  $\Delta^{8,11,14,17}$  dont la désaturation  $\Delta^5$  produit l'acide arachidonique (AA ou eicosatetraénoïque) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) (planche 2.4). Cette voie

### Synthèse du Malonyl-CoA



### Schéma général des étapes suivantes



Tout cela est réalisé par un seul complexe enzymatique :  
l'Acide Gras Synthase

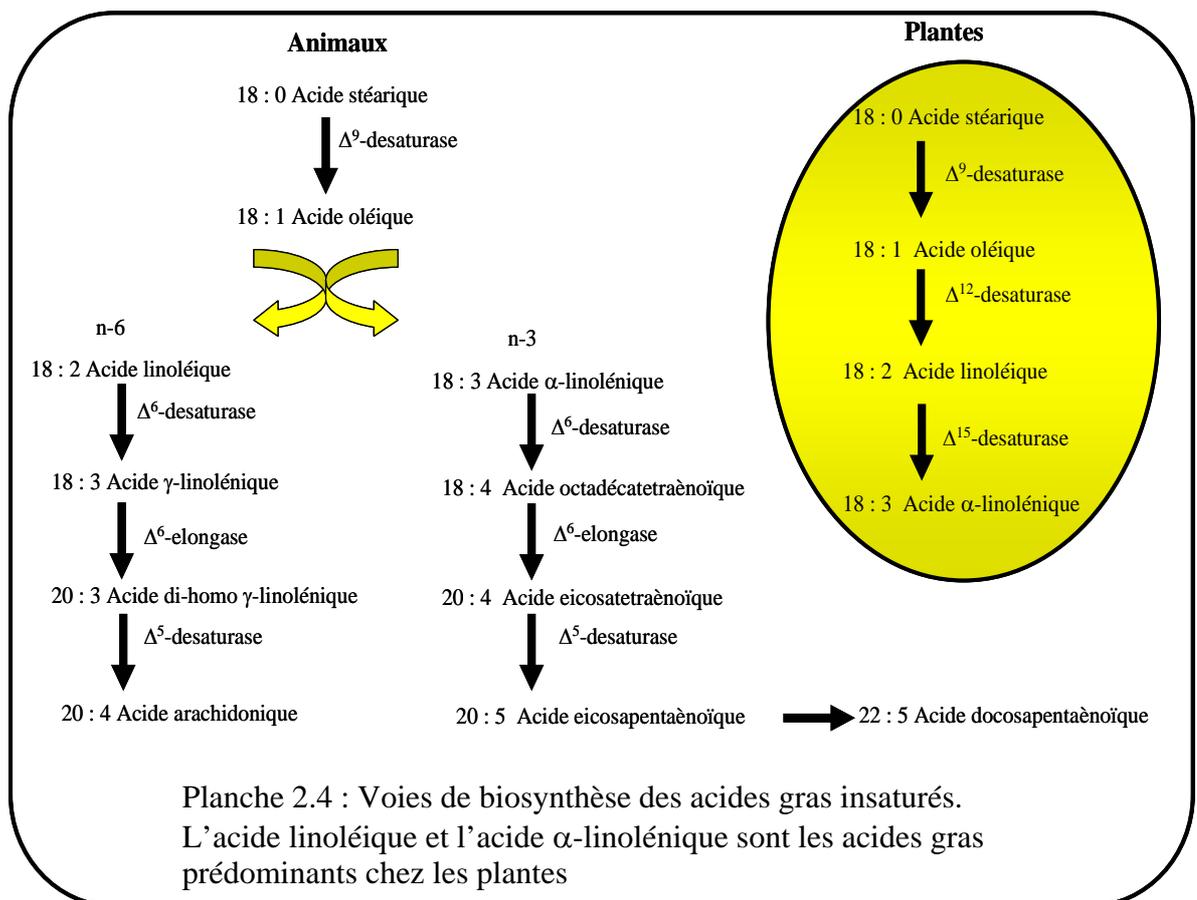
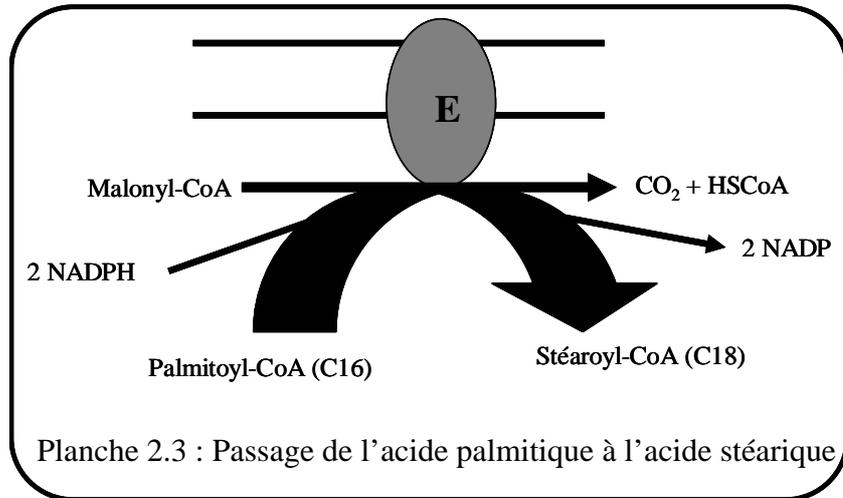
ADP : adénosine diphosphate

ATP : adénosine triphosphate

NADPH : nicotinamide adénine dinucleotide phosphate

ACP : 4 phosphopantotheine (acyl carrier proteine)

Planche 2.2 : Biosynthèse des acides gras saturés

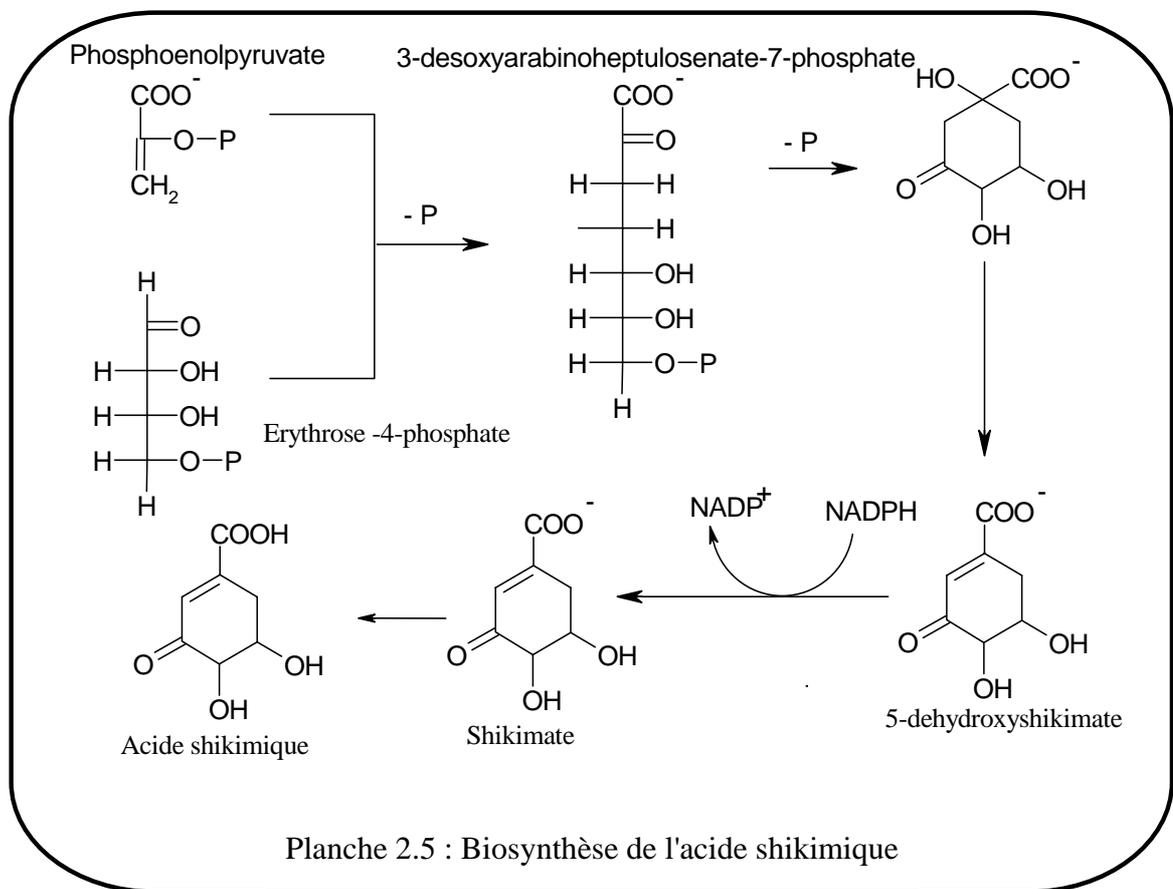


de biosynthèse des acides EPA et AA bien que générale diffère légèrement d'un organisme à un autre. La première étape de cette voie a été confirmée après l'isolement de la  $\Delta^4$ -desaturase à partir de l'algue unicellulaire marine (microalgue) *Thraustochytrium* spp. et d'une microalgue d'eau douce *Euglena gracilis* [323].

Bien que la majorité des plantes supérieures n'ont pas la capacité de métaboliser les acides gras insaturés en C20, beaucoup d'organismes inférieurs peuvent en produire [324]. Récemment, Qi et al [325] ont isolé la  $\Delta^9$ -elongase à partir des acides gras insaturés en C22 métabolisés par la microalgue *Isochrysis galbana*. Elle est capable d'allonger (élongation) les acides gras en C18 (soit le LA ou le ALA). Cette constatation suggère que la voie de biosynthèse des AGI dans *I. galbana* est similaire à celle de l'espèce *Euglena gracilis* citée précédemment [323].

#### 2.2.2.2.3 Biosynthèse des phénols

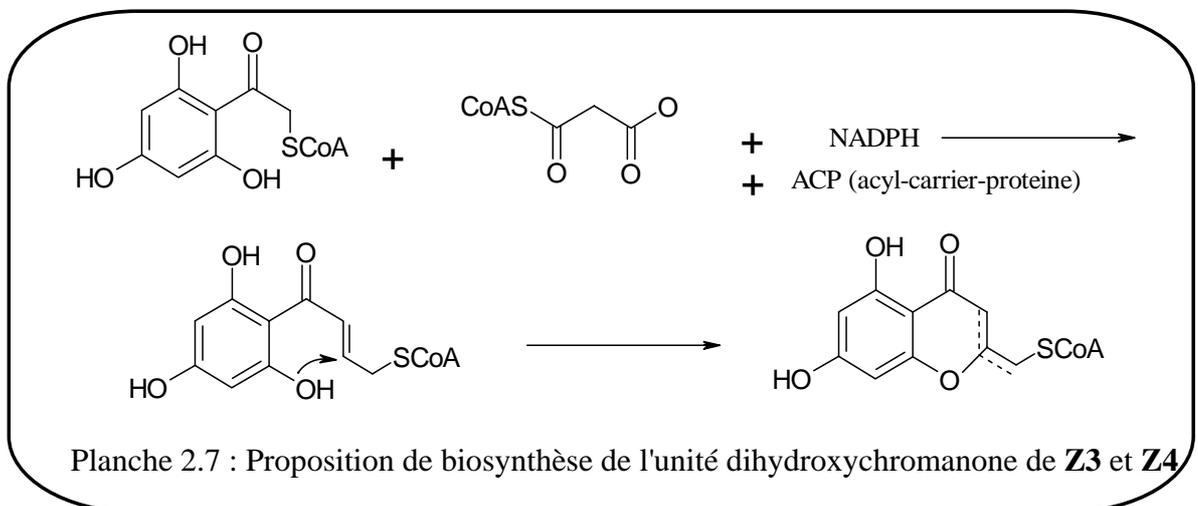
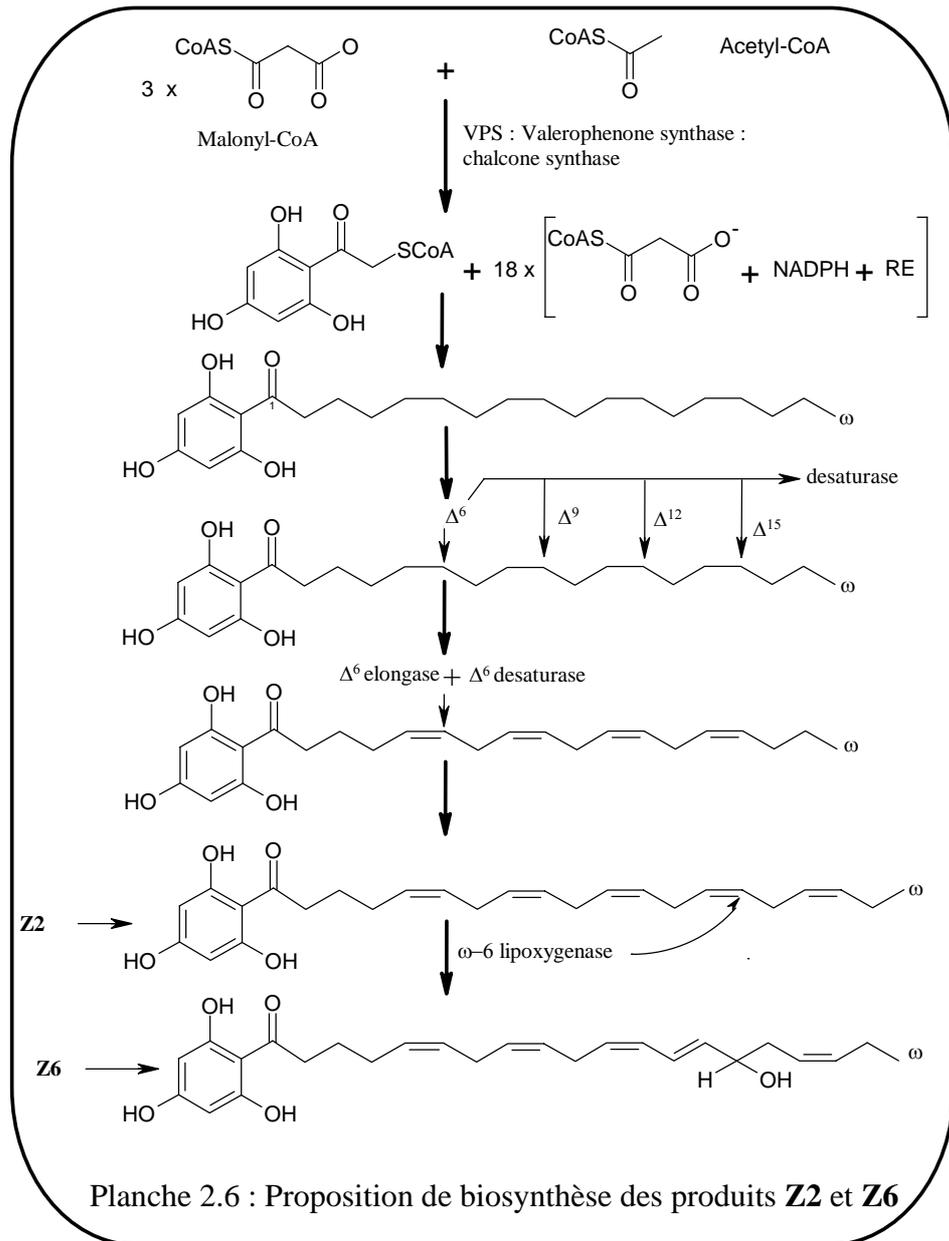
Les produits phénoliques, notamment, les phlorotanins sont métabolisés par divers organismes vivants. La voie biosynthétique utilisée par la majorité de ces produits est soit



celle de l'acide shikimique, soit celle de l'acétate (acetyl-CoA), soit une combinaison des deux [326]. L'acide shikimique utilisé dans la biosynthèse est obtenu par une combinaison du phosphoenolpyruvate et de l'erythrose-4-phosphate (planche 2.5). Le phloroglucinol est l'unité de base des phlorotanins, dont il est le précurseur.

#### 2.2.4.2.4 Proposition de biosynthèse des métabolites isolés de *Zonaria tournefortii*

Les produits isolés à partir de l'espèce *Zonaria tournefortii* sont formés d'un noyau phloroglucinol auquel est rattaché une chaîne hydrocarbonée contenant une fonction carbonyle et parfois une fonction alcool. La chaîne hydrocarbonée contient 20 (**Z2**, **Z5** et **Z6**) ou 22 atomes de carbone (**Z3** et **Z4**) avec 5 doubles liaisons. Cette constatation oriente l'hypothèse de biosynthèse vers l'utilisation en tant que précurseurs de l'acide eicosapentaénoïque (d'autant plus que ce dernier n'est autre que le produit **Z5** que nous avons isolé dans l'algue) et l'acide docosapentaénoïque. Dans le cas des produits **Z2** et **Z6**, l'hypothèse de biosynthèse que nous proposons est fondée sur des travaux publiés récemment [327-329]. Elle consiste en l'utilisation de l'acétyl-CoA (précurseur universel des lipides) et du malonyl-CoA (précurseur des acides gras) (planche 2.6). La première étape consiste en la condensation de trois unités de malonyl-CoA et d'une unité d'acétyl-CoA, ce qui conduit à la phloroacétophénone. La seconde étape consiste en une succession (16 fois) de réactions du malonyl-CoA permettant l'addition de deux atomes de carbone à chaque fois (planche 34), le produit obtenu est la phlorooctadécaphénone. L'action des enzymes desaturases  $\Delta^6$ ,  $\Delta^9$ ,  $\Delta^{12}$ ,  $\Delta^{15}$ , suivie d'une élongase  $\Delta^6$  et d'une autre desaturase  $\Delta^6$  permet d'obtenir le produit **Z2** (planche 37). Concernant le produit **Z6** qui contient une fonction alcool sur le carbone 15, l'action d'une  $\omega$ -6 lipoxygénase (LOX) [330, 331] permet l'introduction du groupement hydroxyle en position 15, avec déplacement de la double liaison de C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub> à C<sub>13</sub>-C<sub>14</sub>. Concernant les produits **Z3** et **Z4**, une cyclisation intramoléculaire après addition de la première unité de malonyl-CoA mène à la formation de l'unité dihydroxychromanone (planche 2.7).



### 2.2.3 Etude chimique de l'espèce *Bifurcaria bifurcata* (Velley) Ross

Une première extraction au  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  permet d'obtenir l'extrait brut de l'algue avec un rendement de 2,63 %. Le traitement d'une masse de 22,89 g de cet extrait selon le protocole représenté dans la figure 2.2 conduit à la récupération de deux fractions :

- une fraction apolaire (phase isooctanique) de masse de 3,55 g (cette fraction renferme la plupart des composés diterpéniques décrits de cette algue (chapitre 1.1).
- une fraction polaire (phase méthanolique) de masse de 19,34 g.

Dans le cadre de cette étude nous nous sommes intéressés à la fraction polaire, dont les premiers travaux ont déjà mené à l'isolement de deux diterpènes trihydroxylés dans notre laboratoire d'accueil [69, 308]. La séparation de cette fraction sur une colonne ouverte de gel de silice a permis de récupérer 13 fractions. L'analyse par CCM nous a permis de repérer les produits déjà identifiés et de porter notre attention sur les fractions **F5** et **F6** éluées par le mélange  $\text{AcOEt}/\text{MeOH}$ , dans les proportions respectives 98/2 et 95/5. Une analyse préliminaire par CLHP analytique en phase normale nous a révélé que la fraction **5** (figure 2.19-a) est un mélange complexe, nous avons procédé de ce fait à son acétylation. Le traitement de la fraction **5** acétylée (1,96 g) par CLHP semi-préparative en phase normale, avec le mélange d'élution  $\text{AcOEt}/\text{TMP}$  : 20/80, nous a permis de séparer trois diterpènes acétylés **B1**<sub>acet.</sub> (277 mg), **B2**<sub>acet.</sub> (101,68 mg) et **B3**<sub>acet.</sub> (104,7 mg) (figure 2.19-b). Les produits **B1**<sub>acet.</sub> et **B2**<sub>acet.</sub> sont deux acétates correspondant aux deux diterpènes trihydroxylés **B1** et **B2** déjà isolés de la même espèce [69, 308], alors que **B3**<sub>acet.</sub> correspond à un diterpène trihydroxylé non encore décrit **B3** (Planche 2.8).

L'étude de la fraction **F6** (1,49 g) a été effectuée en deux étapes : (1) traitement par CLHP analytique en phase normale, avec le système d'élution  $\text{AcOEt}/\text{TMP}$  : 75/25, qui a conduit à la récupération d'un mélange de produits correspondant au pic **X** (316 mg) (figure 2.20), (2) étude du mélange **X** par CLHP analytique à polarité de phases inversée, avec le système d'élution  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  : 37/63, qui a permis d'isoler les produits **B3** (15 mg) et **B4** (19 mg) non encore décrits dans la littérature (figure 2.21) (Planche 2.8).

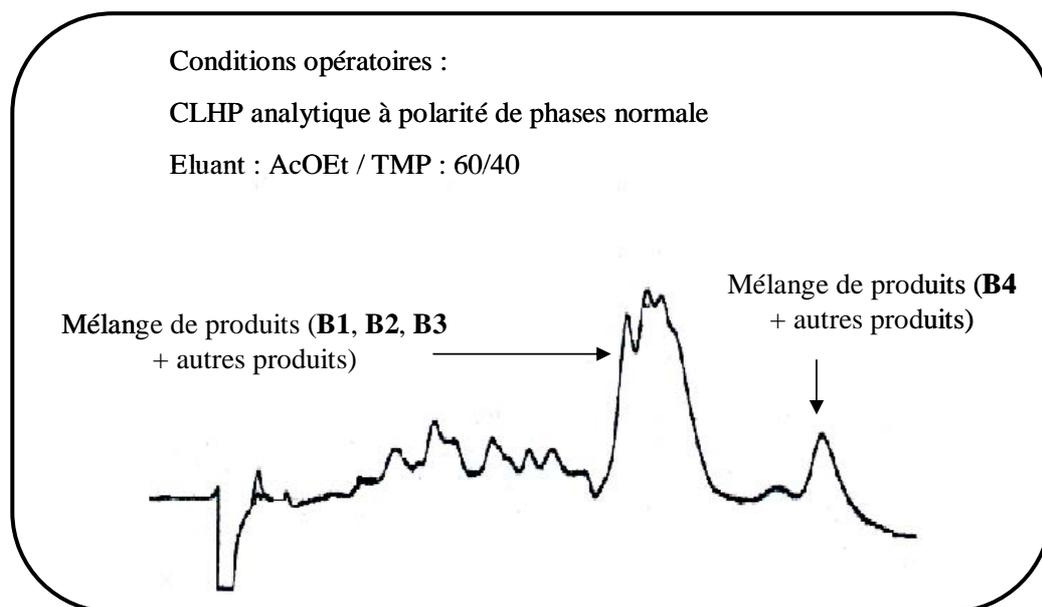


Figure 2.19-a : Chromatogramme en CLHP de la fraction 5

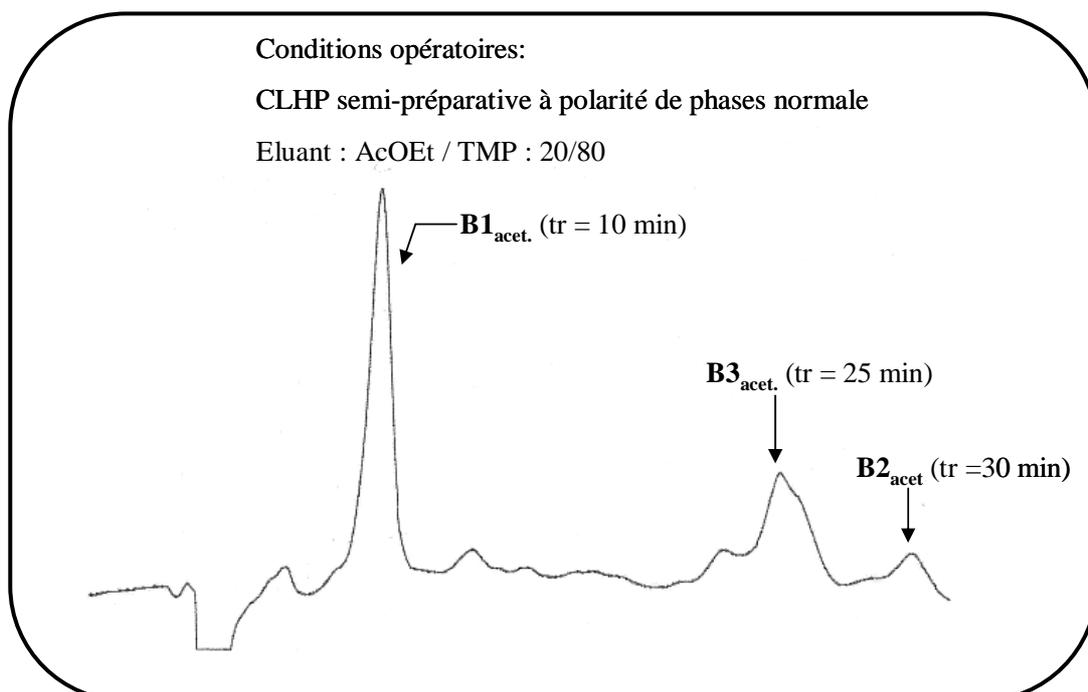


Figure 2.19-b : Chromatogramme en CLHP de la fraction 5 acétylée

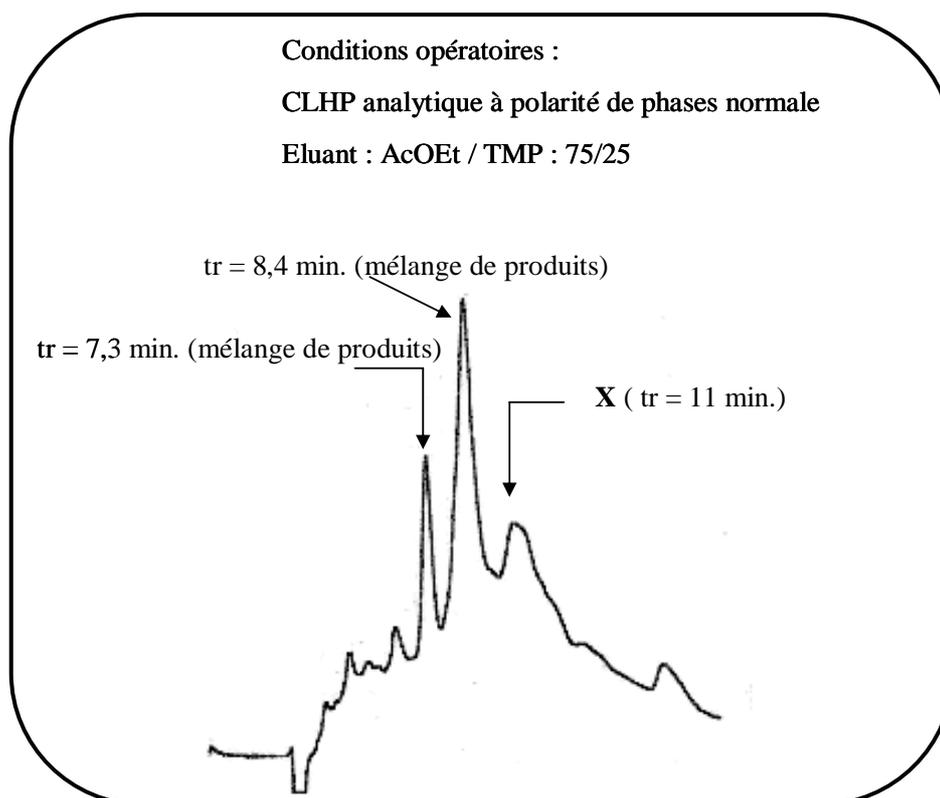


Figure 2.20 : Chromatogramme en CLHP de la fraction 6

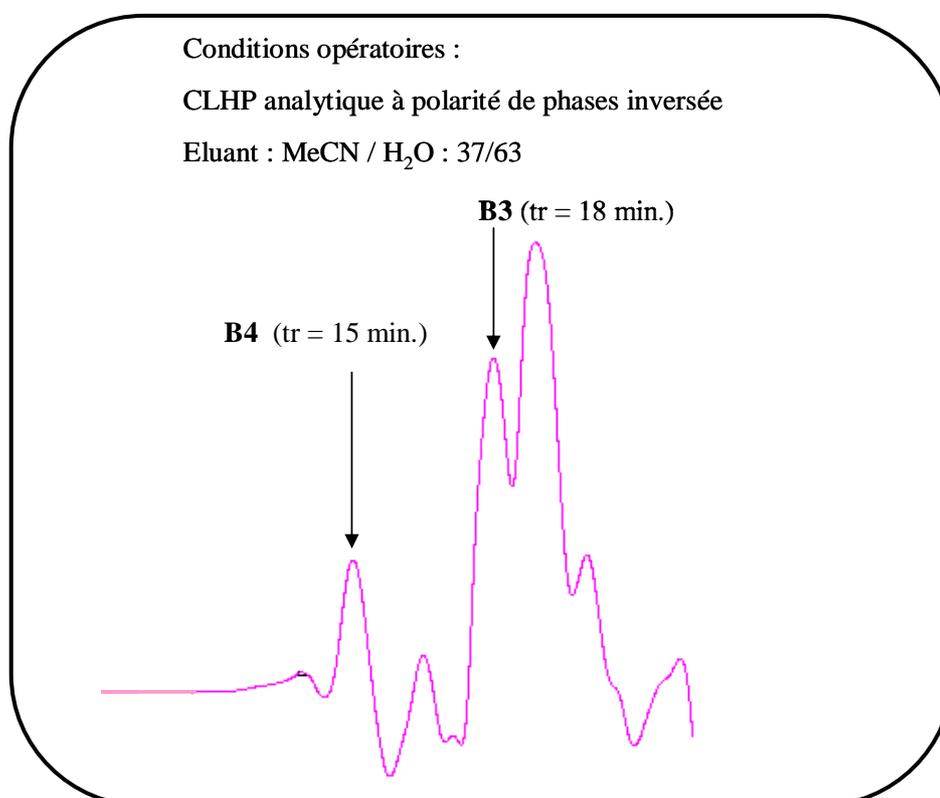


Figure 2.21 : Chromatogramme en CLHP du mélange de produits

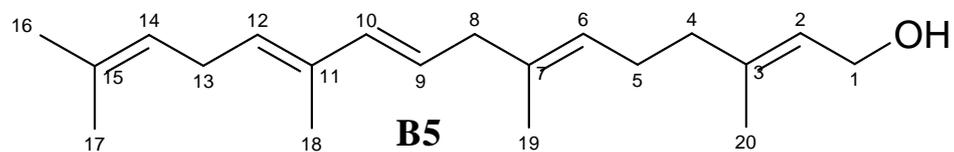
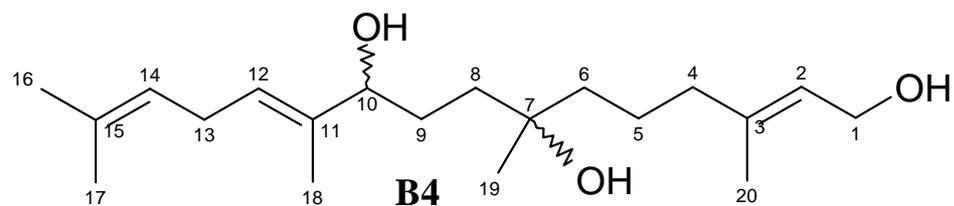
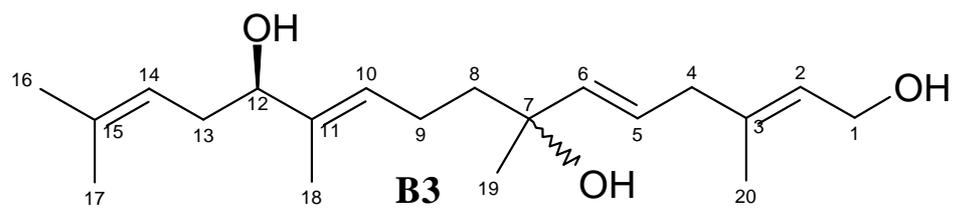
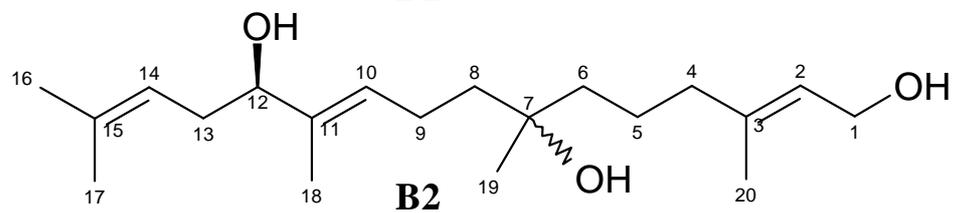
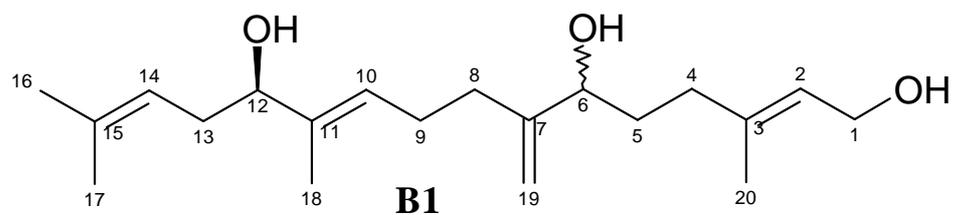
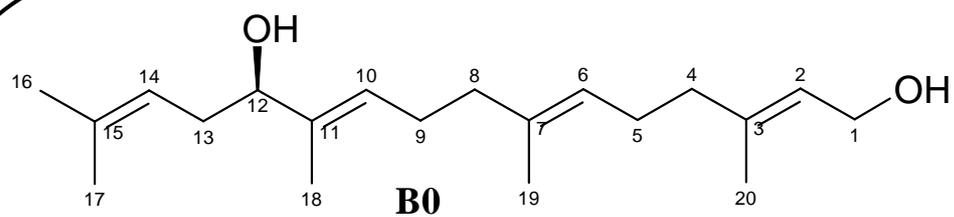


Planche 2.8 : Diterpènes de *Bifurcaria bifurcata*

**B0, B1, B2 et B5** : structures connues

**B3 et B4** : structures originales

### 2.2.3.1 Etude structurale des produits isolés

#### 2.2.3.1.1 Analyse structurale du composé B3

- Analyse par spectrométrie de masse

La formule brute de **B3**, déterminée par spectrométrie de masse haute résolution, est  $C_{20}H_{34}O_3$  correspondant à une masse molaire de 322 g/mol. Les principales fragmentations obtenues par impact électronique sont données dans la figure 2.22. L'examen du spectre montre que l'ion moléculaire à  $m/z = 322$  est invisible, on note également que les ions à  $m/z = 304$  et  $286$  correspondant, respectivement, à l'élimination d'une et de deux molécules d'eau ont des intensités relatives très faibles. Le pic de base à  $m/z = 81$  correspond à la coupure de la liaison  $C_{11}-C_{12}$  avec élimination d'une molécule d'eau conduisant à un système conjugué très stable. Les ions à  $m/z = 55$  et  $69$  correspondant, respectivement, à l'isobutényle (coupure  $C_{13}-C_{14}$ ) et à l'unité isoprénique (coupure  $C_{12}-C_{13}$ ) ont une intensité relative très importante.

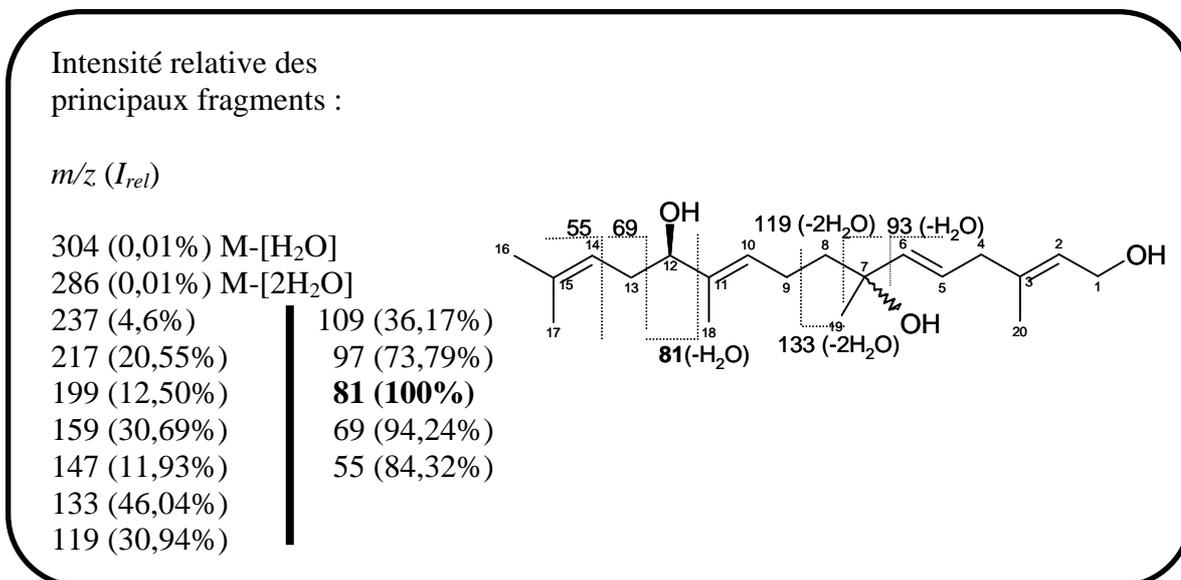


Figure 2.22 : Fragmentation du composé **B3** par impact électronique

- Analyse par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (Appendice C)

L'examen du spectre infrarouge indique la présence d'une bande d'absorption large et intense à  $3372\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{O-H}$ ) caractéristique de la présence de plusieurs fonctions alcools. Ces dernières sont confirmées par la bande d'absorption à  $1007\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{C-O}$ ). La présence de

doubles liaisons éthyléniques est confirmée par les bandes d'absorption à  $2968\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-H}}$  éthyléniques) et à  $1669\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=C}}$ ) d'intensité faible.

- Détermination du pouvoir rotatoire

Le produit est optiquement actif, son pouvoir rotatoire mesuré dans le dichlorométhane avec une lampe au sodium (589 nm) a conduit à la valeur suivante pour son pouvoir rotatoire spécifique :  $[\alpha]_D^{20} = -3,5^\circ$  ( $C = 0,2$  ;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

- Analyse par spectroscopie de RMN (Appendice C)

L'analyse du composé **B3** par spectroscopie de RMN du  $^{13}\text{C}$  montre que ce composé possède une structure à vingt atomes de carbone, comprenant :

- 5 carbones primaires ( $-\text{CH}_3$ ),
- 5 carbones secondaires ( $-\text{CH}_2-$ ),
- 6 carbones tertiaires dont un est hybridé  $\text{sp}^3$  et 5 sont hybridés  $\text{sp}^2$  ( $-\text{CH}-$ ),
- 4 carbones quaternaires dont un est hybridé  $\text{sp}^3$  et trois sont hybridés  $\text{sp}^2$ .

On remarque que les signaux à  $\delta$  11,7 (C-18),  $\delta$  16,4 (C-20) et  $\delta$  18,0 ppm (C-17), correspondant à des groupements méthyles fixés sur double liaison, sont tous trois inférieurs à 20 ppm. Il s'agit d'un blindage dû à la présence d'un groupement méthylène situé en  $\gamma$ . Blindage qui ne peut avoir lieu que si les groupements méthyles sont fixés sur des doubles liaisons de configuration *E* [332, 333]. L'analyse comparée de **B3**, en RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$ , avec le bifurcadiol (**B0**) et le composé **B2** montre que les spectres des 3 molécules sont similaires au niveau des deux dernières unités isopréniques et d'une partie de la première (C1 à C3 et C20). Par contre, des modifications majeures sont à signaler au niveau de la seconde unité isoprénique. En particulier, comme pour **B2** il faut localiser une fonction alcool tertiaire sur cette unité, mise en évidence par le signal d'un atome de carbone quaternaire à  $\delta$  72,9 ppm en RMN  $^{13}\text{C}$ , de même qu'un groupement méthyle sur carbone  $\text{sp}^3$  correspondant au singulet à  $\delta$  1,32 ppm ( $-\text{CH}_3$  19) en RMN  $^1\text{H}$  (étant donné que la fonction alcool est tertiaire, le groupement méthyle et l'hydroxyle sont vraisemblablement fixés sur le même atome de carbone (C-7).

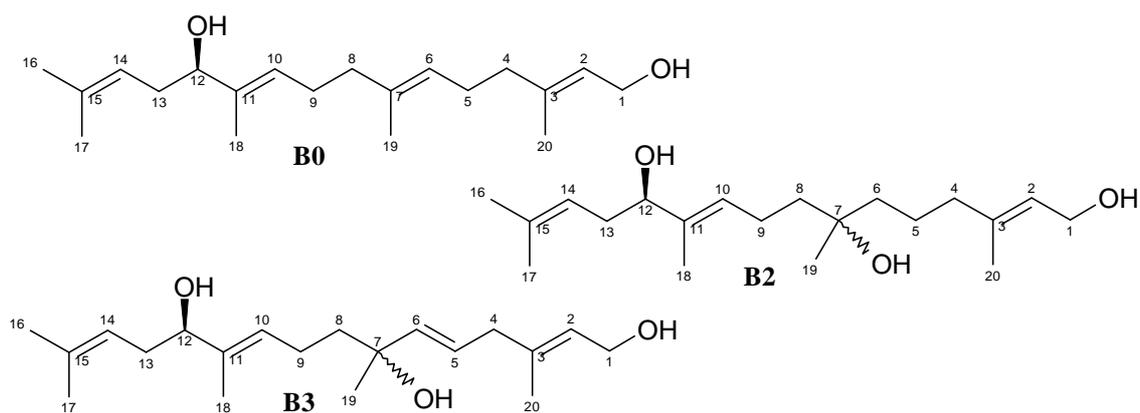
A cette deuxième unité isoprénique correspondent également les signaux de RMN  $^{13}\text{C}$  à  $\delta$  125,3 et  $\delta$  138,8 ppm (2  $-\text{CH}-$  éthyléniques) et de RMN  $^1\text{H}$  à  $\delta$  5,57 ppm (1H, d, H-6) et  $\delta$  5,65 ppm (1H, dt, H-5) qui différencient nettement le composé **B3** de **B0** et **B2**. Il s'agit

des signaux de la double liaison en C-5 dont une expérience de découplage de spin en RMN  $^1\text{H}$  monodimensionnelle a permis de montrer un couplage scalaire homonucléaire entre ces protons éthyléniques (H-5 plus particulièrement) et les protons du méthylène en C-4 qui se trouvent fortement déblindés à  $\delta$  2,77 ppm (2H, d, H-4). L'irradiation du proton à  $\delta$  2,77 ppm permet de transformer le système  $\text{ABX}_2$  formé par les protons à  $\delta$  2,77, 5,57 et 5,65 ppm en un système AB à  $\delta$  5,57 et 5,65 ppm ( $J_{\text{AB}} = 15$  Hz) et l'irradiation à  $\delta$  5,57 - 5,65 ppm permet de transformer le doublet à  $\delta$  2,77 ppm (H-4) en un singulet. Ce découplage de spin nous a permis, de plus, de bien déterminer la constante de couplage entre les protons 5 et 6. La valeur obtenue ( $^3J_{\text{H-H}} = 15,0$  Hz) indique que la double liaison éthylénique en C-5 possède une configuration *E*.

La comparaison des données de la littérature avec nos résultats spectroscopiques montre que le composé **B3** est un nouveau diterpène trihydroxylé qui dérive, comme **B2** du (R)-12 hydroxygéranylgeraniol (Bifurcadiol) **B0**. Les attributions des protons et des carbones (tableaux 14 et 15) ont été confirmées par des expériences de RMN bidimensionnelle homonucléaires  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY, NOESY) et hétéronucléaires  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMQC, HMBC) et par des séquences DEPT (45, 90 et 135). En particulier, le spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  permet de localiser sans ambiguïté la double liaison en C-5 grâce aux couplages  $^3J_{\text{H-H}}$  entre H-4/H-5 et  $^4J_{\text{H-H}}$  entre H-4/H-6, de même que les doubles liaisons en C-2, C-10 et C-14 grâce aux couplages  $^4J_{\text{H-H}}$ , respectivement, entre H-2/H<sub>20</sub>, H<sub>10</sub>/H<sub>18</sub> et H<sub>14</sub>/H<sub>16</sub>, H<sub>14</sub>/H<sub>17</sub> (figure 2.23-a). La configuration *E* de ces doubles liaisons est confirmée par la séquence NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  :

- double liaison en C-2 : corrélations H-1/H-20 et H-2/H-4,
- double liaison en C-5 : corrélations H-5/H-19 et H-4/H-6,
- double liaison en C-10 : corrélations H-9/H-18 et H-10/H-12,
- double liaison en C-14 : corrélation H-13/H-17 (permet de distinguer H-16 de H-17).

La séquence HMBC confirme également la position de la double liaison en C-5 (couplages  $^2J$  et  $^3J_{\text{C-H}}$  entre C-4/H-5, C-4/H-6, C-7/H-5, C-7/H-6) ainsi que celle du groupement méthyle 19 avec les couplages  $^2J$  et  $^3J_{\text{C-H}}$  entre C-7/H-19, C-8/H-19 et C-6/H-19 (figure 2.24-b).

Tableau 2.10 : Données de RMN  $^1\text{H}$  des composés **B0**, **B2** et **B3**

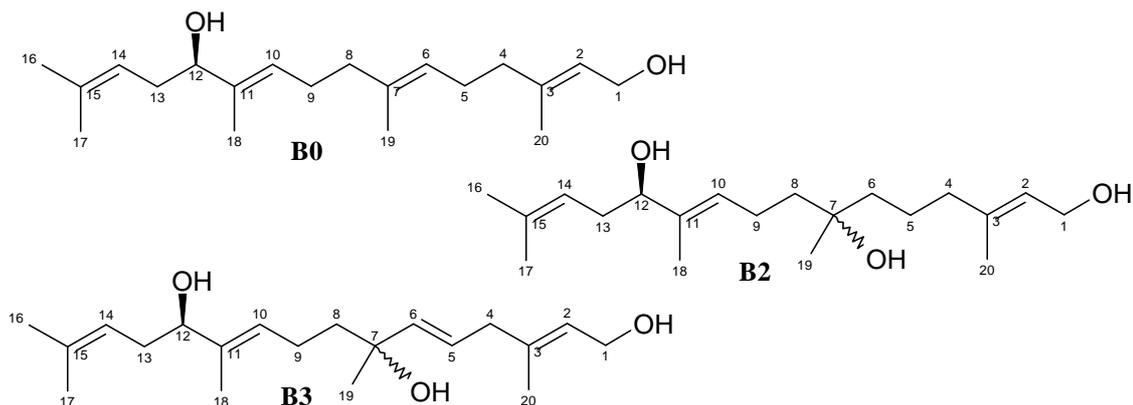
N° H	<b>B0</b> (bifurcadiol) <sup>a</sup> CDCl <sub>3</sub> 360 MHz δ (ppm)	Composé <b>B2</b> <sup>b</sup> CDCl <sub>3</sub> 400 MHz δ (ppm)	Composé <b>B3</b> CDCl <sub>3</sub> 250 MHz δ (ppm)
1	4,09 d (6,8)	4,12 d (6,9)	4,19 d (6,8)
2	5,35 t (6,8)	5,38 t (7)	5,46 t (6,8)
4	1,99 m	1,99 t (7)	<b>2,77 d (5,0)</b>
5	2,07 m	1,40-1,48 m	<b>5,65 dt (15,0 ; 5,0)</b>
6	5,07 t (6,8)	1,38-1,44 m	<b>5,57 d (15,0)</b>
8	1,99 m	1,45-1,50 m	<b>1,58 m</b>
9	2,07 m	2,05 m	2,08 m
10	5,32 t (6,8)	5,37 t (7)	5,43 t (6,6)
12	3,92 t (6,7)	3,94 t (6,7)	4,00 t (7,0)
13	2,20 dd (6,7 ; 7,0)	2,20-2,28 m	2,21 m
14	5,04 t (7,0)	5,05 t (7,2)	5,11 t (7,0)
16	1,68 s	1,69 s	1,75 s
17	1,60 s	1,60 s	1,66 s
18	1,57 s	1,60 s	1,64 s
19	1,56 s	1,14 s	<b>1,32 s</b>
20	1,63 s	1,64 s	1,70 s

Les constantes de couplage entre parenthèses sont exprimées en Hz.

Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS.

<sup>a</sup> valeurs de RMN  $^1\text{H}$  de la référence [60] ajoutées pour comparaison

<sup>b</sup> valeurs de RMN  $^1\text{H}$  de la référence [308] ajoutées pour comparaison.

Tableau 2.11 : Données de RMN  $^{13}\text{C}$  des composés **B0**, **B2** et **B3**

N° C	<b>B0</b> (bifurcadiol) <sup>a</sup>		Composé <b>B2</b> <sup>b</sup>		Composé <b>B3</b>	
	CDCl <sub>3</sub> 90 MHz δ (ppm)	Multiplicité DEPT	CDCl <sub>3</sub> 100 MHz δ (ppm)	Multiplicité DEPT	CDCl <sub>3</sub> 62,5 MHz δ (ppm)	Multiplicité DEPT
1	59,2	CH <sub>2</sub>	59,2	CH <sub>2</sub>	59,4	CH <sub>2</sub>
2	123,5	CH	123,6	CH	124,2	CH
3	139,1	C	139,4	C	138,4	C
4	39,4	CH <sub>2</sub>	39,8	CH <sub>2</sub>	<b>42,3</b>	CH <sub>2</sub>
5	26,7	CH <sub>2</sub>	21,9	CH <sub>2</sub>	<b>125,3</b>	CH
6	124,0	CH	41,4	CH <sub>2</sub>	<b>138,8</b>	CH
7	134,9	C	72,8	C	<b>72,9</b>	C
8	39,2	CH <sub>2</sub>	41,2	CH <sub>2</sub>	42,2	CH <sub>2</sub>
9	26,0	CH <sub>2</sub>	22,1	CH <sub>2</sub>	22,5	CH <sub>2</sub>
10	125,8	CH	126,1	CH	126,1	CH
11	136,7	C	136,9	C	137,0	C
12	77,1	CH	77,1	CH	77,1	CH
13	34,2	CH <sub>2</sub>	34,2	CH <sub>2</sub>	34,2	CH <sub>2</sub>
14	120,2	CH	120,1	CH	120,1	CH
15	134,2	C	134,7	C	134,9	C
16	25,8	CH <sub>3</sub>	25,9	CH <sub>3</sub>	25,9	CH <sub>3</sub>
17	17,9	CH <sub>3</sub>	18,0	CH <sub>3</sub>	18,0	CH <sub>3</sub>
18	11,6	CH <sub>3</sub>	11,7	CH <sub>3</sub>	11,7	CH <sub>3</sub>
19	15,9	CH <sub>3</sub>	26,7	CH <sub>3</sub>	<b>28,2</b>	CH <sub>3</sub>
20	16,2	CH <sub>3</sub>	16,1	CH <sub>3</sub>	16,4	CH <sub>3</sub>

Les constantes de couplage entre parenthèses sont exprimées en Hz.

Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS.

<sup>a</sup> valeurs de RMN  $^{13}\text{C}$  de la référence [60] ajoutées pour comparaison

<sup>b</sup> valeurs de RMN  $^{13}\text{C}$  de la référence [308] ajoutées pour comparaison.

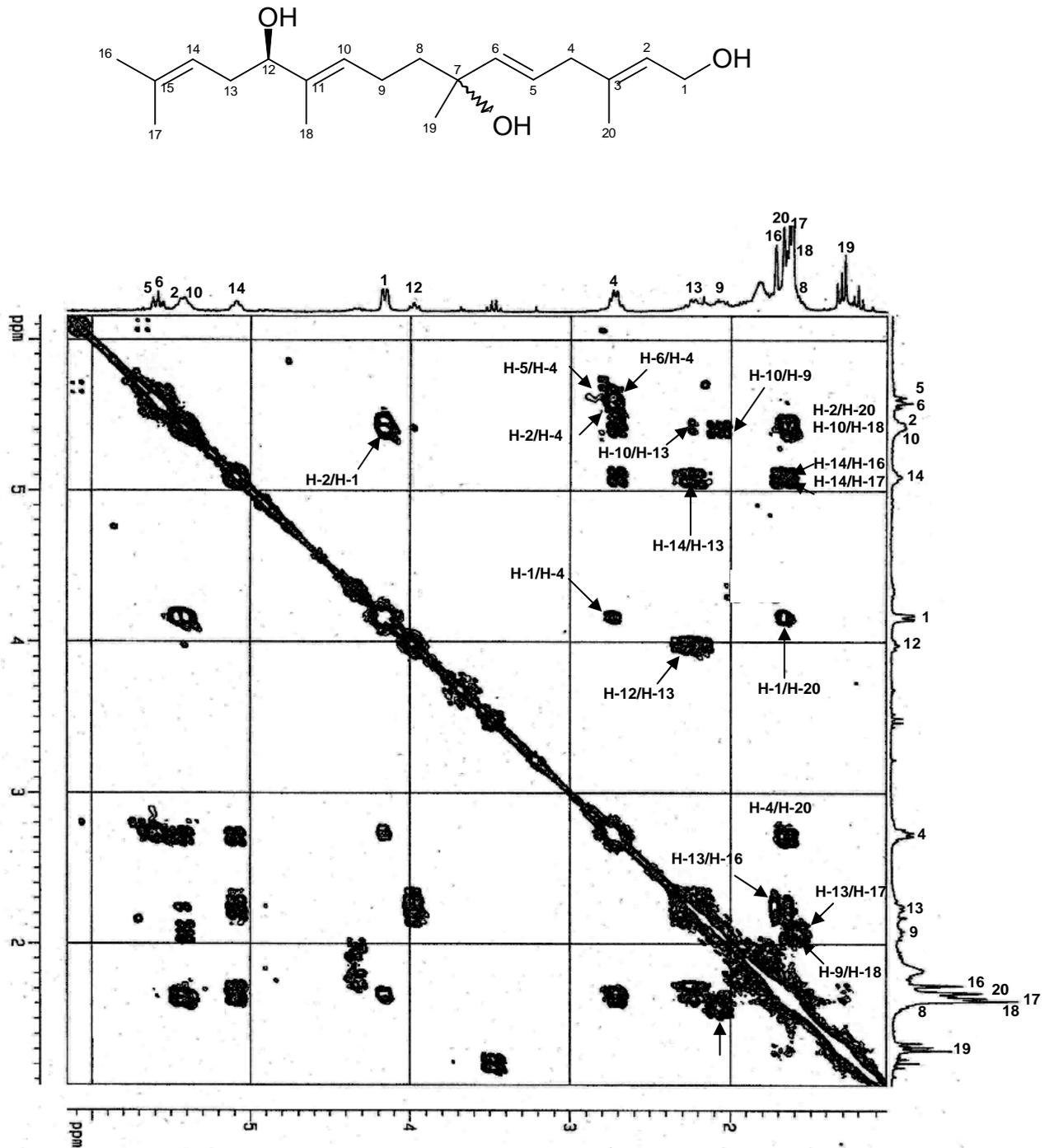


Figure 2.23-a : Spectre RMN COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  à 250 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **B3**

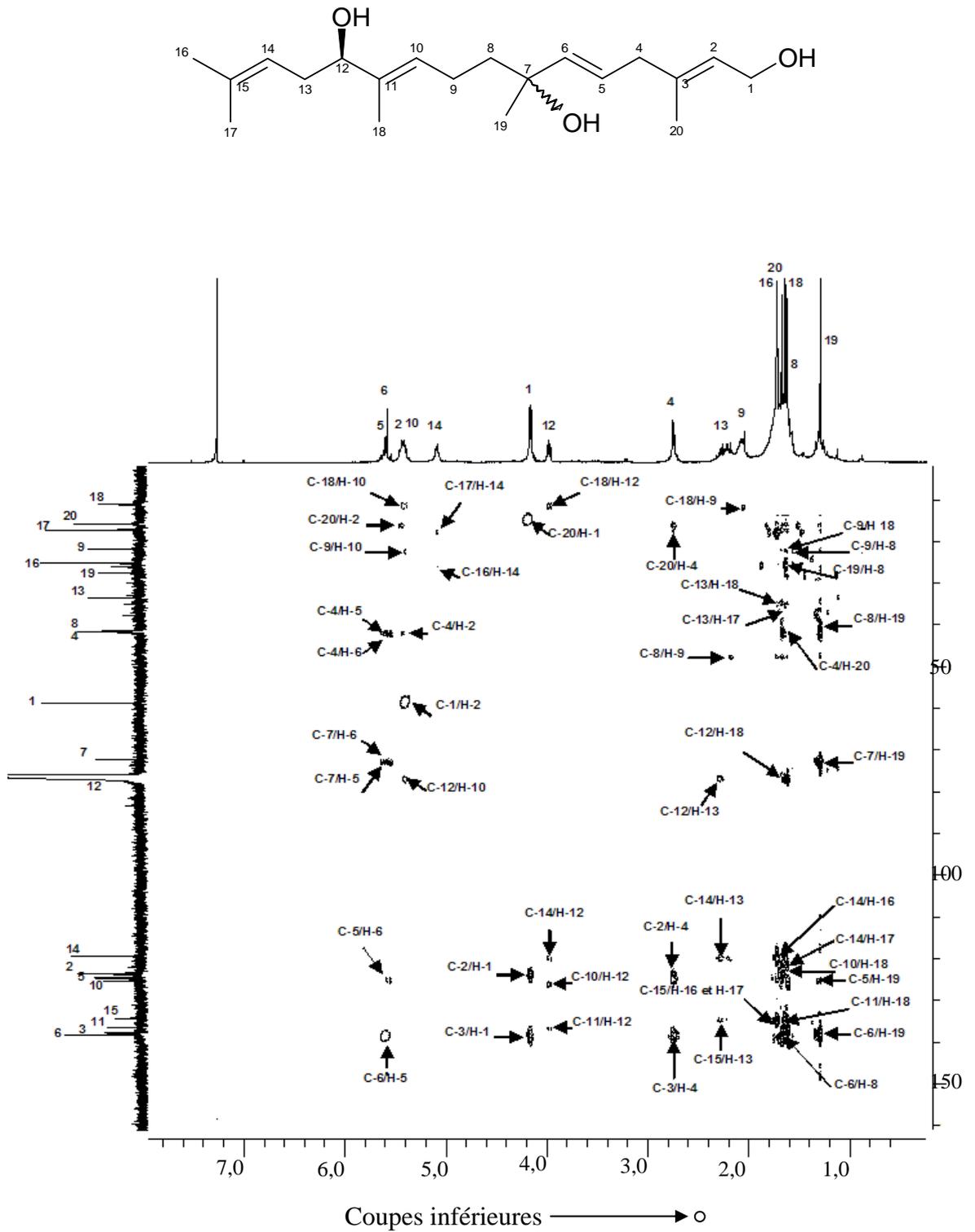


Figure 2.23-b : Spectre RMN HMBC à 400 MHz dans CDCl<sub>3</sub> du produit **B3**

En ce qui concerne la configuration absolue des carbones asymétriques, on peut préciser que le carbone 12 est de configuration R (comme **B0** et **B2**) sur la base de considérations biosynthétiques (il a été vérifié récemment, à l'aide de la méthode de Mosher modifiée, que d'une façon générale les diterpènes de *Bifurcaria bifurcata* récoltée à Oualidia dérivent tous du (R)-12-hydroxygéranylgeraniol (**B0**), [69]. Par contre, la configuration absolue du C-7, plus difficile à établir, fera l'objet d'un travail ultérieur au sein de notre laboratoire d'accueil.

#### 2.2.3.1.2 Etude structurale du composé **B4**

- Analyse par spectrométrie de masse (Appendice D)

Le spectre de masse, enregistré à haute résolution, révèle que la formule brute du composé **B4** est  $C_{20}H_{36}O_3$ , soit une masse molaire  $M = 324$  g/mol et un degré d'insaturation D.I. = 3. Les principales fragmentations obtenues par impact électronique sont indiquées dans la figure 2.24. L'ion moléculaire à  $m/z = 324$  est invisible sur le spectre, toutefois, la déshydratation partielle de la molécule conduit à l'observation de deux fragments à  $m/z = 306$  (0,015 %) et à  $m/z = 288$  (0,11%). Le pic de base à  $m/z = 81$  correspond à la coupure de la liaison  $C_5-C_6$  avec l'élimination d'une molécule d'eau. Les fragments à  $m/z = 55$  et 69 correspondent, respectivement, au départ de l'isobutényle (coupure entre  $C_{13}-C_{14}$ ) et à l'unité isoprénique (coupure entre  $C_{13}-C_{12}$ ). On constate aussi que la coupure de deux unités isopréniques, avec élimination d'une molécule d'eau, est favorisée, c'est ce qui explique le fragment à  $m/z = 135$  (10,77 %).

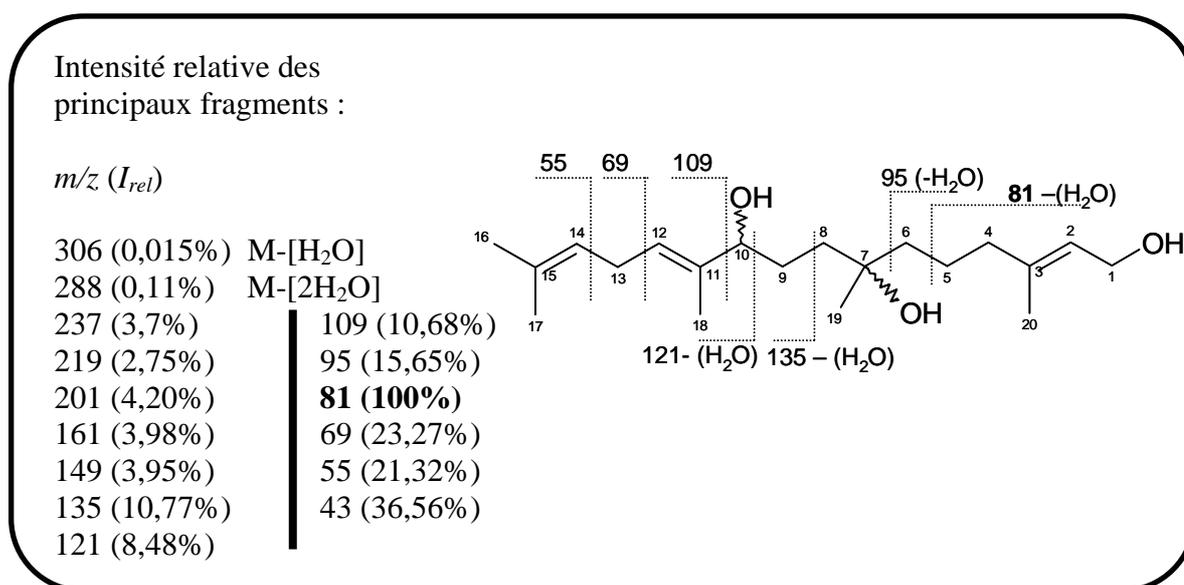


Figure 2.24 : Fragmentation du composé **B4** par impact électronique

- Analyse par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (Appendice C)

Le spectre infrarouge présente une bande d'absorption large et intense à  $3362\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{O-H}}$ ), caractérisant la présence de plusieurs fonctions alcools. Ces dernières sont confirmées par la bande ( $\nu_{\text{C-O}}$ ) à  $1003\text{ cm}^{-1}$ . Egalement, les bandes d'absorption à  $2968\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-H}}$  éthyléniques) et  $1667\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=C}}$ ) indiquent la présence de groupements éthyléniques.

- Détermination du pouvoir rotatoire

Le produit est optiquement actif, son pouvoir rotatoire mesuré dans le dichlorométhane avec une lampe au sodium (589 nm) conduit à la valeur suivante de son pouvoir rotatoire spécifique :

$$[\alpha]_D^{20} = -11,0^\circ \quad (C = 0,2 ; \text{CH}_2\text{Cl}_2).$$

- Analyse par spectroscopie de RMN (Appendice C)

L'analyse par spectroscopie RMN du carbone 13 (RMN  $^{13}\text{C}$  et expériences DEPT) montre que ce composé (tableau 16) possède vingt atomes de carbones dont :

- 5 carbones primaires ( $-\text{CH}_3$ ),
- 7 carbones secondaires ( $-\text{CH}_2$ ),
- 4 carbones tertiaires dont un est hybridé  $\text{sp}^3$  et trois hybridés  $\text{sp}^2$  ( $=\text{CH}-$ ),
- 4 carbones quaternaires, dont un est hybridé  $\text{sp}^3$  et trois sont hybridés  $\text{sp}^2$ .

On remarque que les signaux à  $\delta$  11,4 (C-18),  $\delta$  16,1 (C-20) et  $\delta$  17,7 ppm (C-17), correspondant à des groupements méthyles fixés sur double liaison, sont tous trois inférieurs à 20 ppm. Il s'agit d'un blindage dû à la présence d'un groupement méthylène situé en  $\gamma$ . Blindage qui ne peut avoir lieu que si les groupements méthyles sont fixés sur des doubles liaisons de configuration *E* [332, 333]. Le signal du méthylène résonnant à  $\delta$  59,4 ppm (C-1) suggère la présence d'un alcool primaire. Cette constatation est consolidée par les signaux apparaissant dans le spectre de RMN  $^1\text{H}$  (tableau 2.12) à  $\delta$  4,15 ppm (2H, d, H-1) et  $\delta$  5,41 ppm (1H, t, H-2) qui confirme l'existence d'une fonction alcool allylique à l'extrémité de la chaîne diterpénique.

L'analyse comparée de **B4** en RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  (tableaux 2.12 et 2.13) avec les composés **B2** et **B5**, isolés également de *Bifurcaria bifurcata* [29, 308], montre que les spectres des trois molécules présentent de grandes similitudes au niveau des deux premières unités isopréniques pour **B4** et **B2** (la seule différence est le déblindage important du C-7 qui passe de 72,8 à 82,8 ppm) et au niveau de la dernière unité isoprénique pour **B4** et **B5**. Par

contre, des modifications importantes sont à signaler au niveau de la troisième unité isoprénique. En particulier, il faut localiser dans cette unité une fonction alcool secondaire, mise en évidence par le signal d'un atome de carbone tertiaire à  $\delta$  84,5 ppm en RMN  $^{13}\text{C}$  (on remarque que ce signal est encore fortement déblindé par rapport à celui de la même fonction dans **B2** qui résonne à  $\delta$  77,1 ppm : C-12) et de celui d'un proton sur C  $\text{sp}^3$  à  $\delta$  4,25 ppm (1H, t, H-10) en RMN  $^1\text{H}$ .

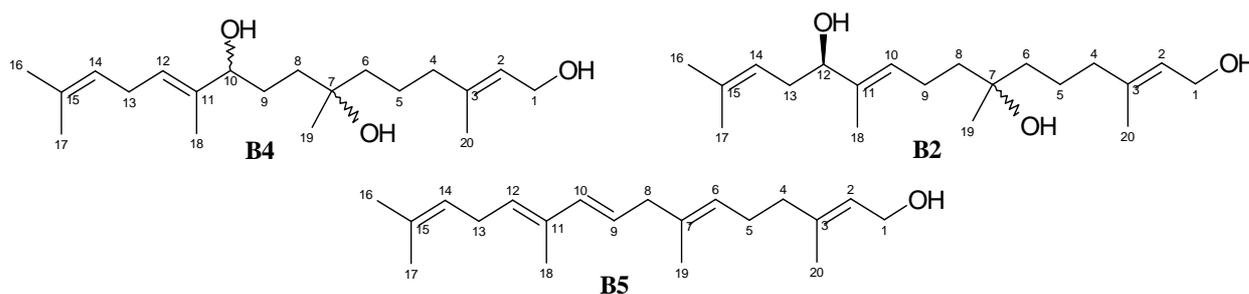
A cette troisième unité isoprénique correspondent également les signaux :

- d'un groupement méthylénique à  $\delta$  30,8 ppm en RMN  $^{13}\text{C}$ . Ce signal est fortement déblindé (à cause de l'hydroxyle de la fonction alcool secondaire situé en  $\beta$ ) par rapport à celui du même atome de carbone ( $\delta$  22,1 ppm, C-9) dans **B2** où il subit l'effet d'écran du méthyle 18 au travers d'une double liaison *E*,
- d'une double liaison trisubstituée à  $\delta$  125,4 (=CH) et  $\delta$  134,9 ppm (C quaternaire  $\text{sp}^2$ ) en RMN  $^{13}\text{C}$  et  $\delta$  5,41 (1H, t,  $J = 7$  Hz) en RMN  $^1\text{H}$ ,
- d'un groupement méthyle sur double liaison *E* à  $\delta$  11,4 ppm en RMN  $^{13}\text{C}$  et  $\delta$  1,62 ppm en RMN  $^1\text{H}$ .

Ces résultats montrent que **B4** est un nouveau diterpène trihydroxylé pour lequel la fonction alcool secondaire n'est pas fixée en C-12 ou C-13, comme cela se rencontrait jusqu'à présent pour les diterpènes de *Bifurcaria bifurcata* [334], mais en C-10.

Les attributions des signaux de RMN des protons et des carbones reportées dans les tableaux 2.12 et 2.13 ont été confirmées par les séquences de RMN bidimensionnelle homo (COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) et hétéronucléaires (HMQC et HMBC). En particulier, le spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  permet de localiser les doubles liaisons en C-2, C-11 et C-14 grâce aux couplages  $^4J_{\text{H-H}}$ , respectivement, entre H-2/H-20, H-12/H-18 et H-14/H-16, H-14/H-17 (Appendice C). La configuration *E* de ces doubles liaisons indiquée précédemment sur la base de données empiriques de RMN  $^{13}\text{C}$ , est confirmée par la séquence NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  :

- double liaison en C-2 : corrélations entre H-1/H-20 et H-2/H-4,
- double liaison en C-11 : corrélations entre H-12/H-10 et H-13/H-18,
- double liaison en C-14 : corrélation entre H-13/H-17 (permet de distinguer H-17 de H-16).

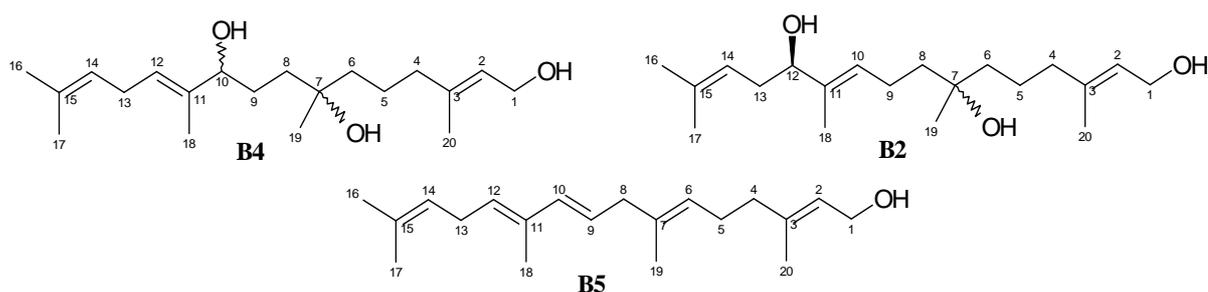
Tableau 2.12 : Données de RMN  $^{13}\text{C}$  des composés **B4**, **B2** et **B5**

N° C	Composé <b>B4</b>		Composé <b>B2</b> <sup>a</sup>		Composé <b>B5</b> <sup>b</sup>	
	CDCl <sub>3</sub> 100 MHz δ (ppm)	Multiplicité DEPT	CDCl <sub>3</sub> 100 MHz δ (ppm)	Multiplicité DEPT	CDCl <sub>3</sub> 50 MHz δ (ppm)	Multiplicité DEPT
1	59,4	CH <sub>2</sub>	59,2	CH <sub>2</sub>	59,4	CH <sub>2</sub>
2	123,3	CH	123,6	CH	123,4	CH
3	139,9	C	139,4	C	139,6	C
4	39,9	CH <sub>2</sub>	39,8	CH <sub>2</sub>	39,5	CH <sub>2</sub>
5	22,6	CH <sub>2</sub>	21,9	CH <sub>2</sub>	26,4	CH <sub>2</sub>
6	41,0	CH <sub>2</sub>	41,4	CH <sub>2</sub>	124,5	CH
7	<b>82,8</b>	C	72,8	C	134,6	C
8	37,2	CH <sub>2</sub>	41,2	CH <sub>2</sub>	43,1	CH <sub>2</sub>
9	<b>30,8</b>	CH <sub>2</sub>	22,1	CH <sub>2</sub>	125,6	CH
10	<b>84,5</b>	CH	126,1	CH	135,9	CH
11	<b>134,9</b>	C	136,9	C	131,8	C
12	<b>125,4</b>	CH	77,1	CH	129,4	CH
13	26,8	CH <sub>2</sub>	34,2	CH <sub>2</sub>	27,2	CH <sub>2</sub>
14	122,8	CH	120,1	CH	122,5	CH
15	131,5	C	134,7	C	133,3	C
16	25,6	CH <sub>3</sub>	25,9	CH <sub>3</sub>	25,7	CH <sub>3</sub>
17	17,7	CH <sub>3</sub>	18,0	CH <sub>3</sub>	17,7	CH <sub>3</sub>
18	11,4	CH <sub>3</sub>	11,7	CH <sub>3</sub>	12,5	CH <sub>3</sub>
19	26,7	CH <sub>3</sub>	26,7	CH <sub>3</sub>	16,1	CH <sub>3</sub>
20	16,1	CH <sub>3</sub>	16,1	CH <sub>3</sub>	16,2	CH <sub>3</sub>

Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS.

(a) valeurs de RMN  $^{13}\text{C}$  de la référence [308] ajoutées pour comparaison.

(b) valeurs de RMN  $^{13}\text{C}$  de la référence [29] ajoutées pour comparaison.

Tableau 2.13 : Données de RMN  $^1\text{H}$  des composés **B4**, **B2** et **B5**

N <sup>o</sup> H	Composé B4 CDCl <sub>3</sub> 400 MHz $\delta$ (ppm)	Composé B2 <sup>a</sup> CDCl <sub>3</sub> 400 MHz $\delta$ (ppm)	Composé B5 <sup>b</sup> CDCl <sub>3</sub> 200 MHz $\delta$ (ppm)
1	4,15 d (6,8)	4,12 d (6,9)	4,15 d (7,0)
2	5,41 t (7)	5,38 t (7)	5,42 t (7,0)
4	2,02 t (6,5)	1,99 t (7)	2,00-2,20 m
5	1,45-1,50 m	1,40-1,48 m	2,00-2,20 m
6	1,45-1,50 m	1,38-1,44 m	5,15 t (7,0)
8-a	1,68 m	1,45-1,50 m	2,75 d (7,0)
8-b	1,80 m		
9-a	<b>1,78 m</b>	2,05 m	5,51 dt (15,0, 7,0)
9-b	<b>1,91 m</b>		
10	<b>4,25 t (7)</b>	5,37 t (7)	6,05 d (15,0)
12	<b>5,41 t (7)</b>	3,94 t (6,7)	5,35 t (7,0)
13	2,712 t (7)	2,20-2,28 m	2,81 t (7,0)
14	5,10 t (7)	5,05 t (7,2)	5,11 t (7,0)
16	1,68 s	1,69 s	1,68 s
17	1,62 s	1,60 s	1,64 s
18	1,62 s	1,60 s	1,75 s
19	1,22 s	1,14 s	1,59 s
20	1,67 s	1,64 s	1,68 s

Les constantes de couplage entre parenthèses sont exprimées en Hz (RMN  $^1\text{H}$ ).

Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS.

(a) valeurs de RMN  $^1\text{H}$  de la référence [308] ajoutées pour comparaison.

(b) valeurs de RMN  $^1\text{H}$  de la référence [29] ajoutées pour comparaison.

La séquence HMBC (figure 2.25) permet de préciser l'ensemble de l'enchaînement carboné, notamment, au niveau des atomes de carbone quaternaires. En particulier, la position de la fonction alcool secondaire en C-10 est confirmée sans ambiguïté avec les corrélations longues distances  $^2J$  et  $^3J_{C-H}$  entre C-11/H-10, C-18/H-10, C-10/H-12, C-9/H-10 et C-8/H-10, de même celle de la fonction alcool tertiaire en C-7 avec les corrélations entre C-7/H-9, C-8/H-19 et C-6/H-19. Toutes autres hypothèses de structure, où les deux fonctions alcools secondaire et tertiaire seraient vicinales, ne sont pas compatibles avec les données spectrales de RMN 2D. Ces caractéristiques structurales étant établies, il est probable que le déblindage des carbones C-10 ( $\delta$  84,5 ppm) et C-7 ( $\delta$  82,8 ppm) en RMN  $^{13}C$  soit dû à la présence pour chacun d'eux de deux hydroxyles, respectivement en  $\alpha$  et en  $\delta$ .

En ce qui concerne les carbones chiraux, la configuration absolue du C-10 devra être précisée par la méthode de Mosher modifiée, de la même façon que cela a été réalisé pour le bifurcadiol (**B0**) et ses dérivés [69]. Celle du C-7, comme nous l'avons déjà indiqué pour le **B3**, devra faire l'objet d'un travail ultérieur au sein de notre laboratoire d'accueil.

#### 2.2.3.2 Discussion des résultats

Ce travail constitue un complément à l'étude des diterpènes trihydroxylés de l'espèce *Bifurcaria bifurcata* récoltée à Oualidia (Maroc). Il porte à quatre le nombre de diterpènes de ce type découverts dans cette algue. L'un des deux que nous avons décrits (**B3**) appartient, comme les deux précédemment isolés (**B1** et **B2**) à la série des dérivés du (R)-12-hydroxygéranylgeraniol (Bifurcadiol **B0**) qui sont caractéristiques de ce lieu de récolte [29, 55]. Par contre, le second (**B4**) est le premier représentant des diterpènes linéaires de *Bifurcaria bifurcata* à présenter une fonction oxygénée en C-10.

Nous pensons qu'il serait intéressant d'entreprendre l'étude des diterpènes trihydroxylés de cette espèce en d'autres lieux de récolte (Bretagne et autres sites de la côte atlantique marocaine où les diterpènes dihydroxylés ont la fonction secondaire fixée en C-13 [334], afin de vérifier si les diterpènes hydroxylés en C-10 sont communs à toute l'espèce ou n'appartiennent uniquement qu'aux spécimens de Oualidia.

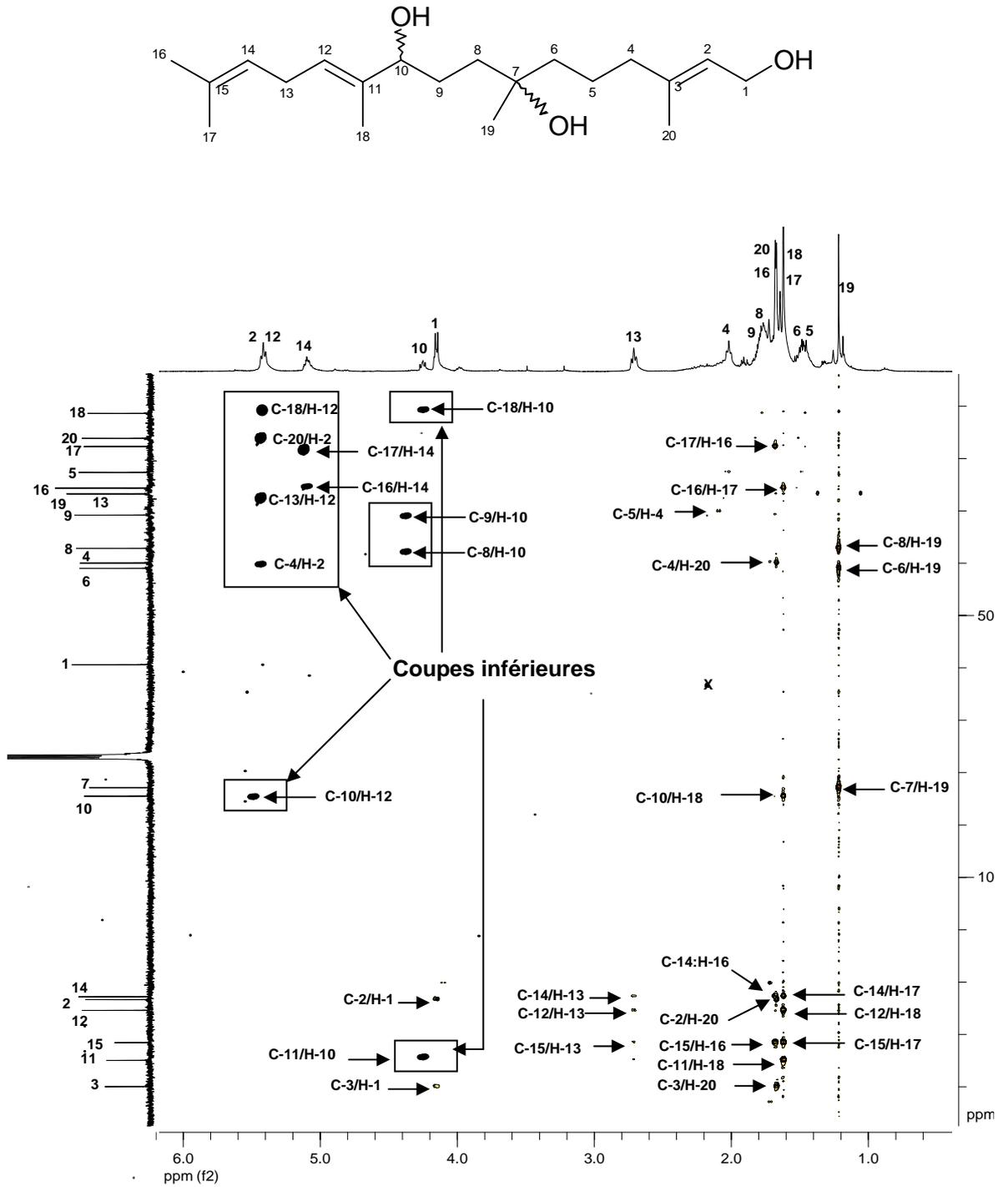


Figure 2.25 : Spectre RMN HMBC à 400 MHz dans CDCl<sub>3</sub> du produit **B4**

### CHAPITRE 3

#### PRODUITS VOLATILS DE *DICTYOPTERIS MEMBRANACEA*

«The temptation to form premature theories upon insufficient data is the bane of our profession » (Sir Arthur Conan Doyle, *The valley of Fear*, 1915)  
 «On savait extraire les huiles naturelles et résines, préparer par distillation l'eau de rose et les eaux imprégnées de matières odorantes, spécialement les essences de térébenthine et de genièvre, ces dernières déjà connues des anciens»  
 (M. Berthelot, *La Chimie au Moyen Âge I*, Paris, 1893)

Ce chapitre est consacré à l'étude des fractions volatiles obtenues par différentes techniques d'extraction de l'extrait éthéré (concrète) de l'algue brune *Dictyoptéris membranacea* récoltée sur les côtes algériennes (Figure 2.1).

Il se subdivise en deux sous chapitres distincts.

Le premier porte sur :

- la présentation et la description des techniques utilisées pour l'obtention des fractions volatiles : hydrodistillation classique, hydrodistillation assistée aux micro-ondes et extraction par le dioxyde de carbone supercritique,
- l'établissement de modèles mathématiques basés sur un bilan de matière différentiel, dans le but de modéliser la cinétique d'extraction par le dioxyde de carbone supercritique,
- la représentation par un modèle simplifié des données cinétiques d'extraction dans le cas de l'hydrodistillation assistée aux micro-ondes.

Le second est axé sur :

- l'étude par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse des différentes fractions volatiles obtenues. Elle comprend, d'une part, un dosage par étalonnage interne des constituants de ces différentes fractions afin de comparer leur composition chimique et, d'autre part, un dosage par étalonnage externe de ces constituants au cours des études de cinétique d'extraction, dans le but de suivre l'évolution de leur teneur au cours du temps. Dans un but comparatif, une étude analytique qualitative de la fraction volatile de l'espèce *Dictyoptéris membranacea* récoltée sur les côtes atlantiques

est également décrite. Nous terminons par une discussion théorique brève de la procédure d'agrandissement de l'échelle d'un extracteur « scaling up ».

### 3.1 Etude des différentes techniques d'extraction utilisées : description et modélisation

#### 3.1.1 Extraction de la fraction volatile par le dioxyde de carbone supercritique

##### 3.1.1.1 Description de la technique et des conditions opératoires

Les différentes expériences sont effectuées sur un extracteur aux fluides supercritiques de type HP 7680 A équipé d'une cartouche d'extraction de volume 7 ml (figure 3.1-a), la récupération des produits se fait par l'intermédiaire d'un piège collecteur (figure 3.1-b).



Figure 3.1 : a : Cartouche d'extraction  
b : Piège collecteur

##### - Nature de l'extrait

La concrète est obtenue par extraction de l'algue sèche à l'éther diéthylique avec un rendement de **1,2 %**, c'est un extrait vert foncé légèrement visqueux. En fait, la concrète est constituée de deux phases : une phase huileuse et une phase cireuse. La première renferme les produits volatils de faible poids moléculaire (à l'état liquide), la seconde est formée de produits plus lourds. La majeure partie de la phase huileuse est facile à extraire à l'état libre avec une résistance au transfert de matière faible. Une partie de la phase

huileuse est adsorbée dans la phase cireuse. Des observations par microscopie optique montrent des zones sombres et claires correspondant, respectivement, à la phase cireuse et à la phase huileuse (figure 3.2). L'adaptation du niveau de gris du contraste et de la luminosité (photoshop pro.6) a permis de délimiter la fraction de surface occupée par la phase huileuse et celle occupée par la phase cireuse. L'utilisation de l'histogramme du même logiciel a permis d'estimer la fraction de surface de la phase huileuse :  $f_0 = 0,48$  qui représente une bonne indication de la proportion de la phase huileuse dans l'extrait brut.

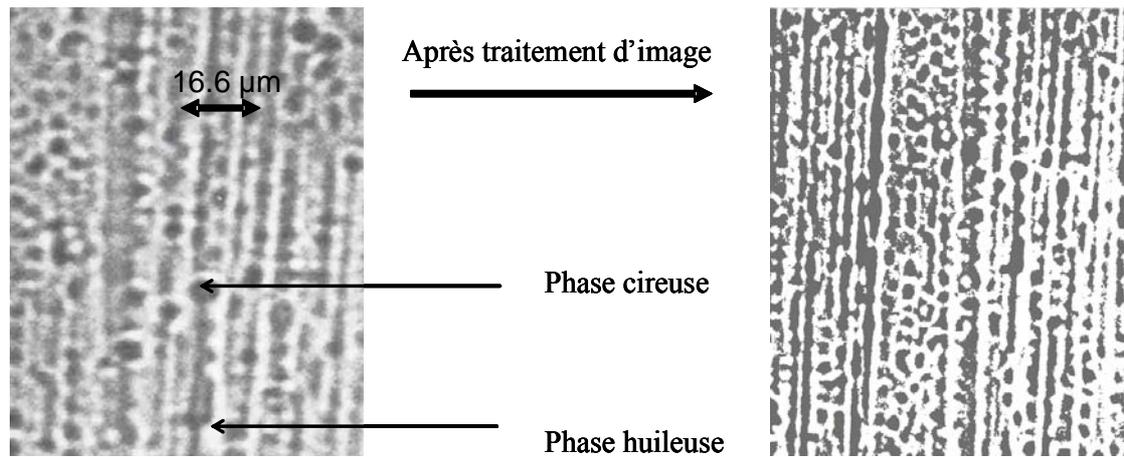


Figure 3.2 : Observation microscopique de l'extrait étheré de *Dictyopteris membranacea*

#### - Préparation et extraction

L'extrait étheré (concrète) de *Dictyopteris membranacea* est ajouté à une masse bien définie (constante pour toutes les expériences) de billes de verre de 2 mm de diamètre, le mélange est agité à l'aide d'un évaporateur rotatif, ce qui permet de créer un film uniforme d'extrait autour des billes de verre. Le remplissage de la cartouche d'extraction a été effectué de façon aléatoire. Des mesures approximatives des fractions de volume des différentes phases en présence montrent que la fraction de volume occupée par les billes de verres est de 0,6, celle occupée par la concrète ( $\epsilon_c$ ) est de 0,1 et la fraction de vide ( $\epsilon$ ) est de 0,3. La hauteur du lit (billes enveloppées de concrète) dans l'extracteur est de 6 cm. Le solvant d'extraction est le dioxyde de carbone très pur stabilisé avec de l'hélium (CO<sub>2</sub> 5.2; 99,999 % de pureté).

#### - Piégeage des produits

La récupération des produits est effectuée à l'aide du piège collecteur qui consiste en une cartouche garnie de Tenax comme phase stationnaire. Le piège est refroidi à la température de 0 °C, à l'aide de dioxyde de carbone technique, pour éviter que les produits

ne soient entraînés dans le courant gazeux. La récupération de la fraction volatile est obtenue ensuite par élution du piège, successivement avec du dichlorométhane stabilisé à l'éthanol puis de l'éther non stabilisé.

### 3.1.1.2 Modélisation mathématique

#### 3.1.1.2.1 Modèles basés sur le bilan de matière

L'extracteur est un tube cylindrique représenté par la figure 3.3. Il permet d'établir les équations différentielles de bilan de matière sur la base des hypothèses suivantes :

- Les billes de verre sont rangées aléatoirement, la concrète est uniformément distribuée. La fraction de vide n'est pas affectée par la diminution du film de concrète au cours de l'extraction.
- Le débit volumique du fluide supercritique (solvant)  $\phi$  est uniforme sur toutes les sections de l'extracteur. La vitesse superficielle  $U$  ( $u = U/\varepsilon$ ) est constante et il n'y a pas de profil de vitesse le long du rayon.
- La dispersion axiale, les gradients de température et de pression de vapeur sont négligeables.
- La fraction volatile est formée d'un mélange de composés ou de classes de composés (pseudo-composés (PC)). On suppose que la fraction volatile globale se comporte comme un pseudo-composé appelé soluté, la concentration  $y = y(t,z)$  est exprimée en g soluté / g solvant. La concentration des différents composés ou classes de composés (pseudo-composés) est  $y_i = y_i(t,z)$  et ( $i= 1$  à  $n$ ).
- La concentration moyenne de la fraction volatile dans la phase solide  $x$  est exprimée en g soluté / g concrète insoluble, la concentration des pseudo-composés dans la phase solide est  $x_i$  ( $i=1$  à  $n$ ).

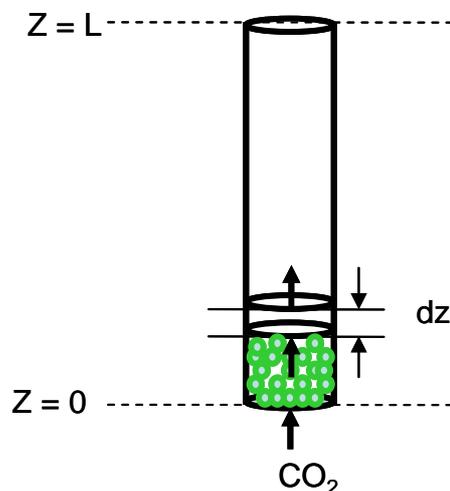


Figure 3.3 : Représentation schématique de l'extracteur

- Description du phénomène et délimitation des étapes d'extraction

Au début du processus d'extraction, la concentration initiale du soluté dans la concrète (phase solide) est  $x_0$  ( $x_{i,0}$ ), le passage à travers le lit de fluide supercritique frais ( $y(t,0) = 0$ ) permet de solubiliser instantanément la phase huileuse libre de produits volatils et une concentration d'équilibre  $y^*$  ( $y_i^*$ ) (qu'on appelle aussi solubilité) est atteinte instantanément dans toute les sections du lit. Le saut de concentration du soluté est considéré comme étant un front d'onde (n fronts d'ondes pour les n composés) qui se propage avec une vitesse définie (différente pour chaque pseudo-composé) le long de l'extracteur, plus faible que la vitesse superficielle U. La concentration initiale de soluté dans la phase solide  $x_0$  ( $x_{i,0}$ ) est la somme d'une fraction de soluté libre et une fraction de soluté liée de concentration  $x_k$  ( $x_{i,k}$ ). Il s'ensuit que [335, 336] :

- la concentration d'équilibre dans la phase fluide (pour chaque pseudo-composé) est fonction de la concentration initiale dans la phase solide  $x_0$  ( $x_{i,0}$ ), alors  $y^* = y(x_0)$  ( $y_i^* = y(x_{i,0})$ ),
- pour chaque pseudo-composé, dans la couche solide juste derrière le front d'onde, la concentration (transition de phase) dans la phase solide est  $x_k$  ( $x_{i,k}$ ). On admet aussi que seule l'huile liée reste dans la phase solide. La concentration dans la phase fluide est alors  $y^* = y_0$ ,
- dans les couches derrière le front d'onde, l'extraction est gérée par un processus diffusionnel dont la résistance au transfert de matière est contrôlée par la phase solide.

Le bilan de matière différentiel est régi par le système d'équations différentielles :

$$\left\{ \begin{array}{l} \rho_f \varepsilon \frac{\partial y}{\partial t} + \rho_f u \varepsilon \frac{\partial y}{\partial z} + \rho_f \varepsilon D_L \frac{\partial^2 y}{\partial z^2} = J(y, x) \\ \rho_s \varepsilon_c \frac{\partial x}{\partial t} = -J(y, x) \end{array} \right\} \text{Eq.1}$$

Le système (Eq.1) est formé de deux équations différentielles du premier ordre avec des coefficients constants. La résolution du système d'équation nécessite la connaissance des conditions initiales et aux limites.

Conditions aux limites :

A l'entrée de l'extracteur, le fluide (solvant) est frais.

$$\forall t > 0 \text{ et pour } z = 0, y(t,0) = 0 \quad \text{Eq.2}$$

Conditions initiales :

A l'instant initial, un équilibre de concentration rapide s'établit entre la phase fluide et la phase solide.

$$\forall z > 0 \text{ et pour } t = 0, y = y^*(x_0) = y_0 \text{ et } x = x_0 \quad \text{Eq.3}$$

L'expression générale du flux de transfert de matière est donnée par :

$$J(y, x) = a_p k_f \rho_f (y^* - y) = a_p k_s \rho_s (x - x^*) \quad \text{Eq.4}$$

$y$  : concentration du soluté dans la phase fluide (g soluté/g solvant)  
 $x$  : concentration du soluté dans la concrète (phase solide) (g soluté / g concrète non soluble)  
 $\varepsilon$  : fraction de volume occupée par le fluide  
 $\varepsilon_c$  : fraction de volume occupée par la concrète  
 $D_L$  : coefficient de dispersion axiale ( $m^2/s$ )  
 $\rho_f$  : masse volumique du fluide ( $kg/m^3$ ) ou ( $g/l$ )  
 $\rho_s$  : masse volumique de la fraction de concrète non soluble ( $kg/m^3$ ) ou ( $g/l$ )  
 $J$  : flux de transfert de matière ( $kg/m^3s$ )  
 $t$  : temps (s)  
 $z$  : axe de coordonnées (sens de déplacement du fluide)  
 $y^*$  : concentration de soluté en phase fluide à l'équilibre (g soluté / g solvant)  
 $y_0$  : concentration de soluté en phase fluide au début de l'extraction (solubilité dans du soluté dans le solvant) (g soluté / g solvant)  
 $x_0$  : concentration initiale du soluté dans la concrète (g soluté / g concrète non soluble)  
 $x^*$  : concentration de soluté dans la concrète à l'équilibre ((g soluté / g concrète non soluble)  
 $a_p$  : surface spécifique ( $m^{-1}$ )  
 $k_f$  : coefficient de transfert de matière en phase fluide (m/s)

3.1.1.2.1.1 Solution numérique

L'intégration du système (Eq.1) avec les conditions initiales et aux limites (Eq.2 et 3) et en négligeant la dispersion axiale (voir hypothèses) est effectuée par voie numérique (**modèle SMN**). Concernant l'expression du flux de transfert de matière  $J$ , les travaux de Reverchon [336] et Lack [337] ont permis d'exprimer  $J$  par deux équations en fonction de la concentration de transition de phase  $x_k$ , chacune d'elles décrit un régime de transfert de matière (Eq. 5 et 6). Les travaux de Cygnarowicz [338] ont permis d'exprimer le flux de transfert de matière  $J$  par une seule expression permettant de décrire les deux régimes d'extraction (Eq.7).

-----

Remarque : les équations développées ci-dessus (éq.1-4) pour le soluté (fraction volatile) peuvent être aussi écrites pour chaque pseudo-composé des différentes classes de composés qui forment la fraction volatile.

Modèle de reverchon	$\left[ \begin{array}{l} J(x > x_k, y) = a_p k_f \rho_f (y_0 - y) \\ J(x \leq x_k, y) = a_p k_f \rho_f (y_0 - y) / \left( \frac{x_k - x}{x_k} + 0.01 \right) \end{array} \right]$	Eq.5
Modèle de Lack	$\left[ \begin{array}{l} J(x > x_k, y) = a_p k_f \rho_f (y_0 - y) \\ J(x \leq x_k, y) = a_p k_f \rho_f x (y_0 - y) / x_k \end{array} \right]$	Eq.6
Modèle Cygnarowicz	$\left[ J(x, y) = a_p k_f \rho_f (y_0 - y) \exp \left[ \ln(0.001) \frac{x_0 - x}{x_0 - x_k} \right] \right]$	Eq.7

### 3.1.1.2.1.2 Solution analytique : Modèles simplifiés

#### - Extraction uniforme et pas d'accumulation de matière

En négligeant l'accumulation de matière ( $\partial y / \partial t = 0$ ) et en considérant une extraction uniforme le long du lit ( $\partial y / \partial z = \text{cste}$ ), le système d'équation 1 a été simplifié et appliqué pour l'extraction de l'huile de basilic [339] et de l'huile de grains de céleri [257]. La solution analytique, en considérant la condition initiale (Eq.3) et la condition d'équilibre (Eq.23), est donnée par l'équation 8 (**SM1**).

$e = x_0 - x_0 \exp[-A\alpha(1-B)t] \quad \text{Eq.8}$
$A = a_p k_f \rho_f [\rho_s \varepsilon_c]^{-1}, \quad B = \frac{A}{A + \dot{q}}, \quad y^* = \alpha x \quad (\alpha : \text{constante d'équilibre fluide/solide})$
$\dot{q} : \text{flux massique spécifique du solvant (g soluté/ g de concrète non soluble .s).}$

$e$  : masse soluté extraite (g) / masse de concrète non soluble (g)

Dans le cas d'une extraction à deux régimes séparés par une concentration de transition de phases  $x_k$ , la solution analytique [257, 340] est donnée par l'équation 9 (**SM2**).

Les concentrations d'équilibre de phases sont données par :	
$y^* = y_0 \quad x \geq x_k$	
$y^* = \alpha x \quad x < x_k$	
Le temps de transition de phase:	
$t_k = \frac{(x_0 - x_k)}{[y_0 A(1-B)]}$	
La solution analytique est de la forme:	
$e = \left\{ \begin{array}{l} y_0 A(1-B)t \quad x \geq x_k \text{ ou } t \leq t_k \\ x_0 - x_k \exp[-A\alpha(1-B)(t - t_k)] \quad x < x_k \text{ ou } t > t_k \end{array} \right\}$	Eq.9

- Extraction sans accumulation de matière

En admettant l'absence d'accumulation de matière ( $\partial y / \partial t = 0$ ), le système d'équation 1 s'écrit :

$$\left\{ \begin{array}{l} \rho_f u \varepsilon \frac{\partial y}{\partial z} = J(y, x) \\ \rho_s \varepsilon_c \frac{\partial x}{\partial t} = -J(y, x) \end{array} \right\} \quad \text{Eq.10}$$

En utilisant le système d'équations 10, Sovová et al [255, 341-344] ont développé un modèle très intéressant basé sur l'introduction de deux coefficients de transfert de matière  $k_f$  et  $k_{fs}$  en phase fluide régissant les deux régimes d'extraction séparés par la concentration de transition de phases  $x_k$ . Les expressions du flux de transfert de matière  $J$  pour ce modèle sont données par l'équation 11.

$$\text{Modèle de Sovová et al} \quad \left[ \begin{array}{l} J(x > x_k, y) = a_p k_f \rho_f (y^* - y) \\ J(x \leq x_k, y) = a_p k_{fs} \rho_f x (1 - y / y^*) \end{array} \right] \quad \text{Eq.11}$$

En considérant les conditions initiales et aux limites (Eq.3-4) et l'expression du flux donnée par le modèle de Sovová (Eq.11), la solution analytique est donnée par l'équation 12 (**SM3**).

$$e = \left\{ \begin{array}{ll} q y_0 [1 - \exp(-Z)] & q \leq q_m \\ y_0 [q - q_m \exp(z_w - Z)] & q_m \leq q \leq q_n \\ x_0 - \frac{y_0}{W} \ln \{ 1 + [\exp(W x_0 / y_0) - 1] \exp[W(q_m - q) x_k / x_0] \} & q \geq q_n \end{array} \right\} \quad \text{Eq.12}$$

$$q_m = (x_0 - x_k) / y_0 Z \quad \text{Eq.13}$$

$$q_n = q_m + \frac{1}{W} \ln \frac{x_k + (x_0 - x_k) \exp(W x_0 / y_0)}{x_0} \quad \text{Eq.14}$$

$$\frac{z_w}{Z} = \frac{y_0}{W x_0} \ln \frac{x_0 \exp[W(q - q_m)] - x_k}{x_0 - x_k} \quad \text{Eq.15}$$

$$Z = a_p k_f \rho_f / \left[ \dot{q} \varepsilon_c \rho_s \right] \quad \text{et} \quad W = a_p k_{fs} / \dot{q} \varepsilon_c \quad \text{Eq.16}$$

$q$  : masse de solvant (g)/ masse de concrète non soluble (g)

### 3.1.1.2.1.3 Modèle empirique

Nous adoptons le modèle développé par Naik et al [264], il est défini de la même manière que le modèle de Langmuir pour l'adsorption (Eq.17) (**SME**).

$$e = \frac{e_{\infty}t}{b+t} \quad \text{et} \quad Y = \frac{Y_{\infty}t}{b+t} \quad \text{Eq.17}$$

### 3.1.1.2.1.4 Evaluation des paramètres intervenant dans les différents modèles

La courbe de variation de la masse extraite  $m_e$  en fonction de la masse de solvant  $m_s$  (ou  $e = f(q)$ ) est formée d'une partie linéaire, représentant le régime d'extraction contrôlé par la solubilité [249], suivie d'une courbe indiquant le passage à un régime contrôlé par la résistance au transfert de matière en phase solide. La concentration initiale dans le solvant  $y_0$  est évaluée expérimentalement comme étant la pente de la droite correspondant à la partie linéaire de la courbe (première étape d'extraction).

$$y_0 = \frac{m_e}{m_s} = \frac{m_e}{m_o - m_{e\infty}} \frac{m_o - m_{e\infty}}{m_s} = \frac{e}{q}$$

$$Y = \frac{m_e}{m_o} \quad \text{et} \quad Y_{\infty} = \frac{m_{e\infty}}{m_o} \quad \text{Eq.18}$$

$m_e$  : masse d'huile extraite,  $m_o$  : masse initiale de concrète

L'extraction exhaustive de la concrète permet de récupérer la masse maximale d'huile, soit  $m_{e\infty}$ , elle est assimilée à la masse initiale d'huile dans la concrète. On peut alors définir un rendement asymptotique  $e_{\infty}$ .

$$x_o = \frac{m_{e\infty}}{m_o - m_{e\infty}} = e_{\infty} = \frac{Y_{\infty}}{1 - Y_{\infty}} \quad \text{Eq.19}$$

Le bilan de matière global sur la concrète permet d'écrire une relation entre la masse volumique de la partie non soluble de la concrète  $\rho_s$  et la masse volumique globale de la concrète  $\rho_c$ .

$$\rho_s x_o = \rho_c Y_{\infty} \quad \text{Eq.20}$$

A partir des observations microscopiques, la fraction  $f_o$  de la phase huileuse dans la concrète est estimée par traitement d'image (& I.1.1). En admettant que le régime

d'extraction contrôlé par la solubilité et caractérisé par un front d'onde, dure jusqu'à la disparition totale de la phase huileuse, on peut écrire :

$$f_o \rho_c Y_\infty = \rho_s (x_o - x_k) \quad \text{Eq.21}$$

Dans l'équation 4,  $a_p$  représente la surface spécifique des billes de verre, elle est définie comme :

$$a_p = \frac{6(1-\varepsilon)}{d_b} \quad \text{Eq.22}$$

Pour évaluer les concentrations d'équilibre, on admet une relation linéaire :

$$y^* = \alpha x \quad \text{Eq.23}$$

$m_e$  : masse de soluté extraite (g),  $m_s$  : masse de solvant utilisé (g),  $m_0$  : masse de concrète (g),  $Y$  : rendement d'extraction,,  $Y_\infty$  : rendement asymptotique,  $m_{e\infty}$  : masse extraite à un temps infini (g),  $b$  : constante,  $\rho_c$  : masse volumique de la concrète.

### 3.1.1.3 Résultats et discussion

#### 3.1.1.3.1 Conditions opératoires

Nous avons procédé à l'optimisation de certains paramètres tels que le temps d'équilibre et la pression d'extraction, les autres paramètres, maintenus constants, sont :

Température d'extraction = 40°C

Température du détendeur (nozzle) = 50°C

Température de piégeage = 0°C

#### - Optimisation du temps d'équilibre

Le temps d'équilibre est le temps permettant à l'appareil d'atteindre les conditions stationnaires d'extraction. L'expérience que nous avons effectuée dans le cadre de son optimisation, montre que le temps d'équilibre n'influence que légèrement le rendement d'extraction (figure 3.4). C'est ce qui explique le fait que beaucoup de travaux [249] prennent par défaut un temps d'équilibre de 5 min, souvent recommandé dans le manuel d'utilisation de l'appareil. En conséquence, nous avons fixé un temps d'équilibre de 5 min. durant toutes les expériences.

- Optimisation de la pression d'extraction

La pression d'extraction est directement reliée au pouvoir solvant, une augmentation de pression entraîne une faible sélectivité du solvant et par conséquent un rendement plus élevé. L'expérience effectuée (figure 3.5) montre que, effectivement, le rendement augmente avec la pression pour se stabiliser autour de 110 bars. Nous avons remarqué que l'augmentation de la pression conduit à des extraits de plus en plus colorés, ce qui correspond à l'extraction de produits à haut poids moléculaire. Dans ce cadre, l'évolution quantitative de la composition chimique de l'extrait obtenu, en fonction de la pression et du temps, a été étudiée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, en utilisant un étalonnage externe (voir Chapitre 3.2).

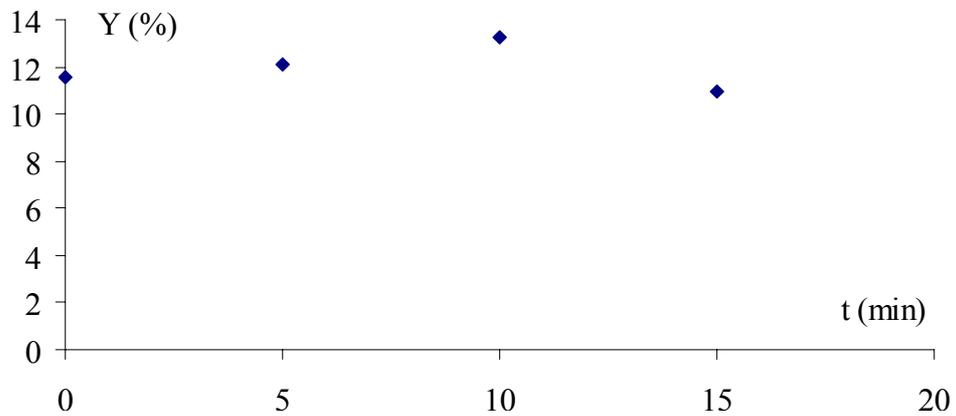


Figure 3.4 : Variation du rendement en fonction du temps d'équilibre

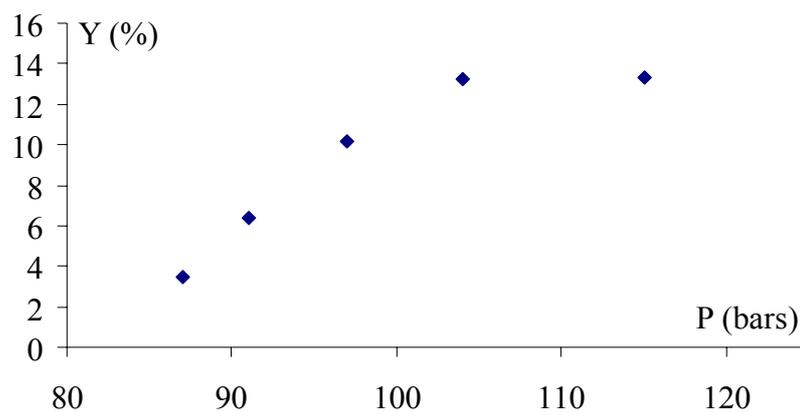


Figure 3.5 : Variation du rendement en fonction de la pression

### 3.1.1.3.2 Etude cinétique et modélisation mathématique

L'étude cinétique a été effectuée à trois pressions différentes : 91 bars, 104 bars et 115 bars. Pour chaque pression nous avons effectué trois cinétiques à trois débits de dioxyde de carbone : 0,5 ml/min, 1 ml/min et 1,5 ml/min. Au cours des différentes expériences, nous avons veillé à ce que le remplissage de la cartouche d'extraction soit fait de la même manière, afin de ne pas influencer les conditions hydrodynamiques. Les extraits obtenus en fonction du temps pour chaque couple pression – débit sont pesés pour suivre l'évolution de la masse extraite. Ils sont ensuite soumis à une analyse par CG-SM pour déterminer l'évolution de la composition chimique toujours en fonction du temps. Les modèles mathématiques représentés par les équations 1 (**SMN**), 8 (**SM1**), 9 (**SM2**), 12 (**SM3**) et 17 (**SME**) ont été appliqués aux différentes études cinétiques. L'application de ces modèles a permis, d'une part, d'optimiser les paramètres de chaque modèle et, d'autre part, d'évaluer le degré de simulation (fitting) des différents modèles par estimation de l'erreur relative. L'optimisation des paramètres est effectuée, de façon à minimiser l'erreur relative entre les valeurs expérimentales et celles obtenues à partir du modèle, selon l'équation 24.

$$\sum_{1}^n (e_{\text{exp}} - e_{\text{mod}})^2 / n = \min \quad \text{ou} \quad \sum_{1}^n (y_{\text{exp}} - y_{\text{mod}})^2 / n = \min, \quad n : \text{nombre d'expériences} \quad \text{Eq.24}$$

L'application des différents modèles nécessite, au préalable, la détermination des paramètres  $Y_{\infty}$ ,  $y^*$  (ou  $y_0$  qui représente la solubilité de la fraction volatile dans le dioxyde de carbone),  $x_0$  et  $\rho_s$ . L'exploitation des données expérimentales sous forme d'une variation du rendement en fonction du temps permet d'estimer une valeur asymptotique du rendement  $Y_{\infty}$  en utilisant un modèle exponentiel ou le modèle empirique **SME**. Un exemple de détermination de  $Y_{\infty}$ , à  $P = 104$  bars, est donné dans la figure 3.6.

L'optimisation des valeurs expérimentales par un modèle du type  $Y = \frac{Y_{\infty} t}{b + t}$  (modèle **SME**) permet d'estimer la valeur de  $Y_{\infty} = 0,325$  (l'extrapolation de  $Y$  à temps infini ;  $t \geq 2,5$  H) et  $b = 11,82$ .

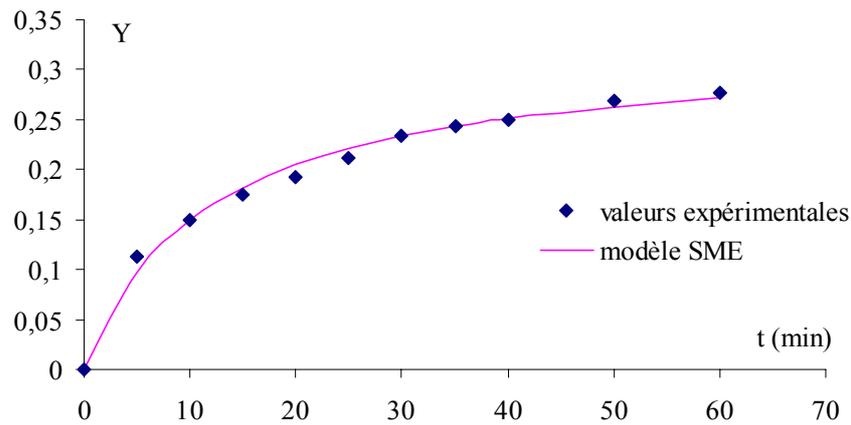


Figure 3.6 : Variation du rendement en fonction du temps - P = 104 bars

Les valeurs de  $Y_{\infty}$  à P = 91 et 115 bars ont été déterminées de façon similaire (Appendice D).

La détermination du rendement asymptotique  $Y_{\infty}$  permet de calculer la valeur de  $x_0$  (Eq.19) et  $\rho_s$  (Eq.20). La valeur de  $y_0$  (ou  $y^*$ ) est déterminée comme étant la pente de la droite d'interpolation de la partie linéaire de la courbe  $m_e = f(m_s)$  ou  $e = f(q)$  (Eq.18) en se basant principalement sur les données obtenues pour le débit le plus faible (0,5 ml/min) [249]. Cette grandeur représente la solubilité de la fraction volatile dans le dioxyde de carbone supercritique. L'estimation de la valeur de  $y_0$  est déduite à partir des figures 3.7 et 3.8. La figure 3.7 montre la variation du rendement en fonction du temps à P = 104 bars, à un débit de 0,5, 1 et 1,5 ml/min. La représentation des mêmes données cinétiques (figure 3.7) sous la forme  $m_e = f(m_s)$  ou  $e = f(q)$  (figure 3.8) fait apparaître une partie linéaire au début du processus ( $q \leq 25$ ), la pente de cette droite représente la valeur de  $y_0$  (ou  $y^*$ ) (tableau 3.1).

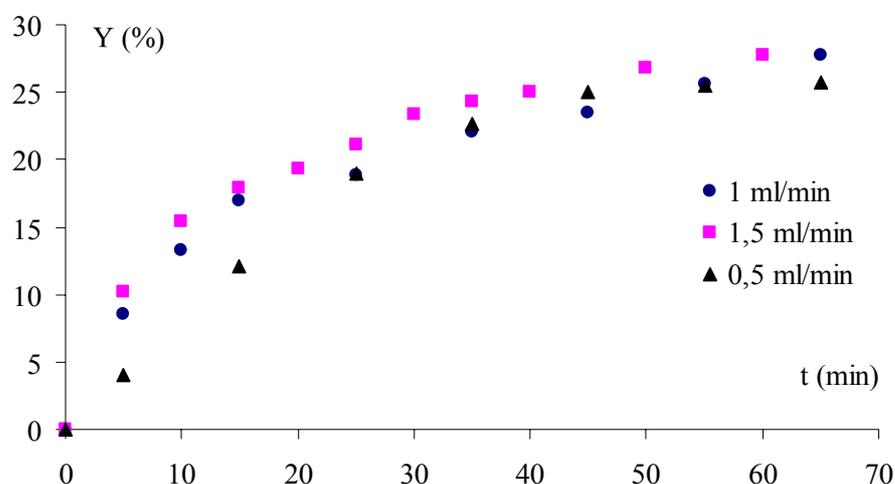


Figure 3.7 : Variation du rendement en fonction du temps (P = 104 bars)

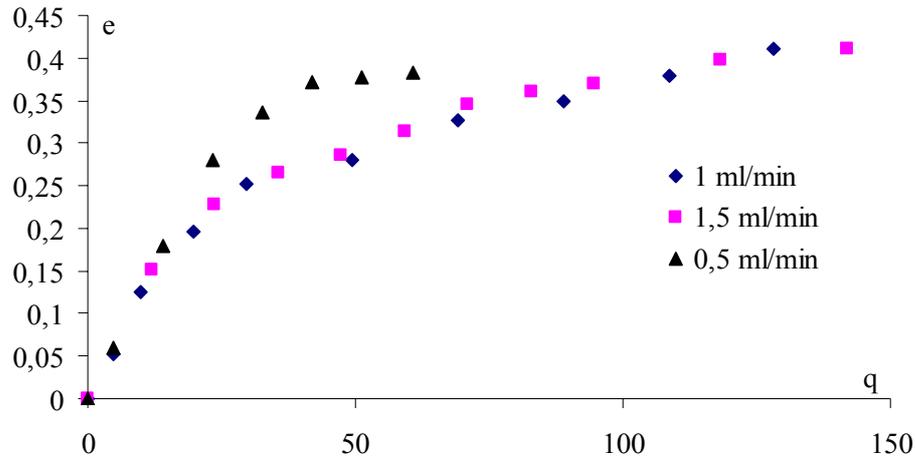


Figure 3.8 : Variation de e en fonction de q (P = 104 bars)

Les valeurs de  $y_o$  à P = 91 et 115 bars ont été déterminées de manière identique (Appendice D). La surface spécifique a été calculée en utilisant l'équation 22 et la masse volumique de la concrète a été estimée expérimentalement. A titre comparatif, avec les valeurs optimisées, la valeur de  $x_k$  est calculée selon l'équation 21 en utilisant la valeur de  $f_o = 0,48$ . Les valeurs estimées et mesurées des principaux paramètres utilisés pour décrire les modèles sous leur forme explicite (analytique) sont regroupées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Principaux paramètres expérimentaux des différents modèles

P (bars)	$\rho_c$	$\rho_s$	$\varepsilon$	$\varepsilon_c$	$a_p$	$Y_\infty$	$x_o$	$y_o$	$x_k$
91	0,942	0,879	0,3	0,1	2100	0,0663	0,071	0,0022	0,036
104	0,942	0,635	0,3	0,1	2100	0,3252	0,482	0,0128	0,250
115	0,942	0,704	0,3	0,1	2100	0,2519	0,336	0,0047	0,174

### 3.1.1.1.3.2.1 Application du modèle numérique

L'objectif est d'appliquer le système d'équation 1 (dispersion axiale négligeable), dans les conditions initiales et aux limites (Eq.2 et 3), à nos résultats expérimentaux. Des tests préliminaires ont montré que l'expression du flux de transfert de matière J représentée par le modèle de Cygnarowicz (Eq.7) permet de mieux représenter les valeurs expérimentales que les modèles de Reverchon (Eq.5) et Lack (Eq.6). L'expression du flux de transfert de matière dans le modèle de Cygnarowicz renferme le terme  $a_p \rho_f k_f (y_o - y)$  (qu'on retrouve d'ailleurs dans les modèles de Lack et Reverchon) que multiplie une fonction de la

$$J = a_p \rho_f k_f f(x) (y_o - y) \quad \text{avec} \quad f(x) = \frac{1}{\left( \frac{x_o - x}{x_o - x_k} \right) + c} \quad \text{et } c : \text{ paramètre à optimiser Eq.25}$$

concentration :  $f(x) = ((x_o - x)/(x_o - x_k))$ . Dans l'équation 7,  $f(x)$  est représentée par :  $f(x) = \exp [(\log(0,001) * ((x_o - x)/(x_o - x_k))]$ . Lors d'un travail ultérieur, Cygnarowicz [345] a donné une autre expression pour  $f(x)$  :  $f(x) = C^{[(x_k - x)/(x_o - x_k)]}$  ( $C$  : constante). En se basant sur ces travaux, nous avons proposé une expression du flux de transfert de matière donnée par l'équation 25, avec  $c$ , étant un paramètre à optimiser.

La discrétisation du système d'équations 1 a été effectuée selon la méthode de Lax-Wendroff [346]. La résolution a été réalisée avec un programme MAPLE (Appendice D), l'objectif étant de rechercher le minimum (selon l'équation 24) entre les valeurs de  $y$  calculées par le modèle et celles de  $y$  obtenues par voie expérimentale. Afin de comparer le modèle de Cygnarowicz (Eq.7) et celui que nous avons proposé (Eq.25), les solutions obtenues par les deux modèles sont représentées sur le graphique qui donne la variation de concentration dans la phase fluide ( $y$ ) en fonction du temps et sur lequel sont également indiquées les valeurs expérimentales. Les paramètres à optimiser sont :  $x_k$  et  $k_f$  pour le modèle de Cygnarowicz et  $x_k$ ,  $k_f$  et  $c$  pour le modèle proposé. Les valeurs optimales de ces paramètres dans les conditions expérimentales sont données dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Valeurs optimales des paramètres du modèle de Cygnarowicz et de celui proposé

P (bars)	Débit ml/min	Modèle de Cygnarowicz		Modèle proposé		
		$k_f$	$x_k$	$k_f$	$x_k$	$c$
91	0,5	0,32	0,021	0,1	0,02	0,2
	1,5	1,2	0,021	1,2	0,04	1
104	0,5	1,20	0,23	1,2	0,28	1,2
	1	1,20	0,15	0,22	0,19	0,50
	1,5	1,20	0,21	1,2	0,28	1,13
115	0,5	1,2	0,1	0,1	0,42	0,20
	1	1,2	0,2	0,1	0,15	0,31
	1,5	1,2	0,15	0,13	0,1	0,4

La variation de  $y$  en fonction du temps à la pression d'extraction  $P = 104$  bars et aux débits 0,5 ; 1 et 1,5 ml/min est donnée dans les figures 3.9 - 3.11. Les courbes obtenues à la pression d'extraction  $P = 91$  bars (débit de 0,5 et 1,5 ml/min) et  $P = 115$  bars (0,5, 1, 1,5 ml/min) sont données en appendice (Appendice D).

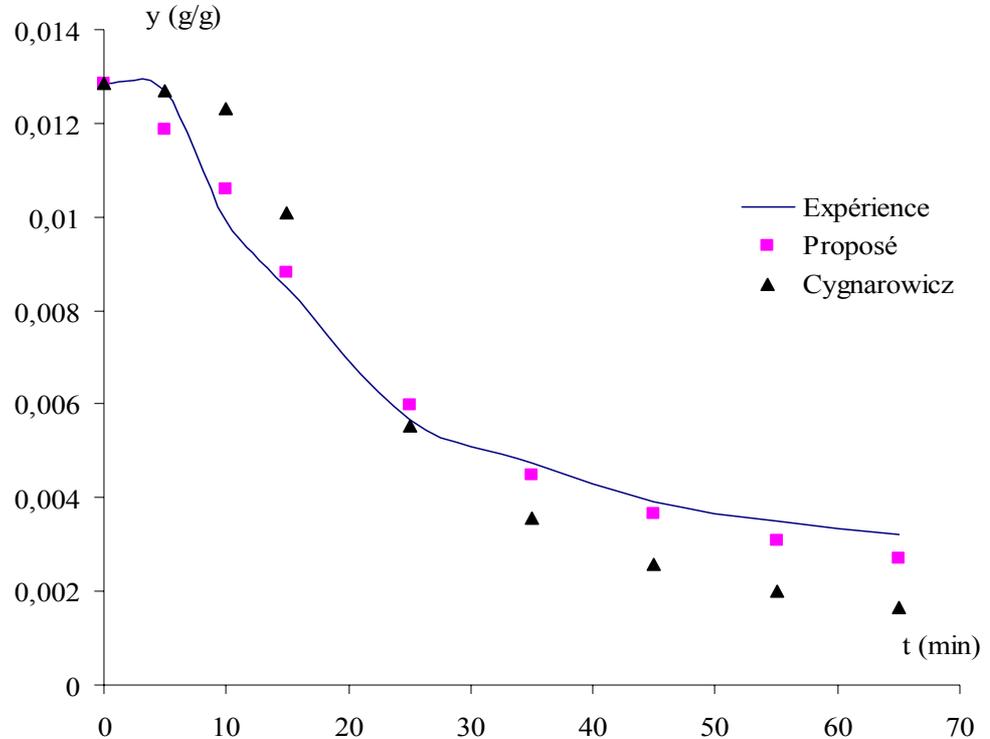


Figure 3.9 : Variation de  $y$  en fonction de  $t$   
 $P = 104$  bars et débit = 1 ml/min

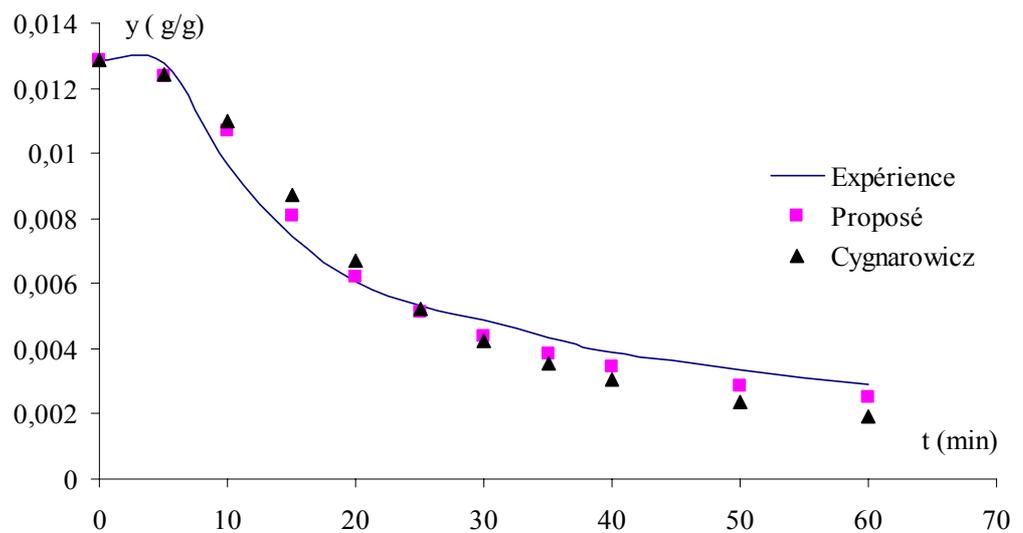


Figure 3.10 : Variation de  $y$  en fonction de  $t$   
 $P = 104$  bars et débit = 1,5 ml/min

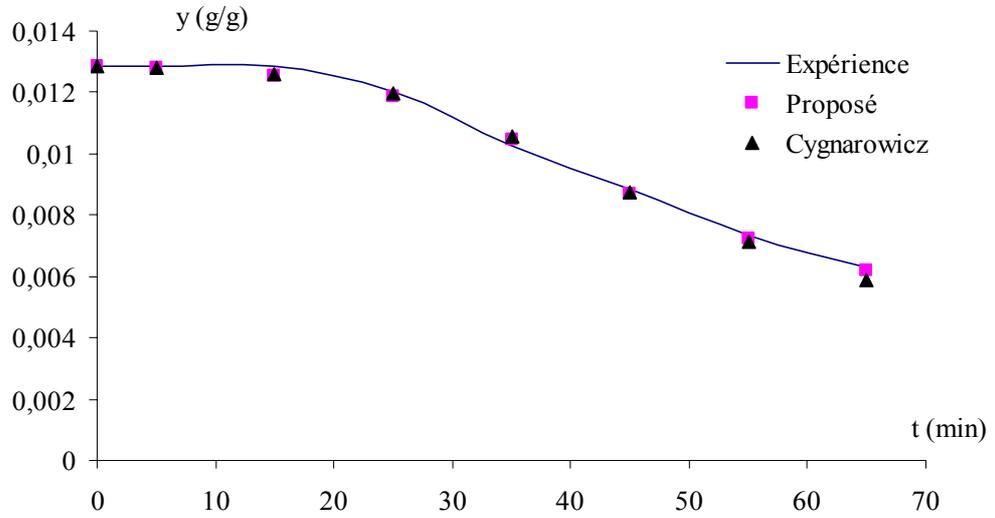


Figure 3.11 : Variation de  $y$  en fonction de  $t$   
 $P = 104$  bars et débit =  $0,5$

Le profil de variation de la concentration  $y$  en fonction de la longueur de l'extracteur ( $Z = 6$  cm) à la pression d'extraction  $P = 104$  bars (débit de  $0,5$ ,  $1$  et  $1,5$  ml/min) est donné dans les figures 3.12 à 3.17.

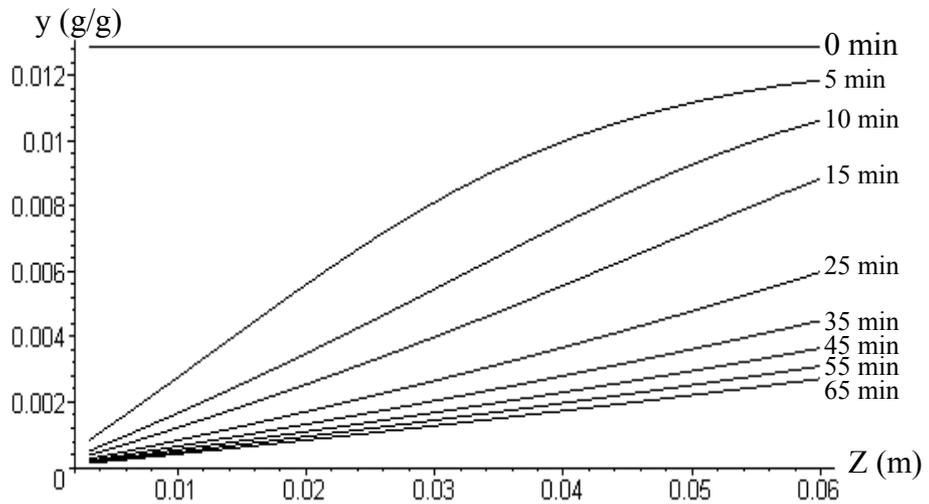


Figure 3.12 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 104$  bars – débit =  $1$  ml/min  
 Modèle proposé

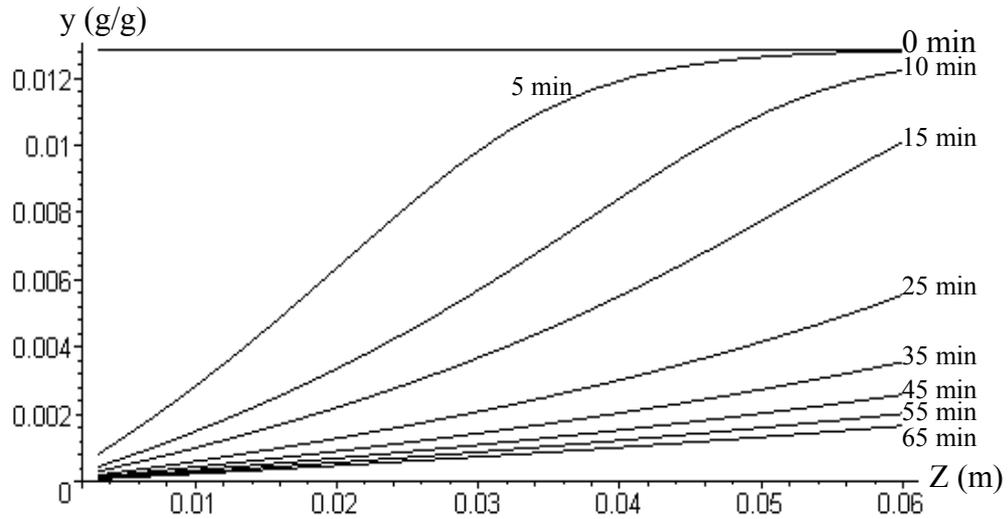


Figure 3.13 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 104$  bars – débit =  $1$  ml/min  
 Modèle de Cygnarowicz

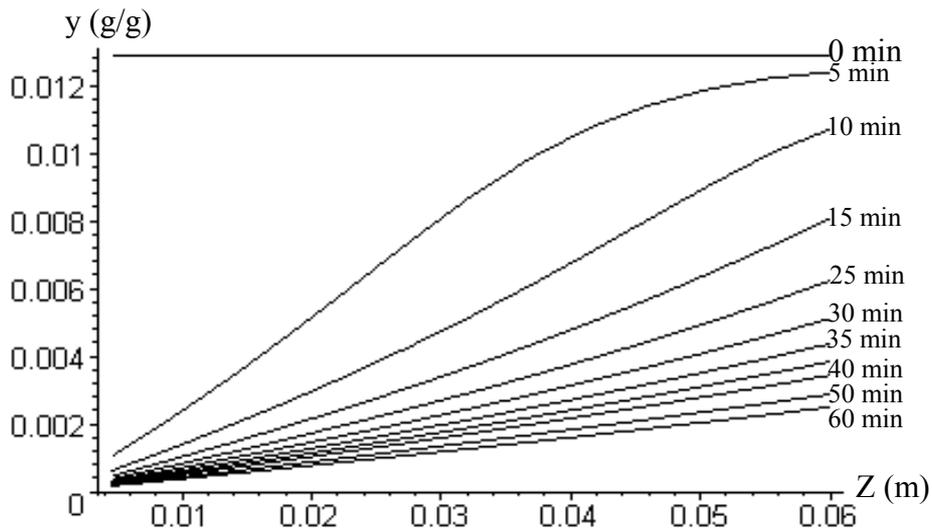


Figure 3.14 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 104$  bars – débit =  $1,5$  ml/min  
 Modèle proposé

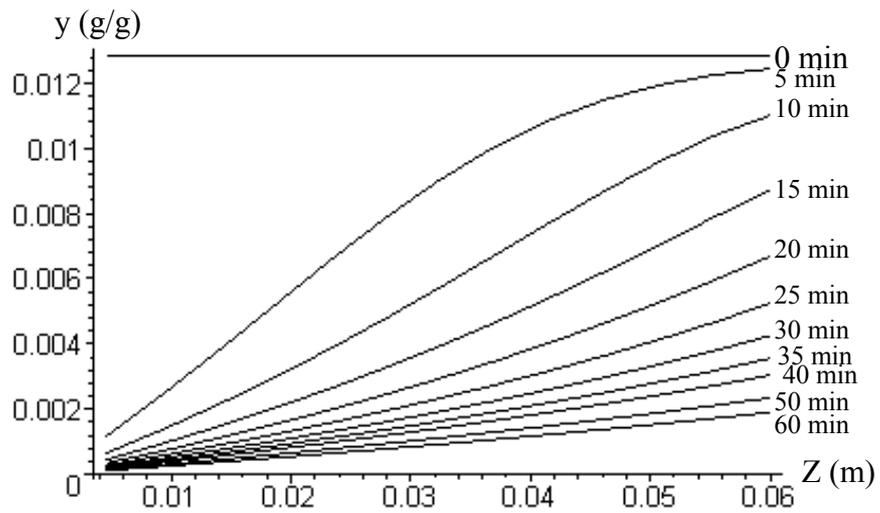


Figure 3.15 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 104$  bars – débit = 1,5 ml/min  
 Modèle de Cygnarowicz

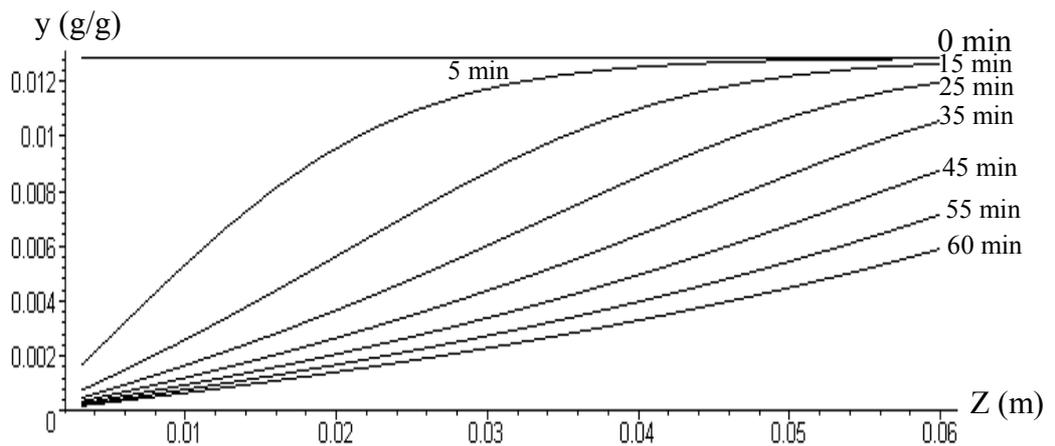


Figure 3.16 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 104$  bars – débit = 0,5 ml/min  
 Modèle proposé

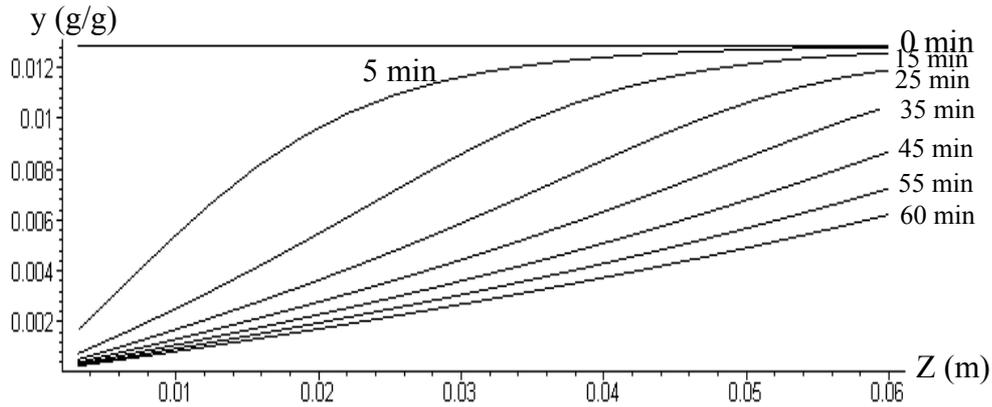


Figure 3.17 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 104$  bars – débit =  $0,5$  ml/min  
 Modèle de Cygnarowicz

La déviation relative (équation 24) entre les valeurs expérimentales et celles données par le modèle de Cygnarowicz et le modèle proposé sont données dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Déviation relative entre valeurs expérimentales et celles des modèles de Cygnarowicz et proposé

P (bars)	91		104			115		
Débit (ml/min)	0,5	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5
Modèle Proposé	$3,2^E-7$	$4,6^E-8$	$1,9^E-7$	$1,8^E-6$	$2,7^E-7$	$9,2^E-7$	$6,8^E-7$	$6,0^E-7$
Modèle de Cygnarowicz	$2,8^E-8$	$9,0^E-7$	$3,5^E-7$	$1,6^E-5$	$7,7^E-7$	$4,9^E-7$	$3,1^E-6$	$4,5^E-6$

### Discussion des résultats

Dans cette première partie de la modélisation de la cinétique d'extraction de la fraction volatile par le dioxyde de carbone supercritique, nous avons décrit le processus par le système d'équations différentielles (Eq.1) qui n'est en fait que le bilan de matière différentiel dans l'extracteur. En admettant une dispersion axiale négligeable (ce qui est tout à fait acceptable vu les conditions hydrodynamiques expérimentales), nous avons résolu le système d'équations 1 en adoptant un schéma de discrétisation explicite du

système d'équation selon la méthode de Lax-Wendroff, le programme de calcul est réalisé avec le logiciel MAPLE (Appendice D). Concernant l'expression du flux de transfert de matière, nous avons procédé, primo, à l'application du modèle décrit par Cygnarowicz (Eq.7), secundo, à la proposition d'un nouveau modèle en se basant sur les travaux de Cygnarowicz (Eq.25). L'application de ces deux modèles dans la résolution du système d'équation 1 a mené aux résultats donnés dans les figures 3.9 à 3.11 et en appendice D (graphes donnant la variation de  $y$  en fonction du temps). L'examen de ces figures montre que le modèle de Cygnarowicz représente relativement bien la cinétique d'extraction jusqu'à un temps de 15 minutes, c'est-à-dire le temps où l'extraction est contrôlée par un régime de solubilité. Pour des temps supérieurs à 15 minutes, on constate une déviation par rapport aux valeurs expérimentales. On constate également que pour une pression de 91 bars et un débit de 0,5 ml/min on obtient une simulation parfaite des résultats expérimentaux, et que la plus grande déviation est obtenue pour la pression de 115 bars et un débit de 1,5 ml/min. Un calcul effectué, en substituant la valeur constante  $[\log(0,001)]$  dans le modèle de Cygnarowicz (Eq.7) par un paramètre variable à optimiser, a montré que la déviation par rapport aux valeurs expérimentales devient plus faible et une nette amélioration est observée.

L'application du modèle que nous avons proposé, donné par l'équation 25 (figures 3.9 à 3.11 et appendice D), permet une meilleure simulation des résultats expérimentaux. Le processus global (régime de solubilisation et de diffusion) est bien représenté par l'équation de ce modèle. A notre avis, la simulation pourrait être meilleure en adoptant une technique d'optimisation plus élaborée dans le calcul du minimum existant entre les valeurs expérimentales et celles obtenues à partir du modèle. L'examen du profil de concentration de la fraction volatile dans la phase fluide en fonction de la hauteur du lit  $Z$  (figures 3.12 à 3.17 et appendice D) permet de faire les constatations suivantes : (1) pour un temps inférieur à 15 min., la courbe  $y = f(z)$  présente une concavité, correspondant à un saut de concentration (point d'inflexion), séparant deux régimes d'extraction : un régime de solubilisation (pour une concentration dans la phase solide  $x \leq x_k$ ) et un régime diffusionnel contrôlé par la résistance dans la phase solide, (2) pour un temps supérieur à 15 min., le profil de concentration est une droite de faible pente correspondant à l'établissement du régime diffusionnel, (3) on constate également que la concentration  $y$  est élevée à la sortie de l'extracteur, région où la concrète est moins épuisée en recevant le fluide chargé de soluté. Ces mêmes constatations ont été rapportées dans les travaux de

Reverchon [336], Perrut [340] et Sovová [255] qui expliquent clairement l'existence de régimes au cours du processus d'extraction.

### 3.1.1.1.3.2.2 Application des modèles analytiques et empirique

L'objectif de cette partie est d'appliquer les solutions analytiques du système d'équation 1 simplifié, données par les modèles **SM1**, **SM2** et **SM3**, à la cinétique d'extraction afin de comparer les résultats avec la simulation obtenue par voie numérique (&3.1.1.1.3.2.1). Le modèle empirique **SME** est également appliqué aux données cinétiques.

Afin d'écrire les modèles **SM1**, **SM2**, **SM3** et **SME** sous forme explicite, les paramètres inconnus :  $k_f$  et  $\alpha$  pour le modèle **SM1** (tableau 3.4),  $k_f$ ;  $\alpha$ ;  $t_k$  et  $x_k$  pour le modèle **SM2** (tableau 3.5),  $k_f$ ;  $k_s$  et  $x_k$  pour le modèle **SM3** (tableau 3.6) et les paramètres  $e_\infty$  et  $b$  pour le modèle **SME** (tableau 3.7) ont été optimisés selon l'équation 24.

Tableau 3.4 : Paramètres optimisés du modèle **SM1**

P (bars)	91			104			115		
Débit ml/mn	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5
$k_f \cdot 10^{-5}$ m/s	1,03	0,78	1,03	1,01	1,02	1,42	7,50	8,33	8,45
$\alpha$	0,047	0,019	0,029	0,410	0,800	0,410	0,009	0,007	0,008

Tableau 3.5 : Paramètres optimisés du modèle **SM2**

P (bars)	91			104			115		
Débit ml/mn	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5
$k_f \cdot 10^{-6}$ m/s	2,833	12	6,333	1,214	4,033	2,488	8,333	6,5	4,164
$\alpha$	0,061	0,019	0,023	0,030	0,012	0,014	0,007	0,006	0,013
$t_k$ (mn)	10,97	12,23	10,97	10,99	11,99	10,99	11,99	11,99	11,99
$x_k$	0,055	0,057	0,034	0,319	0,250	0,242	0,252	0,241	0,232

Tableau 3.6 : Paramètres optimisés du modèle **SM3**

P (bars)	91			104			115		
Débit ml/min	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5
$k_f \cdot 10^{-6}$ m/s	3,66	0,75	3,11	1,63	2,33	1,41	1,46	1,66	1,98
$k_s \cdot 10^{-8}$ m/s	1,98	4,76	2,22	3,41	1,54	7,22	0,80	0,96	2,88
xk	0,023	0,057	0,039	0,313	0,242	0,247	0,250	0,235	0,227

Tableau 3.7 : Paramètres optimisés du modèle **SME**

P (bars)	91			104			115		
Débits ml/min	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5
$e_{\infty}$	0,065	0,063	0,066	0,324	0,293	0,325	0,193	0,206	0,252
b	35,0	28,76	15,30	17,76	11,26	11,82	33,53	23,07	22,00

Afin de comparer le taux de simulation (fitting) de la cinétique d'extraction par les différents modèles, nous représentons sur le graphique de la variation de la concentration  $e$  en fonction de  $q$  les valeurs expérimentales et les valeurs obtenues en appliquant les différents modèles. Les figures 3.18 - 3.20 montrent la variation  $e = f(q)$  à  $P = 104$  bars pour les débits 0,5, 1 et 1,5 ml/min.

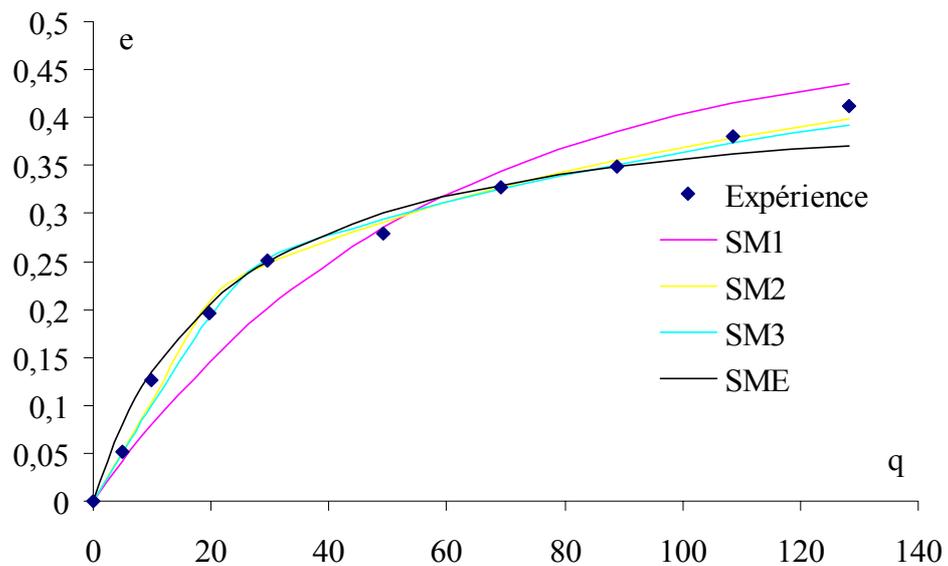


Figure 3.18 : Variation de  $e$  en fonction de  $q$   
 $P = 104$  bars, débit ( $\text{CO}_2$ ) = 1 ml/min

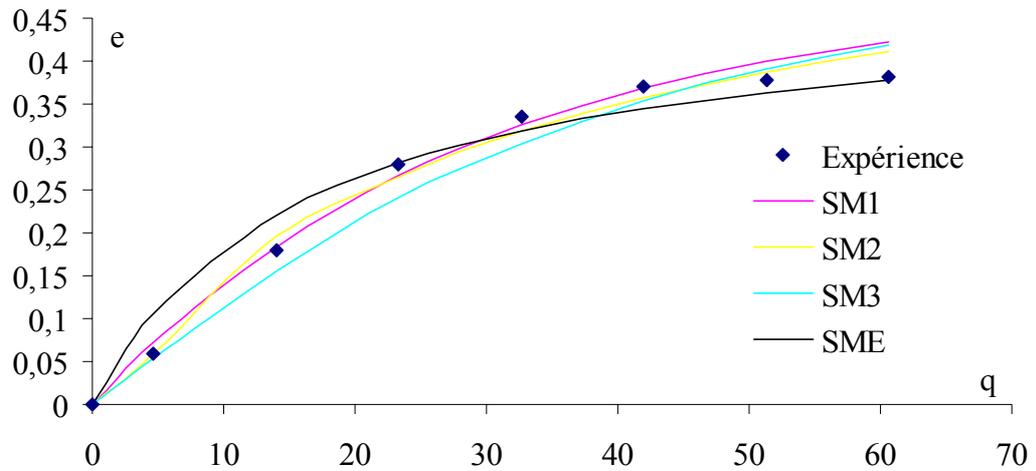


Figure 3.19 : Variation de  $e$  en fonction de  $q$   
 $P = 104$  bars, débit ( $\text{CO}_2$ ) =  $0,5$  ml/min

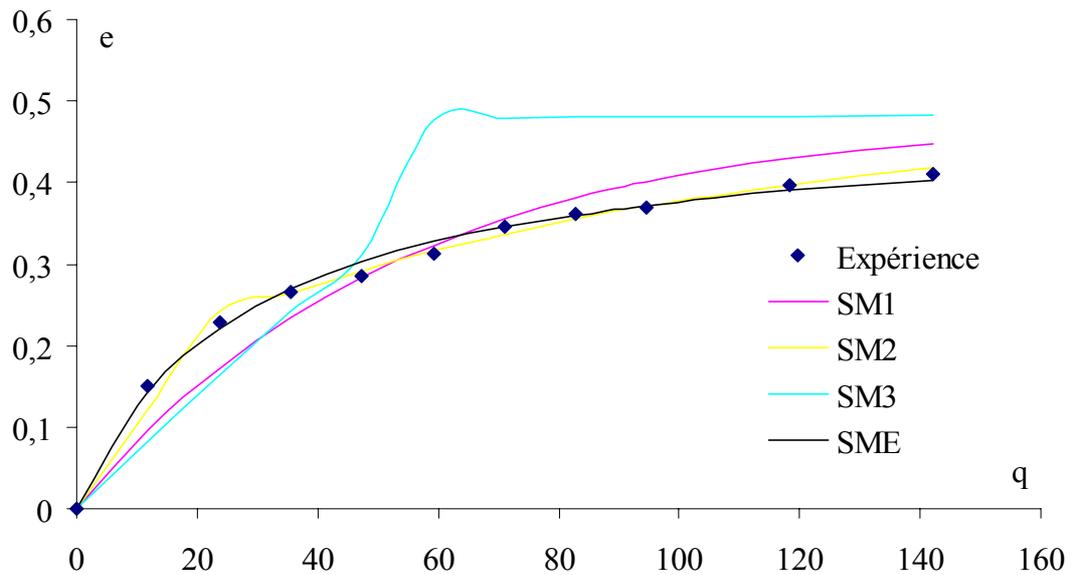


Figure 3.20 : Variation de  $e$  en fonction de  $q$   
 $P = 104$  bars, débit ( $\text{CO}_2$ ) =  $1,5$  ml/min

La simulation des données cinétiques expérimentales pour des pressions  $P = 91$  et  $115$  bars aux trois débits est représentée par les figures données en appendice D.

Afin de comparer le « fitting » des valeurs expérimentales, nous présentons dans le tableau 3.8 les valeurs des erreurs relatives représentant la déviation entre les valeurs expérimentales et celles déterminées par les différents modèles.

Tableau 3.8 : Déviation des différents modèles par rapport aux valeurs expérimentales

P (bars)	91			104			115		
	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5
<b>SM1</b>	7,2 <sup>E-6</sup>	9,7 <sup>E-6</sup>	1,9 <sup>E-5</sup>	2,3 <sup>E-4</sup>	1 <sup>E-3</sup>	9,9 <sup>E-4</sup>	3,3 <sup>E-4</sup>	4,1 <sup>E-4</sup>	5,0 <sup>E-5</sup>
<b>SM2</b>	5,5 <sup>E-6</sup>	8,4 <sup>E-6</sup>	8,0 <sup>E-6</sup>	2,3 <sup>E-4</sup>	9,8 <sup>E-5</sup>	1,1 <sup>E-4</sup>	1,1 <sup>E-5</sup>	2,2 <sup>E-5</sup>	2,5 <sup>E-5</sup>
<b>SM3</b>	5,3 <sup>E-6</sup>	4,5 <sup>E-6</sup>	9,7 <sup>E-6</sup>	6,2 <sup>E-4</sup>	1,3 <sup>E-4</sup>	8,4 <sup>E-3</sup>	9,2 <sup>E-5</sup>	9,3 <sup>E-5</sup>	8,1 <sup>E-5</sup>
<b>SME</b>	1,08	0,04	0,145	1,13	1,399	5,6 <sup>E-5</sup>	0,16	0,639	3,4

### Discussion

Dans cette seconde étape de la modélisation de la cinétique d'extraction, nous avons simulé les valeurs expérimentales par les modèles analytiques **SM1**, **SM2** et **SM3** (solutions du système d'équations 1 simplifié) et par le modèle empirique **SME**. Après avoir optimisé les paramètres inconnus des quatre modèles selon l'équation 24, ils ont été représentés sous forme de variation de  $e$  en fonction de  $q$  sur le même graphique. A l'examen des figures 3.18 à 3.20, des appendices (Appendice D) et du tableau 3.8, on constate que :

- le modèle empirique **SME**, vu la simplicité de son application, peut représenter de façon acceptable les données expérimentales, comme c'est le cas de l'expérience réalisée à  $P = 104$  bars et un débit de 1,5 ml/min,
- les modèles **SM1** et **SM2**, obtenus dans le cas où on admet une extraction uniforme et sans accumulation de matière, représentent les données cinétiques à différentes pressions d'extraction de manière correcte. Pour la pression  $P = 91$  bars, on constate que la déviation par rapport aux valeurs expérimentales est très faible ( $\sim 10^{-6}$ ), ce qui est tout à fait cohérent avec les hypothèses simplificatrices. Donc ce type de modèle, peut décrire idéalement un processus d'extraction se produisant à des pressions et débits faibles,
- le modèle **SM3** développé par Sovová [255] et qui a été appliqué dans de nombreux travaux, est un excellent modèle permettant de décrire très correctement le processus d'extraction en tenant compte des deux régimes, comme en témoigne les valeurs des erreurs relatives rapportées dans le tableau 3.8. La déviation importante par rapport aux valeurs expérimentales observée à  $P = 104$  bars et 1,5 ml/min. est un cas particulier que nous n'avons rencontré que pour cette expérience.

### 3.1.1.1.3.2.3 Conclusion

La modélisation mathématique a été effectuée en deux étapes :

- en appliquant le système d'équations 1 non simplifié avec une résolution numérique (**SMN**), en adoptant une expression du flux de transfert de matière donnée par le modèle de Cygnarowicz et un modèle que nous avons proposé au cours de cette étude,
- en appliquant le système d'équations 1 simplifié avec des solutions analytiques (**SM1, SM2, SM3**) et un modèle empirique **SME**.

Le modèle **SMN** semble pouvoir décrire parfaitement le processus d'extraction en utilisant l'expression adaptée du flux de transfert de matière et en adoptant une technique d'optimisation rigoureuse qui permettrait la recherche du bon minimum. Dans ce travail, nous avons appliqué le modèle de Cygnarowicz et un modèle que nous avons proposé. Ce dernier semble apporter des résultats plus intéressants dans la simulation des données cinétiques expérimentales. Nous avons adopté un schéma de discrétisation explicite (schéma de Lax-Wendroff) parce que le schéma implicite (bien que inconditionnellement stable) a montré un phénomène de diffusion numérique. Comme perspectives, nous pensons qu'il serait intéressant de développer un schéma implicite adapté à ce problème qui permettrait d'éviter le phénomène de diffusion numérique. Il serait judicieux, également, d'appliquer des méthodes d'optimisation plus rigoureuses.

L'application des modèles analytiques simplifiés (**SM1, SM2, SM3**) et le modèle empirique **SME** permet de représenter, relativement bien, le processus d'extraction en fonction des conditions opératoires. Le modèle **SM3** souvent utilisé dans la modélisation de la cinétique d'extraction, reste à notre avis un bon modèle, valable dans un large domaine de conditions expérimentales.

### 3.1.2 Hydrodistillation assistée aux micro-ondes

L'appareillage utilisé est un four à micro-ondes focalisées de type Discover, d'une puissance maximale de 300 W (l'un des systèmes de dernière génération mis en œuvre par la société CEM), équipé d'un modulateur de puissance et d'un capteur infrarouge pour la mesure de température. Il peut contenir des extracteurs de volume allant jusqu'à 125 ml. L'hydrodistillation est réalisée en utilisant un extracteur en verre de 100 ml surmonté d'un système de Dean-Starck et d'un réfrigérant permettant la condensation et la récupération de la fraction volatile (figure 3.21).



Figure 3.21 : Système d'hydrodistillation assistée aux micro-ondes

#### 3.1.2.1 Conditions opératoires

L'hydrodistillation est effectuée sur l'extrait étheré de *Dictyopteris membranacea* (concrète). Avant d'effectuer l'étude cinétique, nous avons procédé à l'optimisation de deux paramètres : la puissance de chauffe et le rapport de la masse d'extrait sur le volume d'eau utilisé. En se fixant un temps d'extraction de 5 min. et un volume d'eau d'entraînement de 50 ml, nous avons étudié la variation du rendement d'hydrodistillation en fonction de la puissance de chauffe qu'on a fait varier de 100 à 260 watts. Le rendement maximal  $Y_{\max}$  a été obtenu pour une puissance de 180 W (le rendement est le rapport de la masse de fraction volatile obtenue sur la masse d'extrait étheré utilisé). En se fixant une puissance de 180 W, un temps d'entraînement de 5 min. et un volume d'eau de 50 ml, nous avons suivi l'évolution du rendement en fonction du rapport de la masse d'extrait étheré sur le volume d'eau utilisé. Les résultats obtenus montrent que le rapport de 56,2 mg d'extrait / 50 ml d'eau donne le meilleur rendement. En utilisant la valeur optimale du rapport de masse d'extrait au volume d'eau, une étude cinétique a été effectuée aux puissances de 120, 180 et 240 watts. Les données cinétiques expérimentales ont été représentées par un modèle empirique (**SME**, Eq.17). La figure 3.22 montre la variation du rendement en fonction du temps pour les trois puissances de chauffe et leur simulation par le modèle empirique. Les valeurs des paramètres du modèle empirique  $Y_{\infty}$  et  $b$  sont données dans le tableau 3.9.

Tableau 3.9 : Paramètres du modèle empirique

Puissance (w)	120	180	240
$Y_{\infty}$	0,213	0,144	0,209
b	28,04	3,83	42,59

### 3.1.3 Hydrodistillation à la vapeur d'eau

Cette technique bien que très ancienne reste une technique de choix pour la préparation des huiles essentielles et autres fractions volatiles. L'objectif de cette étude est de préparer une fraction volatile à partir de l'extrait éthéré de *Dictyopteris membranacea* et de comparer sa composition chimique à celles des fractions volatiles obtenues par hydrodistillation assistée aux micro-ondes et par extraction au dioxyde de carbone supercritique. Le travail expérimental a été effectué avec un montage de Dean-Starck modifié (figure 3.23) conduisant à un rendement de **12,87 %** (par rapport à l'extrait éthéré).

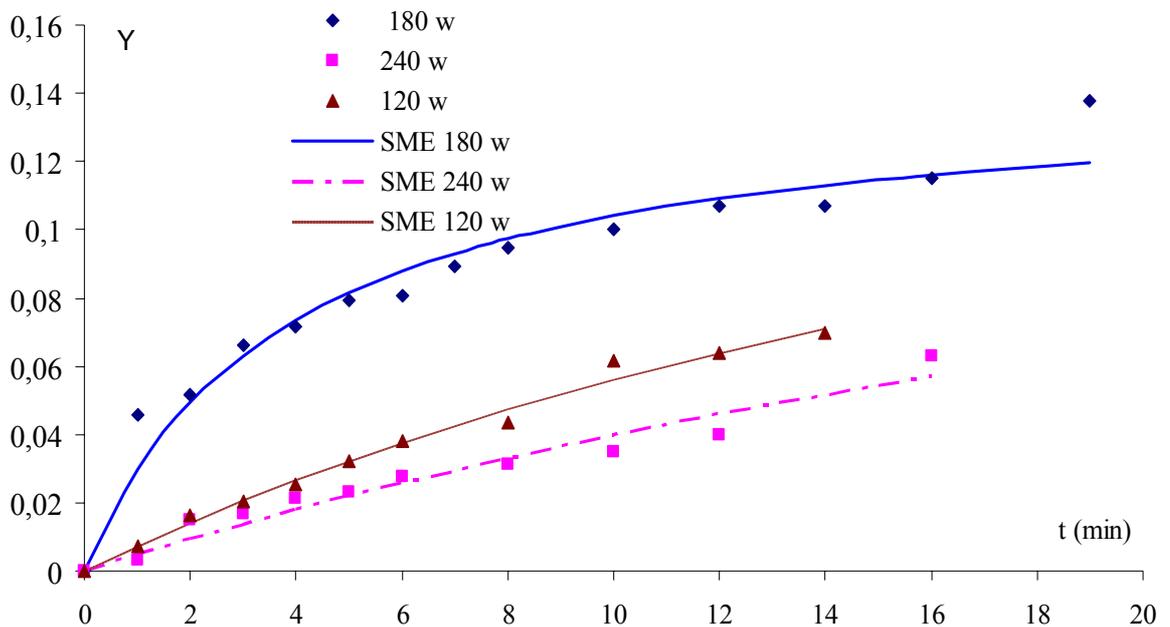


Figure 3.22 : Variation du rendement en fonction du temps (simulation par le modèle empirique)



Figure 3.23 : Montage utilisé dans l'hydrodistillation

### 3.1.4 Conclusion

La comparaison des trois techniques de préparation des fractions volatiles permet de faire les conclusions suivantes :

- L'intérêt de l'utilisation du dioxyde de carbone supercritique comme solvant réside dans ses propriétés dissolvantes « modulables ». Le pouvoir solvant peut être grandement influencé en fonction des conditions expérimentales notamment la pression d'extraction. Il s'ensuit que le choix des conditions opératoires permet de prévoir la nature chimique de l'extrait obtenu. De plus, le haut pouvoir solvant du dioxyde de carbone supercritique permet de réaliser une extraction exhaustive, à condition de maîtriser les conditions de piégeage; c'est ce qui explique les rendements élevés obtenus. Il faut ajouter, également, que la technique opère souvent à basses températures, ce qui favorise l'extraction de produits thermolabiles.
- L'hydrodistillation assistée aux micro-ondes focalisées (FMAH) est une technique rapide, l'entraînement des produits est réalisée en un temps relativement bref (5 à 10 min.), ce qui permet d'éviter leur dégradation. La nature du chauffage, basé sur l'aptitude d'un produit à absorber l'énergie micro-ondes et à la transformer en chaleur, influence la nature chimique de l'extrait obtenu. C'est un chauffage qui est effectué au cœur du système et permet d'éviter les surchauffes dues au transfert de chaleur par conduction. On devrait s'attendre à ce que tous les produits polaires soient extraits, cependant des phénomènes complexes d'interaction entre

constituants peuvent intervenir conduisant uniquement à l'extraction de produits de polarité moyenne. Précisons également que cette technique permet d'obtenir des rendements intéressants en produits volatils.

- L'hydrodistillation à la vapeur d'eau classique présente l'intérêt d'être une technique simple à mettre en œuvre et très pratique. Cette technique appliquée à la concrète permet généralement d'obtenir des rendements supérieurs à ceux l'hydrodistillation à partir de la matière végétale. L'opération d'hydrodistillation est assez longue (environ une heure), ce qui est la cause de dégradation de certains produits sous l'effet de la chaleur. L'entraînement des produits est guidé dans ce cas par leur volatilité.

Au niveau du rendement d'obtention des produits volatils de *D. membranacea* à partir de la concrète (extrait étheré), on a obtenu les résultats suivants dans les conditions optimales de ces trois techniques :

- extraction par le CO<sub>2</sub> supercritique : 15,40 % de la concrète (P = 91 bars ; 30 min) ; 25,00 % de la concrète (P = 104 bars ; 30 min.),
- hydrodistillation assistée aux micro-ondes : 13,00 % de la concrète (10 min.),
- hydrodistillation à la vapeur d'eau : 12,87 % de la concrète (45 min.).

### 3.2 Etude analytique des différentes fractions volatiles

L'objectif de cette étude est le dosage quantitatif des constituants de la fraction volatile de *Dictyopteris membranacea* récoltée sur les côtes algériennes obtenue par les trois techniques d'extraction. La fraction volatile de la même espèce récoltée sur les côtes atlantiques a également fait l'objet d'une étude analytique qualitative comparative. Cette étude comporte quatre parties :

- la première concerne le dosage quantitatif par étalonnage interne des constituants des fractions volatiles obtenues, respectivement, par hydrodistillation à la vapeur d'eau, par hydrodistillation assistée aux micro-ondes et par extraction au dioxyde de carbone supercritique,
- la seconde a trait au dosage quantitatif par étalonnage externe des constituants des fractions volatiles obtenues au cours de l'étude cinétique de l'extraction, respectivement, par le dioxyde de carbone supercritique et par hydrodistillation assistée aux micro-ondes.
- la troisième est consacrée à l'étude analytique comparative de la fraction volatile de la *Dictyopteris membranacea* récoltée sur les côtes atlantiques obtenue par deux

techniques à savoir, l'hydrodistillation classique et l'hydrodistillation assistée aux microondes.

- La quatrième est réservée à une discussion théorique très brève de la procédure d'agrandissement de l'échelle de l'extracteur « scaling up ».

L'analyse a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) sur un chromatographe HP-6890 couplé à un spectromètre de masse HP 5972. Concernant la fraction volatile de *Dictyopteris membranacea* méditerranéennes, la séparation est réalisée sur une colonne de type CP-Sil 8 CB lowbleed/MS (250 µm x 30 m x 0,25 µm avec 5 % phényl 95 % dimethylpolysiloxane) utilisée en mode split (1/90) (avec division) et en programmation de température de 90 °C (3 min.) à 220°C (10 min.) à raison de 3°C/min.

### 3.2.1 Détermination de la composition chimique des fractions volatiles par étalonnage interne

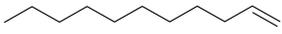
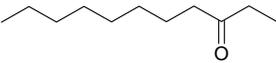
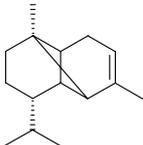
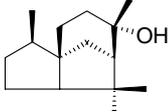
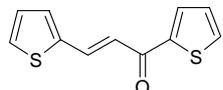
Cette étude a pour but de comparer la composition chimique quantitative des trois fractions volatiles obtenues par :

- l'hydrodistillation à la vapeur d'eau,
- l'extraction au dioxyde de carbone supercritique à la pression de 91 et 104 bars et à un débit de 1 ml/min,
- l'hydrodistillation assistée aux micro-ondes à une puissance de 180 watts.

Les appareils utilisés dans les trois techniques sont décrits, respectivement, dans les paragraphes 3.1.3, 3.1.1.1 et 3.1.2.

Le dosage quantitatif a été effectué par étalonnage interne en utilisant, en tant que standards des constituants de la fraction volatile, des produits commerciaux (de grade analytique) choisis sur la base de leur similitude chimique (même famille structurale) avec les produits à doser (tableau 3.10). L'étalon interne a été choisi en fonction de son temps de rétention, car il est impératif qu'il soit élué de façon à ne pas interférer avec un produit de la fraction volatile. La figure 3.24 montre le profil chromatographique de la fraction volatile de *Dictyopteris membranacea* sans (a) et avec (b) étalon interne. L'investigation menée sur un certain nombre de produits nous a révélé que le undéc-10-èn-1-ol est bien adapté à cette étude.

Tableau 3.10 : Standards utilisés et produits à doser

Standards et concentration de leur solution mère	Produits à doser
Undéc-1-ène (C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> ) 	Hydrocarbures en C-11
Undécan-3-one (C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O) 	Deux cétones provenant de deux produits soufrés et dérivés oxygénés en C-11
α-Copaène (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> ) 	Hydrocarbures sesquiterpéniques
Cédrol (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O) 	Sesquiterpènes oxygénés
Acide tétradécanoïque (C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> )	Acide tétradécanoïque, alcanes et autres produits minoritaires élués dans la même zone du chromatogramme
Acide hexadécanoïque (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	Acide hexadécanoïque et dérivés élués dans la même zone
1,3-Di-[2-thienyl]-1-oxoprop-2-ène (C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> OS <sub>2</sub> ) 	3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone

Fraction volatile obtenue par hydrodistillation  
assistée aux micro-ondes (FMAH)

90 (3 min.) – 3°C/min – 220 (10 min.)

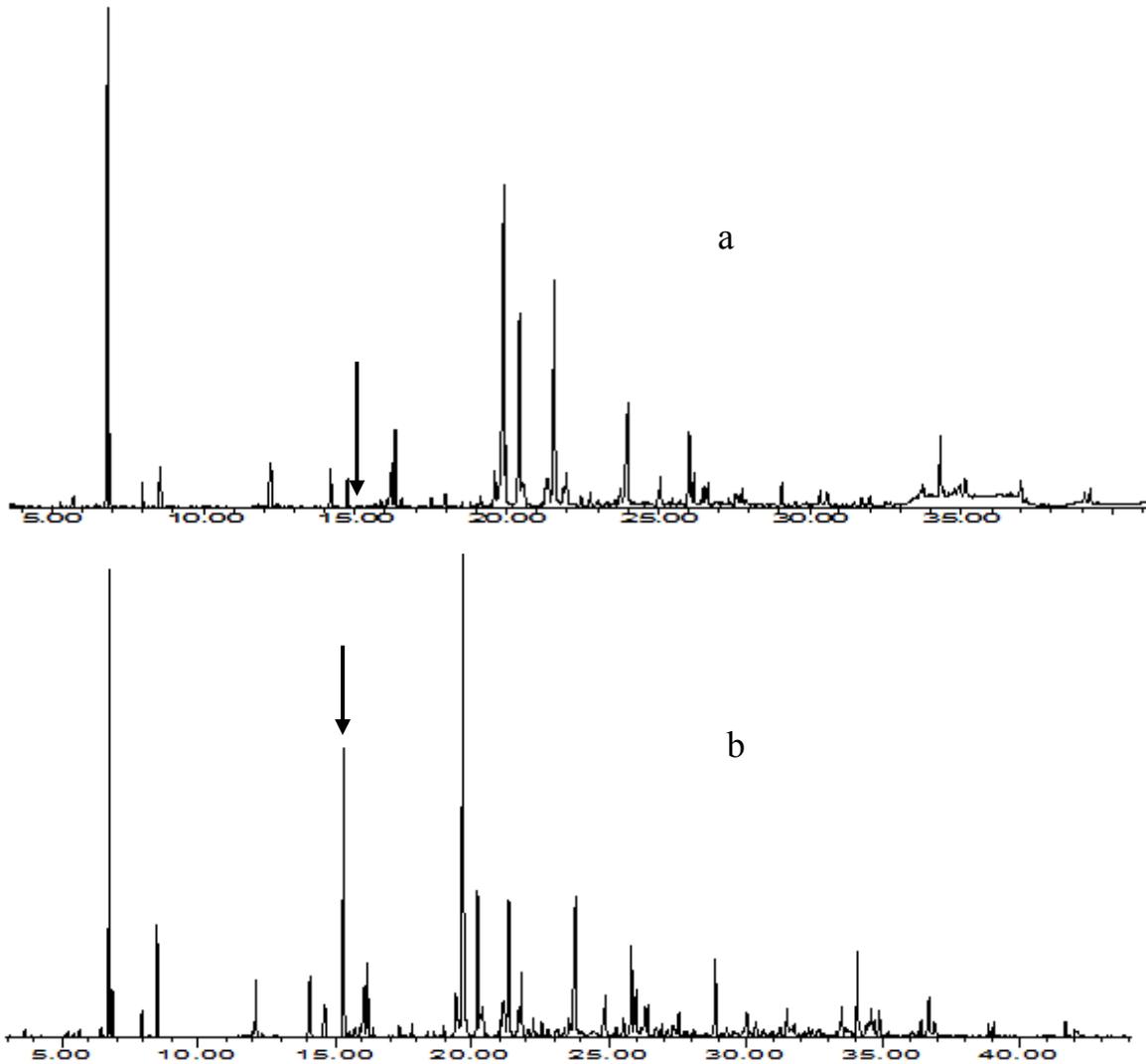


Figure 3.24 : (a) Chromatogramme de la fraction volatile de *Dictyopteris membranacea* sans étalon interne. (b) Chromatogramme avec étalon interne.

### 3.2.1.1 Etude analytique qualitative

L'identification des différents produits de la fraction volatile a été effectuée en se basant sur les banques de données spectrales : NIST-NBS75k, Wiley 7n et Mass Finder 3 (version 2003) ainsi que sur les données de la littérature concernant des produits purs isolés. Nous présentons dans les tableaux 3.11 et 3.12 les produits identifiés avec leur ordre d'éluion, leur temps de rétention et les références utilisées pour leur identification. Le tableau 3.11

rassemble les constituants des fractions volatiles obtenues par hydrodistillation à la vapeur d'eau et par extraction au dioxyde de carbone supercritique (ces deux fractions présentent la même composition sur le plan qualitatif). Le profil chromatographique, commun aux deux fractions, est donné dans la figure 3.25-a. Le tableau 3.12 regroupe les constituants de la fraction volatile obtenue par hydrodistillation assistée aux micro-ondes, dont le profil chromatographique est donné dans la figure 3.25-b.

La composition chimique des fractions volatiles obtenues par hydrodistillation à la vapeur d'eau et par extraction au dioxyde de carbone supercritique (tableau 3.11) renferme une série d'hydrocarbures à 11 atomes de carbone, dominée par le dictyoptérène A (**3** planche 3.1), une série de produits soufrés et dérivés avec la 3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone (**21** planche 3.1) comme constituant majoritaire et une série de produits lipidiques constitués de paraffines, d'acides gras et dérivés. La composition chimique obtenue par hydrodistillation assistée aux micro-ondes (tableau 3.12) est caractérisée par la présence surprenante d'une série de sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés (totalement absente dans les deux autres fractions), avec comme constituant majoritaire l'albicanol (**20** planche 3.2) suivi du zonarène (**24** planche 3.2). Elle renferme en outre, une série moins intense d'hydrocarbures à 11 atomes de carbone ainsi qu'une faible teneur en produits soufrés.

La présence de produits sesquiterpéniques dans la fraction volatile obtenue par hydrodistillation assistée aux micro-ondes est due, probablement, au mécanisme d'entraînement qui est basé, dans cette technique, sur l'aptitude des produits à absorber l'énergie micro-onde et à la transformer en chaleur. Dans l'hydrodistillation classique, l'entraînement des produits est différent, il résulte d'un chauffage par conduction qui provoque une augmentation de leur pression (tension) de vapeur et par conséquent leur entraînement dans le courant de vapeur. L'extraction par le dioxyde de carbone supercritique est basée, pour sa part, sur la solubilité des produits dans le CO<sub>2</sub>, la sélectivité des composés extraits est liée à la pression d'extraction (elle-même liée à la densité du fluide).

90°C (3min.) – 3°C/min – 220°C (10min.)

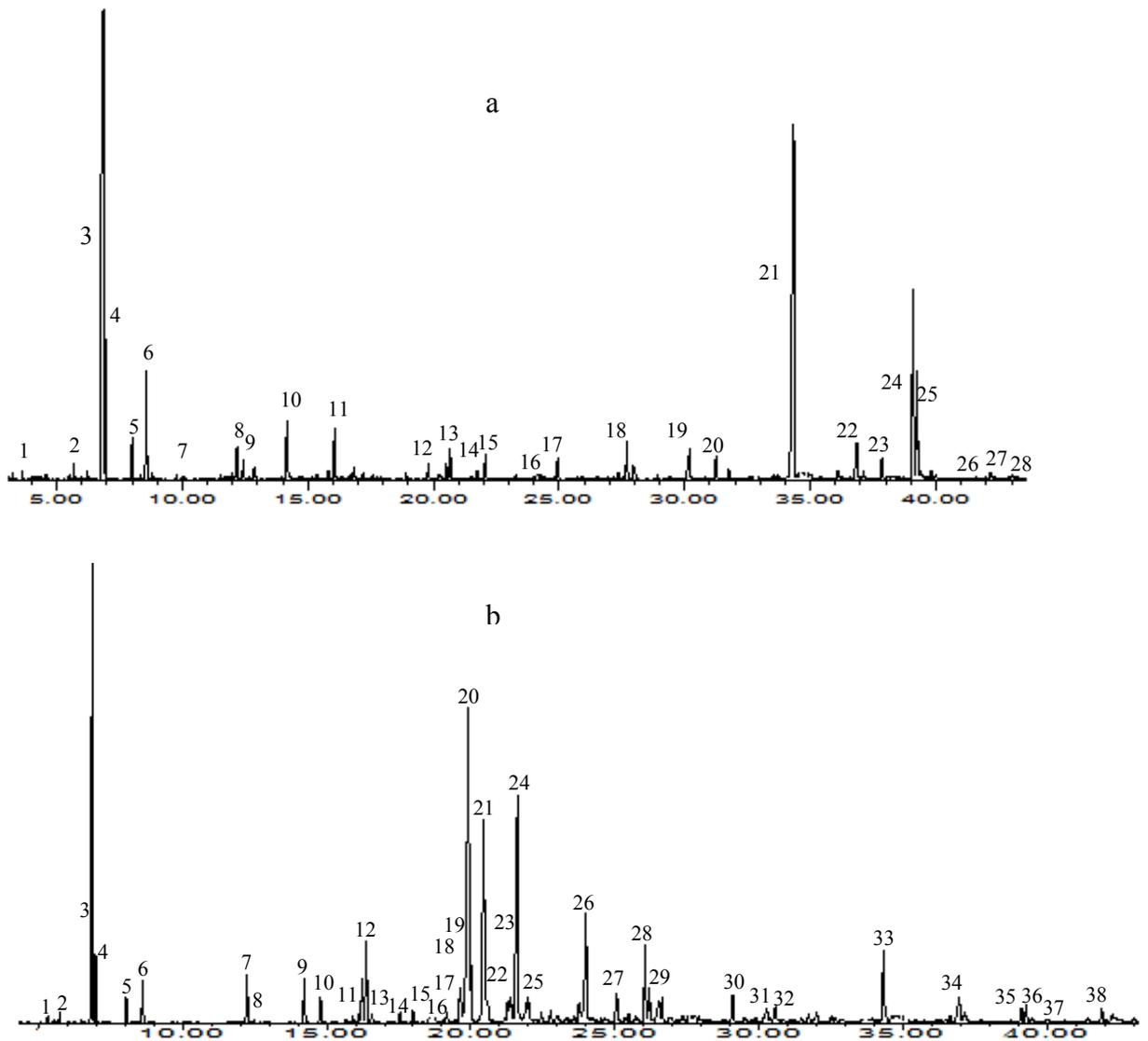


Figure 3.25 : Profil chromatographique de la fraction volatile obtenue par :  
 (a) hydrodistillation et par le dioxyde de carbone supercritique  
 (b) hydrodistillation assistée aux micro-ondes

Tableau 3.11 : Analyse qualitative des fractions volatiles obtenues par hydrodistillation et par le dioxyde de carbone supercritique

Ordre d'élution	Temps de rétention (min)	Produits	Identification
1	3,61	hept-2-ènal	Wiley7n, NBS 75k
2	5.70	3-butyl-4-vinylcyclopentène	Wiley 7n, [147]
3	6.70	dictyoptèrene A	Wiley 7n, [167] [171]
4	6.90	3-(hex-1-ènyl) cyclopentène	Wiley 7n, [174] [187]
5	8.00	6-(but-1-ènyl)cyclohepta-1,4-diène	Wiley 7n, [174] [187]
6	8.57	6-butylcyclohepta-1,4-diène	Wiley 7n, [174] [187]
7	10,00	undéca-1,3,5-triène	Wiley 7n, [187]
8	12,17	undéc-1-èn-3-one	[164]
9	12,40	undécan-3-one	Wiley7n, NBS 75k
10	14.19	undéca-1,4-dièn-3-one	[164]
11	15.95	dictyoprolène	[159] [161]
12	19,67	undeca-2,4,6-triène	Wiley 7n, [187]
13	20,49	pentadécane	Wiley7n, NBS 75k
14	21,60	(3-oxoundecyl) sulfure	[164]
15	21,75	5,6,7,7a tetrahydro-4,4,7a-trimethyl 2(4H)-benzofuranone	Wiley7n, NBS 75k
16	24,29	acide dodécanoïque	Wiley7n, NBS 75k
17	24,90	(3-oxoundec-4-ènyl) sulfure	[164]
18	27,55	octadéc-5-ène	Wiley7n, NBS 75k
19	30,10	acide tétradécanoïque	Wiley7n, NBS 75k
20	31,25	pentadécanoate d'éthyle	Wiley7n, NBS 75k
21	34,20	3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone	[164] [166]
22	36,70	acide hexadécanoïque	Wiley7n, NBS 75k
23	37,83	hexadécanoate d'éthyle	Wiley7n, NBS 75k
24	38,92	eicosa-5,8,11,14-tetraènoate de méthyle	Wiley7n, NBS 75k
25	39,08	eicosa-5,8,11,14,17-pentaènoate de méthyle	Wiley7n, NBS 75k
26	41,20	phytol	Wiley7n, NBS 75k
27	41,80	octadéca-9,12-diènoate de méthyle	Wiley7n, NBS 75k
28	42,10	acide octadéc-9-énoïque	Wiley7n, NBS 75k

Les produits Undéc-1-èn-3-one (**8**) et Undéca-1,4-dièn-3-one (**10**) correspondent en réalité aux produits soufrés (3-oxoundecyl)-thioacétate et (3-oxoundéc-4-ényl)-thioacétate [164] qui par perte d'un groupement thioacétate (figure 3.26) conduisent à ces deux cétones. Le même type de constatation peut être observé pour le (3-oxoundecyl) sulfure (**14**) et le (3-oxoundec-4-ényl) sulfure (**17**) qui proviennent, respectivement, des produits bis-(3-oxoundecyl) disulfure et du bis-(3-oxoundec-4-ényl) disulfure (figure 3.26) par rupture homolytique de la liaison S-S.

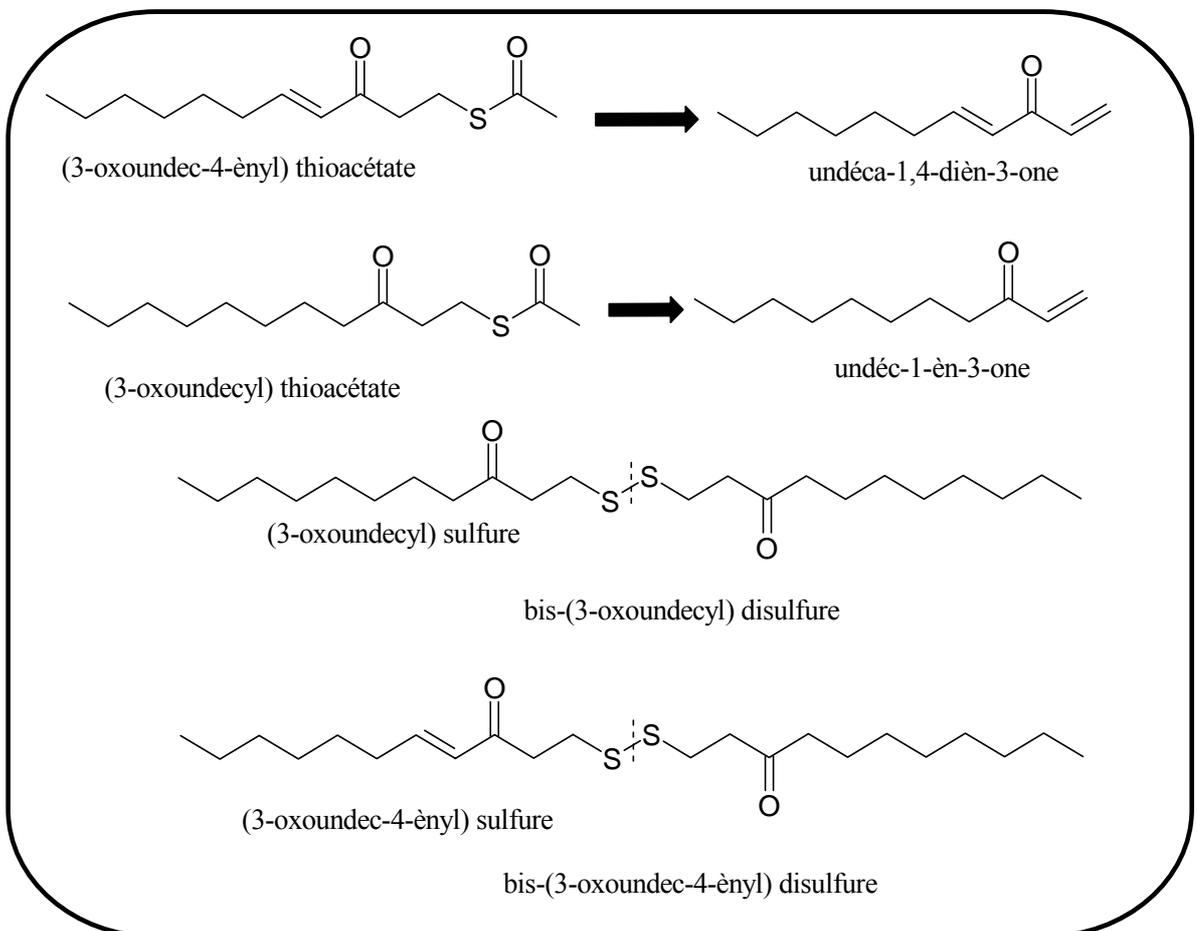


Figure 3.26 : Produits soufrés et leurs dérivés obtenus en CG/SM [164]

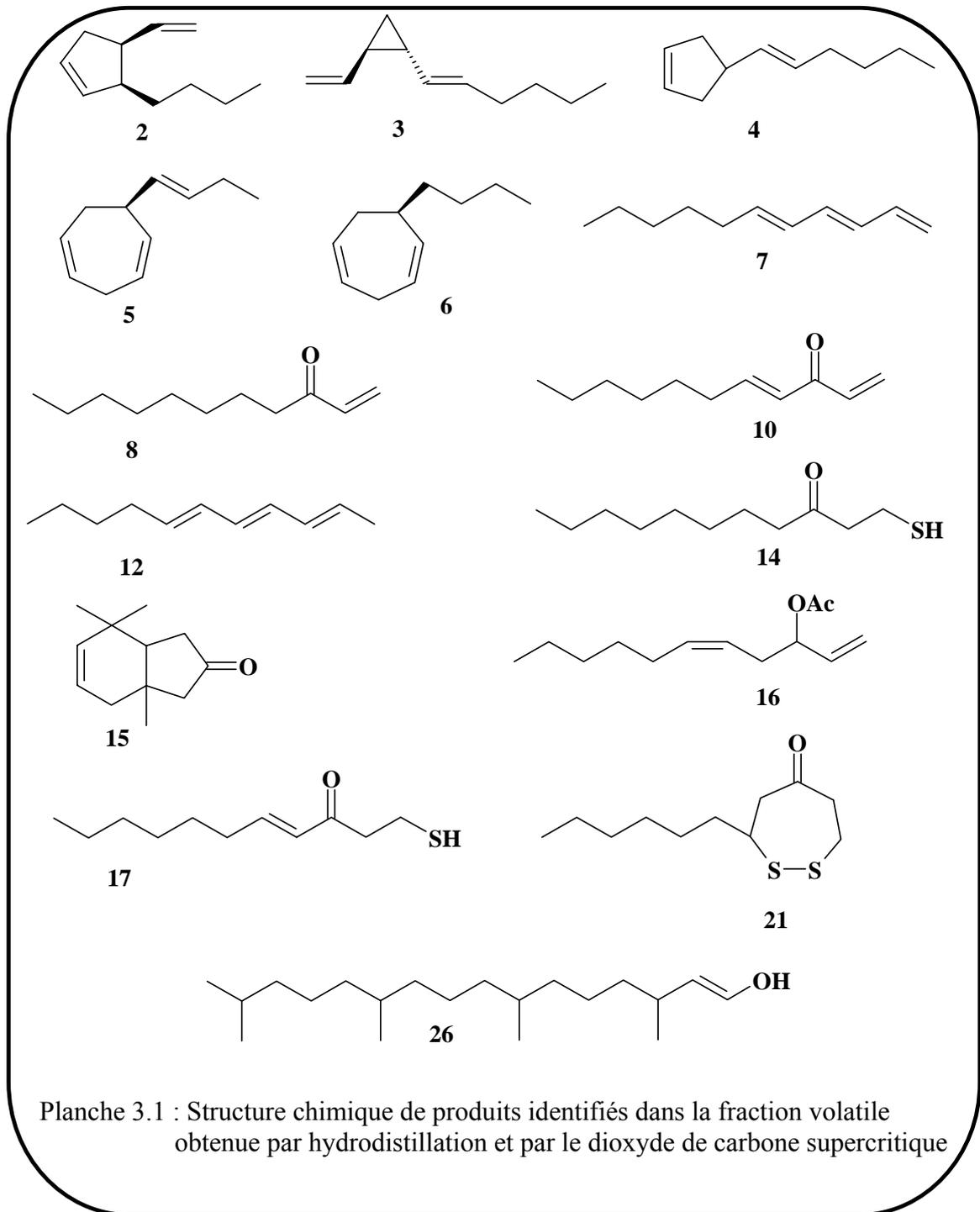


Planche 3.1 : Structure chimique de produits identifiés dans la fraction volatile obtenue par hydrodistillation et par le dioxyde de carbone supercritique

Tableau 3.12 : Analyse qualitative de la fraction volatile obtenue par hydrodistillation assistée aux micro-ondes

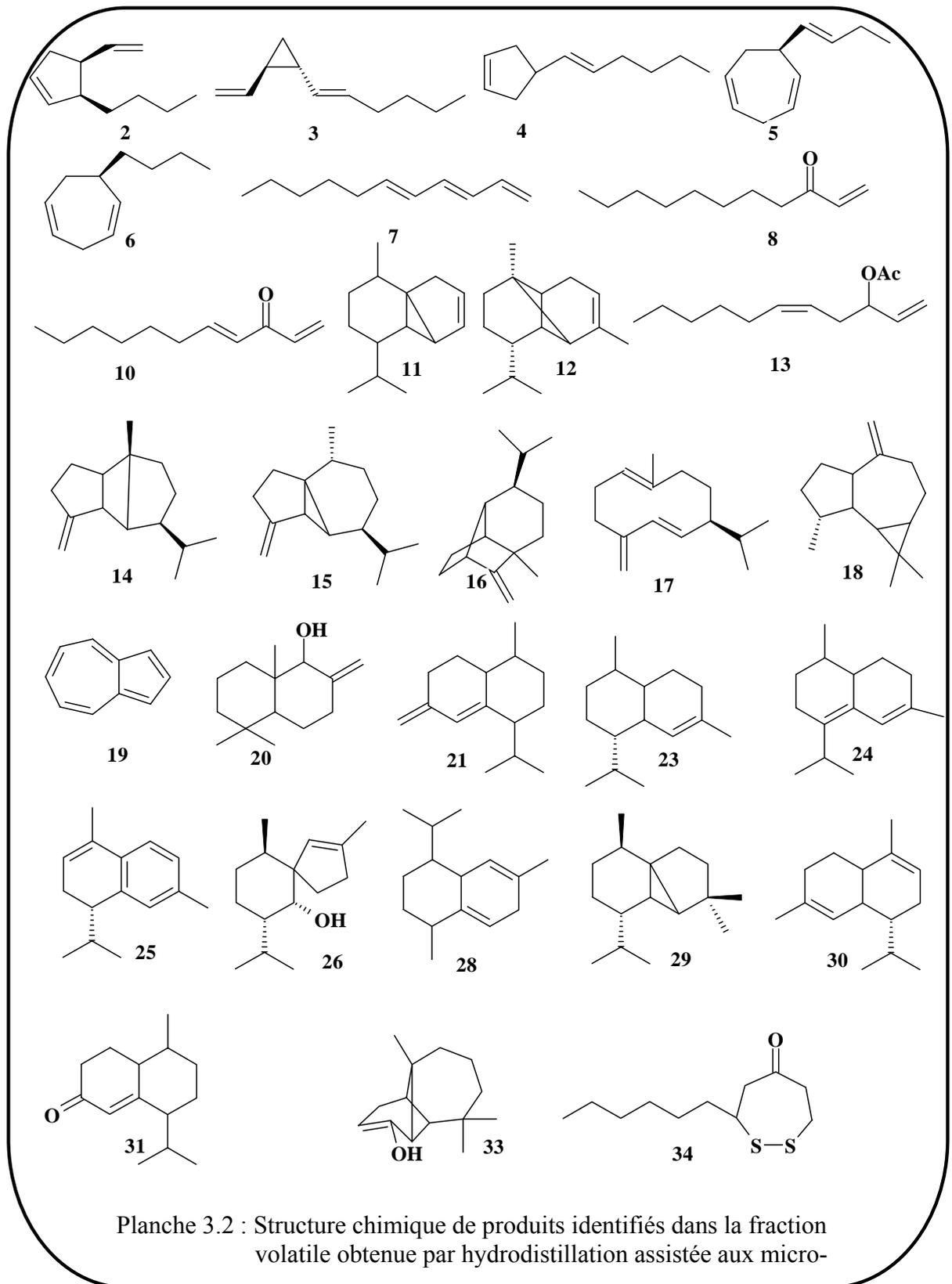
Ordre d'élution	Temps de rétention (min)	Produits	Identification
<b>1</b>	5,20	phénylétanal	Wiley7n, NBS 75k
<b>2</b>	5,70	3-butyl-4-vinylcyclopentène	Wiley 7n, [147]
<b>3</b>	6,70	dictyoptérène A	Wiley 7n, [167] [171]
<b>4</b>	6,90	3-(hex-1-ényl) cyclopentène	Wiley 7n, [174] [187]
<b>5</b>	8,00	6-(but-1-ényl) cyclohepta-1,4-diène	Wiley 7n, [174] [187]
<b>6</b>	8,57	6-butylcyclohepta-1,4-diène	Wiley 7n, [174] [187]
<b>7</b>	12,21	undéc-1-èn-3-one	[164]
<b>8</b>	12,40	undécan-3-one	Wiley7n, NBS 75k
<b>9</b>	12,85	dodéc-8-èn-1-al	Wiley7n, NBS 75k
<b>10</b>	14,19	undéca-1,4-dièn-3-one	[164]
<b>11</b>	14,7	$\alpha$ -Cububène	Mass Finder, Wiley 7n, [347]
<b>12</b>	15,87	$\alpha$ -Copaène	Mass Finder, Wiley 7n, [347]
<b>13</b>	16,09	dictyoprolène	[159] [161]
<b>14</b>	16,2	$\beta$ -bourbonène	Mass Finder, Wiley 7n, [347]
<b>15</b>	16,34	$\beta$ -cububène	Mass Finder, Wiley 7n, [347]
<b>16</b>	16,54	sativène	Mass Finder, Wiley 7n, [347]
<b>17</b>	17,8	germacrène-D	MassFinder, Wiley 7n, [347] [181]
<b>18</b>	18,98	aromadendrène	Mass Finder, Wiley 7n, [347]
<b>19</b>	19,42	azulène	Mass Finder, Wiley 7n, [347]
<b>20</b>	19,65	albicanol	Wiley 7n, Mass Finder
<b>21</b>	20,18	épi-bicyclosesquiphellandrène	Mass Finder, Wiley 7n, [347]
<b>22</b>	20,39	heptadécane	Wiley7n, NBS 75k
<b>23</b>	21,15	$\delta$ -cadinène	Mass Finder, Wiley 7n, [347]
<b>24</b>	21,33	zonarène	Mass Finder, Wiley 7n, [347]
<b>25</b>	21,79	$\alpha$ -calacorène	Mass Finder, Wiley 7n, [347]

<b>26</b>	23,75	axenol (gleenol)	Mass Finder, Wiley 7n, [348], [347]
<b>27</b>	25,06	<b>M = 220</b>	<b>Non identifié</b>
<b>28</b>	25,29	1,2,3,4,4a,7-hexahydro-1,6-diméthyl-4-(1-méthylethyl) Naphtalène	Wiley 7n, [347]
<b>29</b>	25,82	1,10-di-épi-cubébol	[348], [180], [349], Wiley 7n
<b>30</b>	26,20	$\alpha$ -amorphène	Mass Finder, Wiley 7n, [347]
<b>31</b>	28,87	4,4a,5,6,7,8-hexahydro-5-méthyl-8-(1-méthyléthyl)-2(3H) naphtalénone	Wiley 7n
<b>32</b>	30,36	acide tétradécanoïque	Wiley7n, NBS 75k
<b>33</b>	30,55	vulgarol	Mass Finder, Wiley 7n, [347]
<b>34</b>	34,33	3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone	[164] [166]
<b>35</b>	37,00	acide hexadécanoïque	Wiley7n, NBS 75k
<b>36</b>	39,00	eicosa-5,8,11,14-tetraénoate de méthyle	Wiley7n, NBS 75k
<b>37</b>	39,27	octadeca-9,12,15-trienoate de méthyle	Wiley7n, NBS 75k
<b>38</b>	41,91	acide octadéc-9-énoïque	Wiley7n, NBS 75k

Le produit 27, non identifié, présente la fragmentation suivante : 220 (9,25 %) ; 202 (6,07 %) ; 177 (100 %) ; 159 (49,52 %) ; 145 (39,24 %) ; 131 (56,41 %) ; 105 (61,38 %) ; 91 (66,18 %) ; 55 (50 %) ; 43 (67,80 %). MassFinder 3 donne la structure du  $1\alpha,10\alpha$ -Epoxyamorph-4-ène (M = 220) avec un taux de similarité de 32 (dans cette banque de données un taux de similarité supérieur ou égal à 40 est acceptable). Wiley 7n donne la structure du 4,4-diméthyl-3-(3-méthylbut-3-enylidène) (M = 202) avec un taux de similarité de 83 %. En fait, il s'agit probablement d'un alcool sesquiterpénique qui par perte d'une molécule d'eau donne le pic à  $m/z = 202$ .

### 3.2.1.2 Etude analytique quantitative

Le dosage quantitatif par étalonnage interne nécessite tout d'abord l'établissement des droites d'étalonnage en faisant intervenir les concentrations des standards ( $C_{st}$ ) et de l'étalon interne ( $C_{ei}$ ), ainsi que leurs aires sur le chromatogramme. Le tracé consiste en une représentation du rapport des concentrations  $C_{st}/C_{ei}$  en fonction du rapport des aires  $A_{st}/A_{ei}$ . Ce tracé, compte tenu du calcul des grandeurs statistiques (telle que la déviation relative standard  $rsd$ ), a nécessité la réalisation de cinq points expérimentaux, chaque point représentant la moyenne de trois analyses. Le tableau 3.13



regroupe les équations des droites d'étalonnage (Appendice E), la déviation relative standard et la limite de détection des différents standards utilisés. La concentration de l'étalon interne utilisée est de **10 mg/ml** dans l'acétate d'éthyle (solution mère).

Tableau 3.13 : Droites d'étalonnage, déviation relative standard et limite de détection des différents standards

Standards et la concentration de la solution mère (mg/ml)	Equation des droites d'étalonnage et carré du coefficient de corrélation	Déviation relative standard (rsd)	Limite de détection $\delta$
Undéc-1-ène C = 26 mg/ml	$y = 0,9584 x - 0,0096$ $R^2 = 0,999$	0,00465	0,00436
Undéc-3-one C = 3 mg/ml	$y = 1,1804 x - 0,0023$ $R^2 = 0,999$	0,00459	0,00087
$\alpha$ -Copaène C = 3,2 mg/ml	$y = 1,0812 x - 0,0029$ $R^2 = 0,999$	0,00165	0,00026
Cédrol C = 2,7 mg/ml	$y = 1,1611 x + 0,004$ $R^2 = 0,999$	0,00034	0,00503
Acide tétradécanoïque C = 3 mg/ml	$y = 1,7926 x + 0,0235$ $R^2 = 0,999$	0,00222	0,03011
1,3-di-[2-thienyl]-1-oxoprop-2-ène C = 3,4 mg/ml	$y = 2,2804 x + 0,0094$ $R^2 = 0,999$	0,00619	0,02798
Acide hexadécanoïque C = 3 mg/ml	$y = 1,5821 x + 0,0241$ $R^2 = 0,999$	0,07480	0,24920

$$y = \frac{C_{st}}{C_{ei}} \text{ et } x = \frac{A_{st}}{A_{ei}} \quad \text{rsd} = \frac{\sqrt{\sum (y_{\text{droite}} - y_{\text{exp}})^2}}{n - 2} \quad n: \text{ nombre de points expérimentaux}$$

$$\delta = 3 * \text{rsd} + c \quad \text{avec } c : \text{ ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage}$$

La concentration de la solution mère en étalon interne est de 10 mg/ml d'acétate d'éthyle, la concentration moyenne des solutions mères des différentes fractions volatiles est de 250 mg/ml (dans l'acétate d'éthyle). Des expériences préliminaires nous ont permis de déterminer, d'une part, les volumes de solution d'étalon interne et de fractions volatiles à mélanger et, d'autre part, les dilutions à effectuer pour que la concentration moyenne des constituants de la fraction volatile soit dans le domaine de concentration des droites d'étalonnage. Les solutions (fractions volatiles/étalon interne) injectées au cours du dosage ont été préparées en mélangeant un volume donné de solution mère de chaque fraction volatile avec un volume donné de solution mère de l'étalon interne, ce qui correspond à une solution de fraction volatile de concentration **125 mg/ml** et à une solution d'étalon interne de **5 mg/ml**.

En ce qui concerne l'analyse quantitative, les deux tableaux 3.14 et 3.15 regroupent la composition massique (**pourcentage massique : mg de produit / 100 mg de fraction volatile**), correspondant à la moyenne de quatre analyses, et la précision du dosage (fidélité) pour chaque produit. La fidélité<sup>(\*)</sup> exprime en fait la dispersion autour de la valeur moyenne.

Les fractions volatiles dosées : **FVH** (fraction volatile obtenue par hydrodistillation) ; **SFCD** (fraction volatile obtenue par extraction au dioxyde de carbone supercritique à P = 91 et 104 bars) ; **FMAH** (fraction volatile obtenue par hydrodistillation assistée aux micro-ondes) ont été obtenues dans les conditions suivantes :

- Extraction de la concrète à l'éther à partir de l'algue sèche ( $\eta = 1,2 \%$ ),
- **FVH** : hydrodistillation de la concrète à la vapeur d'eau (t = 45 min;  $\eta = 12,8 \%$ ),
- **SFCD** : extraction de la concrète au dioxyde de carbone supercritique (P = 91 bars; t = 30 min;  $\eta = 15,4 \%$ ; P = 104 bars; t = 30 min;  $\eta = 25 \%$ ),
- **FMAH** : hydrodistillation de la concrète sous micro-ondes (P = 180 w; t = 10 min;  $\eta = 13 \%$ ).

(\*) Soit  $\bar{x}$  la valeur moyenne de n analyses,  $\sigma$  l'écart type et  $\sigma_m$  l'écart type moyen

$\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ , t : facteur fourni par la table de fischer en considérant un intervalle

de confiance de 95 %. Pour  $n = 4$ ,  $N = n - 1$  et  $t = 3,182$

La fidélité est définie comme étant :  $\frac{\sigma_m t}{\bar{x}} 100$

Tableau 3.14 : Analyse quantitative des fractions volatiles obtenues hydrodistillation (FVH) et par le dioxyde de carbone supercritique (SFCD)

Ordre d'élu-tion	Fraction volatile Produits	FVH		SFCD (104 bars)		SFCD (91bars)	
		% mass	Pré-ci-sion %	% mass	Pré-ci-sion %	% mass	Pré-ci-sion %
1	hept-2-énal	0,035	0,878	trace	trace	trace	trace
2	3-butyl-4-vinyl cyclopentène	trace	trace	trace	trace	trace	trace
3	dictyoptérène A	27,804	0,022	13,644	0,039	5,215	0,054
4	3-(hex-1-enyl) cyclopentène	1,278	0,120	0,422	0,051	0,094	0,292
5	6-(but-1-ényl)cyclohepta-1,4-diène	0,721	0,101	1,090	0,024	0,119	0,273
6	6-butylcyclohepta-1,4-diène	8,332	0,285	4,330	0,020	1,563	0,337
7	undéca-1,3,5-triène	0,633	0,245	trace	trace	trace	trace
8	undéc-1-èn-3-one	1,292	0,175	0,869	0,197	1,480	0,136
9	undécan-3-one	0,682	0,174	trace	trace	trace	trace
10	undéca-1,4-dièn-3-one	4,383	0,166	1,855	0,225	3,188	0,434
11	dictyoprolène	1,375	0,032	0,701	0,039	0,670	0,111
12	undeca-2,4,6-triène	0,383	0,242	0,013	0,545	trace	trace
13	pentadécane	1,595	0,143	trace	trace	1,027	0,030
14	(3-oxoundecyl) sulfure	trace	trace	1,323	0,116	0,469	0,155
15	5,6,7,7a tetrahydro-4,4,7a-trimethyl 2(4H)-benzofuranone	trace	trace	trace	trace	0,348	0,269
16	acide dodécanoïque	1,694	0,057	1,134	0,081	1,476	0,220
17	(3-oxoundec-4-ényl) sulfure	1,065	0,031	3,301	0,032	2,871	0,101
18	octadéc-5-ène	2,468	0,033	trace	trace	1,906	0,020
19	acide tétradécanoïque	2,422	0,047	3,177	0,062	2,498	0,209
20	pentadécanoate d'éthyle	2,100	0,037	trace	trace	trace	trace
21	3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone	25,721	0,062	45,228	0,068	52,665	0,243
22	acide hexadécanoïque	2,228	0,153	5,028	0,093	3,106	0,608
23	hexadécanoate d'éthyle	1,859	0,044	trace	trace	trace	trace
24	eicosa-5,8,11,14-tetraénoate de méthyle	7,714	0,036	8,117	0,073	11,180	0,183
25	eicosa-5,8,11,14,17-pentaénoate de méthyle	4,218	0,055	4,636	0,068	6,450	0,172
26	phytol	trace	trace	1,377	0,082	1,074	0,194
27	octadéca-9,12-diénoate de méthyle	trace	trace	1,219	0,074	0,924	0,059
28	acide octadéc-9-énoïque	trace	trace	2,535	0,149	1,675	0,279

Tableau 3.15 : Analyse quantitative de la fraction volatile obtenue par hydrodistillation assistée aux micro-ondes (FMAH)

Ordre d'élution	Produits	% Mass	Précision
1	phényléthanal	trace	“
2	3-butyl-4-vinylcyclopentène	trace	“
3	dictyoptérène A	10,4046	0,0462
4	3-(hex-1-ènyl) cyclopentène	0,5964	0,1482
5	6-(but-1-ènyl) cyclohepta-1,4-diène	0,0990	0,5834
6	6-butylcyclohepta-1,4-diène	2,1050	0,4819
7	undéc-1-èn-3-one	1,9152	0,0493
8	undécan-3-one	trace	“
9	dodéc-8-èn-1-al	0,0385	1,4659
10	undéca-1,4-dièn-3-one	1,8559	0,0497
11	$\alpha$ -Cububène	0,8507	0,1566
12	$\alpha$ -Copaène	0,1749	0,3649
13	dictyoprolène	0,1670	0,2266
14	$\beta$ -bourbonène	1,7236	0,0681
15	$\beta$ -cububène	2,7796	0,0564
16	sativène	0,0953	0,4480
17	germacrène-D	0,2991	0,2044
18	aromadendrène	0,2241	0,1534
19	azulène	1,6085	0,0361
20	albicanol	23,1174	0,0246
21	épi-bicyclosquiphellandrène	6,3045	0,0219
22	heptadécane	3,2512	0,0959
23	$\delta$ -cadinène	1,0485	0,1189
24	zonarène	5,5776	0,0391
25	$\alpha$ -calacorène	1,4892	0,1096
26	axenol (gleenol)	5,9849	0,1458
27	<b>M = 220</b>	1,4892	0,1096
28	1,2,3,4,4a,7-hexahydro-1,6-diméthyl-4-(1-méthylethyl) naphtalène	0,5423	0,1560
29	1,10-di-épi-cubébol	3,9447	0,0297
30	$\alpha$ -amorphène	1,3538	0,0978

<b>31</b>	4,4a,5,6,7,8-hexahydro-5-methyl-8-(1-methylethyl)-2(3H) naphtalénone	3,0021	0,0665
<b>32</b>	acide tétradécanoïque	2,5042	0,0688
<b>33</b>	vulgarol	2,3403	0,9694
<b>34</b>	3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone	4,7376	0,0265
<b>35</b>	acide hexadécanoïque	2,9119	0,0622
<b>36</b>	eicosa-5,8,11,14-tetraénoate de méthyle	1,8788	0,0565
<b>37</b>	octadeca-9,12,15-trienoate de méthyle	1,9118	0,0476
<b>38</b>	acide octadéc-9-énoïque	1,9158	0,0697

### 3.2.1.3 Discussion des résultats

L'examen des tableaux 3.14 et 3.15 permet de faire une constatation inattendue : la fraction volatile de *Dictyopteris membranacea* obtenue par hydrodistillation assistée aux micro-ondes (**FMAH**) renferme des sesquiterpènes, alors que cette famille de composés est complètement absente dans les fractions volatiles obtenues par le dioxyde de carbone supercritique (**SFCD**) et par hydrodistillation classique (**FVH**). D'une façon générale, la composition chimique des extraits obtenus à partir des espèces du genre *Dictyopteris* (Partie I & II.3.4) est caractérisée par la présence d'hydrocarbures à 11 atomes de carbone (phéromones sexuelles) et de produits soufrés [187]. Les sesquiterpènes n'ont été décrits que chez certaines espèces de *Dictyopteris* (principalement *divaricata* et *undulata*) récoltées sur les côtes japonaises [176-179]. L'espèce méditerranéenne *Dictyopteris membranacea* récoltée à Ville Franche sur mer (France) [166] contient des C-11 et en grande quantité le produit soufré : 3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone.

Notre étude a permis de montrer que la technique d'extraction utilisée peut influencer la composition chimique de la fraction volatile obtenue, en particulier, les sesquiterpènes sont entraînés sous l'effet des micro-ondes. L'hydrodistillation assistée aux micro-ondes présente donc un mécanisme d'extraction différent de celui de l'hydrodistillation classique. Il faut noter, également, que l'albicanol (**20** planche 3.2) est le produit majeur de la fraction sesquiterpénique, il n'aurait, jusqu'à présent, encore jamais été rencontré dans une espèce du genre *Dictyopteris*. De plus, certains sesquiterpènes hydrocarbonés, bien que connus chez les végétaux terrestres, sont décrits pour la première fois dans *D. membranacea*, il s'agit du  $\beta$ -Bourbonène (**14** planche 3.2), de l'azulène (**19** planche 3.2) et de l'axenol (**26** planche 3.2).

L'albicanol (**20** planche 3.2), un sesquiterpène oxygéné que l'on rencontre fréquemment dans le règne des végétaux terrestres, a été utilisé dans la synthèse de la cyclozonarone [350], un mérosesquiterpène identifié dans *Dictyopteris undulata* en même temps que le zonarène (**24** planche 3.2) (sesquiterpène). Cela nous a conduit à penser que l'albicanol (**20** planche 3.2) pourrait être le précurseur naturel du zonarène (**24** planche 3.2), sachant que la teneur du zonarène (**24** planche 3.2) est la plus importante de la fraction sesquiterpénique de l'huile essentielle obtenue par FMAH après celle de l'albicanol.

Notons aussi que la teneur du dictyoptérène A (le C-11 le plus abondant de cette espèce) est toujours relativement importante dans les trois fractions volatiles, mais à un degré moindre pour la fraction obtenue par le dioxyde de carbone à 91 bars. Les fractions obtenues par le dioxyde de carbone supercritique sont caractérisées par une teneur très importante en 3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone. Par contre, la teneur de ce composé est beaucoup plus faible dans la fraction volatile obtenue par hydrodistillation assistée aux micro-ondes. Les acides gras, quant à eux, se trouvent à des teneurs comparables dans les trois fractions volatiles.

Cette étude montre de façon claire l'importance du choix de la technique d'extraction à utiliser dans le domaine des produits volatils, pour cibler l'obtention préférentielle de certaines familles structurales de composés :

- la FMAH permet l'obtention, en quantité importante de composés sesquiterpéniques qui pourrait s'expliquer par l'aptitude de ces produits à réagir rapidement aux micro-ondes et par conséquent, transformer l'énergie micro-onde absorbée en chaleur qui provoque leur entraînement,
- la SFCD ne permet pas l'obtention de sesquiterpènes, mais celles des produits soufrés est fortement privilégiée, ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces molécules possèdent une bonne solubilité dans le dioxyde de carbone supercritique, dans les conditions expérimentales utilisées notamment la pression utilisée en cours de l'extraction,
- le FVH conduit à une extraction relativement proche de la SFCD, mais avec des teneurs plus faibles en produits soufrés et par contre plus élevées en hydrocarbures en C-11. L'entraînement relativement facile des C-11 est lié à leur grande volatilité. Concernant les produits soufrés, vu leur poids moléculaire élevé et leur faible volatilité, leur entraînement nécessite un temps plus long.

### 3.2.2 Etude analytique quantitative de la cinétique d'extraction par le dioxyde de carbone supercritique et par hydrodistillation assistée aux micro-ondes

Le dosage quantitatif des différentes fractions issues de l'étude cinétique a été effectué par étalonnage externe, car cette technique est mieux adaptée que l'étalonnage interne aux faibles quantités récupérées au cours des cinétiques d'extraction. Le principe de l'étalonnage consiste à déterminer le coefficient de réponse ( $K_{rep}$ ) par l'équation 26. La concentration massique de chaque produit  $C_{prod}$  dans la fraction volatile est ensuite obtenue par la mesure de l'aire du pic correspondant ( $A_{prod}$ ) en appliquant l'équation 27 [351].

$$C_{st} = \frac{K_{rep} A_{st}}{V} \text{ Eq.26} \quad C_{prod} = \frac{K_{rep} A_{prod}}{V} \text{ Eq.27}$$

Etant donné que le volume injecté  $V$  intervient dans le calcul des concentrations et de  $K_{rep}$ , il doit être toujours identique et rigoureusement constant au cours des analyses, aussi bien pour les standards que pour la fraction volatile. Au cours de cette étude analytique les standards utilisés sont les mêmes que ceux de l'analyse par étalonnage interne précédente (& 3.2.1.2), le volume injecté est de 1  $\mu$ l. Les coefficients de réponse obtenus pour les différents standards sont donnés dans le tableau 3.16.

Cette étude nous a permis de suivre l'évolution de la composition chimique des fractions volatiles issues, d'une part, de l'étude cinétique d'extraction par le dioxyde de carbone supercritique aux pressions respectives de 91, 104 et 115 bars et à un débit de 1 ml/mn et, d'autre part, de l'étude cinétique par hydrodistillation assistée aux micro-ondes. La cinétique d'hydrodistillation classique est plus difficile à réaliser à cause des faibles quantités recueillies au cours du temps. Nous nous sommes intéressés à l'évolution de la teneur massique des principaux constituants de ces fractions : le dictyoptérène A, le 6-butylcyclohepta-1,4-diène, l'Undéc-1-èn-3-one, la Undéca-1,4-dièn-3-one, le (3-oxoundec-4-ènyl) sulfure, l'acide tétradécanoïque, l'acide hexadécanoïque, la 3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone et l'albicanol (uniquement présent dans la fraction FMAH).

Tableau 3.16 : Coefficients de réponse des standards utilisés

Standards et concentration de leur solution mère	Coefficient de réponse $K_{rep}$ (mg/unité d'aire)
Undéc-1-ène (0,18 mg/ml)	$1,14 \cdot 10^{-3}$
Undécan-3-one (0,22 mg/ml)	$2,65 \cdot 10^{-3}$
Copaène (0,23 mg/ml)	$1,55 \cdot 10^{-3}$
Cédrol (0,19 mg/ml)	$1,64 \cdot 10^{-3}$
Acide tétradécanoïque (0,15 mg/ml)	$2,95 \cdot 10^{-3}$
Acide hexadécanoïque (0,15 mg/ml)	$2,90 \cdot 10^{-3}$
1,3-di-[2-thienyl-2]-1-oxoprop-2-one (0,16 mg/ml)	$4,72 \cdot 10^{-3}$

### 3.2.2.1 Evolution de la teneur des principaux produits de la fraction volatile extraite par le dioxyde de carbone supercritique

L'évolution de la teneur des différents produits au cours de l'extraction par le dioxyde de carbone supercritique est guidée par leur solubilité [227,352] et leurs propriétés de transfert de matière [353, 354]. Par exemple, les hydrocarbures à 11 atomes de carbone, apolaires et de faible poids moléculaire, comme le dictyoptérène A et le 6-butylcyclohepta-1,4-diène, sont bien solubles dans le dioxyde de carbone supercritique à de faibles pressions, de même les monoterpènes à propriétés similaires comme l' $\alpha$ -pinène et le limonène, montrent une bonne solubilité à une pression de 80 bars [355, 356].

L'examen des figures 3.27 à 3.29 permet de constater que la teneur la plus élevée de dictyoptérène A et de 6-butylcyclohepta-1,4-diène est obtenue dès les premières minutes, ce qui prouve leur grande solubilité. Cette teneur décroît rapidement pour atteindre des valeurs très faibles à 10 ou 15 min, et il est important de constater que la pente de chute augmente en fonction de la pression. Concernant les cétones provenant de produits soufrés : la undéca-1,4- dièn-3-one et la undéc-1-èn-3-one, elles voient leur teneur augmenter graduellement en fonction du temps et de la pression. Ceci est probablement dû à leur solubilité relativement faible (poids moléculaire élevé et produit plus polaire) de même qu'à leurs diffusivité et viscosité qui sont assez faibles, vu leur taille moléculaire relativement grande. La teneur des deux produits soufrés : le (3-oxoundec-4-ènyl) sulfure et la 3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone augmente progressivement à faible pression (91 bars). Par contre pour des pressions plus élevées (104 et 115 bars), leur teneur augmente dès les premières minutes pour passer par un maximum dû à l'extraction rapide de la

quantité de ces deux produits présente dans la phase huileuse de l'extrait : ce maximum est suivi d'une chute progressive de leur teneur massique due à leur faible diffusivité. On constate toutefois, que la teneur du (3-oxoundec-4-ènyl) sulfure augmente de nouveau après une heure d'extraction pour la pression de 115 bars.

Les deux acides tetradécanoïque et hexadécanoïque sont plus abondants dans la phase cireuse (à l'état adsorbé) que huileuse, c'est ce qui explique leur faible teneur dans la première étape d'extraction. L'augmentation de leur teneur en fonction du temps et de la pression est reliée à leur diffusivité progressive. On constate, également, l'obtention d'un pallier à la pression de 91 bars, correspondant à la limite d'extraction à cette pression. Cela est en accord avec le fait que la solubilité est directement reliée à la pression [357, 358]. Notons enfin que la solubilité optimale des produits lourds, tels que les acides gras et les paraffines à haut poids moléculaire est souvent obtenue à des pressions élevées, le paramètre température est aussi prépondérant [359, 360].

#### 3.2.2.2 Evolution de la teneur des principaux produits de la fraction volatile obtenue par hydrodistillation assistée aux micro-ondes

L'hydrodistillation assistée aux micro-ondes est un entraînement à la vapeur d'eau, le chauffage de l'extrait étheré est réalisé soit par conduction thermique à travers l'eau (extraction des produits apolaires de l'extrait), soit par chauffage direct par micro-ondes (extraction des produits polaires de l'extrait) ou par les deux processus en même temps [361, 362]. Le dictyoptérène A a un point d'ébullition assez bas (130-140°C) et une grande volatilité, ce qui favorise la rapidité de son entraînement à la vapeur d'eau (figure 3.30) et se traduit par la diminution de sa teneur en fonction du temps. La même constatation est faite pour l'albicanol qui est un alcool sesquiterpénique relativement plus polaire. Sa polarité favorise son chauffage rapide et par suite son entraînement, c'est ce qui explique l'allure de la variation de sa teneur en fonction du temps (figure 3.30). La variation de la teneur des produits polaires oxygénés (undéca-1,4dièn-3-one et undéc-1-èn-3-one), du produit soufré 3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone et des acides gras tetradécanoïque et hexadécanoïque (figure 3.30) est liée à leur aptitude à être chauffés directement sous l'effet des micro-ondes et à leur distribution entre les phases huileuses et cireuses qui constituent l'extrait. Les produits soufrés de la phase huileuse sont entraînés en fonction de leur polarité (chauffage rapide) et de leur volatilité. Les mêmes produits, dans la phase cireuse, sont d'abord libérés de cette phase (désorption), puis évaporés au fur et à mesure.

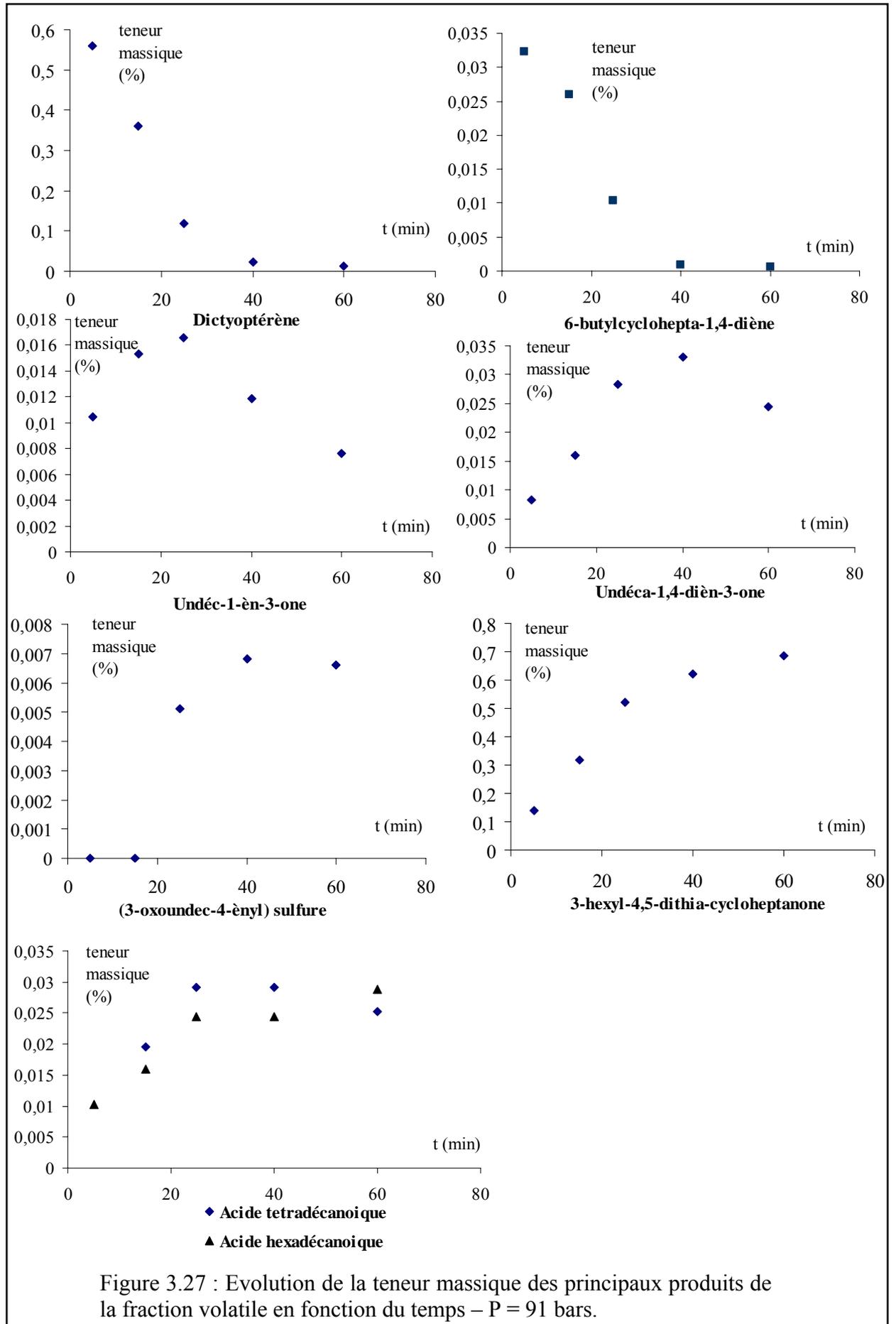
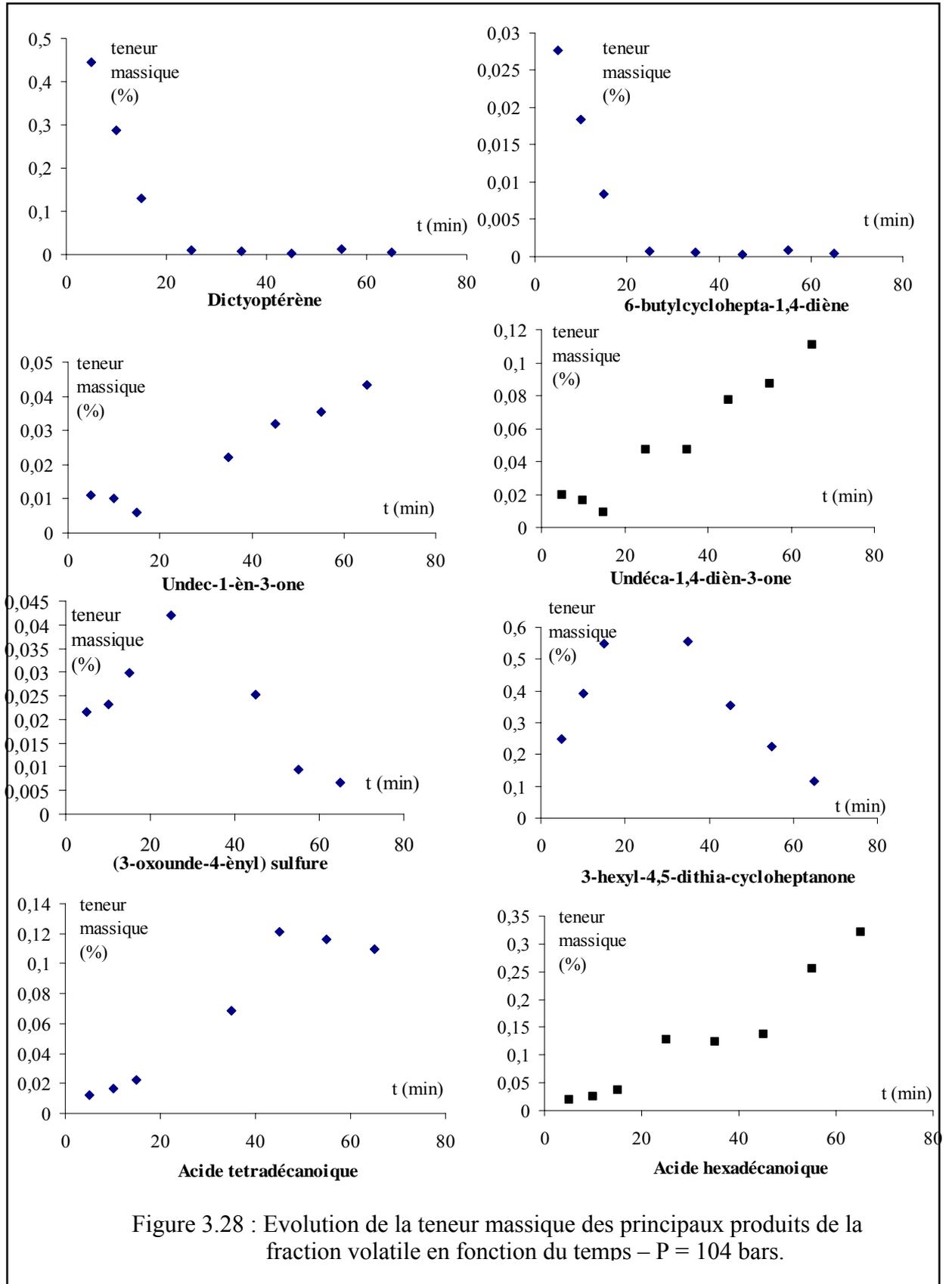
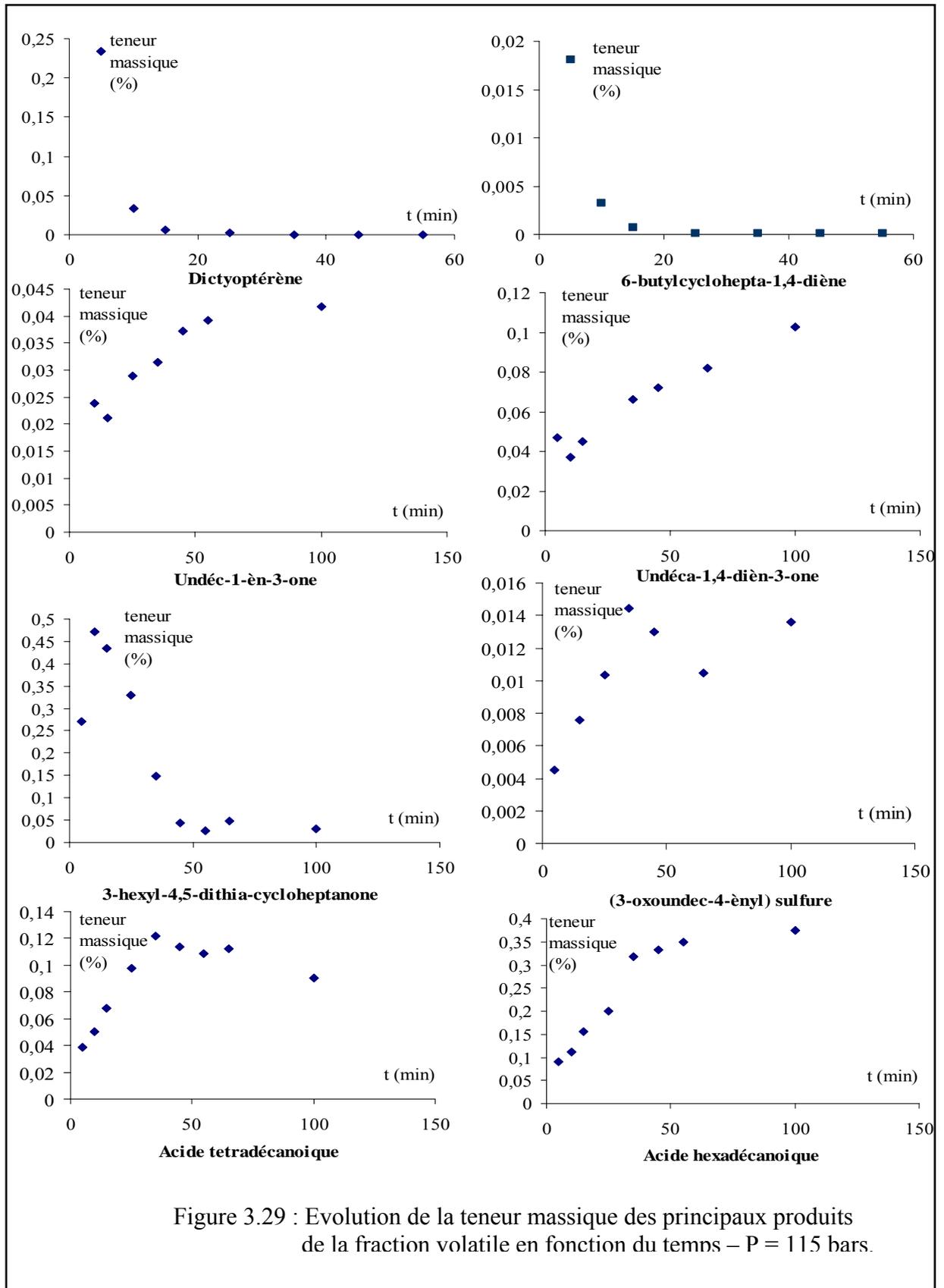


Figure 3.27 : Evolution de la teneur massique des principaux produits de la fraction volatile en fonction du temps – P = 91 bars.





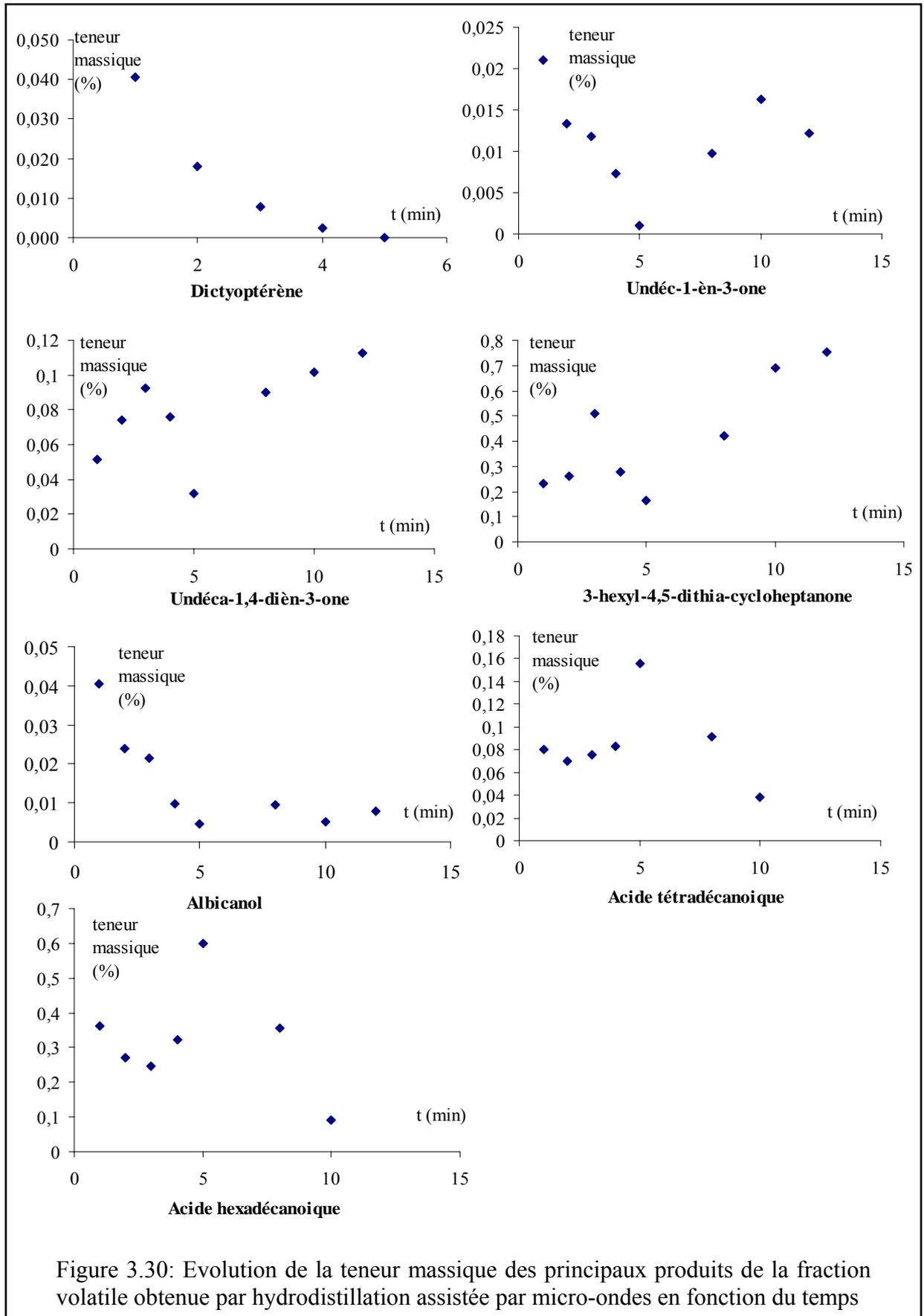


Figure 3.30: Evolution de la teneur massique des principaux produits de la fraction volatile obtenue par hydrodistillation assistée par micro-ondes en fonction du temps

### 3.2.2.3 Conclusion

L'étude cinétique permet de suivre l'évolution de la teneur des produits extraits au cours du temps, les informations fournies permettent d'obtenir les conditions expérimentales optimales pour l'extraction du produit désiré [197]. L'examen des figures 3.28 et 3.30 montre que les deux C-11 : le dictyoptérène A et le 6 butyl-cyclohepta-1,4-diène sont extraits pendant les 15 premières minutes, autrement dit, une extraction au dioxyde de carbone supercritique pendant 10 à 15 min. permettrait d'obtenir un extrait riche en ces deux produits. On remarque aussi, sur les mêmes figures, que la teneur des produits undéc-1-èn-3-one et undéca-1,4-diène est élevée dans les extraits obtenus à partir de 30 min. Les mêmes conclusions peuvent être faites pour les acides tétradécanoïque et hexadécanoïque. Il faut noter, également, que la technique d'extraction joue un rôle important dans la nature chimique de l'extrait obtenu. L'hydrodistillation assistée aux micro-ondes focalisées (FMAH) a permis d'extraire une fraction volatile renfermant une série d'hydrocarbures sesquiterpéniques, totalement absente dans les fractions volatiles obtenues par hydrodistillation classique et par le dioxyde de carbone supercritique. Dans la figure 3.30, les extraits obtenus par FMAH dans les cinq premières minutes sont particulièrement riches en albicanol (**20** planche 3.2) et en dictyoptérène A (**3** planche 3.2), ce résultat était prévisible dans la mesure où le premier est un produit polaire et le second est relativement volatil. On remarque également que les produits soufrés : 3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone (**21** planche 3.1) et (3-oxoundec-4-ènyl) sulfure (**17** planche 3.1) sont particulièrement bien extraits en 30 min. par le dioxyde de carbone supercritique (figures 3.28 et 3.29). C'est ce qui explique la teneur élevée obtenue en ces produits par SFCD (tableau 3.14).

### 3.2.3 Etude analytique qualitative de la fraction volatile de *Dictyopteris membranacea* (Stackhouse) Batters

Cette étude (réalisée avant celle effectuée sur l'espèce méditerranéenne & 3.2.1 et 3.2.2) a été consacrée à l'analyse qualitative de la fraction volatile de *Dictyopteris membranacea* récoltée sur les côtes atlantiques (à Quiberon). L'espèce a été identifiée dans l'herbier du laboratoire de biologie marine fondamentale et appliquée de l'Université de la méditerranée à Marseille (France). L'objectif concerne, primo, l'identification des composés constituant la composition chimique de la fraction volatile et secundo, de comparer sa composition avec celle récoltée sur les côtes méditerranéennes.

La fraction volatile a été obtenue à partir de l'extrait étheré avec un rendement de 1,5 % à partir de l'algue sèche, deux techniques ont été utilisées :

- hydrodistillation classique en utilisant l'appareillage décrit au § 3.1.3, cette technique a permis d'obtenir une fraction volatile avec un rendement de 16,8 %.

- hydrodistillation assistée aux microondes en utilisant un four à microonde focalisée du type Soxwave 3 (Prolabo) combinant l'extraction, la filtration et l'évaporation du solvant (figure 3.31). Cette méthode a permis d'obtenir une fraction volatile avec un rendement de 21,6 %. Avant d'effectuer cette expérience, nous avons procédé, à l'optimisation de deux paramètres : puissance de chauffe et temps d'extraction, les valeurs optimales obtenues sont respectivement de 125 w et 10 mn. Le rapport masse d'extrait au volume d'eau n'a pas une influence nette sur le rendement de la fraction volatile.

L'analyse de la fraction volatile a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse (HP-6890) couplée à un spectromètre de masse (HP-5972). La séparation est réalisée sur une colonne capillaire de type HP-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) avec le programme de température suivant : 90 (10) à 220 (10) à raison de 3 °C/mn. Les produits ont été identifiés en se basant sur la banque de données spectrales de l'appareil (NBS 75k) ainsi sur les données de la littérature. Les produits identifiés dans les fractions volatiles obtenues par les deux techniques, le pourcentage d'aire et le moyen d'identification de chaque produit sont regroupés dans le tableau 3.17.

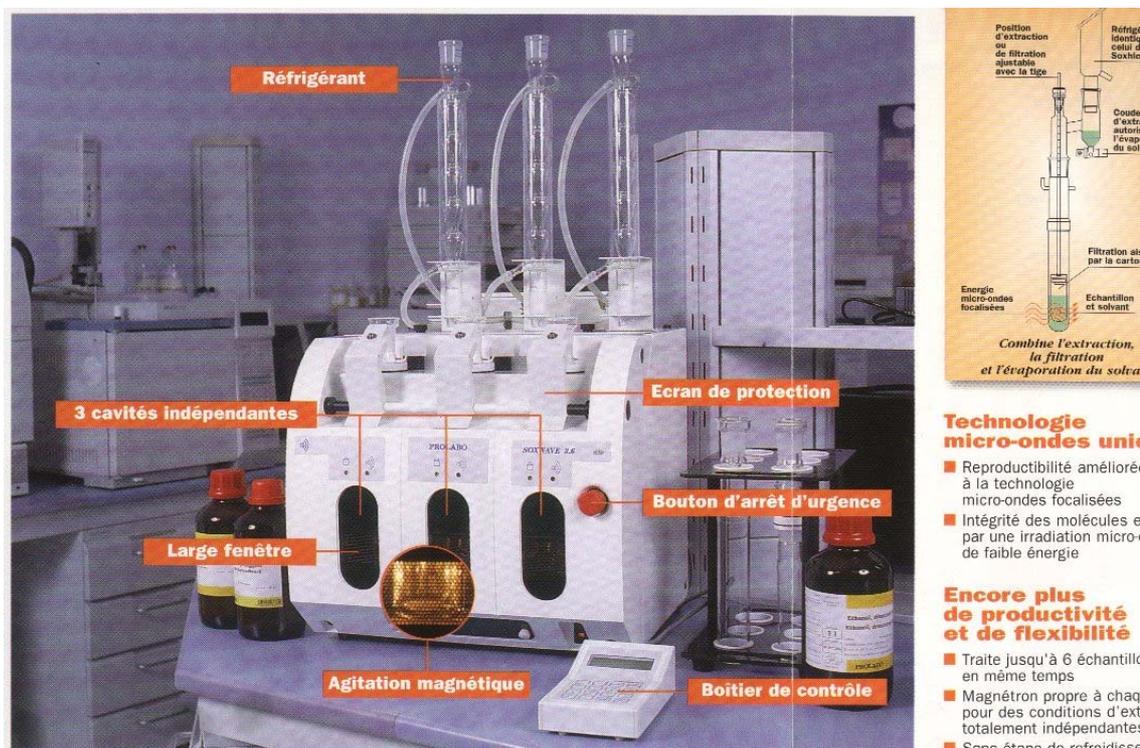


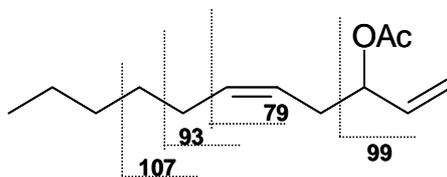
Figure 3.31 : Four à microondes focalisées (soxwave)

Tableau 3.17 : Analyse qualitative de la fraction volatile obtenue par hydrodistillation (FVH) et par hydrodistillation assistée aux microondes (FMAH)

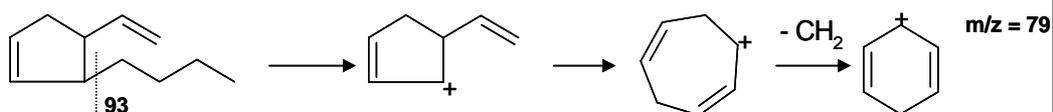
Ordre d'élution	Produits	Idendtification	% aire (FMAH)	% aire (FVH)
1	Bromoform	NBS 75k	7,4	-
2	Acide 8,8-dibromooct-5-enoïque	NBS 75k	3,1	-
3	3-butyl-4-vinylcyclopent-1-ène	NBS 75k, [147]	2,3	-
4	Dictyoptere A	[167], [171]	32,3	7,6
5	1-(hex-1-enyl)-cyclopent-1-ène	NBS 75k, [174]	5,4	1,5
6	Dictyoptère C'	[167], [171]	3,3	0,8
7	3-Undécène	NBS 75k	1,1	0,3
8	1-Undécèn-3-one	[164]	10,5	12,9
9	1,5-Undécadien-3-one	[164]	3,3	6,1
10	Dictyoprolène	[159][161]	3,4	4,5
11	Hexadécane	NBS 75k	1,6	3,2
12	Sesquiterpène oxygéné <sup>a</sup>	--	0,7	-
13	Sesquiterpène oxygéné <sup>b</sup>	--	1,7	7,6
14	Sesquiterpène oxygéné <sup>c</sup>	--	-	4,5
15	Heptadécane	NBS 75k	0,3	0,8
16	Acide tétradécanoïque	NBS 75k	1,1	4,9
17	Tétradécanoate d'éthyle	NBS 75k	0,3	2,3
18	6,10,14-triméthylpentadécan-2-one	NBS 75k	1,1	5,8
19	Acide hexdécanoïque	NBS 75k	0,7	4,5
20	Hexadécanoate d'éthyle	NBS 75k	0,2	3,3
21	Docosane	NBS 75k	0,2	-
22	Tricosane	NBS 75k	0,2	0,3
23	Tétracosane	NBS 75k	0,3	0,6
24	Pentacosane	NBS 75k	0,3	-

La structure des principaux hydrocarbures en C-11 à savoir : le dictyoptere A, 1-(hexyl-1-enyl)-cyclopent-1-ène, dictyoptere C', 3-butyl -4- vinylcyclopent-1-ène, dictyoprolène a été confirmée grâce à l'utilisation des références données dans le tableau 17. L'interprétation de la fragmentation des principaux C-11 sus-cités est donnée par la planche 3.3.

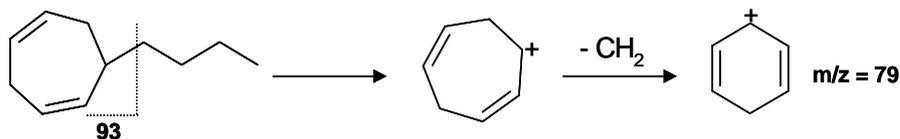
**Dictyoprolene** ( $M^+ = 150$ ) :  $m/z = 107, 93, 99, 79$  (100%).



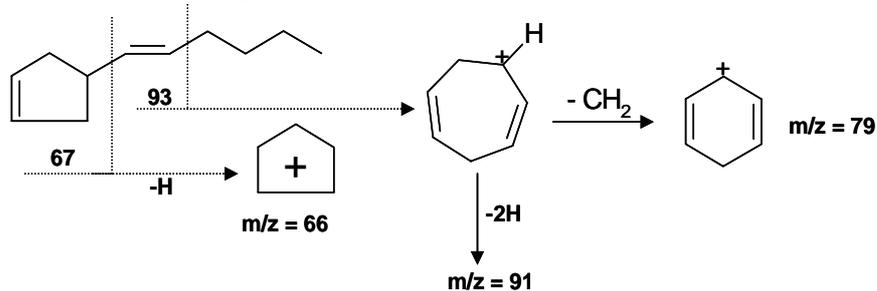
**3-butyl -4- vinylcyclopent-1-ene** ( $M^+ = 150$ ) :  $m/z = 93, 79$  (100%).



**Dictyopterene C'** ( $M^+ = 150$ ) :  $m/z = 93, 79$  (100%).



**1-(hexyl-1-enyl)-cyclopent-1-ene** ( $M^+ = 150$ ) :  $m/z = 93, 91, 79$  (100%), 67, 66.



**Dictyopterene A** ( $M^+ = 150$ ) : ( 67, 91, 93, 107, 121, 135, 150)



Obtention du fragment à  $m/z = 91$

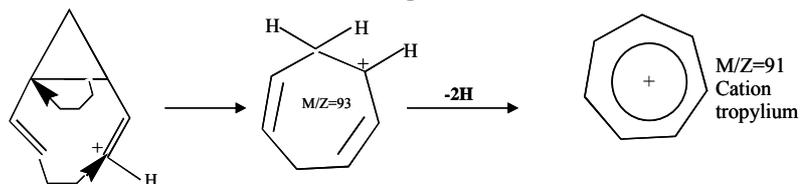


Planche 3.3 : Interprétation de la fragmentation des principaux C-11

L'examen du tableau 3.17 montre que la composition chimique de la fraction volatile est caractérisée par la présence de la classe des hydrocarbures en C-11 déjà rencontrée dans la même espèce récoltée dans d'autres régions [166, 176-179]. Nous avons constaté l'absence (ou probablement présence sous forme de trace) du composé soufré le 3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone. Une étude analytique plus poussée des composés 12, 13 et 14 (tableau 3.17) nous a permis de confirmer que ces composés n'ont pas une nature sesquiterpénique, mais ils peuvent probablement être des stabilisants de solvants (bien que la structure de ces composés n'a pas été complètement élucidée).

La comparaison de la composition chimique de la fraction volatile obtenue par hydrodistillation assistée par micro-ondes (FMAH) dans l'espèce méditerranéenne (tableau 3.11 et 3.12) avec celle obtenue par la même technique à partir de l'espèce récoltée sur les côtes atlantiques [307] (tableau 3.17) révèle que cette dernière ne renferme pas la fraction sesquiterpénique. Ce qui permet de conclure que l'algue provenant de méditerranée privilégie le métabolisme des dérivés terpéniques en plus des C-11 et des composés soufrés. La même constatation a été faite sur la composition chimique de la fraction volatile des espèces du genre *Dictyoptéris* récoltées sur les côtes japonaises (présence de terpènes) [175-179] en comparaison de celles récoltées sur les côtes Hawaïennes (absence de terpènes) [167-168].

#### 3.2.4 Procédure d'agrandissement des dimensions d'un extracteur au fluide supercritique

La bonne qualité des produits obtenus par extraction au dioxyde de carbone supercritique a poussé diverses industries, notamment l'industrie pharmaceutique, à industrialiser le processus [363, 364]. Le passage d'une installation à l'échelle laboratoire à une échelle plus grande (pilote ou industrielle) nécessite tout d'abord la maîtrise des données d'extraction (cinétique d'extraction, propriétés hydrodynamiques) à l'échelle laboratoire. Nous allons exposer la procédure d'agrandissement de l'échelle (passage p.e. de l'échelle analytique à l'échelle pilote) appelée souvent extension ou « scaling-up » en se basant sur les travaux de la littérature.

En se basant sur les hypothèses simplificatrices (& 3.1.1.2.1), le modèle mathématique établi sur la base d'un bilan différentiel de matière est donné par le système d'équation 1 :

$$\left\{ \begin{array}{l} \rho_f \varepsilon \frac{\partial y}{\partial t} + \rho_f u \varepsilon \frac{\partial y}{\partial z} + \rho_f \varepsilon D_L \frac{\partial^2 y}{\partial z^2} = J(y, x) \\ \rho_s \varepsilon_c \frac{\partial x}{\partial t} = -J(y, x) \end{array} \right\} \text{Eq.1}$$

Les conditions initiales et aux limites sont données par les équations 2 et 3. Les paramètres importants dans le processus d'extension de l'échelle sont la vitesse superficielle  $U$  ( $u = U/\varepsilon$ ) et les données cinétiques expérimentales de l'extraction obtenues pour les trois débits du fluide supercritique. Nous admettons le cas général où l'expression du flux de transfert de matière  $J$  est donnée par l'équation 4 avec  $y = \alpha x$  et  $\alpha$  : coefficient d'équilibre fluide /solide (concrète), la résolution du système d'équation 1 (méthode numérique), pour la recherche du minimum entre les valeurs expérimentales et celles du modèle selon l'équation 24, permet d'optimiser les valeurs des coefficients de transfert de matière  $k_f$  et  $\alpha$  (supposés constant). On effectue ensuite des expériences sur des extracteurs à différentes longueurs (longueur du lit d'extraction  $Z$  variable), les données cinétiques expérimentales ( $y = f(t)$  ou  $x = f(t)$ ) qu'on appelle aussi courbes d'extraction sont simulées en utilisant le modèle mathématique avec les valeurs de  $u$ , de  $k_f$  et  $\alpha$  précédemment calculées. On se fixe alors un taux d'extraction de la fraction volatile ( $x_{\text{final}}$  g soluté/g de concrète non soluble), on peut alors déterminer à partir des courbes d'extraction précédentes le temps nécessaire  $\tau$  pour atteindre cette concentration finale  $x_{\text{final}}$  pour chaque longueur du lit d'extraction  $Z$ . L'exploitation de ces résultats permet de déduire une relation entre le temps d'extraction  $\tau$  et la longueur du lit d'extraction  $Z$  pour chaque vitesse  $u$  (pour chaque débit). Un exemple de ce type de relation a été obtenu (Equation 28) dans les travaux sur l'extraction au dioxyde de carbone supercritique des polluants par adsorption sur charbon actif [365].

$$\begin{array}{ll} u = 1,4 \cdot 10^{-3} \text{ m/s} & \tau = -0,0007 Z^2 + 0,5541 Z + 34,064 \\ u = 3 \cdot 10^{-3} \text{ m/s} & \tau = -0,003 Z^2 + 0,7254 Z + 39,509 \\ u = 5 \cdot 10^{-3} \text{ m/s} & \tau = 0,003 Z^2 + 0,7882 Z + 90,606 \end{array} \quad \text{Eq.28}$$

Le même travail [365] a proposé une procédure d'extension de l'échelle (scaling-up) basée sur une boucle itérative où les paramètres de conception (design) sont la capacité de traitement, le nombre d'extracteur et deux valeurs initiales de la longueur totale de l'extracteur et le temps d'extraction. Le programme utilise la relation permettant d'estimer le temps d'extraction en fonction de la longueur de l'extracteur (Eq.28). Deux conditions

aux limites représentent des valeurs de contrôle de la boucle itérative : la géométrie de l'extracteur et la capacité de traitement. En général, pour ce type d'installation, on se fixe une longueur de l'extracteur (2,5 m par exemple) et on respecte un rapport longueur/diamètre dans un intervalle de valeurs limites 5 - 10.

Une autre étude [366] portant sur le processus d'agrandissement de l'échelle a été effectuée en se basant sur un modèle cinétique empirique et en utilisant le modèle de réseau de neurones pour la représentation de la surface de réponse. Les paramètres du modèle en l'occurrence, le coefficient de transfert de matière [367] et la concentration d'équilibre  $y^*$  (solubilité) [368] ont été déterminés par des corrélations empiriques.

En fonction de la vitesse superficielle  $u$  et pour la même quantité à traiter on peut obtenir par le biais du programme de calcul des résultats différents, dans ce cas, le critère économique peut être primordial dans la sélection de l'alternative à choisir. L'aspect économique est important, particulièrement pour une installation à haute pression comme les extracteurs aux fluides supercritiques, où le coût d'investissement est élevé. Une étude du coût d'investissement d'une unité d'extraction [363] fonctionnant en continue a permis de relier par une relation logarithmique le prix unitaire PI au débit de dioxyde de carbone supercritique  $Q$  et au volume de l'extracteur  $V_T$ . Cette étude du coût prend en considération le fait que toute unité d'extraction au dioxyde de carbone supercritique contient les éléments suivants :

- un extracteur (ou un réacteur, ...) de volume total  $V_T$ .
- un système de séparation de l'extrait automatique
- un réservoir de dioxyde carbone liquide
- une pompe permettant de fournir le dioxyde de carbone à la pression désirée
- échangeurs de chaleur
- accessoires de connections (valve,....)

Au cours de cette brève discussion de la procédure d'extension ou d'agrandissement de l'échelle d'un extracteur, nous avons exposé les travaux les plus récents effectués [363-368] dans ce cadre, également, nous avons mis en exergue les paramètres de transfert de matière qu'il faut impérativement maîtriser afin d'effectuer cette étude. L'étude expérimentale du « scaling up » exige la disponibilité d'un extracteur aux fluides supercritiques analytique et un extracteur semi-pilote, et pour chaque type d'extracteur il faut disposer de cartouches d'extraction à différents volumes.

## CONCLUSION

Notre mémoire a été consacré, d'une part, à l'étude chimique de trois espèces d'algues brunes - *Cladostephus hirsutus*, *Zonaria tournefortii* (algues méditerranéennes récoltées sur les côtes algériennes) et *Bifurcaria bifurcata* (algue de l'océan atlantique récoltée sur les côtes marocaines) - et, d'autre part, à l'étude de techniques d'extraction (hydrodistillation (FVH), hydrodistillation assistée aux micro-ondes (FMAH) et extraction au dioxyde de carbone supercritique (SFCD)) que nous avons adaptées et optimisées aux produits volatils des algues marines par le biais de l'algue brune *Dictyoptéris membranacea* (algue récoltée en méditerranée sur les côtes algériennes). Il comprend trois chapitres distincts qui ont été développées de la façon suivante :

- (1) – synthèse bibliographique portant sur : (a) les espèces d'algues étudiées (caractéristiques biologiques et travaux de nature chimique déjà effectués), (b) la description des techniques d'extraction des produits volatils (FVH, FMAH et SFCD),
- (2) – isolement et élucidation structurale des métabolites secondaires de *Cladostephus hirsutus*, *Zonaria tournefortii* et *Bifurcaria bifurcata*,
- (3) – analyse comparative des fractions volatiles de *Dictyoptéris membranacea* obtenues par trois techniques d'extraction spécifiques (FVH, FMAH et SFCD), complétée par la modélisation mathématique de la cinétique d'extraction dans le cas de deux des techniques utilisées (SFCD et FMAH).

Nos travaux personnels sont répertoriés dans les chapitres 2 et 3.

Le chapitre 2 regroupe les résultats concernant l'isolement et la caractérisation structurale des métabolites secondaires présents dans les extraits organiques des trois algues brunes citées précédemment :

- L'étude des extraits de *Cladostephus hirsutus* a permis de montrer que cette algue ne renferme pas de composés terpéniques et qu'elle privilégie, essentiellement, le métabolisme des acides gras, des stérols et de la fucoxanthine (xanthophylle majoritaire des algues brunes). Cependant, l'examen approfondie des fractions polaires de ces extraits a conduit à l'isolement et à la détermination structurale de six produits minoritaires : **H1**, **H2**, **H3**, **H4**, **H5** et le phloroglucinol (**H6**). **H1**, **H2** et **H3** dérivent de la fucoxanthine : **H1** a la structure d'un

acétoxymonoterpène allénique, déjà décrit dans la littérature comme étant un produit de dégradation oxydative de la fucoxanthine. C'est, à notre connaissance, la première fois que ce composé est rencontré à l'état naturel dans une algue marine. Sa structure et sa stéréochimie n'avaient été établies, jusqu'à présent, que sur la base d'une analyse aux rayons X d'un monocristal de son p-bromobenzoate. Nous avons complété ces données bibliographiques avec son étude structurale complète par spectrométrie moléculaire (IR, UV, SM et RMN mono- et bidimensionnelle). Le composé **H2** est un acétoxysesquiterpène allénique non décrit dans la littérature dont la structure a été déterminée par spectrométrie moléculaire. La présence de **H1** et **H2** dans l'algue, à l'état naturel, nous a permis de contribuer à affiner l'hypothèse de biogénèse de la fucoxanthine proposée par l'équipe norvégienne de Liaaen-Jensen. La mise en évidence du lolioïde (**H3**), dont nous avons confirmé la structure par comparaison des données de RMN mono- et bidimensionnelle à celles de la littérature, est en accord avec l'hypothèse de biogénèse proposée pour la fucoxanthine. Par ailleurs, **H4** et **H5** sont des dérivés monohalogénés du phloroglucinol, dont l'un d'entre eux (**H5**) est décrit pour la première fois dans une algue brune.

- les extraits de *Zonaria tournefortii* récoltée en Algérie présentent une composition similaire à ceux de la même espèce étudiée par Amico et al en Sicile, montrant, qu'à l'inverse de certaines algues brunes étudiées dans notre laboratoire d'accueil (*Cystoseira amantacea* var. *stricta* et *Bifurcaria bifurcata* par exemple), il n'y a pas de variation géographique de la composition chimique des extraits organiques de cette espèce. Les principaux métabolites secondaires identifiés sont des composés à biogénèse mixte renfermant un noyau phloroglucinol auquel est rattachée une chaîne lipidique (**Z2** et **Z6**) et leurs dérivés chroméniques (**Z3** et **Z4**). Leur identification a été réalisée par comparaison de leurs données de RMN avec celles de la littérature. La présence d'une quantité relativement importante d'acide eicosapentaénoïque (**Z5**) dans la fraction phénolique des extraits étudiés nous a permis, en outre, de proposer une voie de biogénèse des acylphloroglucinols et de leurs dérivés chroméniques qui sont métabolisés par cette algue.

- En ce qui concerne *Bifurcaria bifurcata* récoltée au Maroc (Oualidia), cette étude entre dans le cadre de la poursuite de travaux entrepris depuis de nombreuses années par notre laboratoire d'accueil sur cette espèce. Elle a été focalisée sur la fraction polaire de l'extrait qui n'a, pour l'instant, que peu été étudiée. Ce travail nous a conduit à isoler et déterminer la structure de deux nouveaux diterpènes linéaires trihydroxylés (**B3** et **B4**). **B3** dérive du (R)-12-hydroxygéranylgeraniol (Bifurcadiol **B0**) comme tous les diterpènes di- ou trihydroxylés isolés, jusqu'à présent, des échantillons de *Bifurcaria bifurcata* récoltés à Oualida (Maroc).

Par contre dans **B4**, l'un des groupements hydroxyles migre de C-12 à C-10. Il s'agit de la première structure de ce type à être identifiée dans une espèce de *Bifurcaria bifurcata* et de la deuxième exception, après le crinitol (deuxième hydroxyle fixé en C-9), à la règle empirique établie par Valls et Pioveti [334] selon laquelle la seconde fonction oxygénée des diterpènes linéaires de *B.bifurcata* est toujours située en C-12 ou en C-13, en fonction du lieu de récolte de l'algue.

L'ensemble des résultats auxquels nous sommes parvenus, dans le cadre de ce chapitre 2, ont été, obtenus grâce à l'utilisation de techniques classiques de purification par chromatographie (sur colonne de gel de silice et CLHP) et d'identification telles que la RMN haute résolution du proton et du carbone 13 ou la spectrométrie de masse. Les techniques plus sophistiquées de RMN 2D des corrélations  $\delta/\delta$  homonucléaires (COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) et hétéronucléaires directes (COSY  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ , HMQC, HSQC) ou longues distances en détection inverse (HMBC) ont aussi été un élément essentiel dans la caractérisation structurale des nouveaux métabolites décrits. Des problèmes de stéréochimie ont pu être résolus par l'étude de l'effet nucléaire Overhauser (NOE). Il s'agit, notamment, de la confirmation de la configuration *E* des doubles liaisons des composés **B3** et **B4**, et de la détermination de la configuration relative des centres chiraux de la molécule **H1**.

Le chapitre 3 concerne l'étude de l'extraction des produits volatils des algues marines par le biais de l'espèce *Dictyoptéris membranacea* récoltée en Algérie. Trois techniques ont été étudiées : (1) l'hydrodistillation à la vapeur d'eau (FVH), très classique, utilisée essentiellement pour comparaison avec les deux autres, (2) l'hydrodistillation assistée aux micro-ondes (FMAH) et (3) l'extraction par le dioxyde de carbone supercritique (SFCD). Une attention particulière a été portée aux deux dernières techniques car elles sont encore peu utilisées, notamment dans le domaine des produits marins. Après optimisation des techniques utilisées et analyse par étalonnage interne des fractions volatiles obtenues, les résultats ont montré que le procédé d'extraction influence fortement la nature et la quantité des composés extraits. Ainsi, si les hydrocarbures à onze atomes de carbone, dont le dictyoptérène A est le composé majoritaire, sont bien représentés dans les trois fractions volatiles, on remarque, d'une part, que la SFCD privilégie l'extraction des produits soufrés - dont la 3-hexyl-4,5-dithia-cycloheptanone est le produit di-soufré majoritaire et, d'autre part, que la FMAH se différencie nettement des deux autres techniques par la présence en quantité relativement importante de sesquiterpènes, dont l'albicanol et le zonarène sont les produits majoritaires. Il

est important de noter, qu'à ce jour, aucun composé de nature sesquitérpenique n'avait été décrit de *Dictyoptéris membranacea*.

Dans le cadre de ce travail, l'étude de la cinétique d'extraction par le dioxyde de carbone supercritique et celle par hydrodistillation assistée aux micro-ondes ont été effectuées. Afin de représenter ces données cinétiques, nous avons développé et appliqué des modèles mathématiques basés sur les lois de transfert de matière. Un bilan de matière dans un élément de volume de l'extracteur (SFCD) a permis de décrire le processus d'extraction par un système d'équations différentielles de premier degré pour lequel deux cas ont été considérés :

#### 1- Système non simplifié : modèle **SMN**

En négligeant la dispersion axiale, et en adoptant la méthode de discrétisation de Lax-Wendroff, la solution du système d'équation a été obtenue par des méthodes numériques. Dans ce modèle numérique (**SMN**), deux expressions du flux de transfert de matière ont été utilisées, la première est celle donnée par le modèle de Cygnarowicz et, la seconde est celle que nous avons proposée dans ce travail. Les résultats obtenus montrent clairement que le modèle proposé permet d'obtenir une meilleure simulation des valeurs expérimentales que celle obtenue par le modèle de Cygnarowicz. Ce dernier, tout en représentant assez bien les valeurs expérimentales pour le début de l'extraction ( $t \leq 15$  min.), montre pour la suite du processus une déviation marquée par rapport aux valeurs expérimentales.

#### 2- Système simplifié : **SM1**, **SM2** et **SM3**

En considérant l'extraction uniforme et l'absence d'accumulation de matière, le système d'équations différentielles admet des solutions analytiques représentées par les modèles **SM1**, **SM2** et **SM3**. L'application des modèles **SM1** et **SM2** aux données cinétiques expérimentales a montré une simulation correcte, cette dernière est nettement meilleure pour l'extraction à faible pression en SFCD, ce qui correspond aux hypothèses admises dans la simplification du système d'équations différentielles. De même, l'application du modèle **SM3** a permis de représenter de manière très correcte les valeurs expérimentales du processus global d'extraction (deux régimes d'extraction : solubilisation et régime diffusionnel).

Le développement de ces modèles associé, à une étude analytique de l'extrait obtenu, joue un rôle très important dans (1) la conception du matériel d'extraction, (2) le calcul des conditions optimales d'extraction sélective d'un produit désiré.

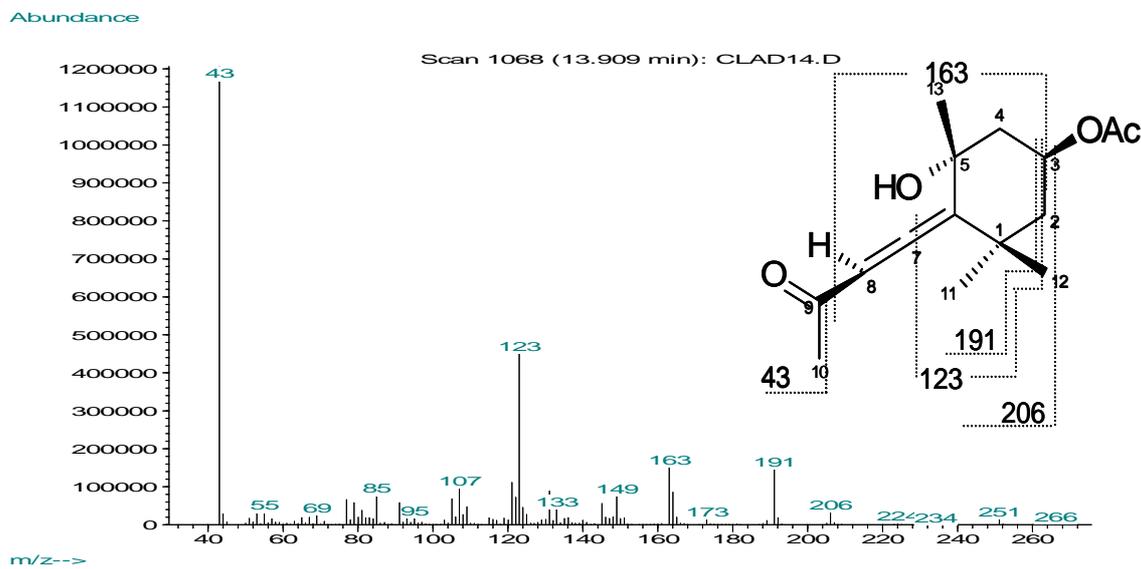
## APPENDICES

## APPENDICE A

## DIFFERENTS SPECTRES DES PRODUITS H1, H2, H3, H4 ET H5

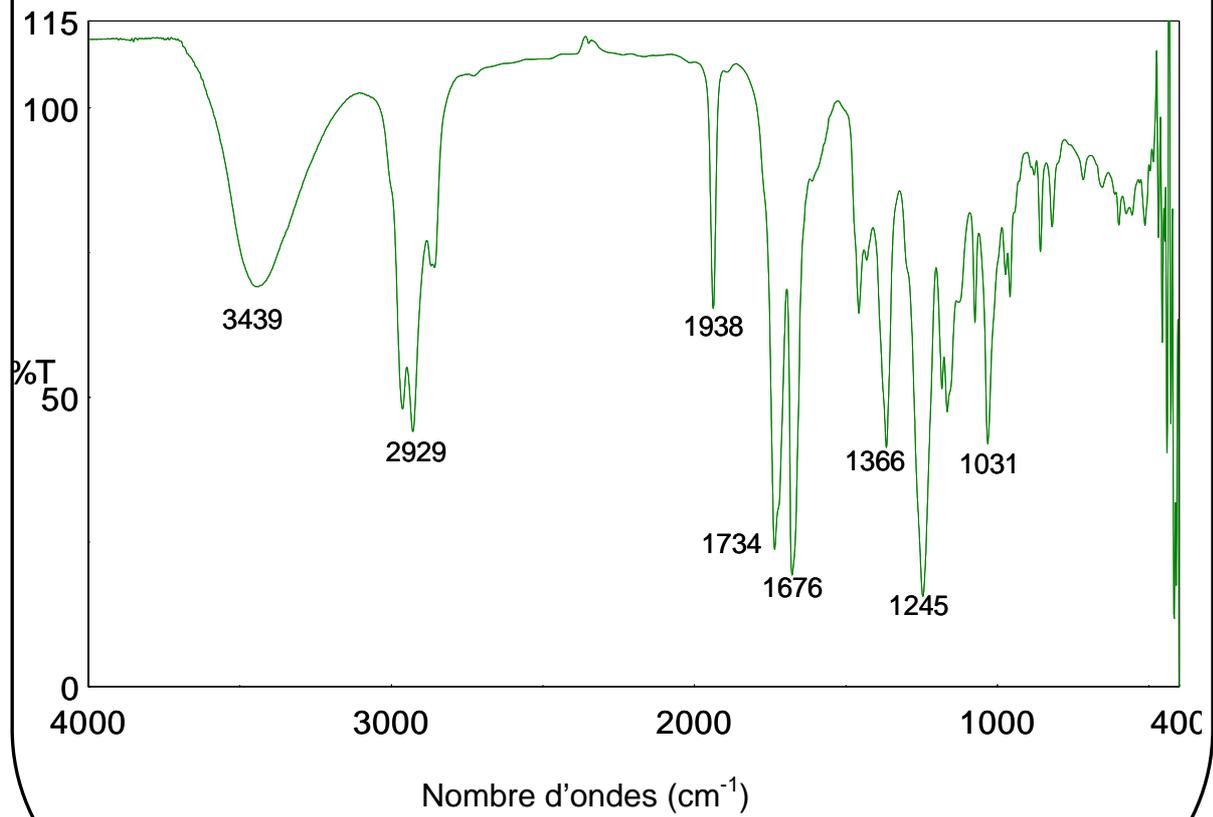
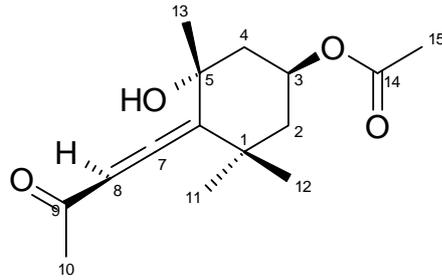
Annexe 1 : Spectre de masse du produit **H1**

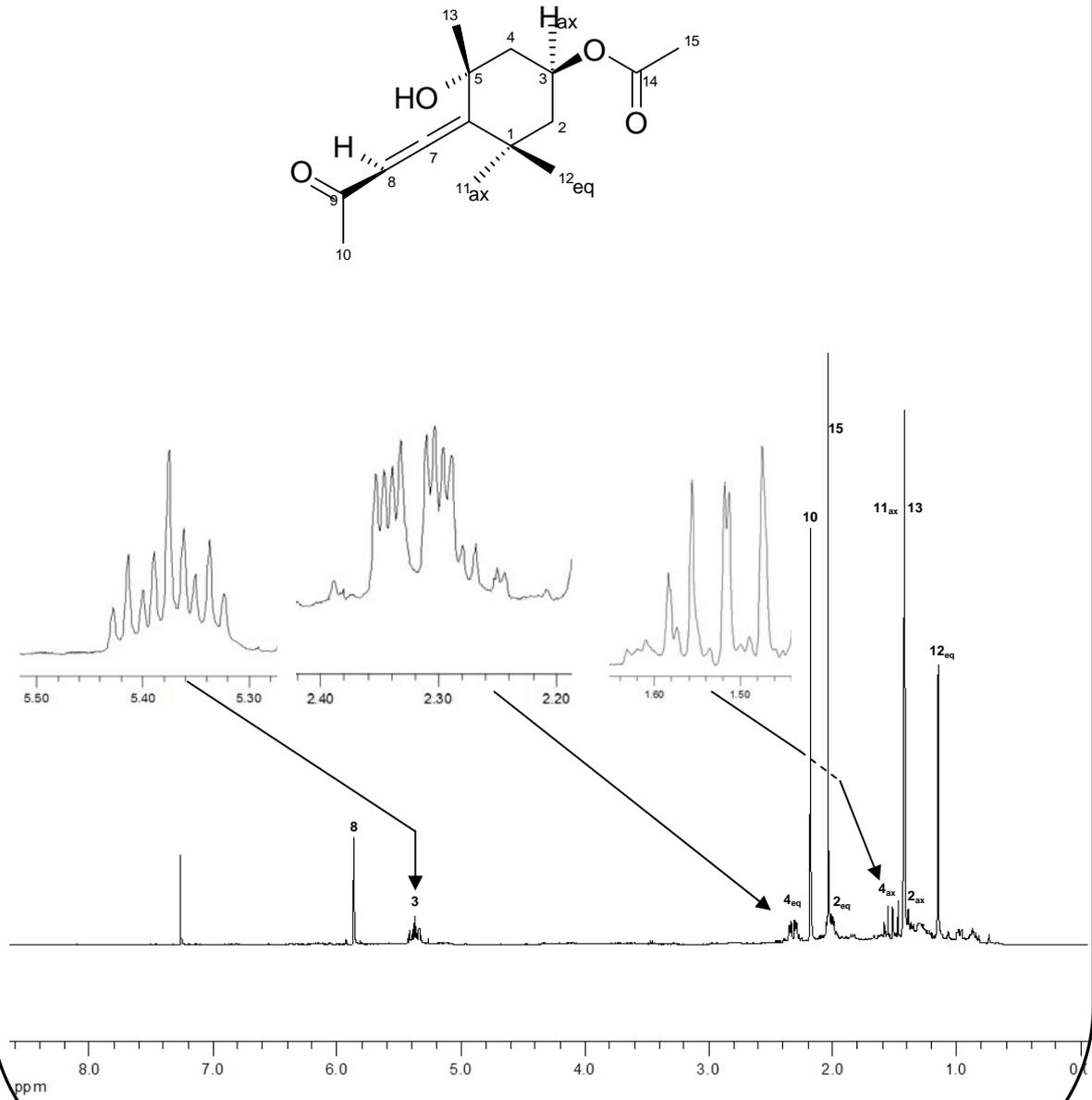
a) Basse résolution par impact électronique

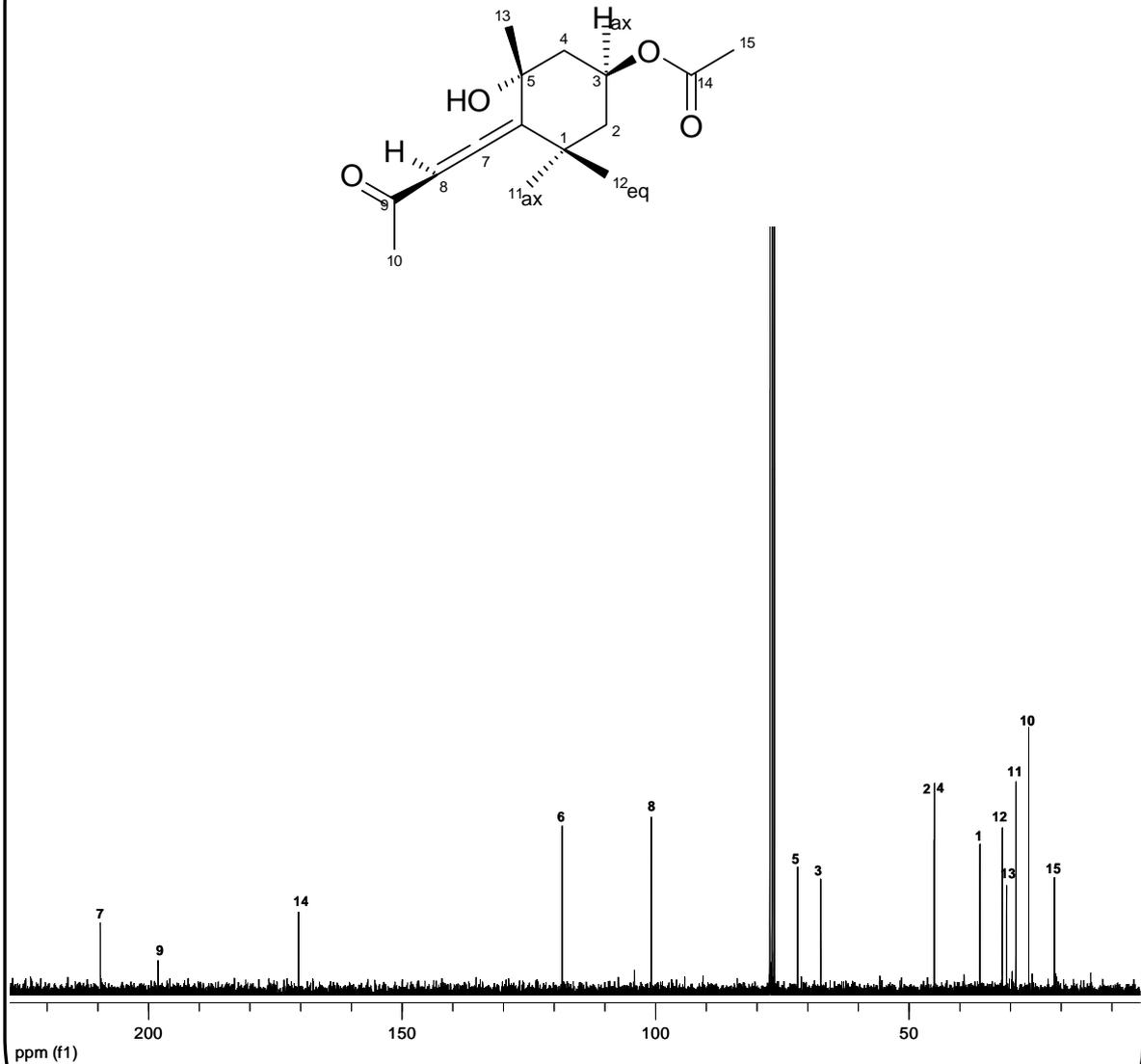


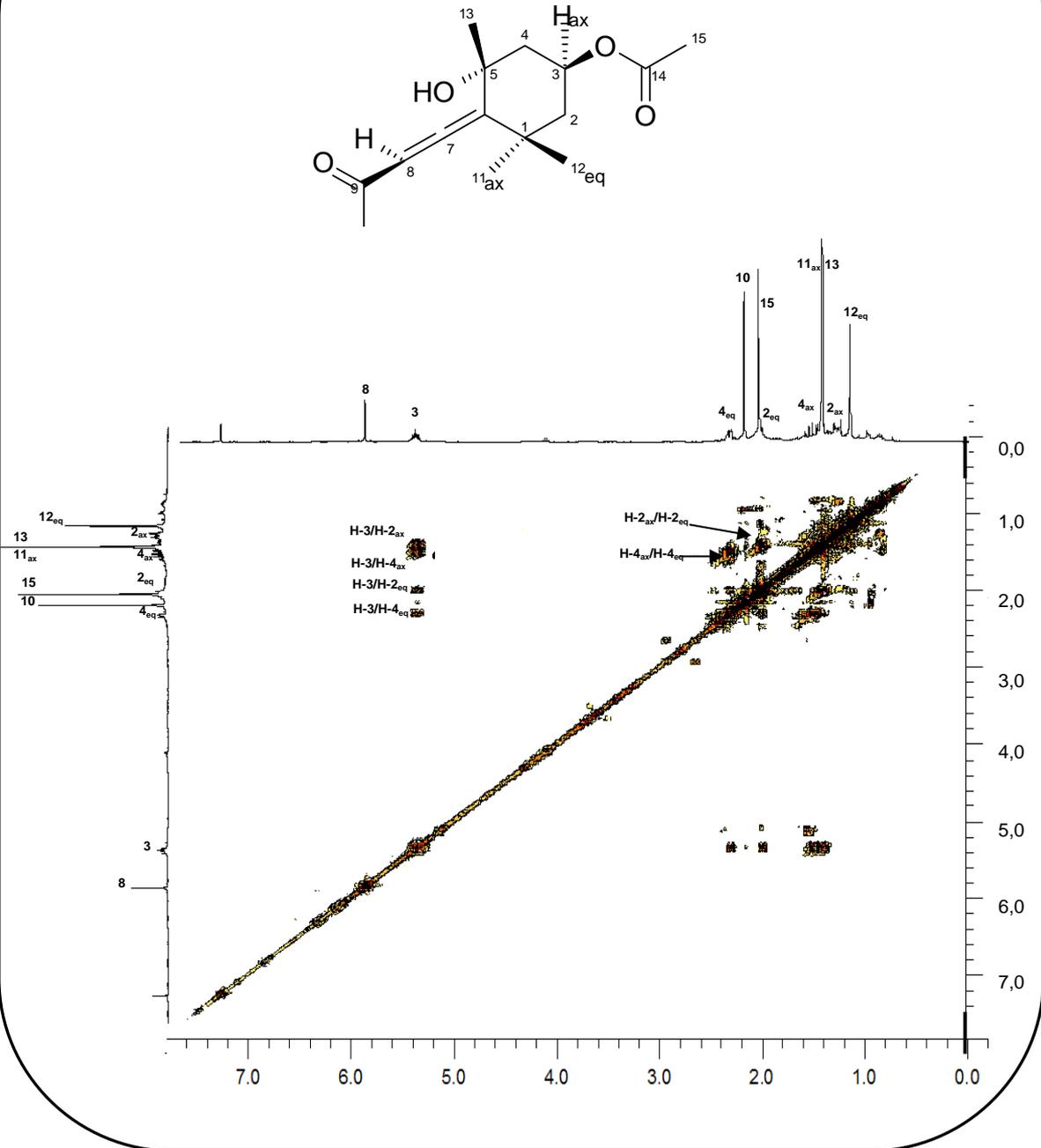
b) Haute résolution par la méthode FAB (Fast Atom Bombardment)

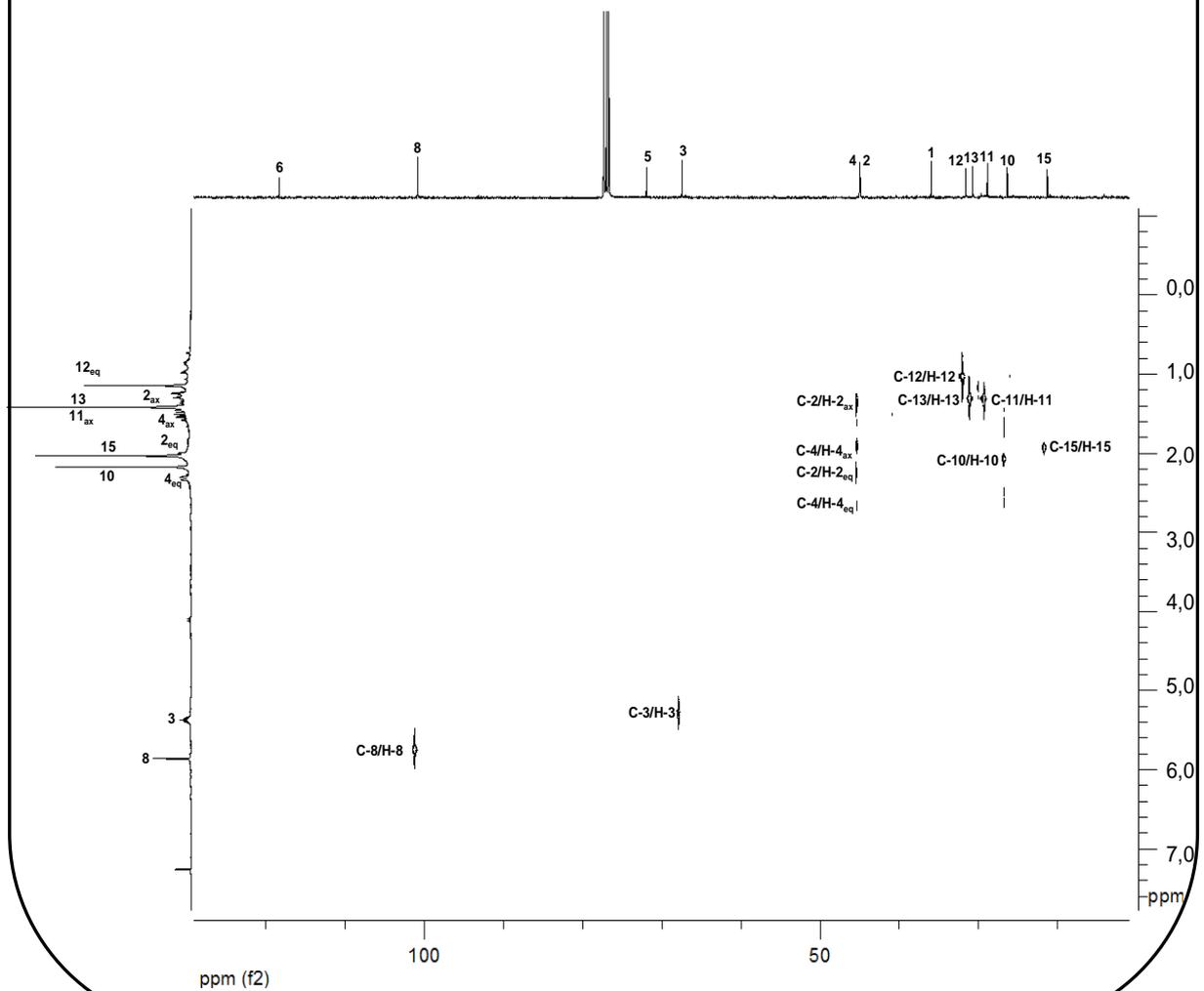
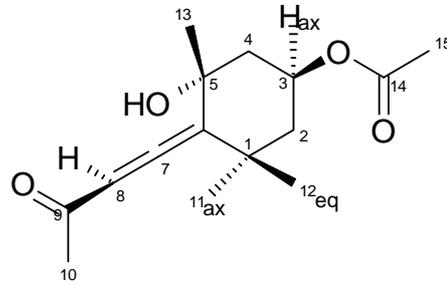
- valeur observée pour  $[M+Na]^+ = 289,1416$
- valeur calculée : 289,1415 pour  $C_{15}H_{22}O_4Na$ , soit une masse molaire de 266 g/mol pour **H1**.

Annexe 2 : Spectre Infrarouge du produit **H1**

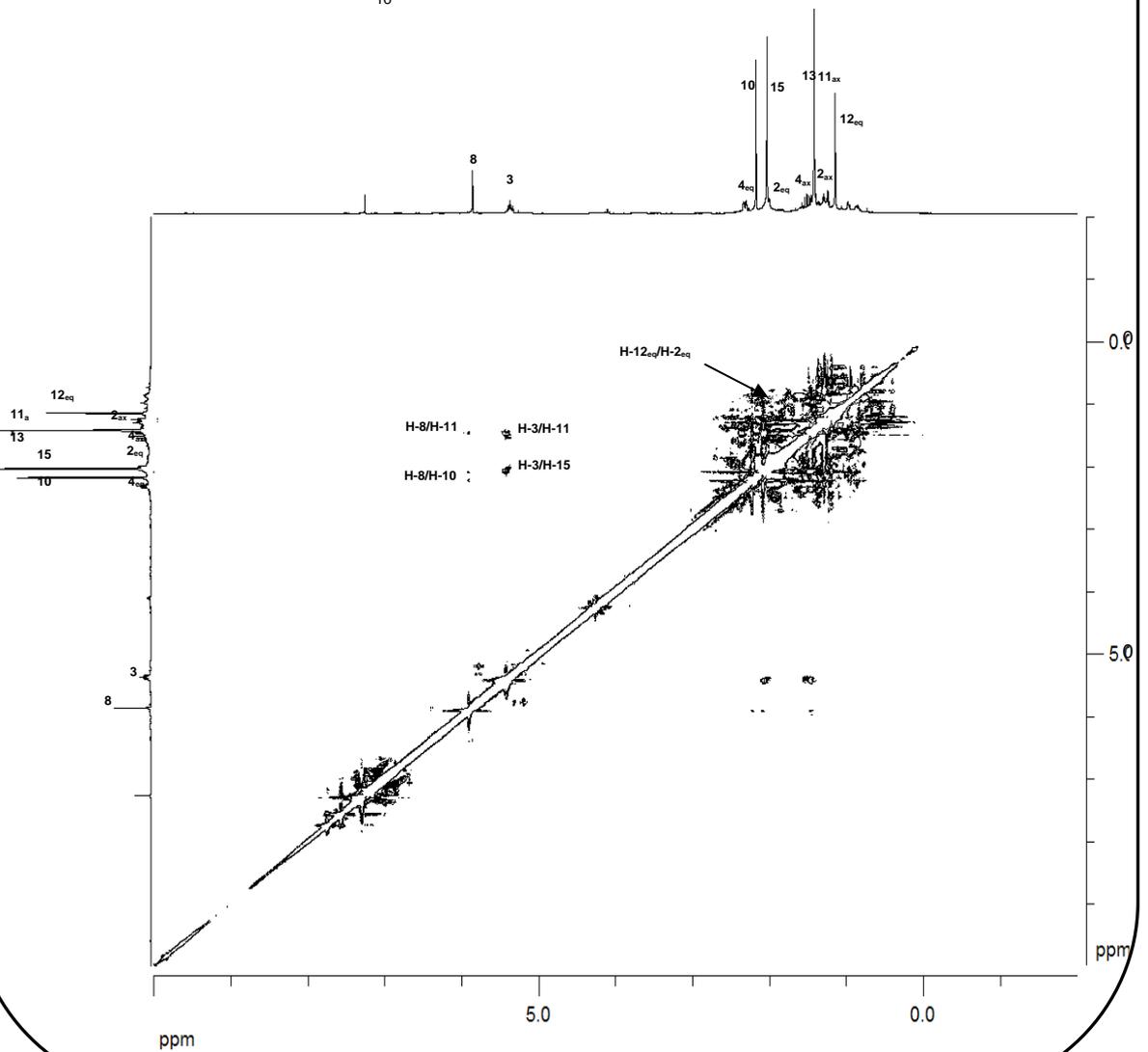
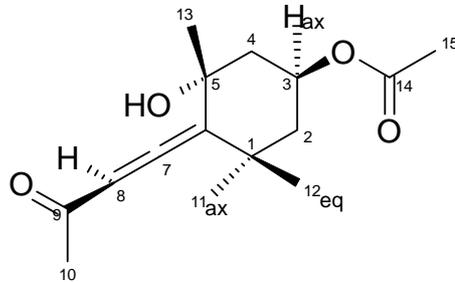
Annexe 3 : Spectre RMN<sup>1</sup>H à 400 MHz dans CDCl<sub>3</sub> du produit **H1**

Annexe 4 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  à 100 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **H1**

Annexe 5 : Spectre RMN COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **H1**

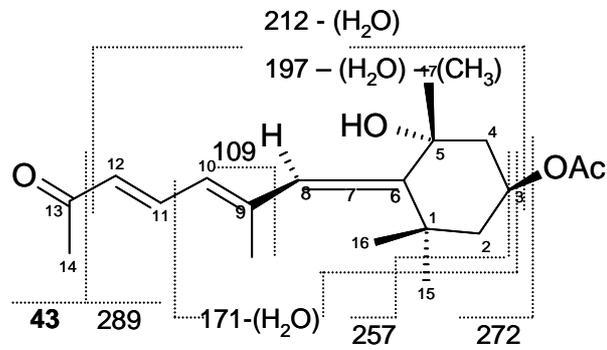
Annexe 6 : Spectre RMN COSY  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  à 100 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **H1**

Annexe 7 : Spectre RMN NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  à 500 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **H1**

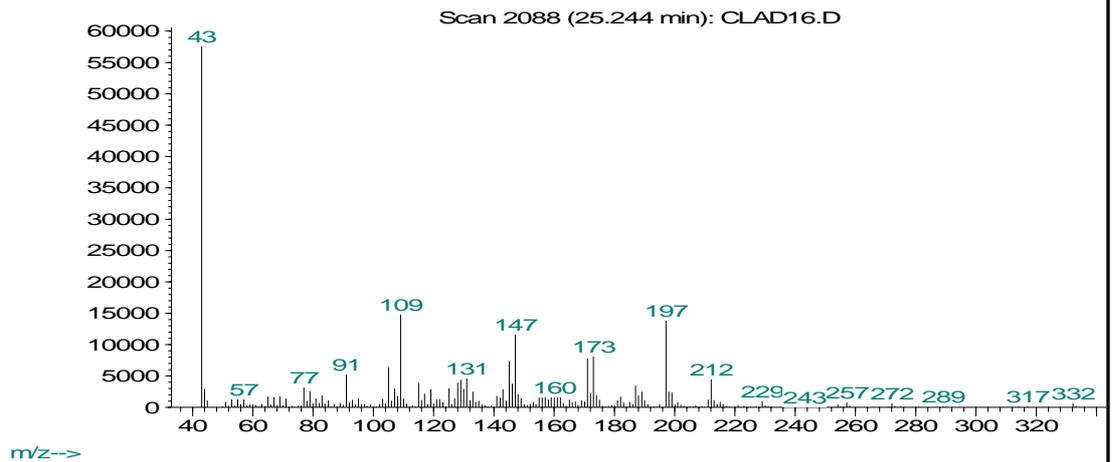


Annexe 8 : Spectre de masse du produit **H2**

## a) Basse résolution par impact électronique

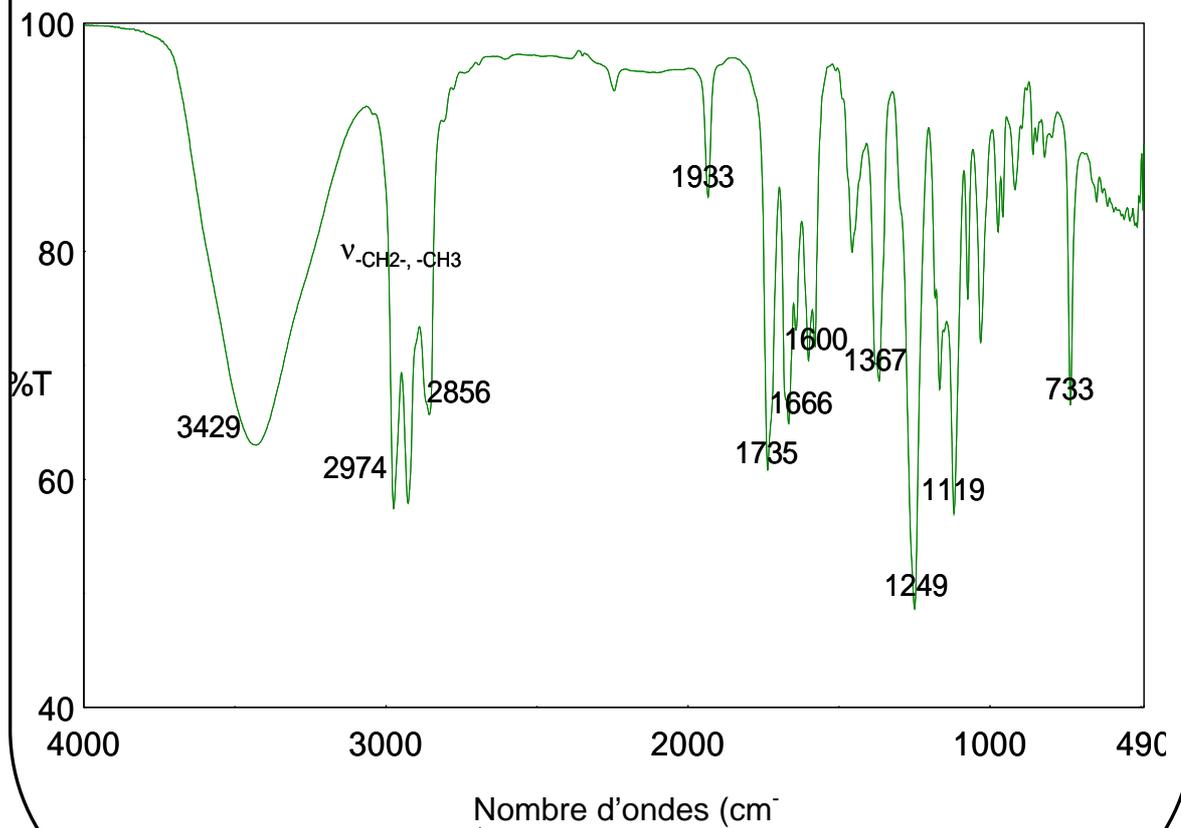
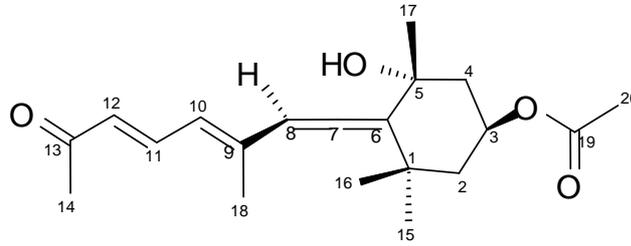


Abundance

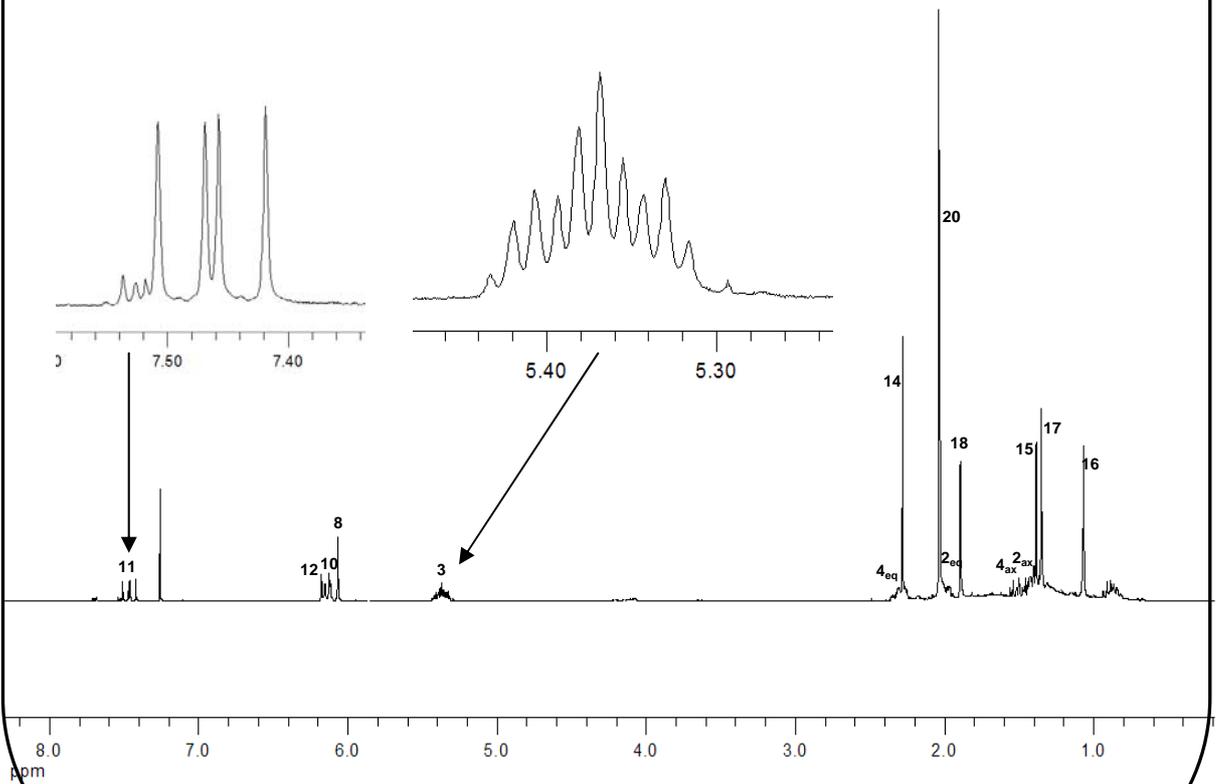
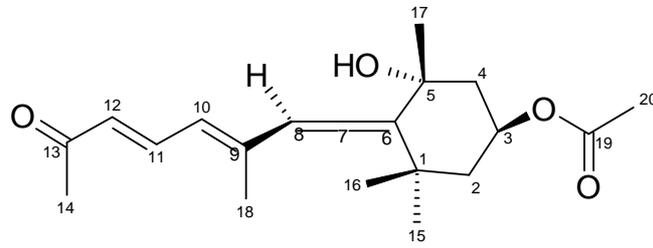


## b) Haute résolution par la méthode FAB

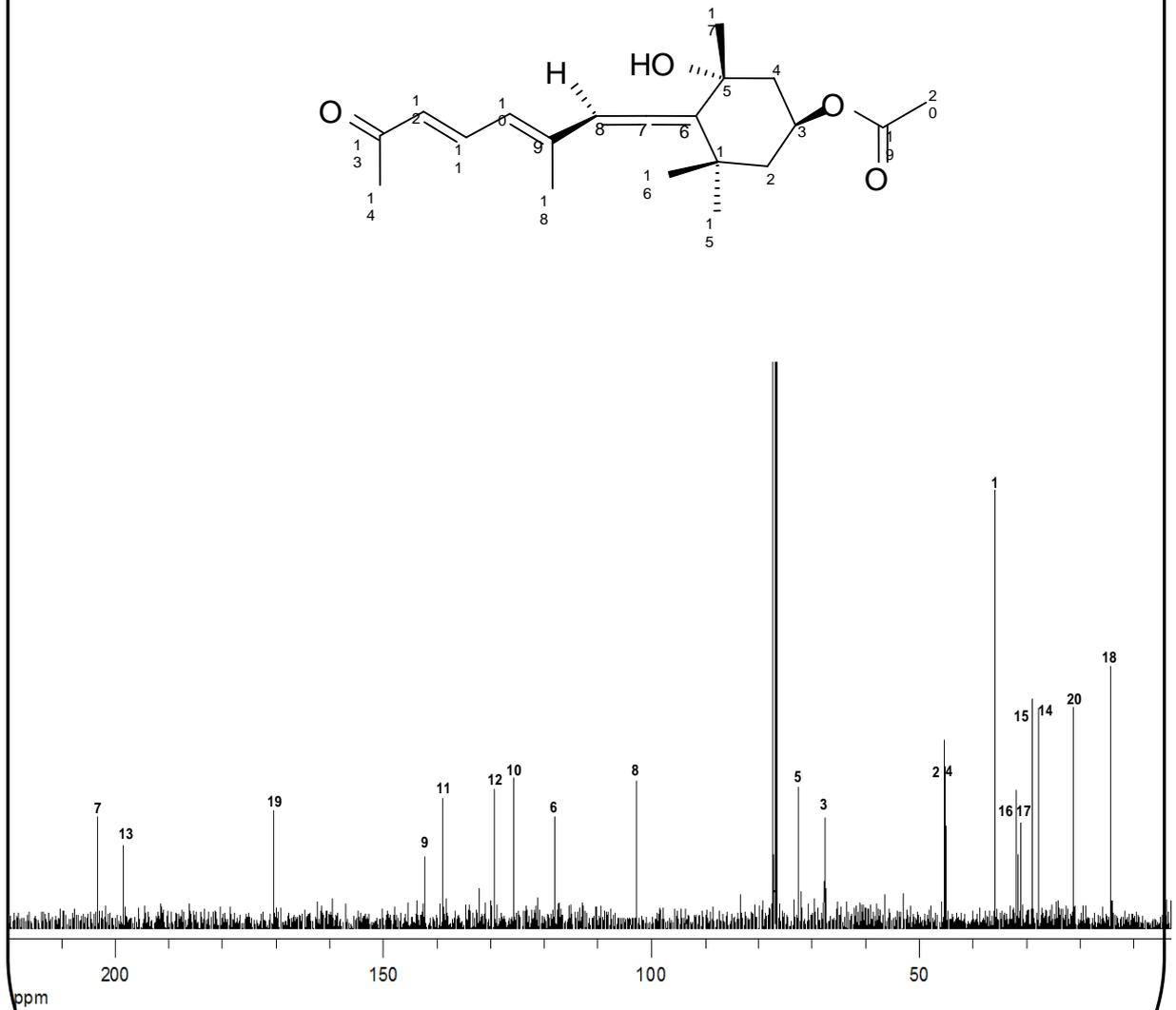
- valeur observée pour  $[M+Na]^+ = 355,1875$
- valeur calculée : 355,1881 pour  $C_{20}H_{28}O_4Na$  soit une masse molaire de 322 g/mol pour **H2**.

Annexe 9 : Spectre Infrarouge du produit **H2**

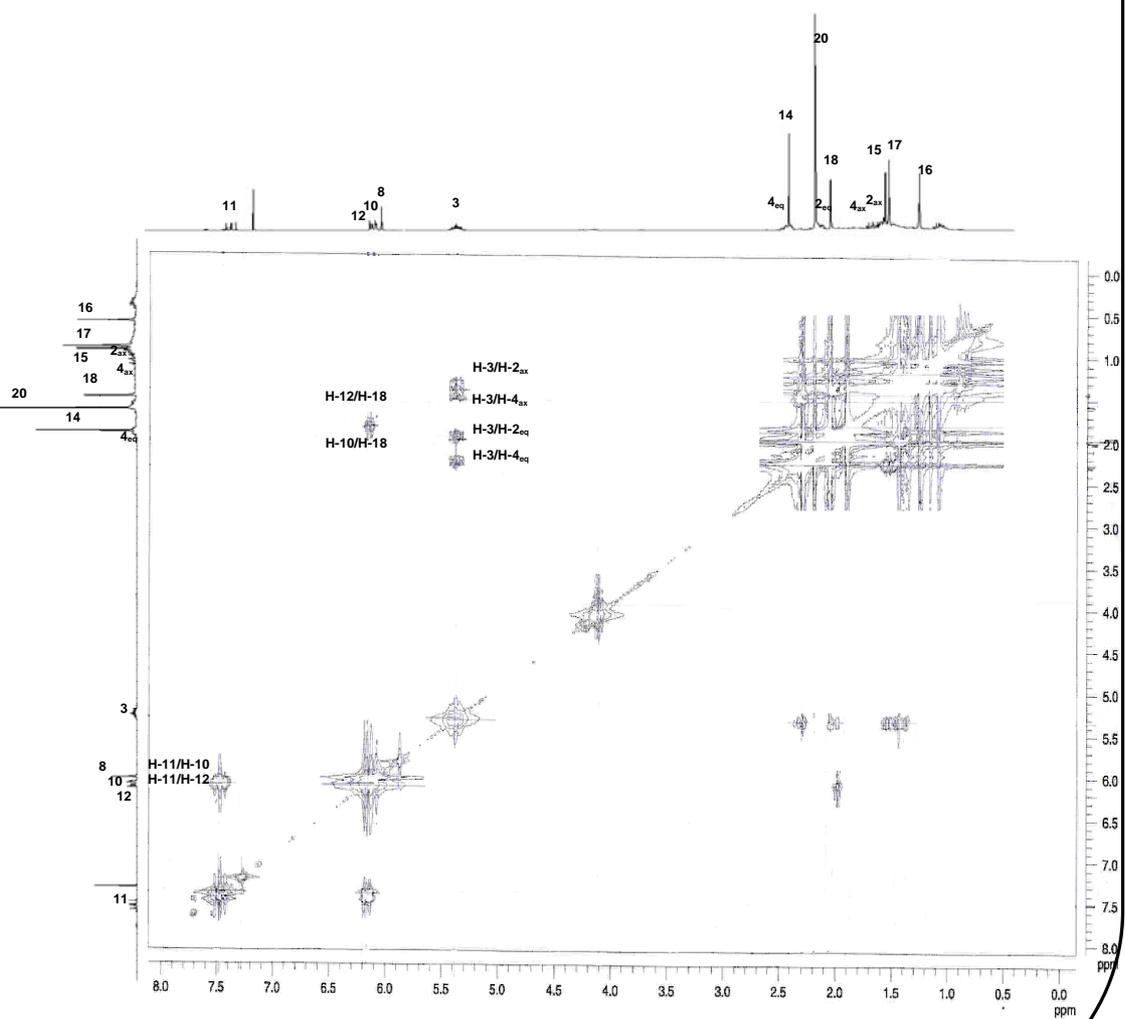
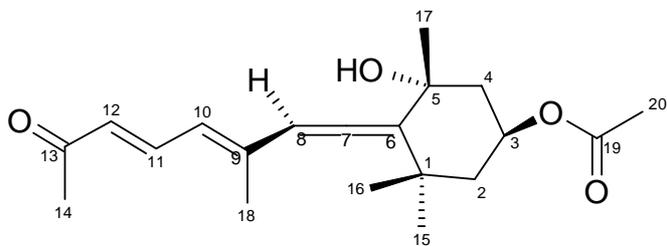
Annexe 10 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 500 MHz dans  $\text{CDCl}_3$   
du produit **H2**



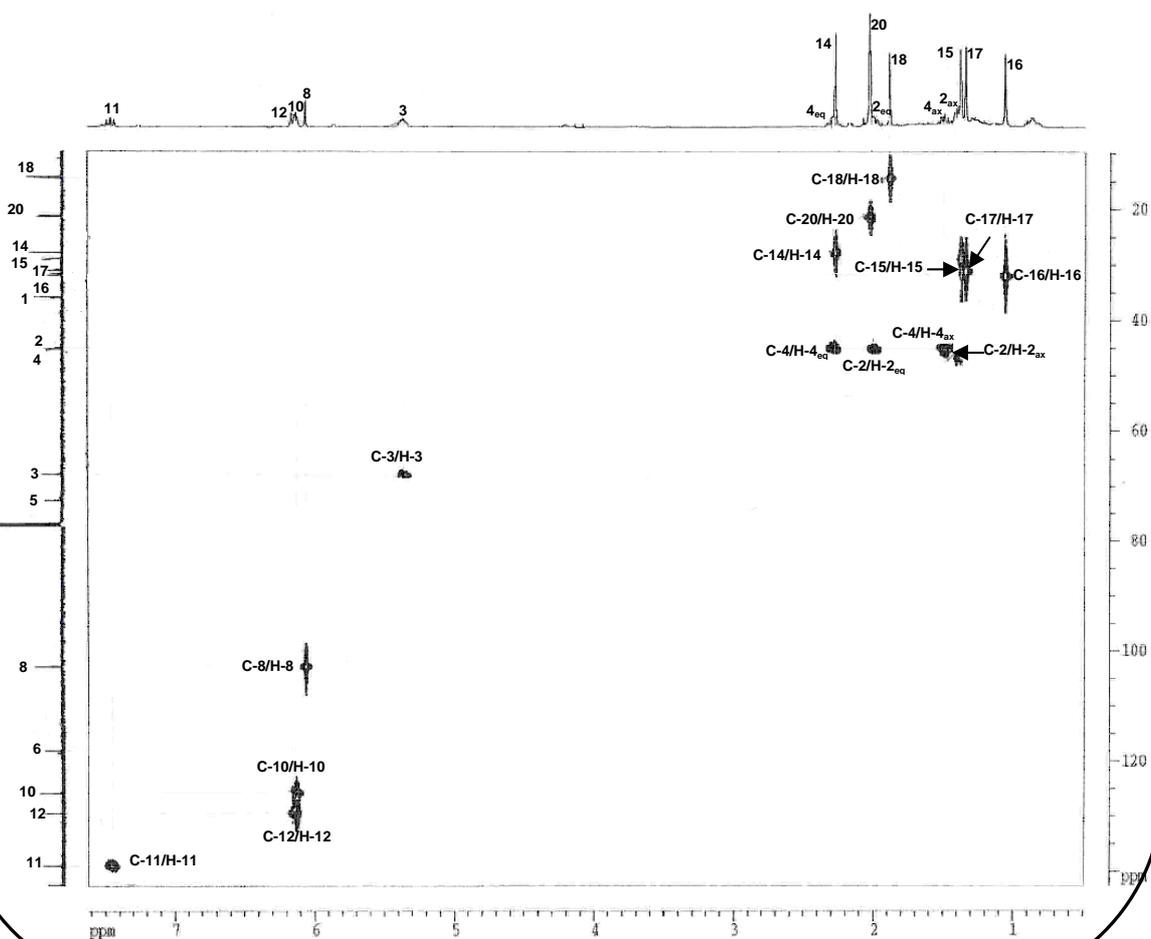
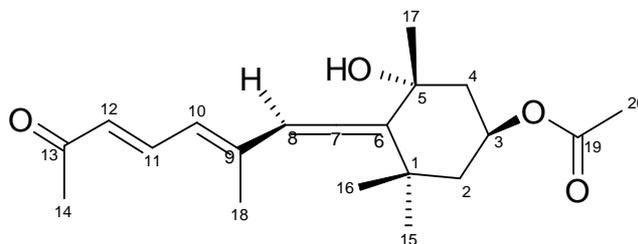
Annexe 11 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  à 125 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **H2**



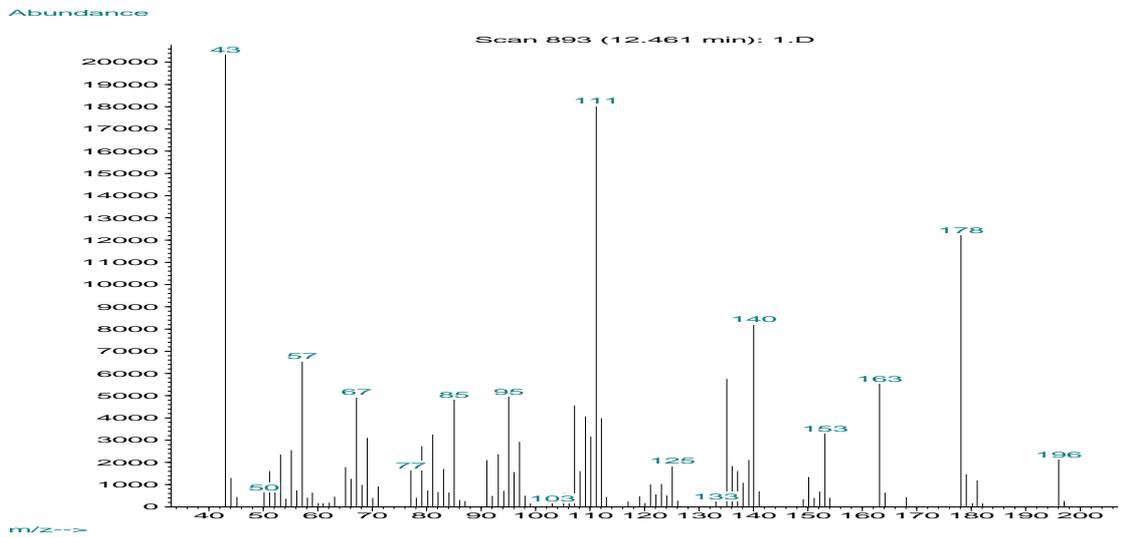
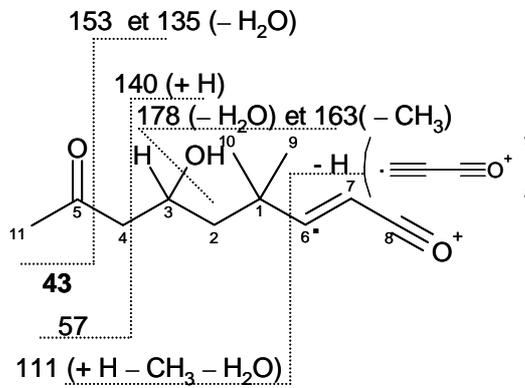
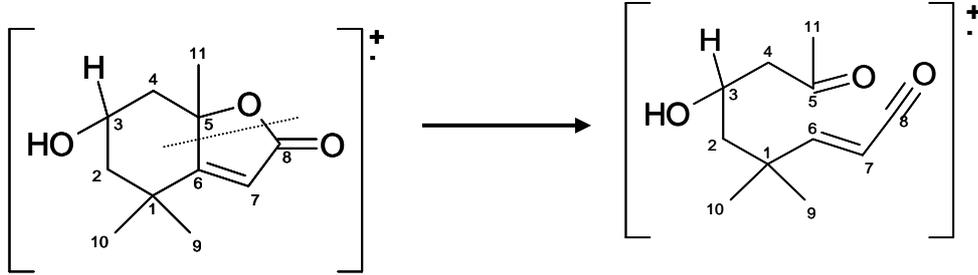
Annexe 12 : Spectre RMN COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  à 500 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **H2**

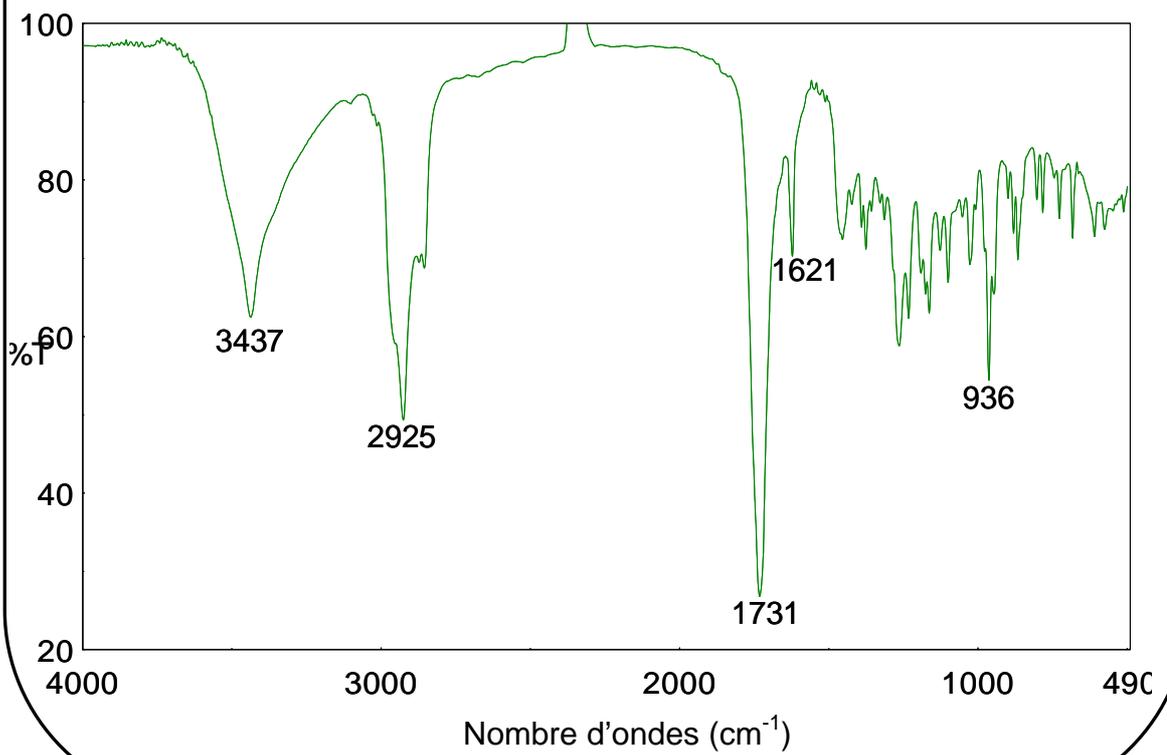
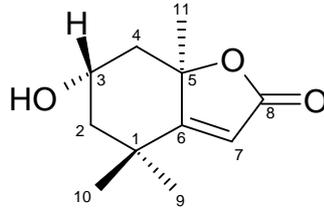


Annexe 13 : Spectre RMN COSY  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  à 125 Mhz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **H2**

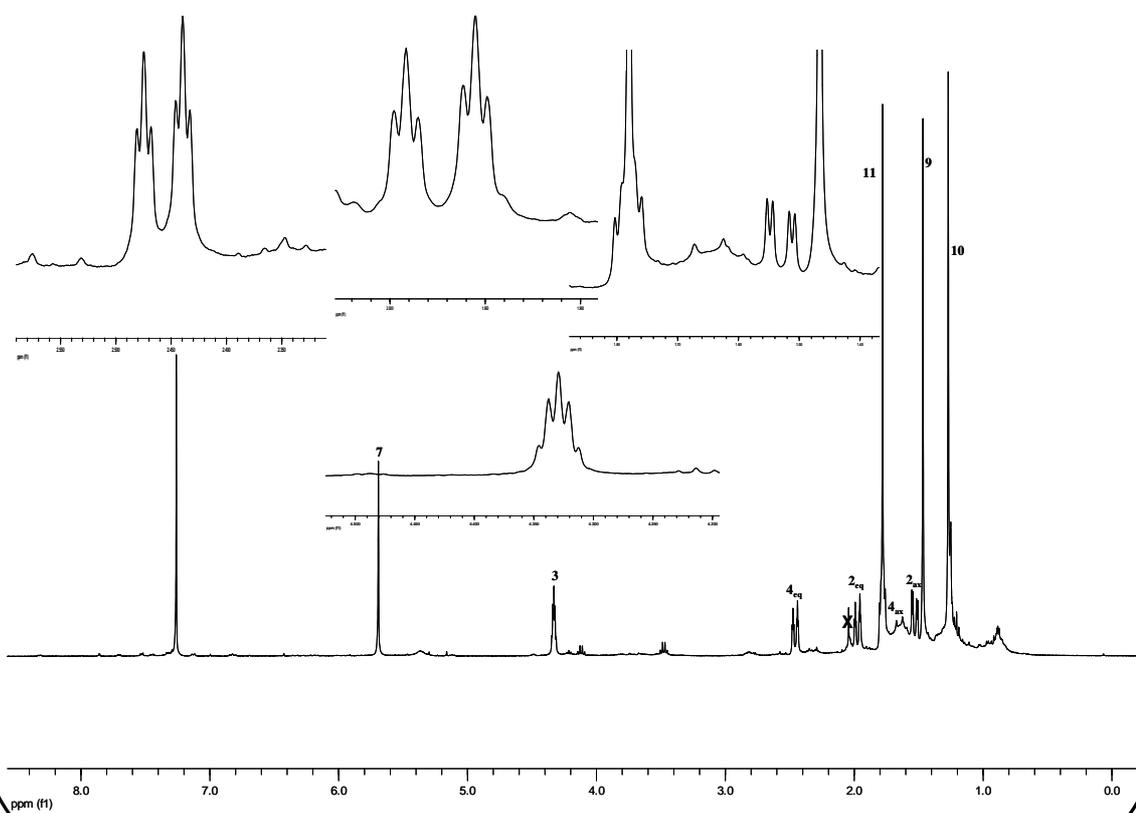
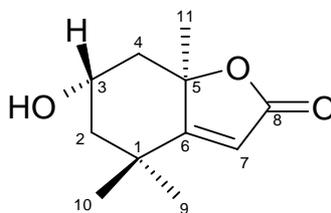


Annexe 14 : Spectre de masse du produit **H3**  
 - Basse résolution par impact électronique

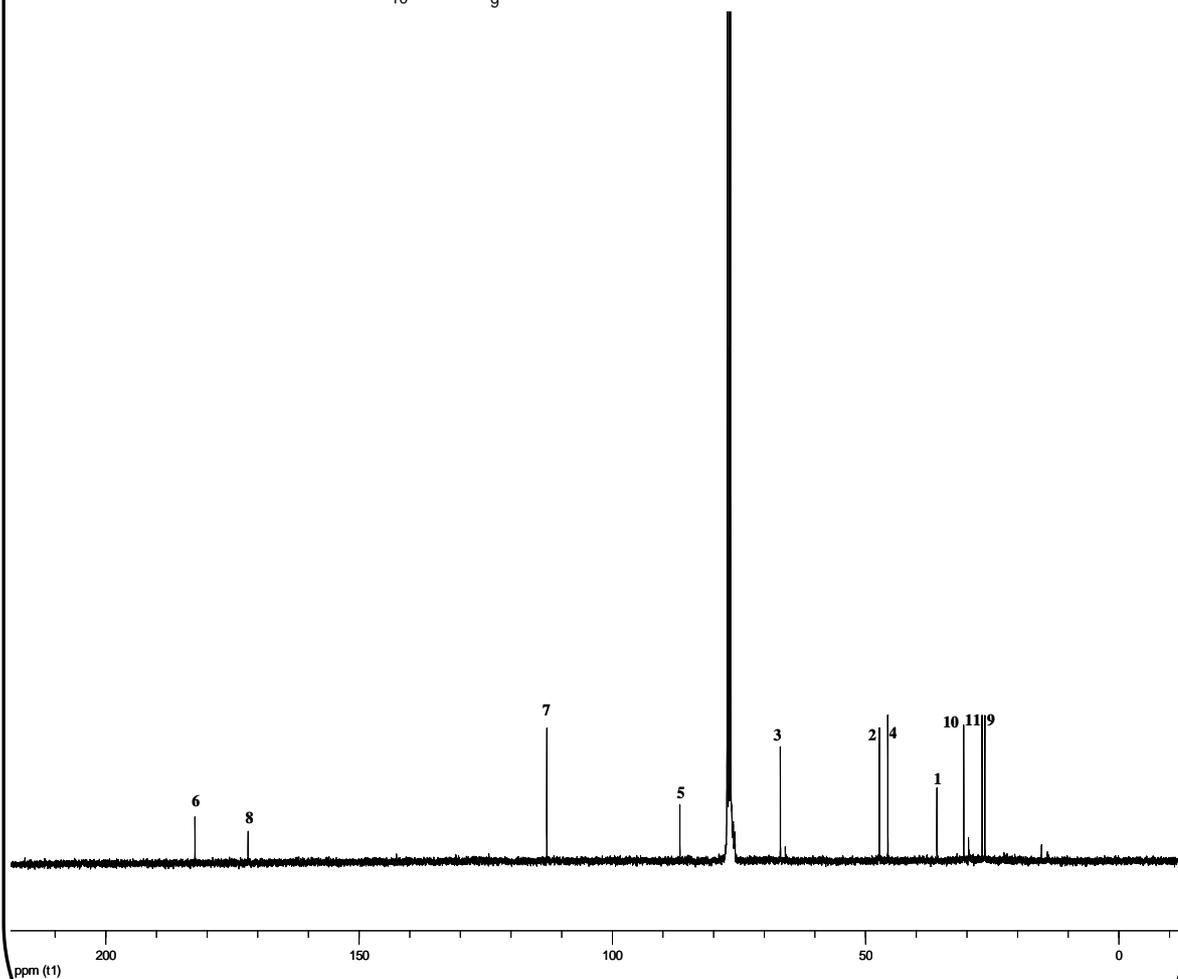
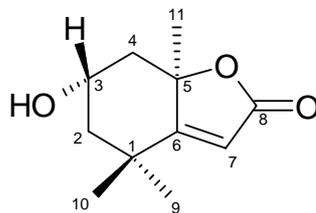


Annexe 15 : Spectre Infrarouge du produit **H3**

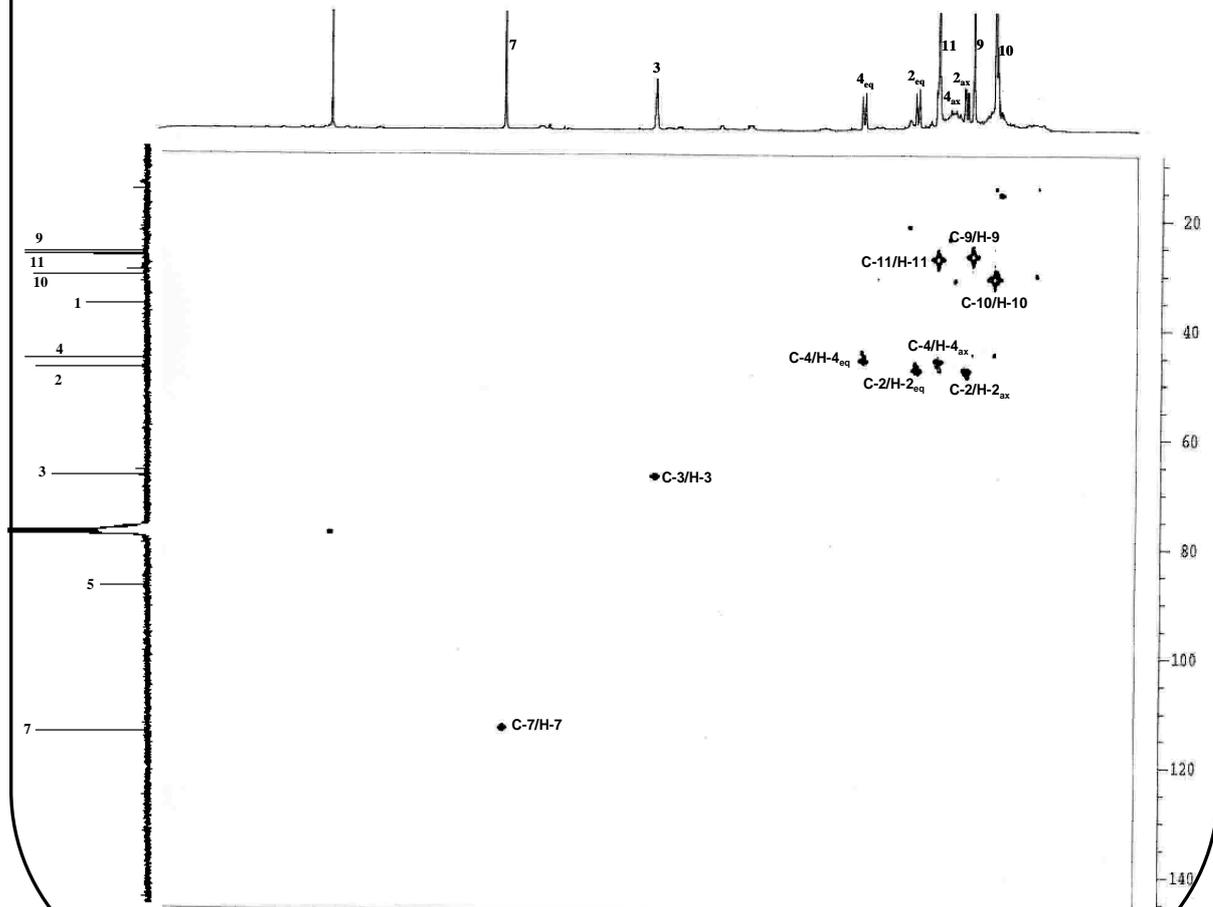
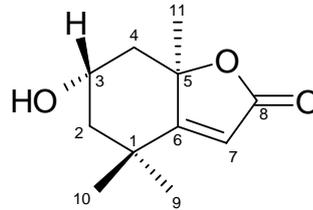
Annexe 16 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **H3**



Annexe 17 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$   
du produit **H3**

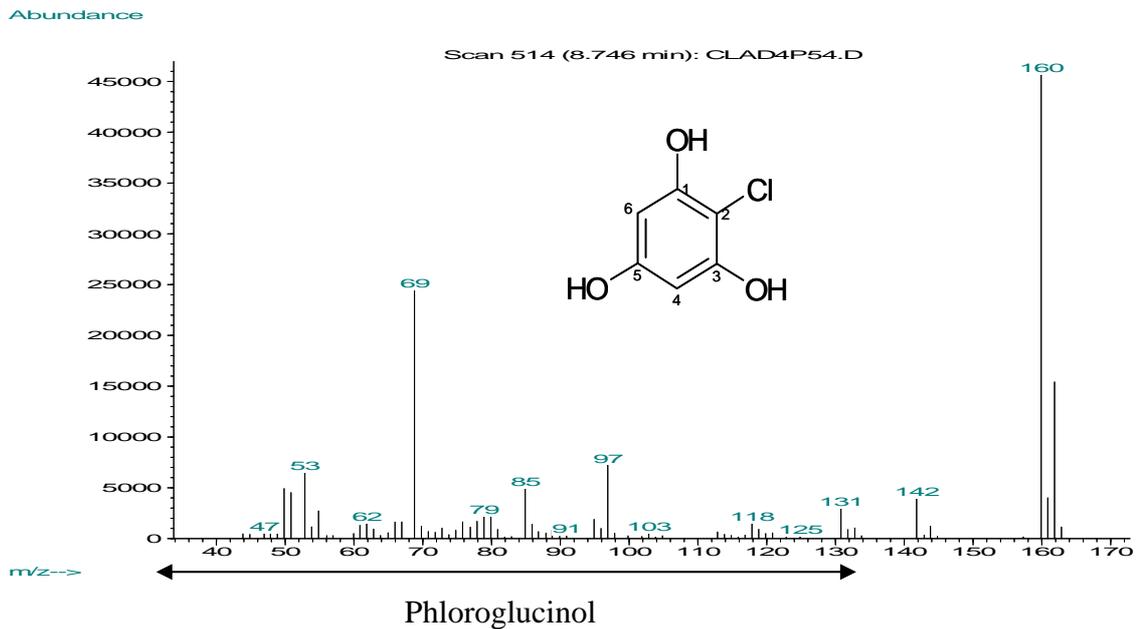


Annexe 18 : Spectre RMN HMQC à 500 MHz dans CDCl<sub>3</sub> du produit **H3**



Annexe 19 : Spectre de masse du produit **H4**

## a) Basse résolution par impact électronique

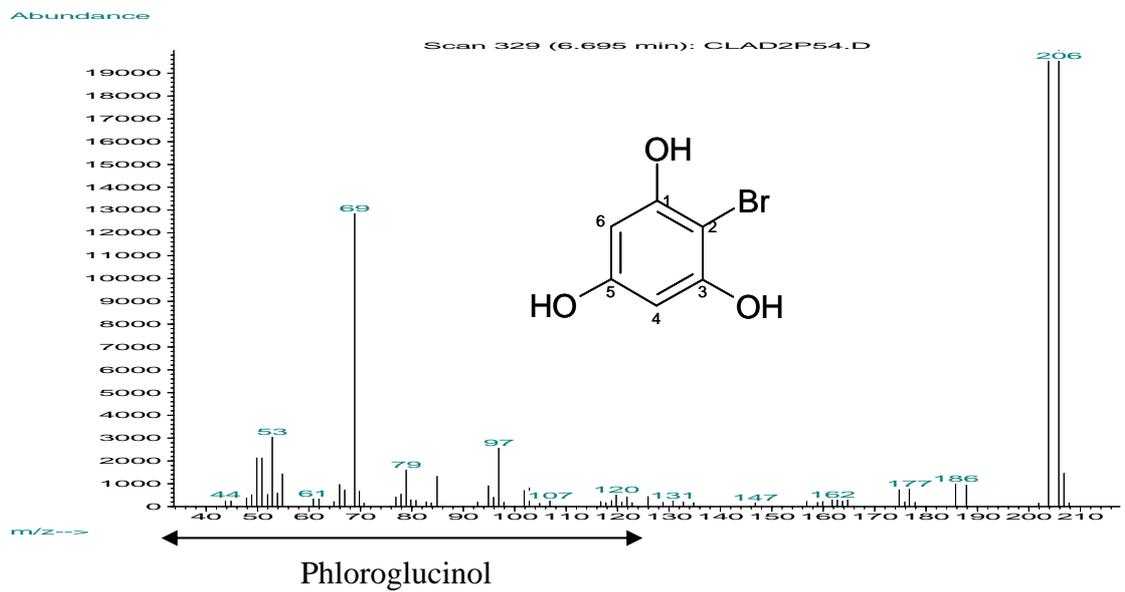


## b) Haute résolution par la méthode FAB

- valeur observée pour  $[M]^+$  = 159,9940
- valeur calculée : 159,9927 pour  $C_6H_5O_3.35Cl$   
soit une masse molaire de 160 g/mol pour **H4**.

Annexe 20 : Spectre de masse du produit **H5**

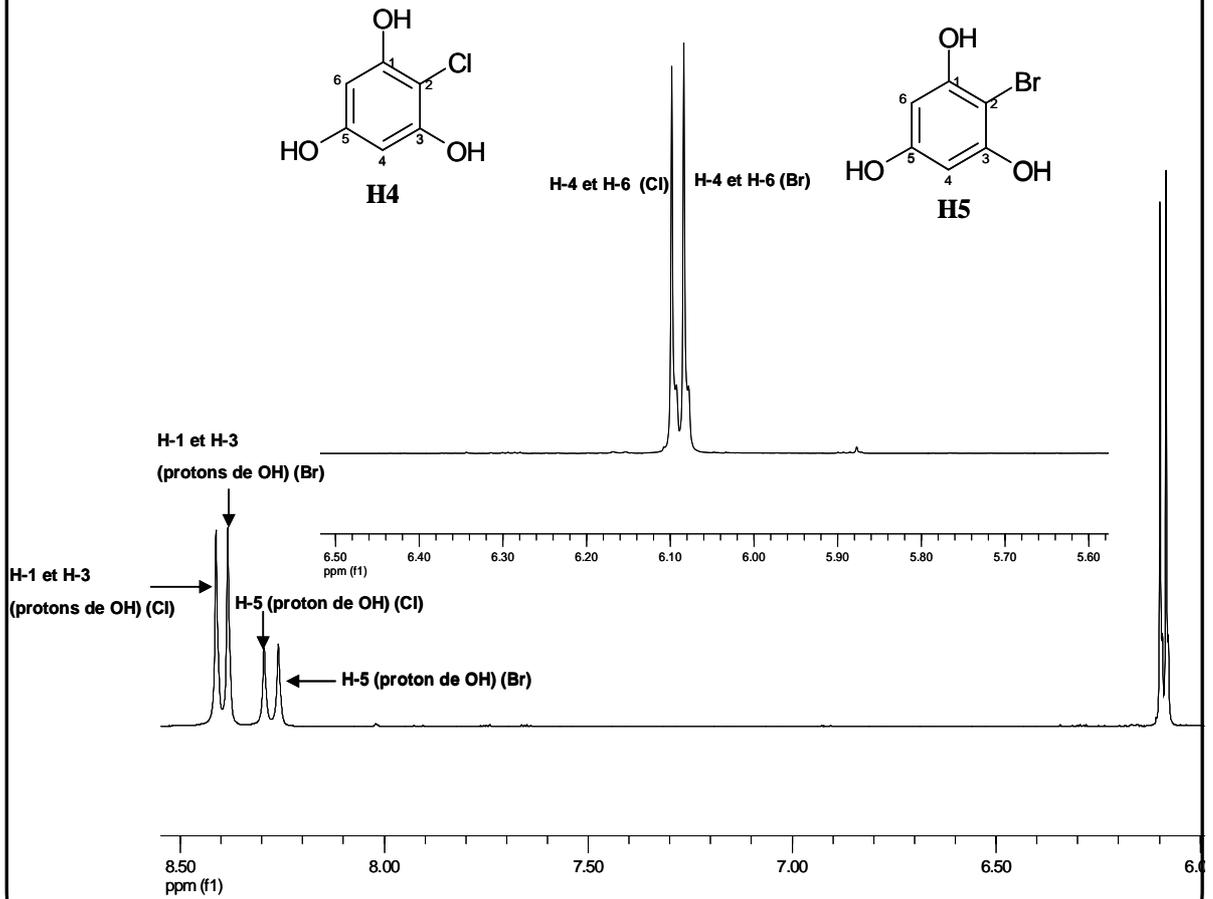
## a) Basse résolution par impact électronique



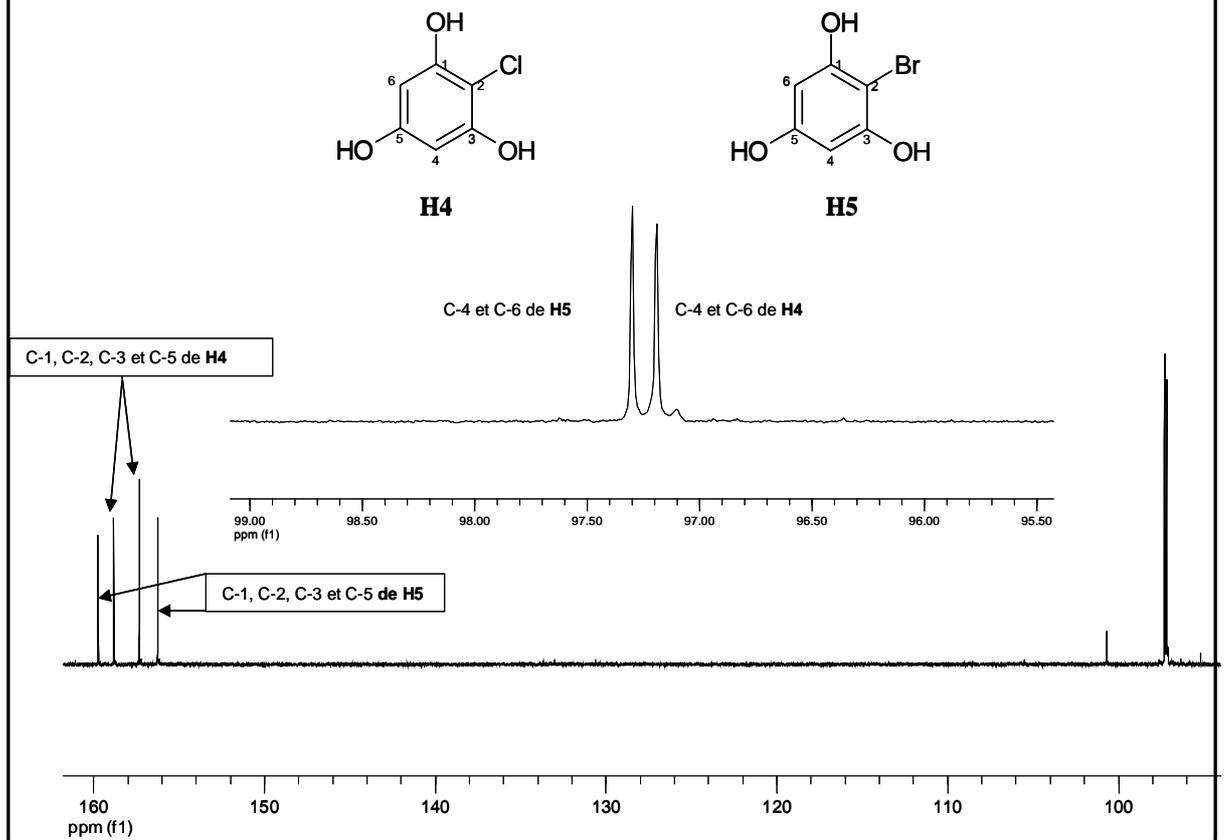
## b) Haute résolution par la méthode FAB

- valeur observée pour  $[M]^+ = 203,9428$
- valeur calculée : 203,9422 pour  $C_6H_5O_3\text{ }^{79}\text{Br}$  soit une masse molaire de 204 g/mol pour **H5**.

Annexe 21 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du mélange de produits **H4** et **H5**



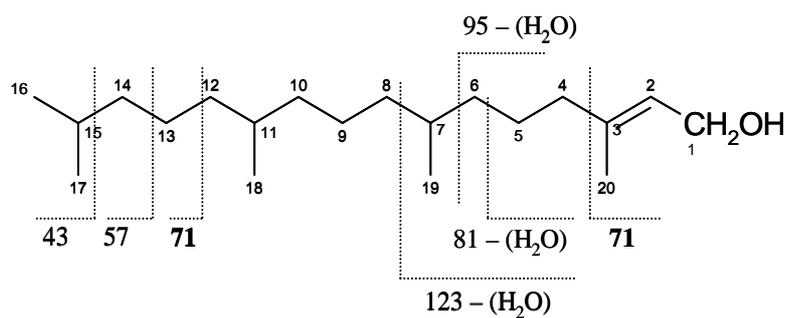
Annexe 22 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  à 100 MHz du mélange de produits **H4** et **H5**



## APPENDICE B

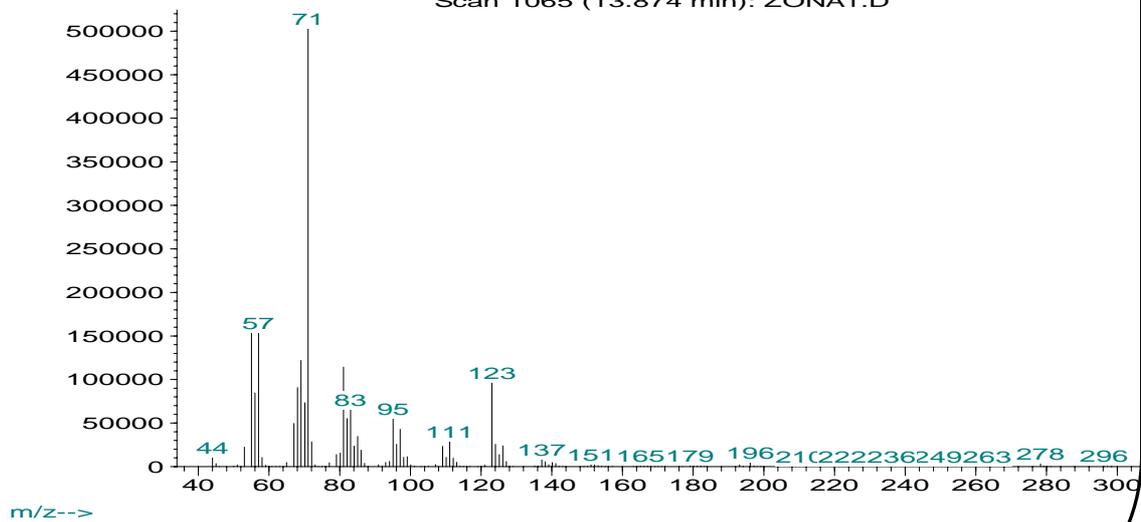
## DIFFERENTS SPECTRES DES PRODUITS Z1, Z2, Z3, Z4, Z5 ET Z6

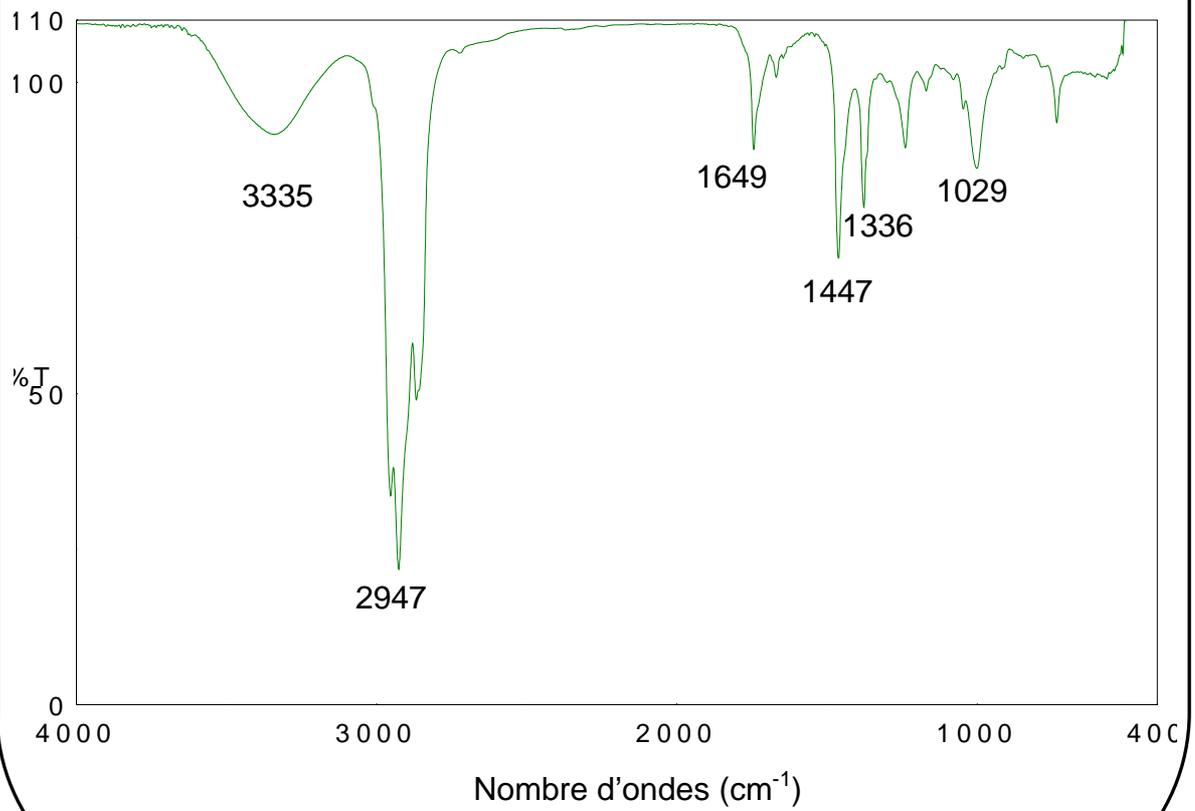
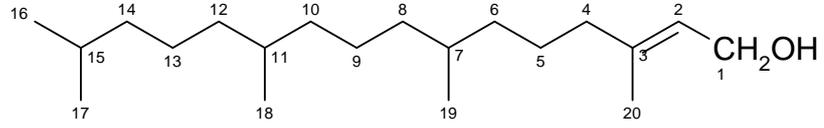
Annexe 1 : Spectre de masse par impact électronique du produit **Z1**  
 - Basse résolution par impact électronique

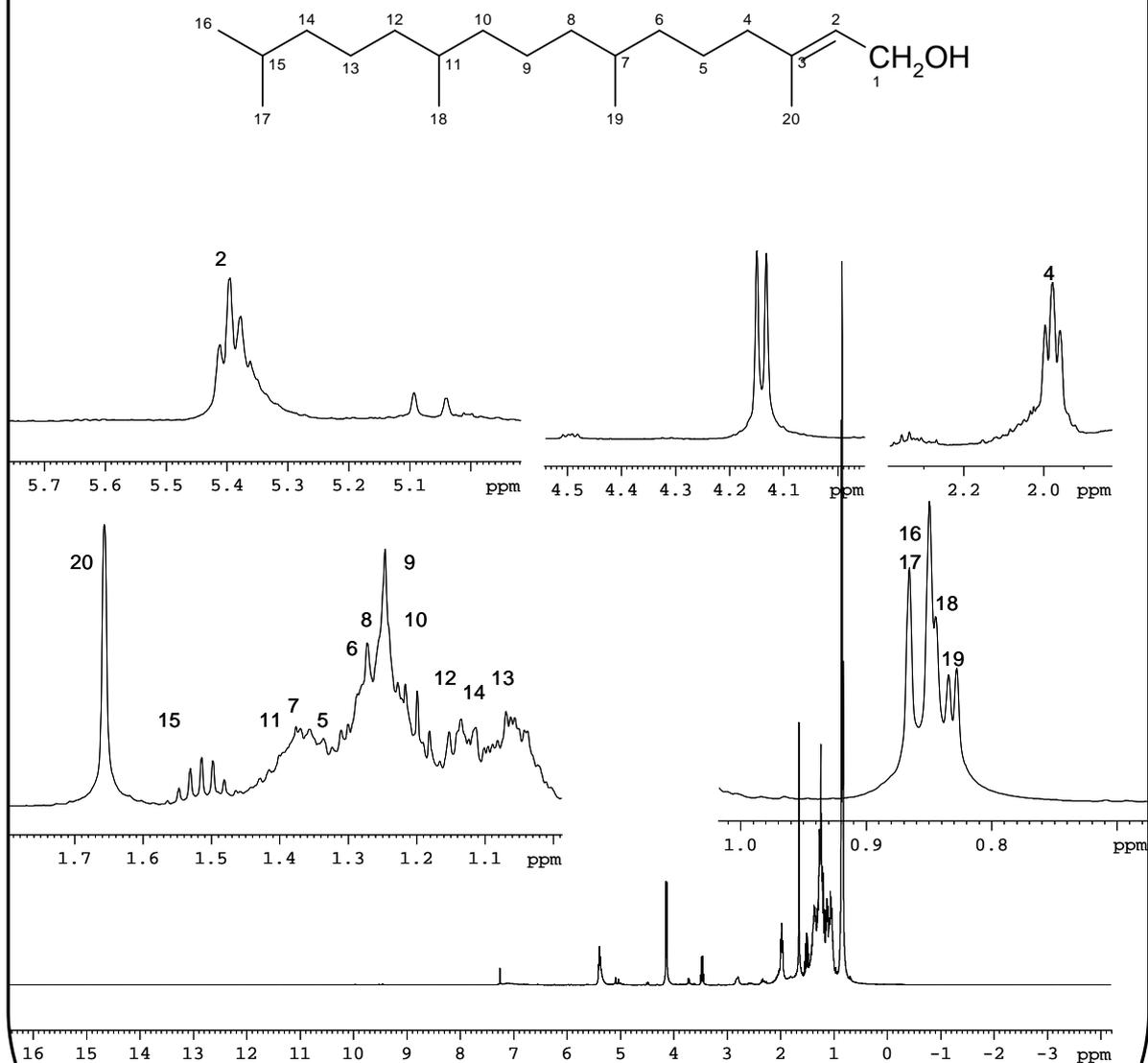


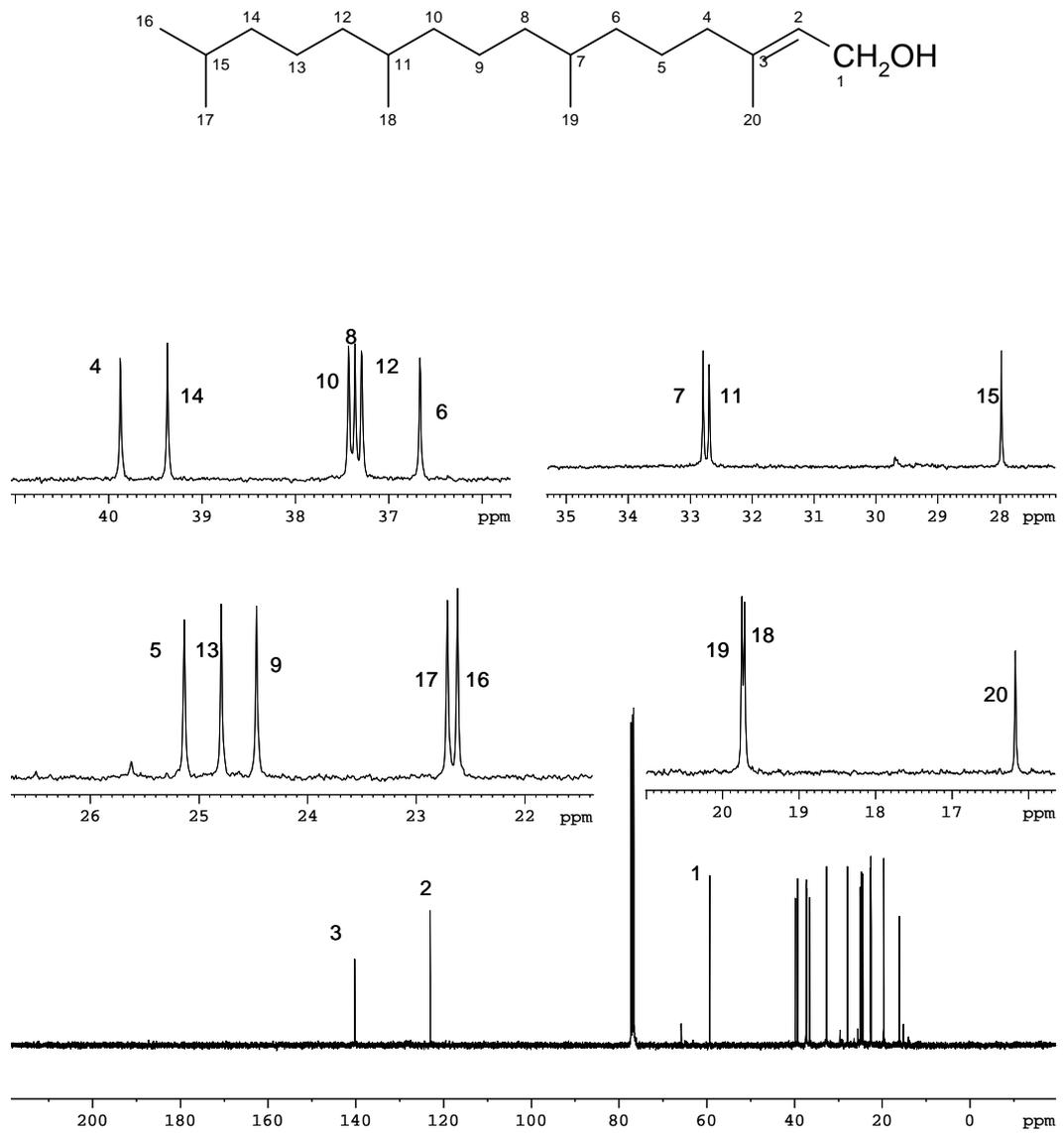
Abundance

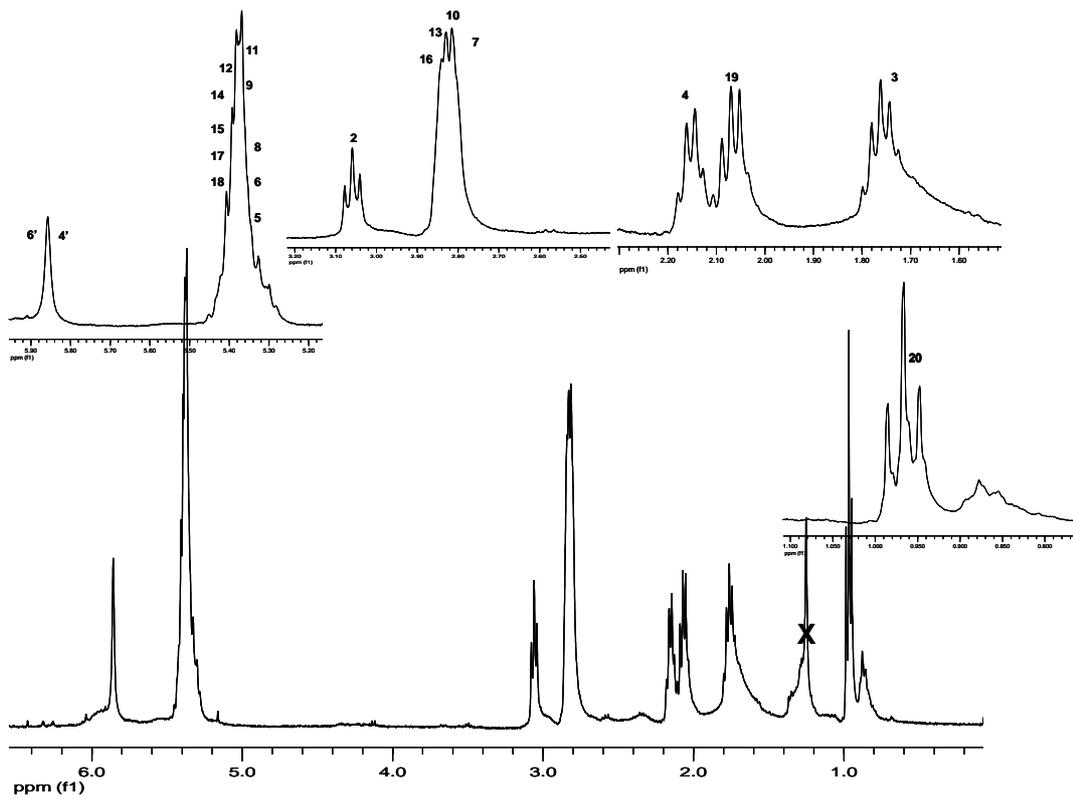
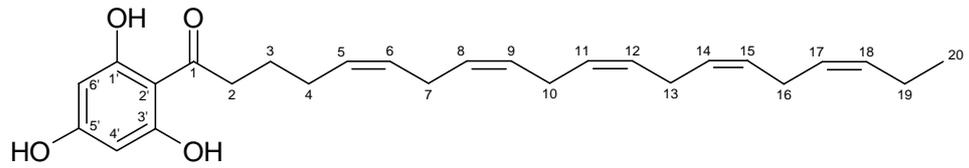
Scan 1065 (13.874 min): ZONA1.D



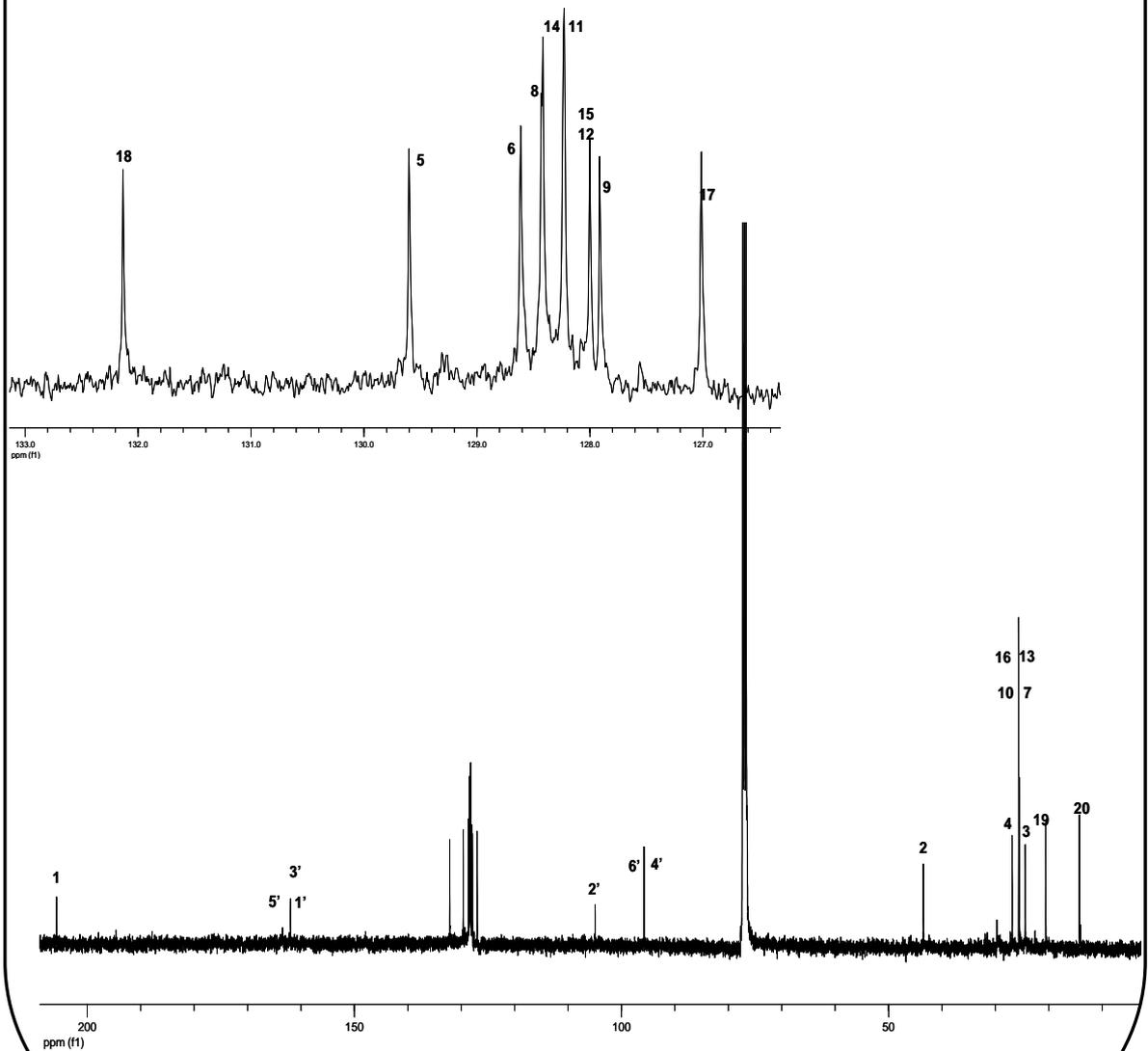
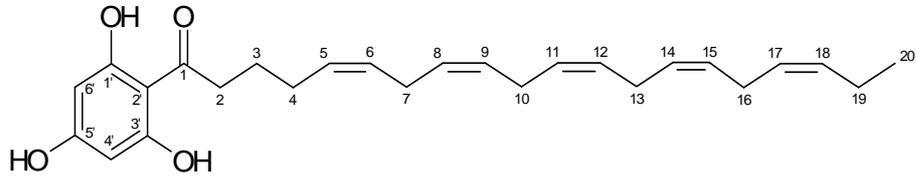
Annexe 2 : Spectre infrarouge du produit **Z1**

Annexe 3 : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **Z1**

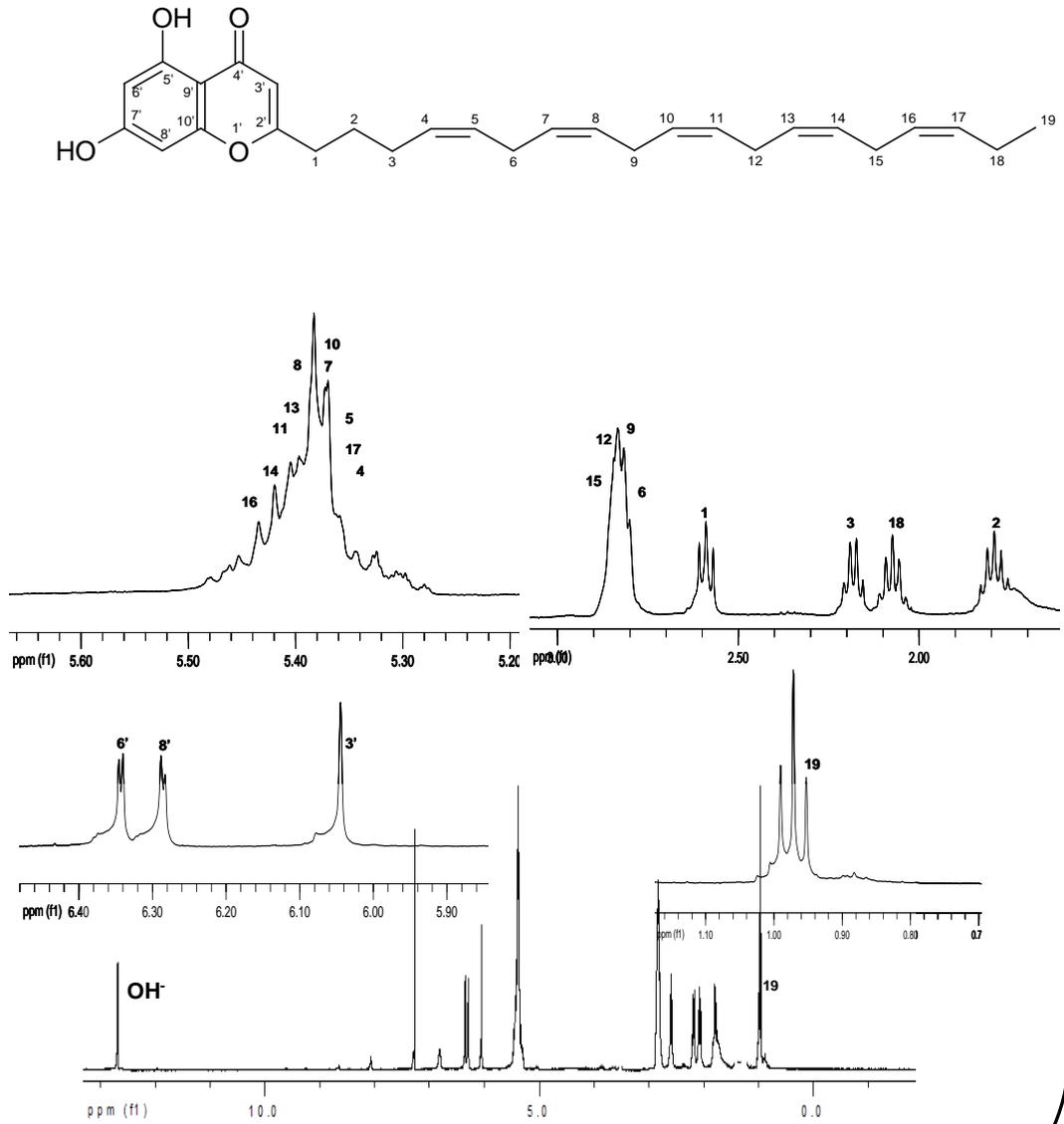
Annexe 4 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  à 100 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **Z1**

Annexe 5 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **Z2**

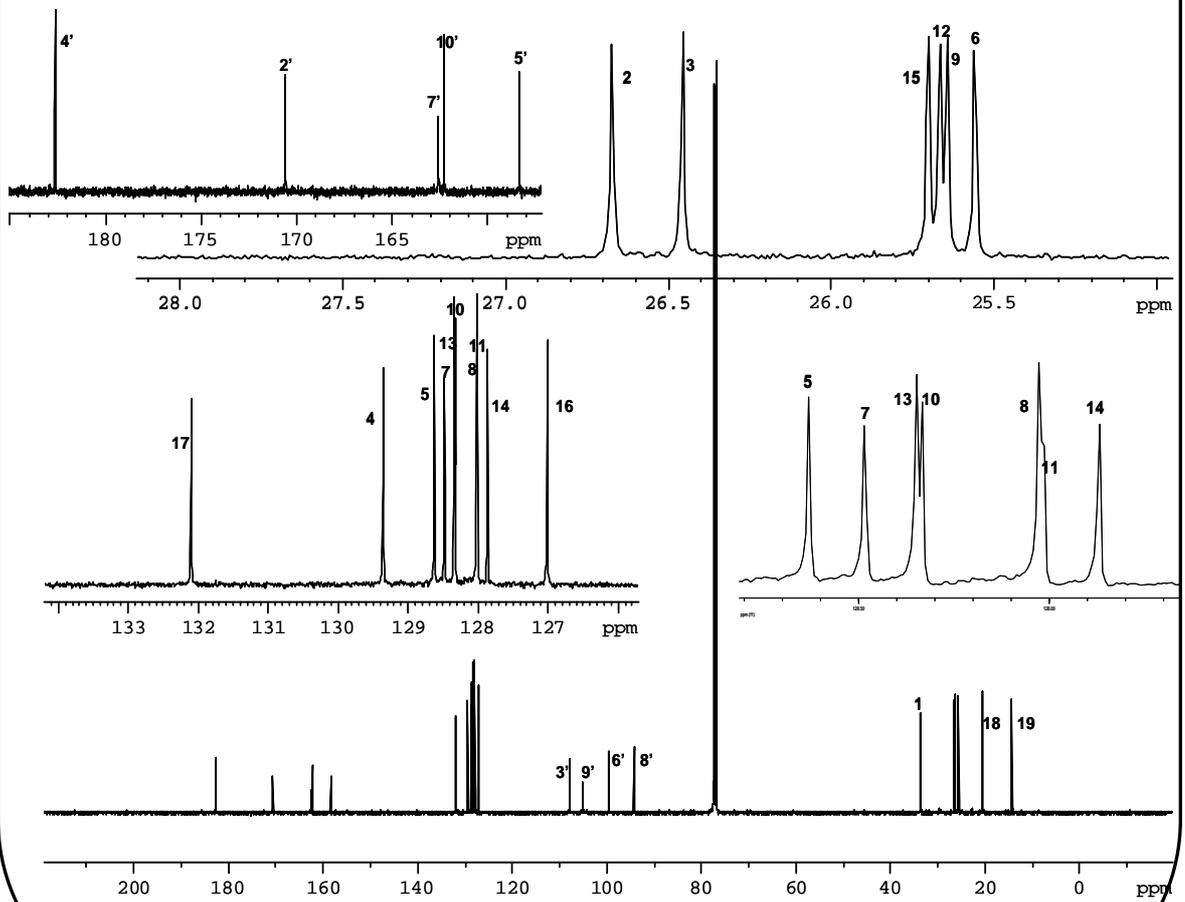
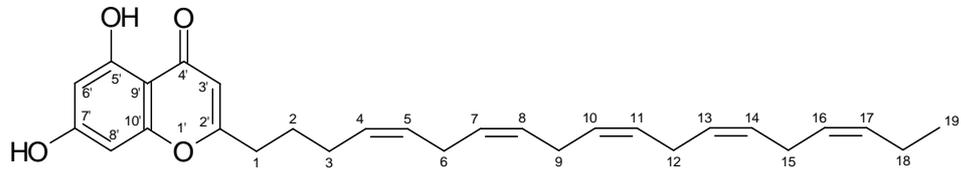
Annexe 6 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  à 100 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **Z2**

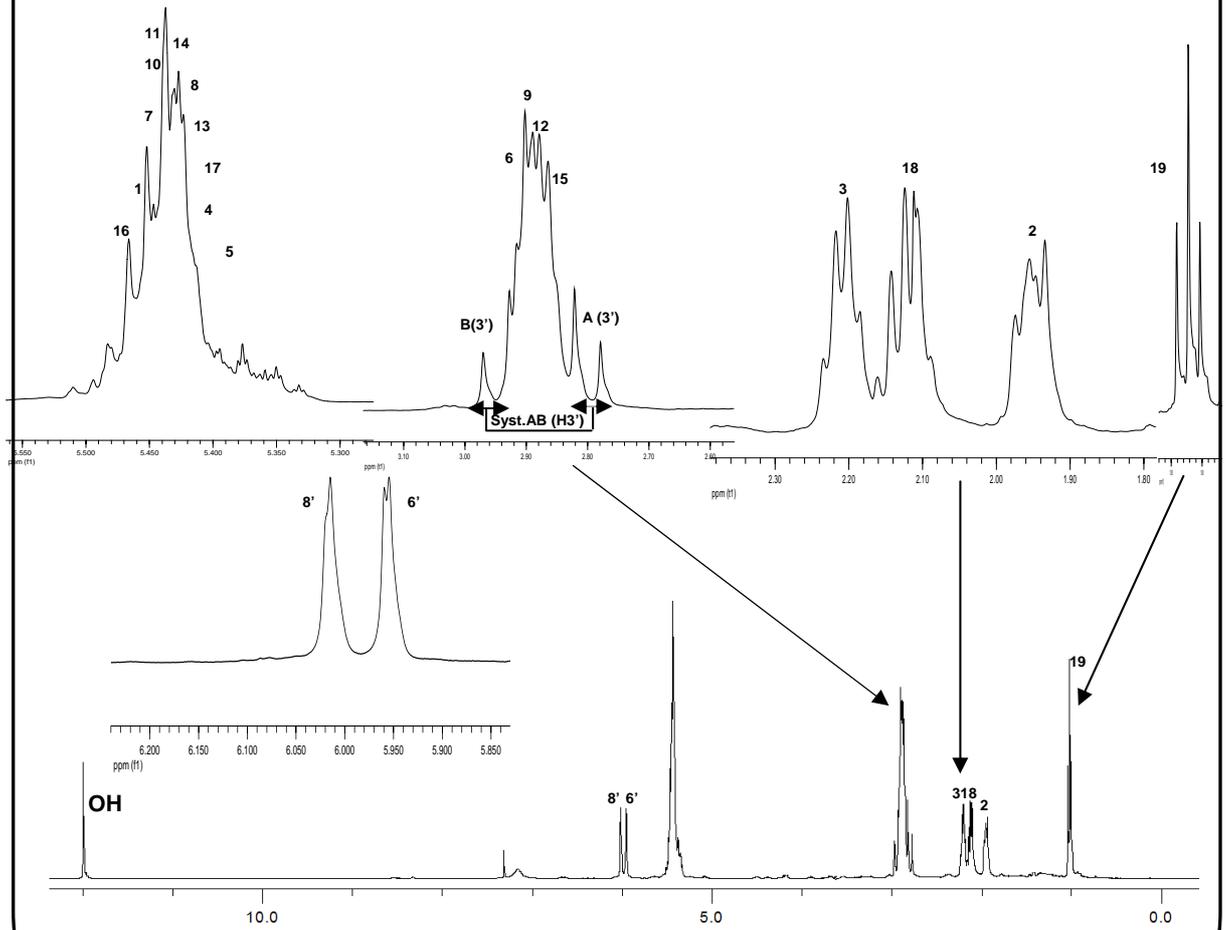
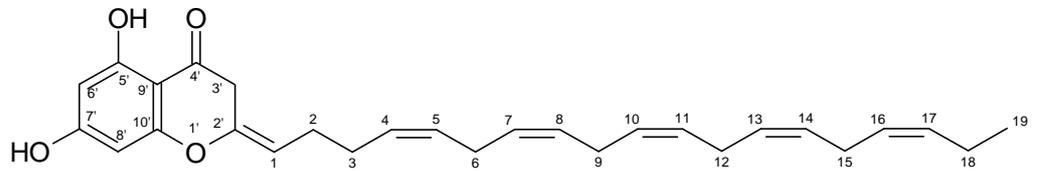


Annexe 7 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **Z3**

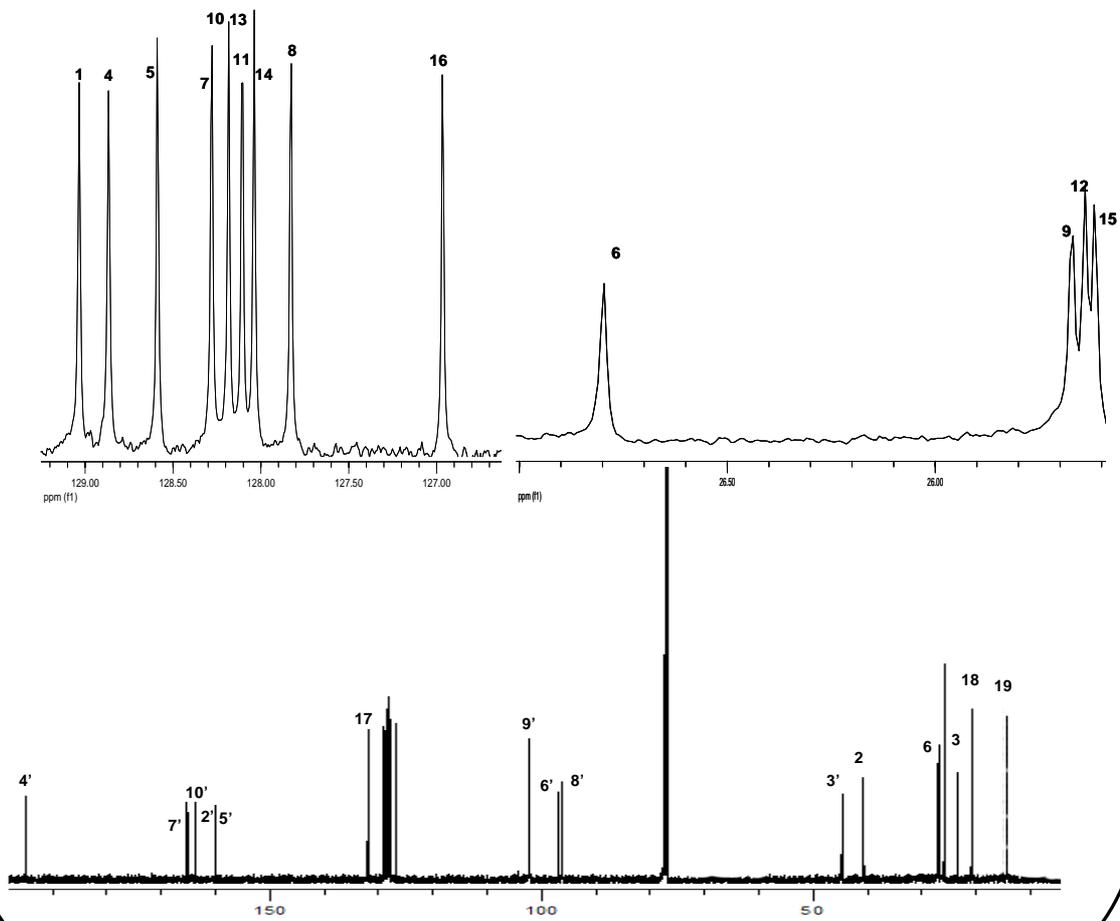
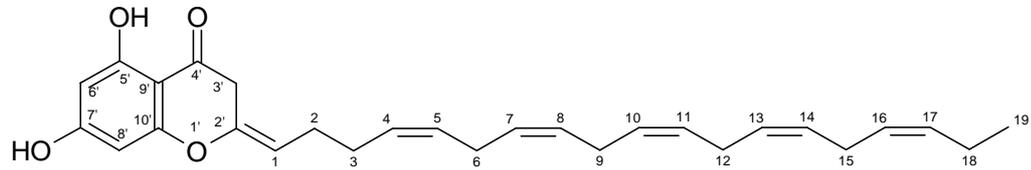


Annexe 8 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  à 100 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **Z3**



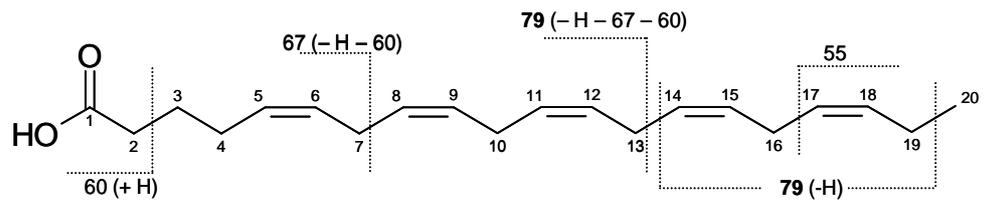
Annexe 9 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **Z4**

Annexe 10 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  à 100 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **Z4**



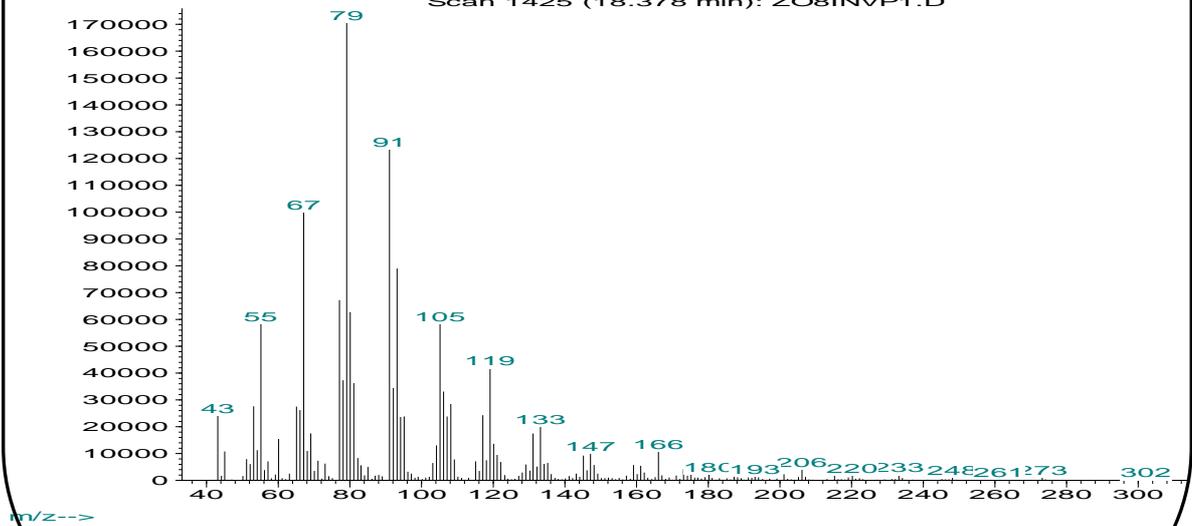
Annexe 11 : Spectre de masse du produit **Z5**

Basse résolution par impact électronique

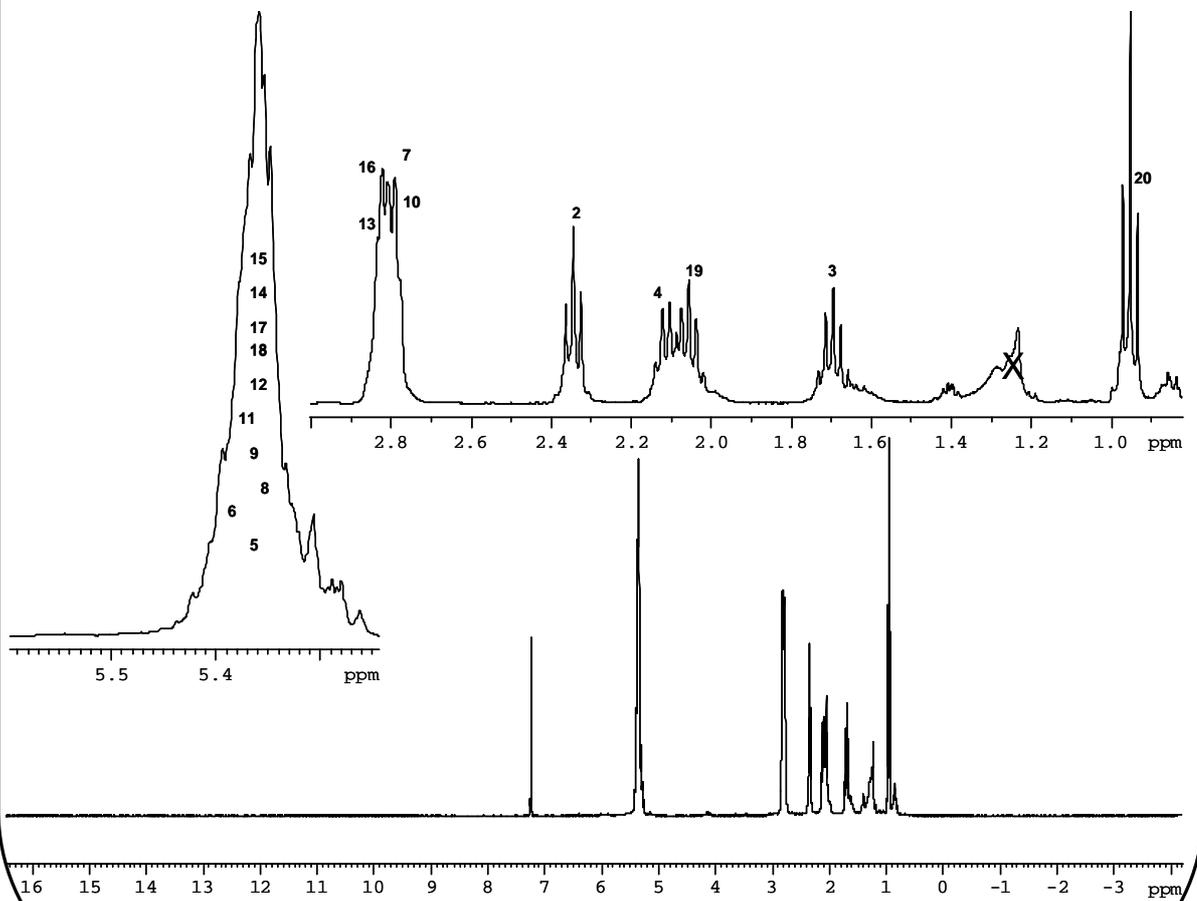
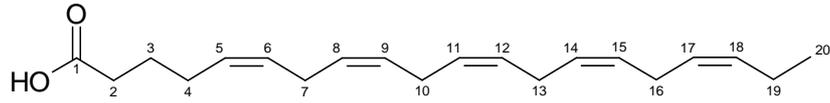


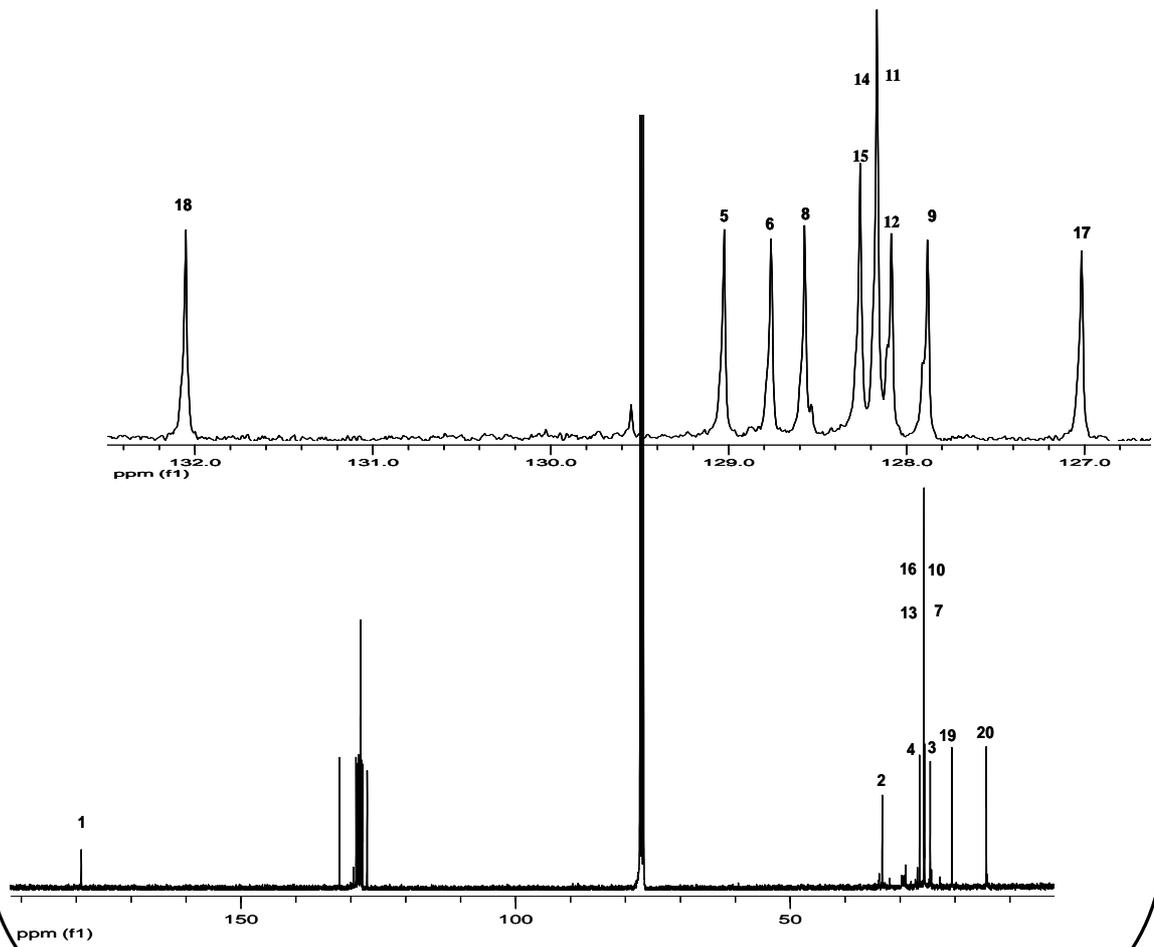
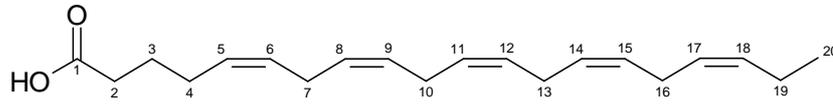
Abundance

Scan 1425 (18.378 min): ZO8INVP1.D

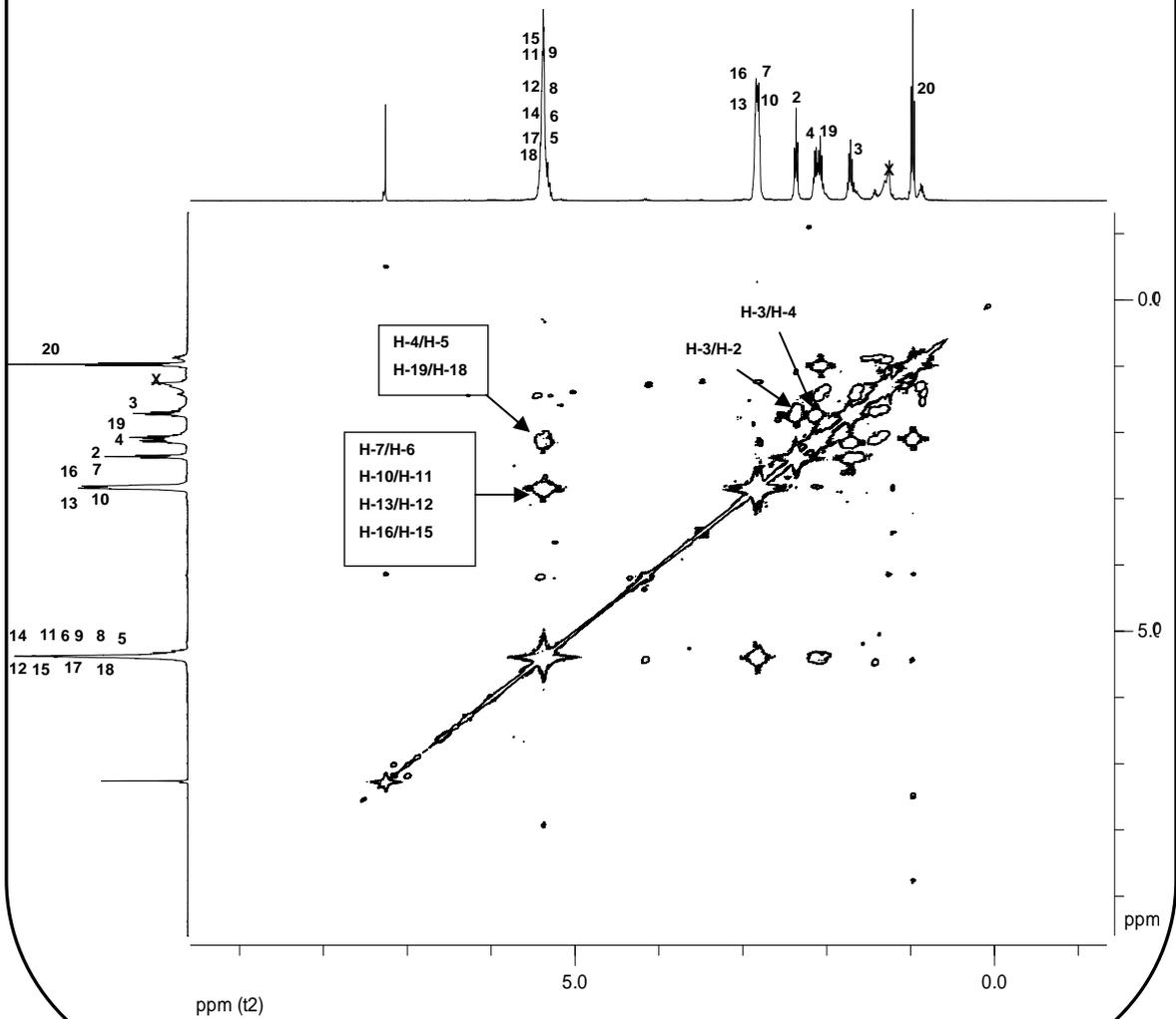
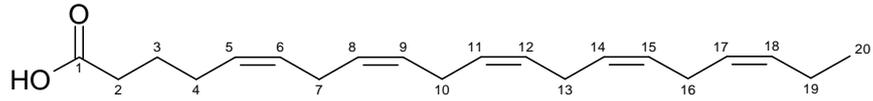


Annexe 12 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$   
du produit **Z5**

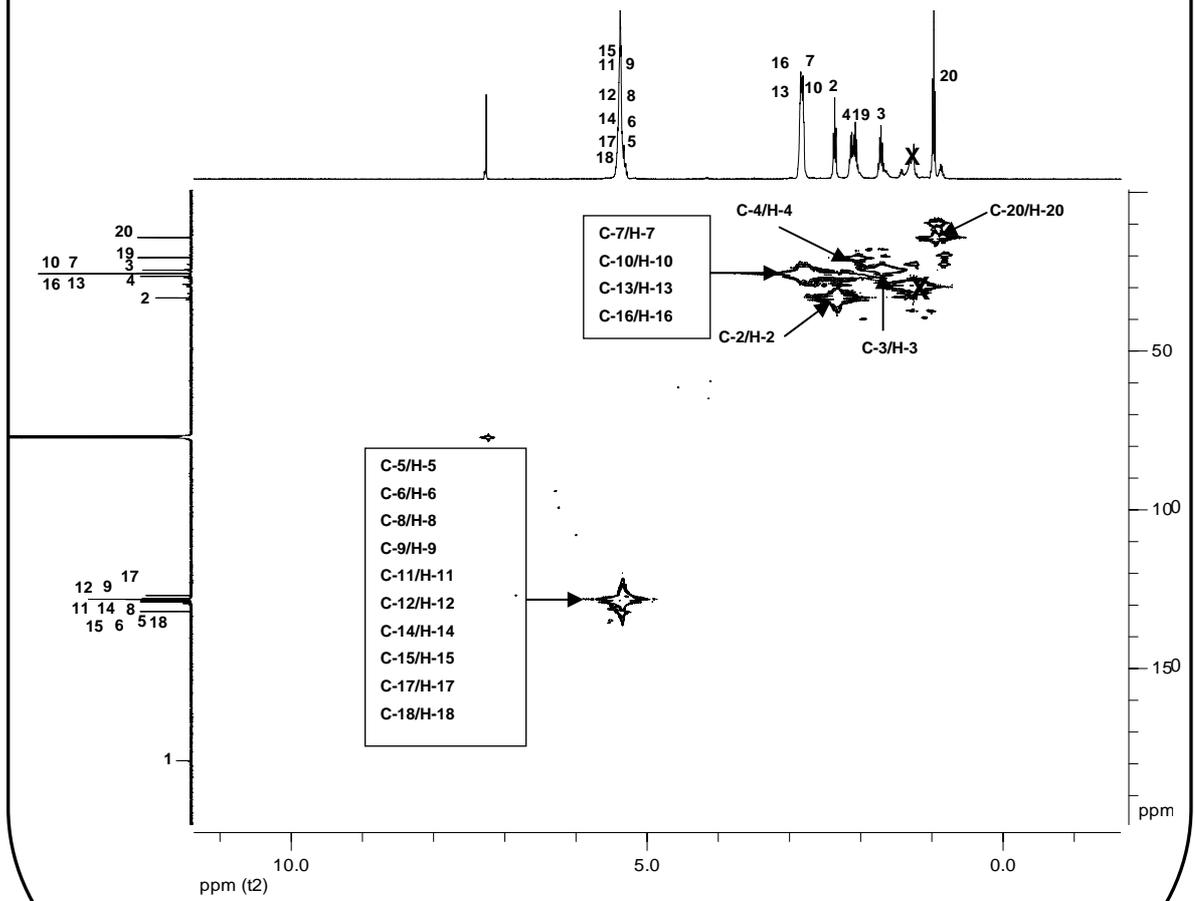
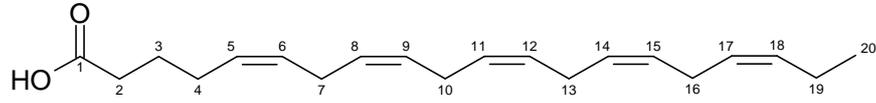


Annexe 13 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  à 100 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **Z5**

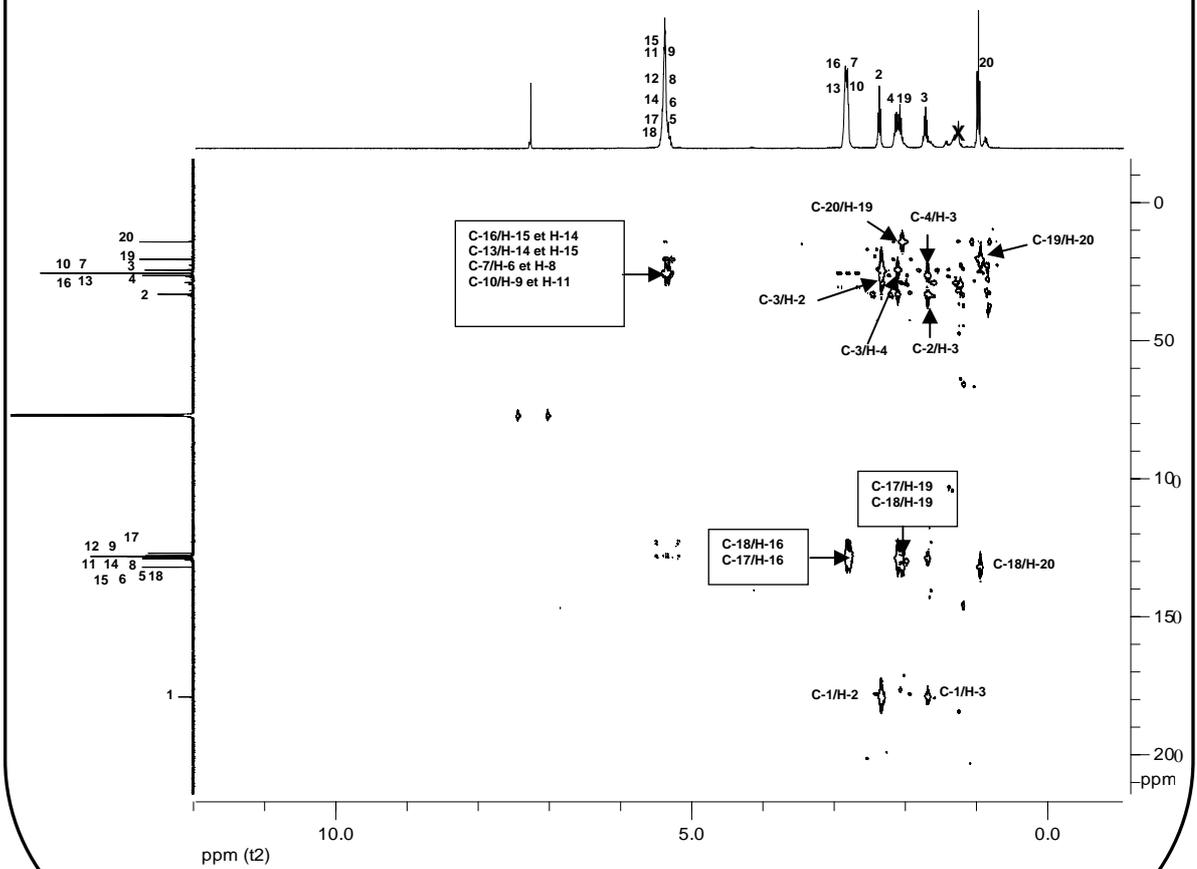
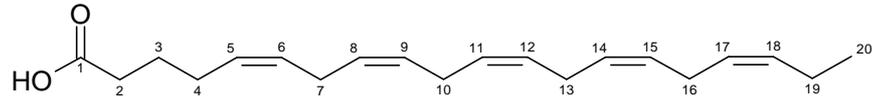
Annexe 14 : Spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **Z5**



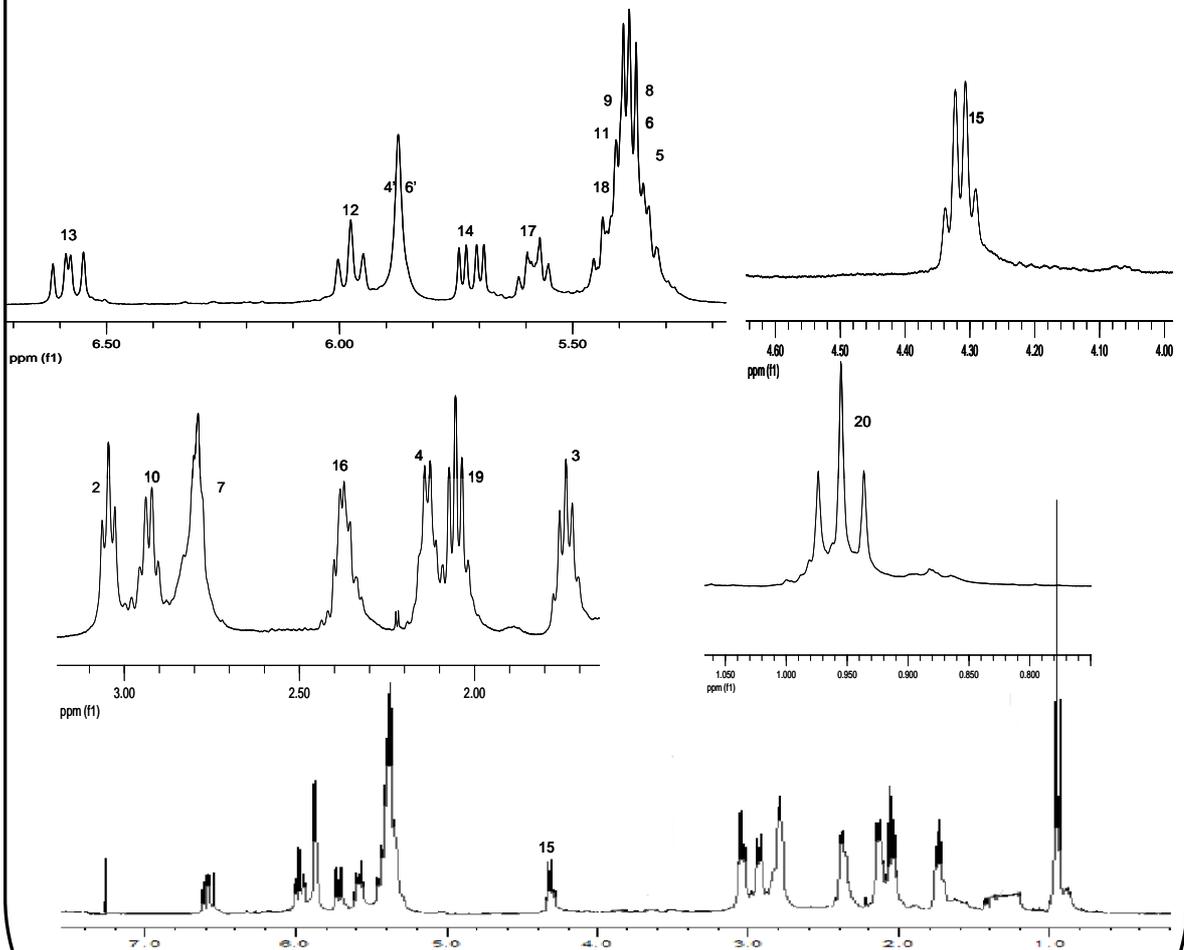
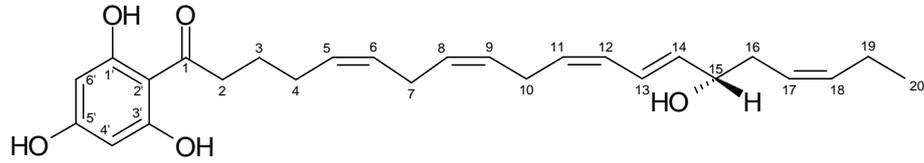
Annexe 15 : Spectre HMQC à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **Z5**



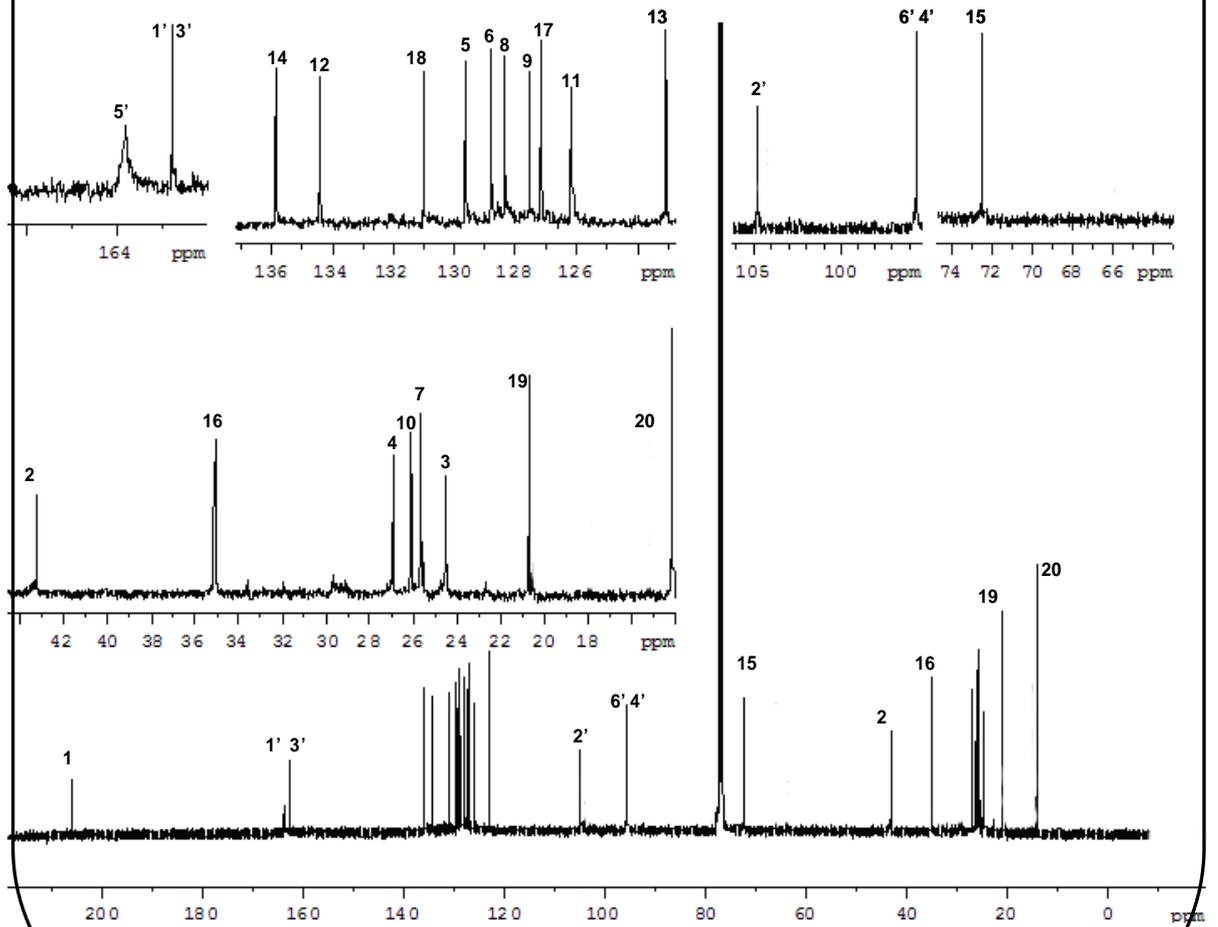
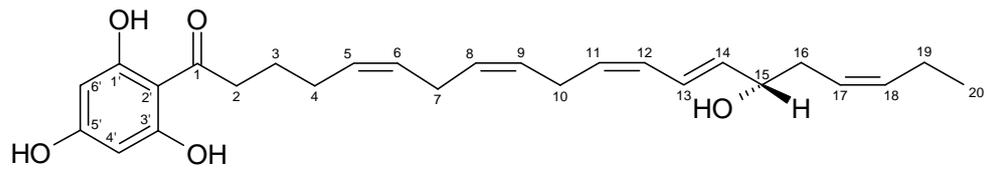
Annexe 16 : Spectre HMBC à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **Z5**



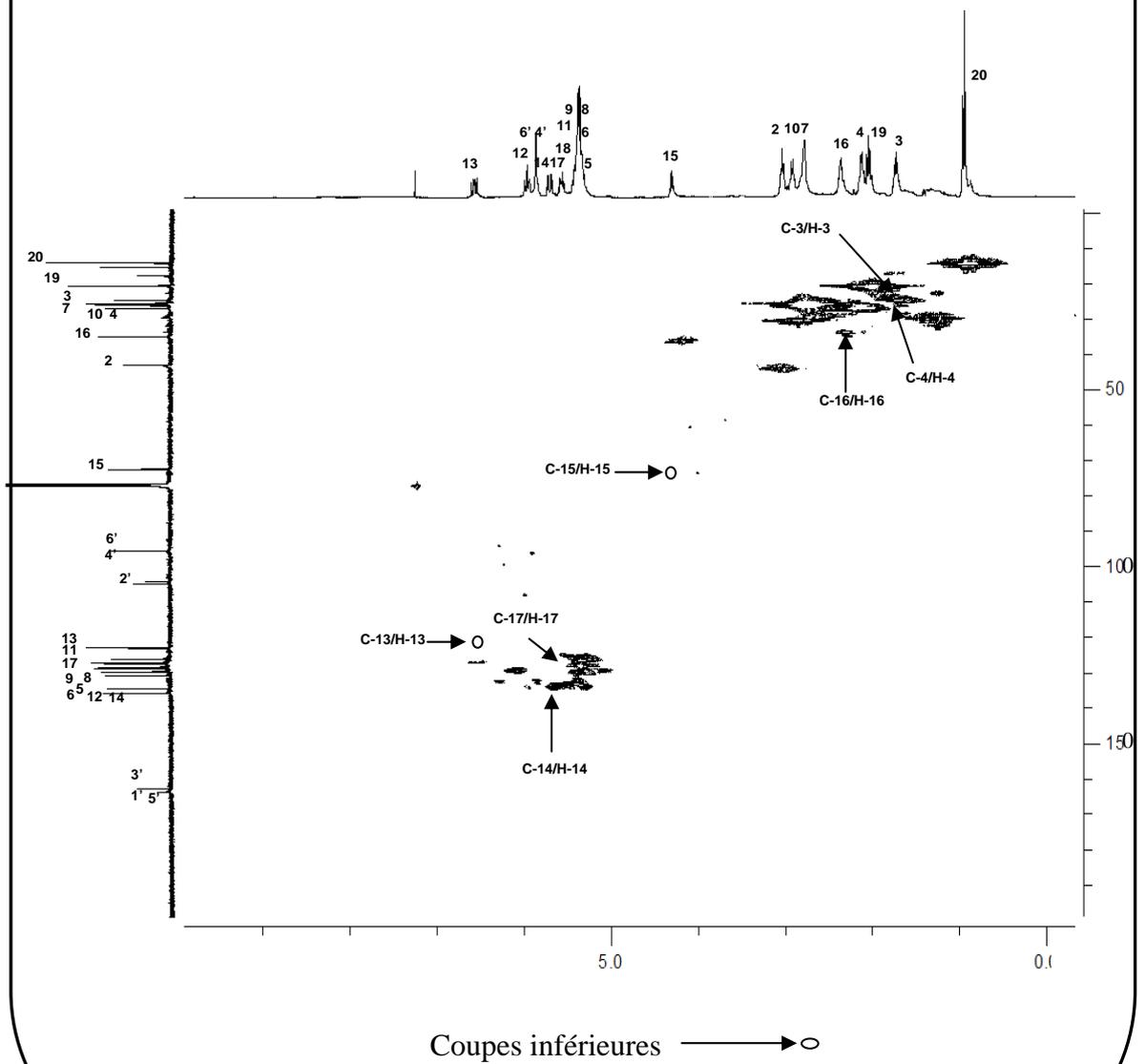
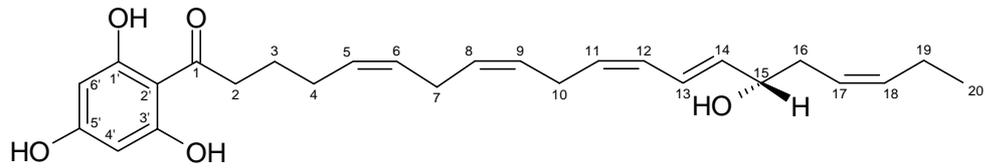
Annexe 17 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **Z6**



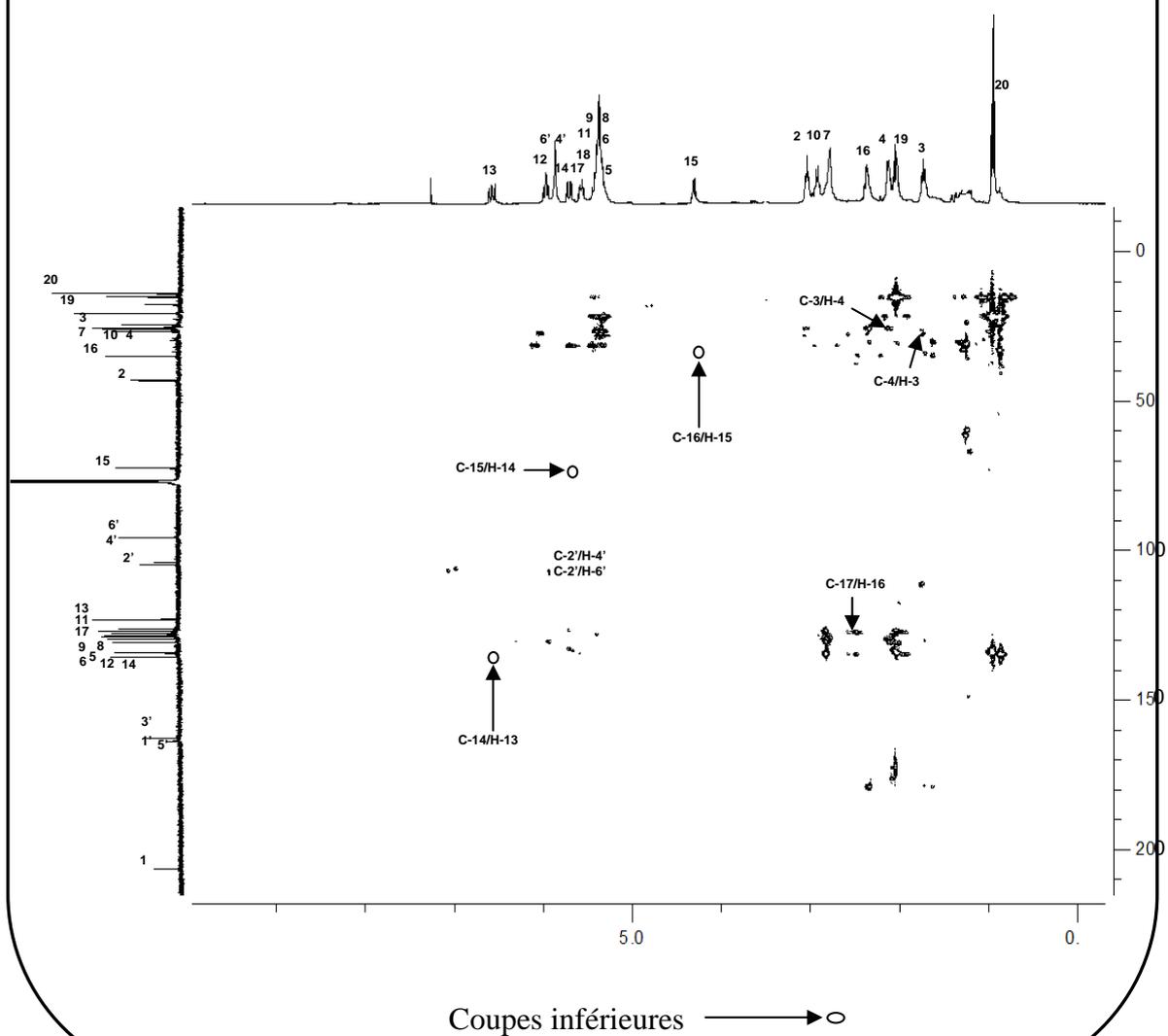
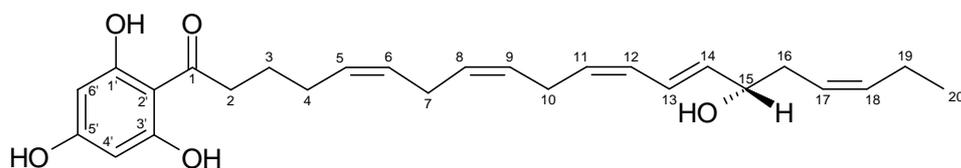
Annexe 18 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  à 100 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **Z6**



Annexe 19 : Spectre HMQC à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **Z6**



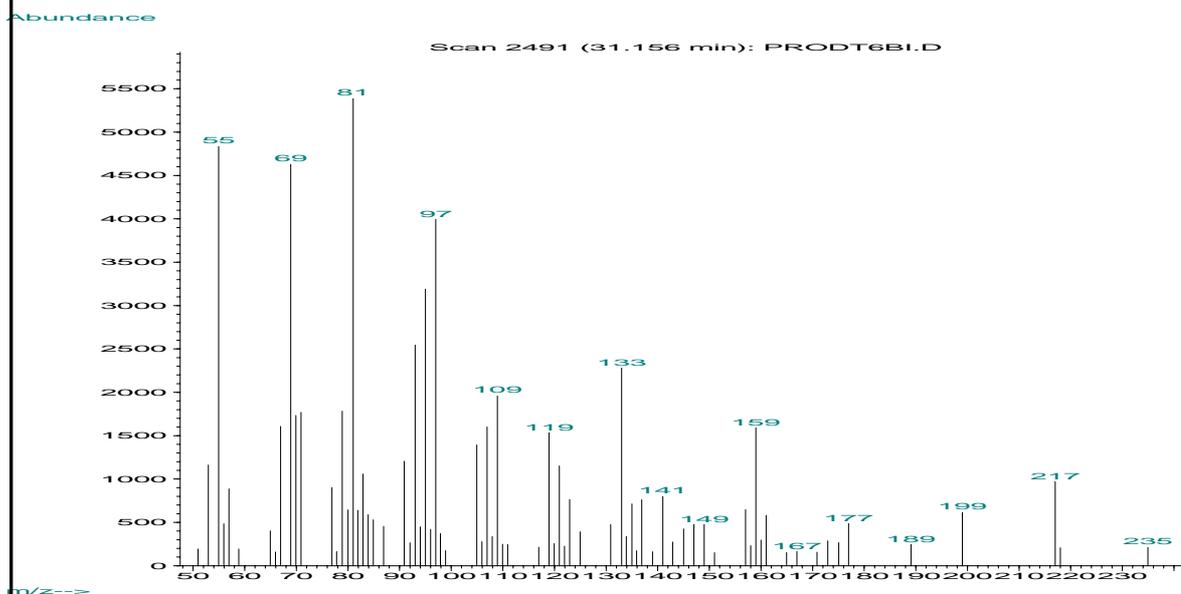
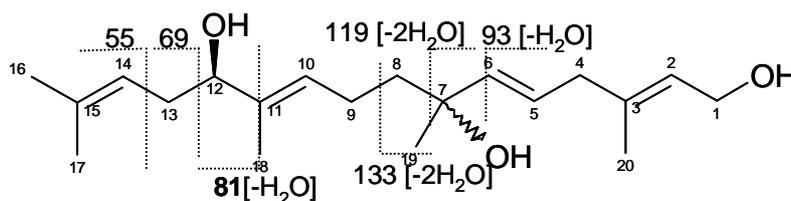
Annexe 20 : Spectre HMBC à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$   
du produit **Z6**



**APPENDICE C**  
**DIFFERENTS SPECTRES DES PRODUITS B3 ET B4**

Annexe 1 : Spectre de masse du produit **B3**

a) par impact électronique

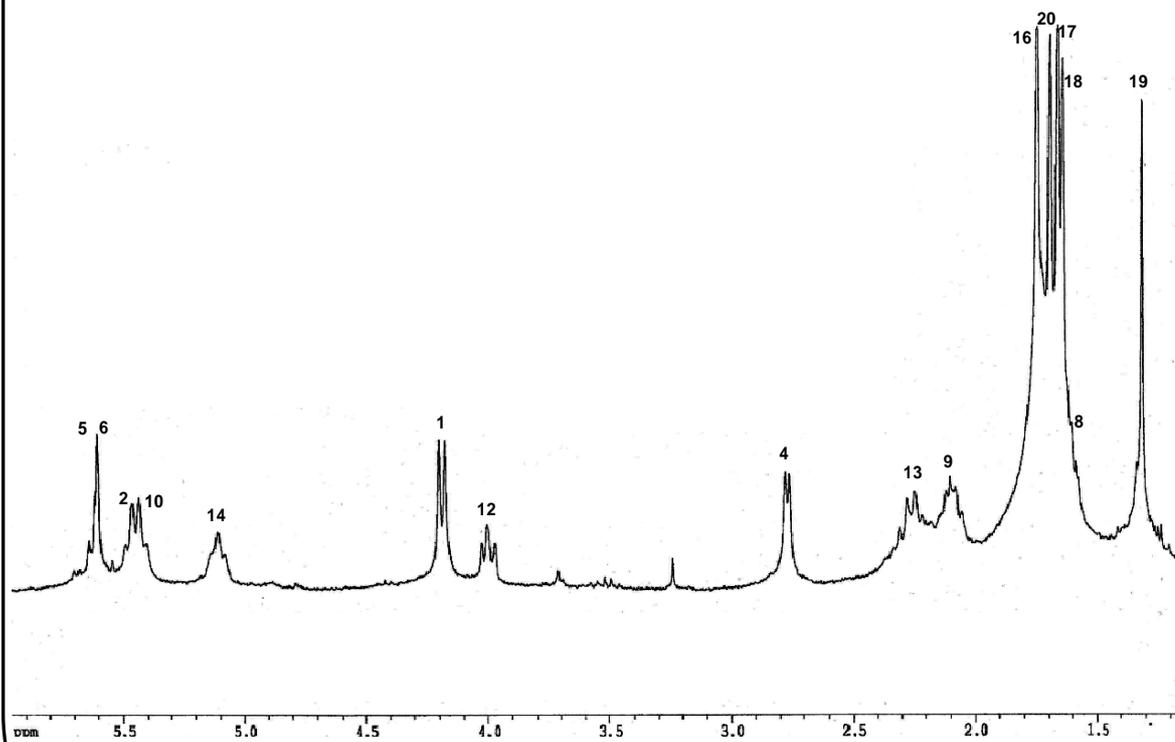
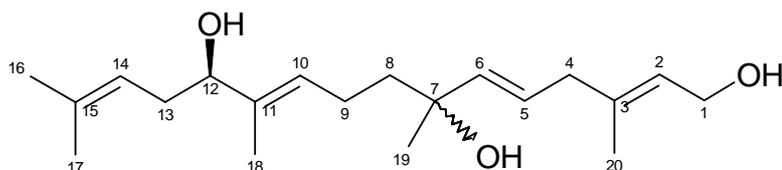


b) haute résolution par la méthode FAB

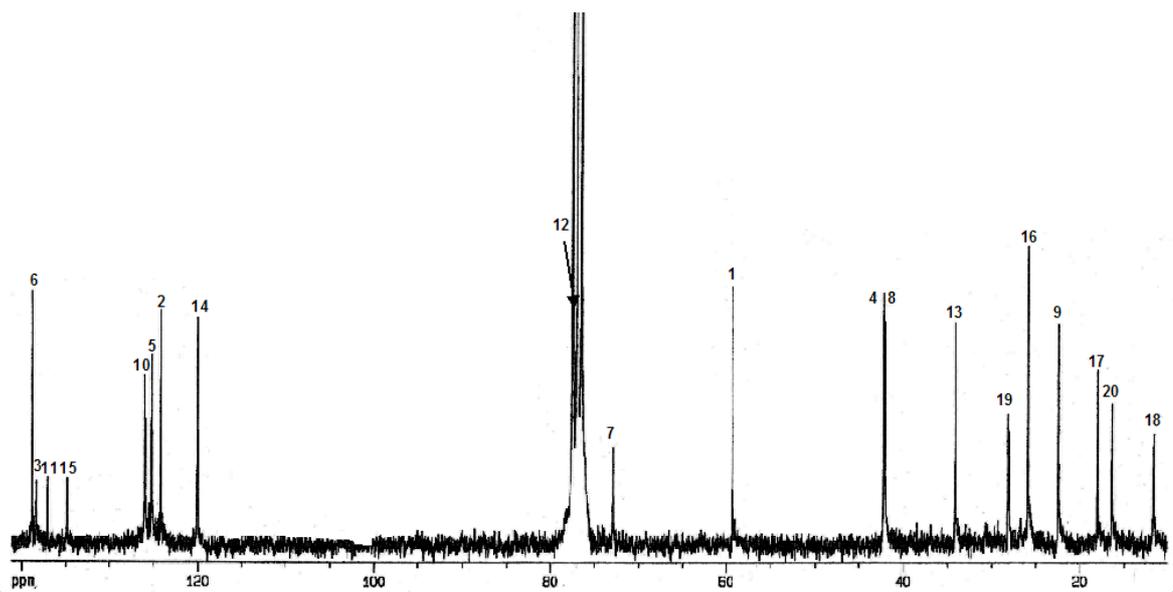
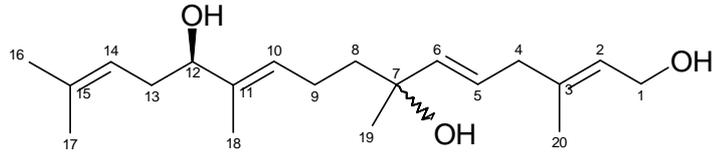
- valeur observée pour  $[M]^+ = 322,25086$
- valeur calculée : 322,25079 pour  $C_{20}H_{34}O_3$  soit une masse molaire de 322 g/mol pour **B3**.



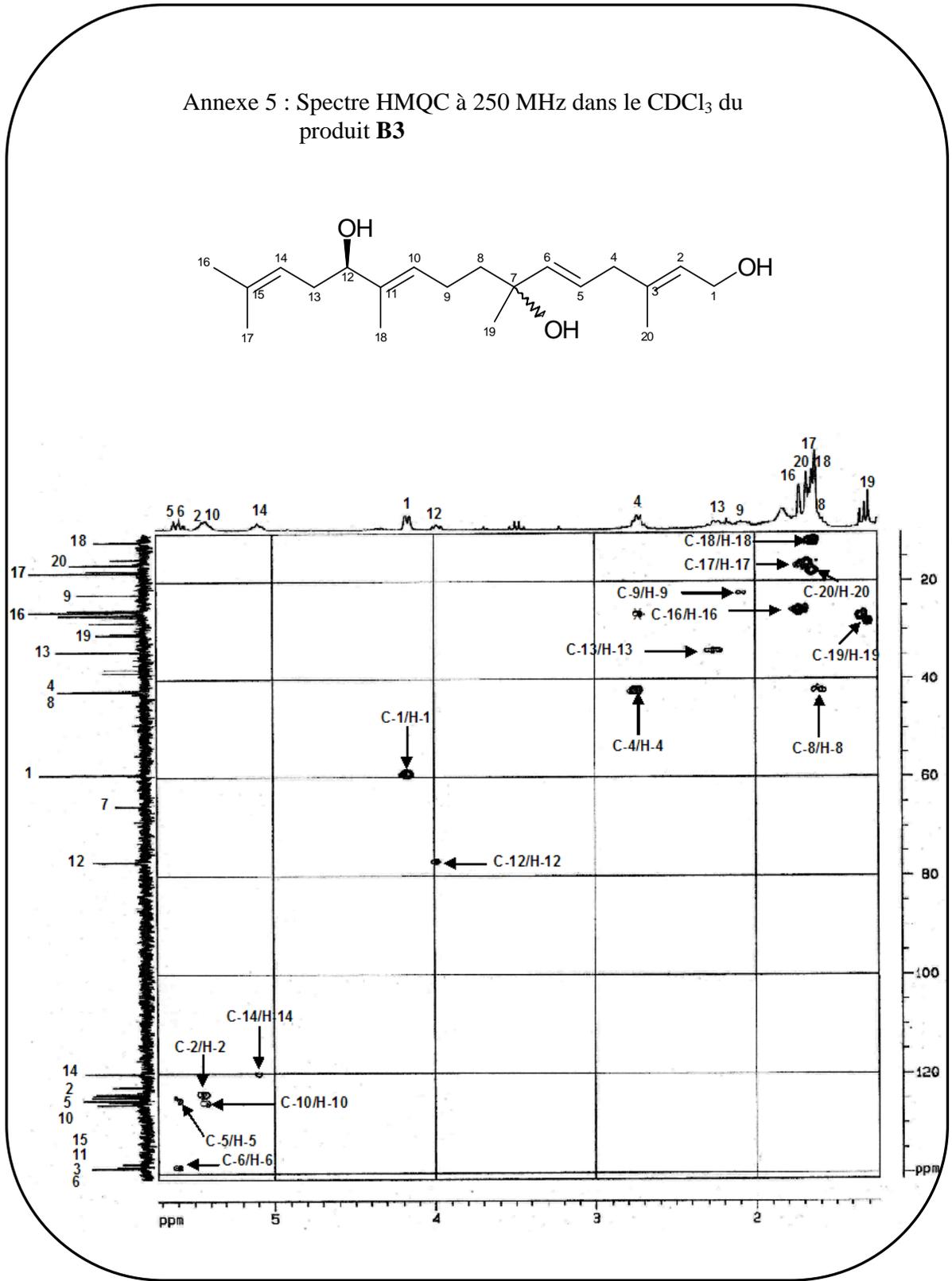
Annexe 3 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 250 MHz dans le  $\text{CDCl}_3$  du produit **B3**



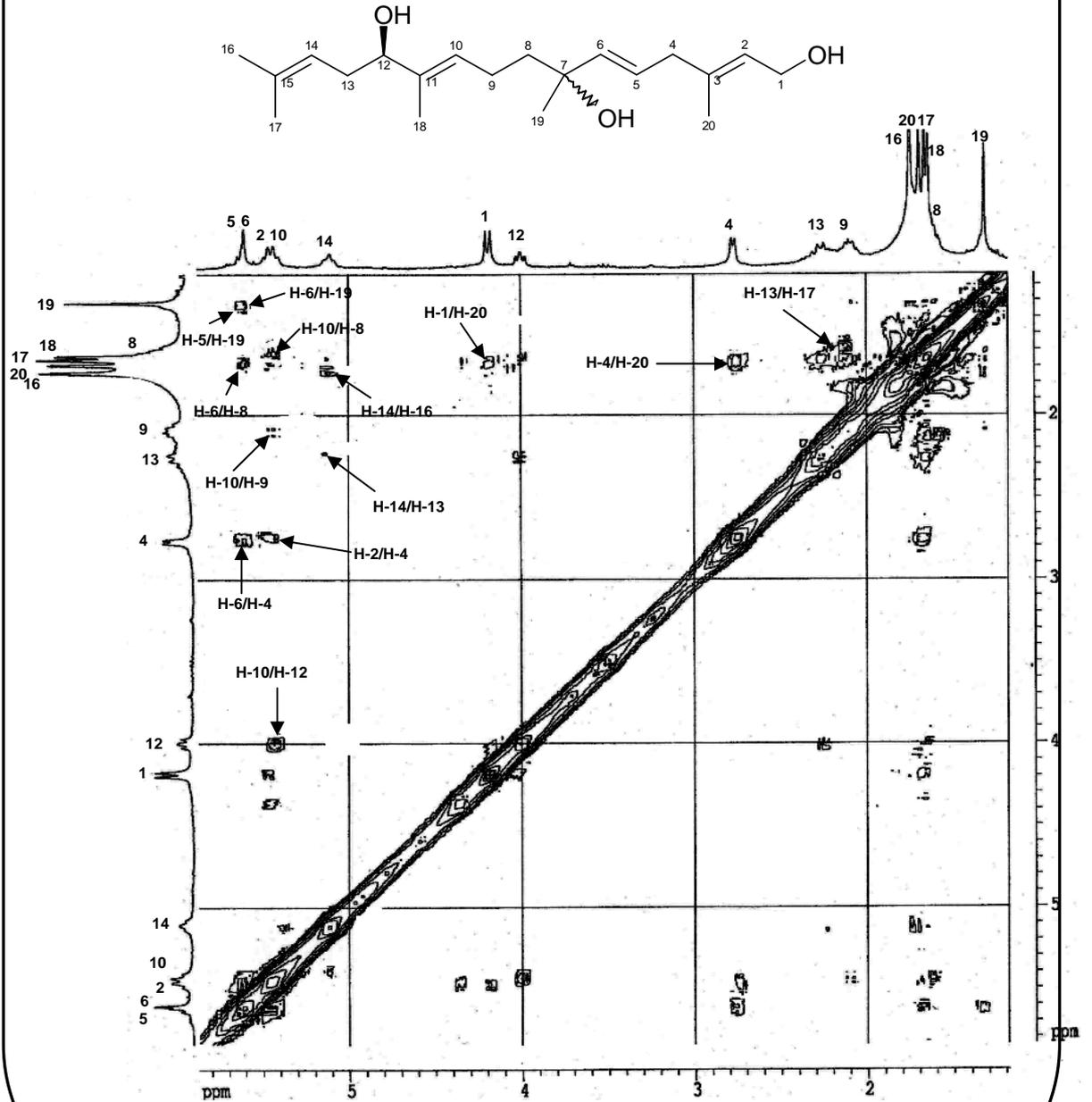
Annexe 4 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  à 62,5 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **B3**



Annexe 5 : Spectre HMQC à 250 MHz dans le CDCl<sub>3</sub> du produit **B3**

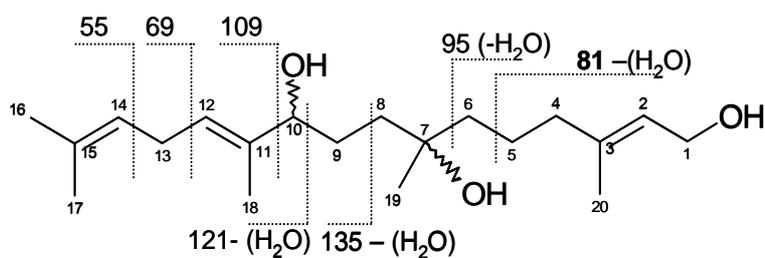


Annexe 6 : Spectre NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  à 250 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **B3**



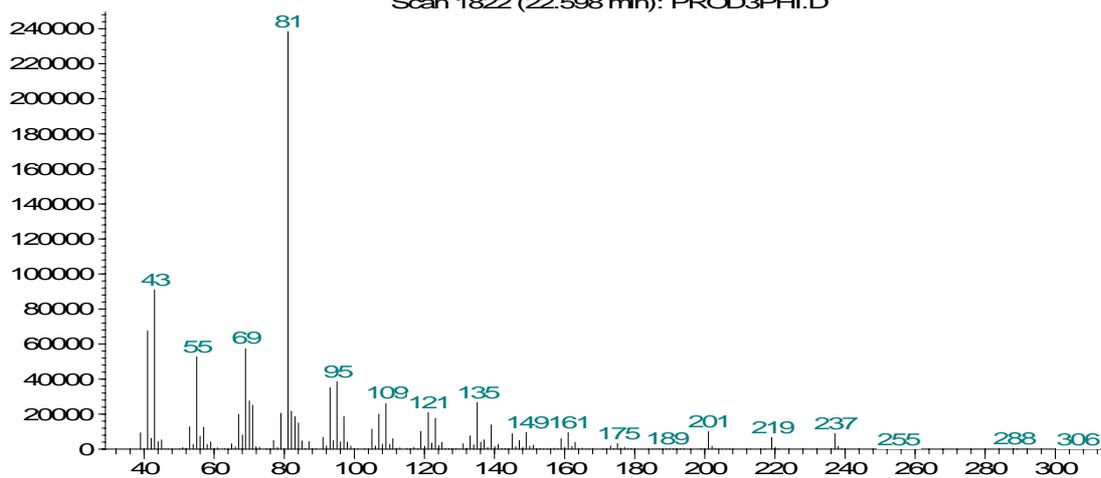
Annexe 7 : Spectre de masse du produit **B4**

a) par impact électronique



Abundance

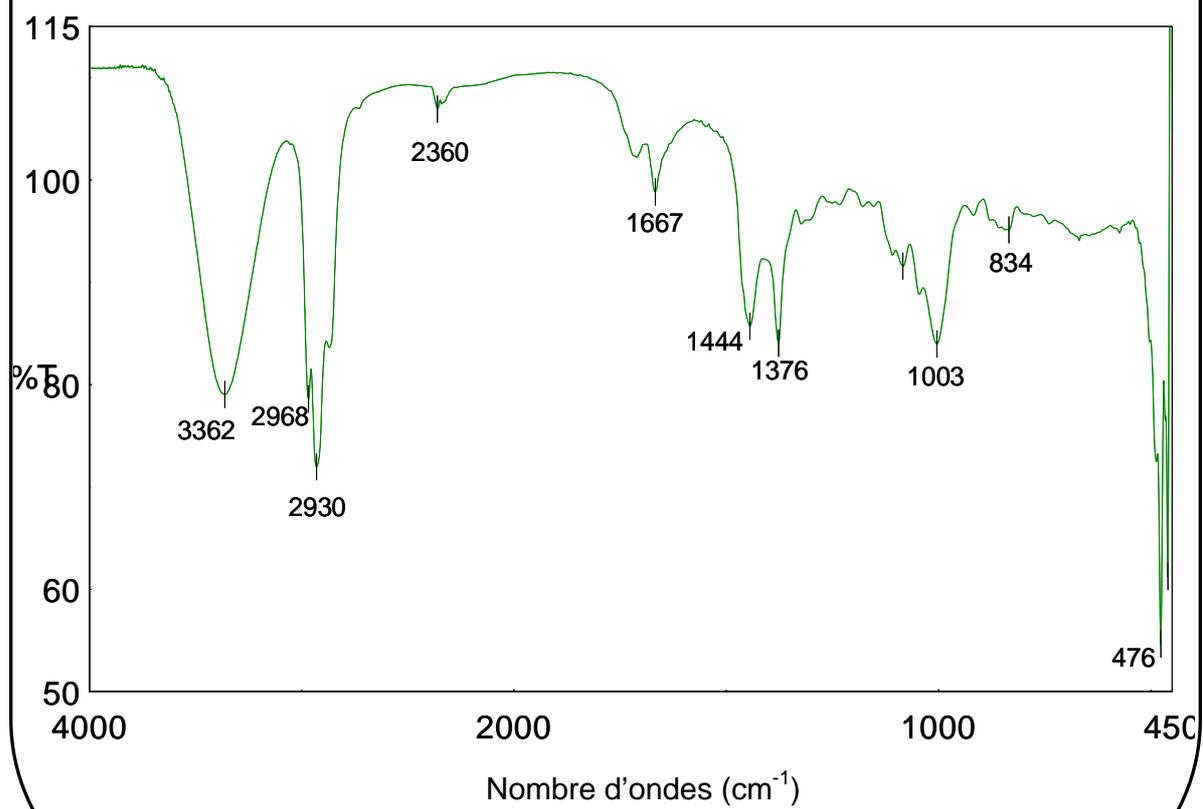
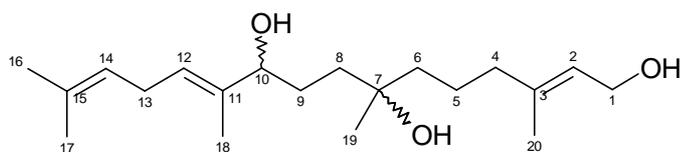
Scan 1822 (22.598 min): PROD3PHI.D



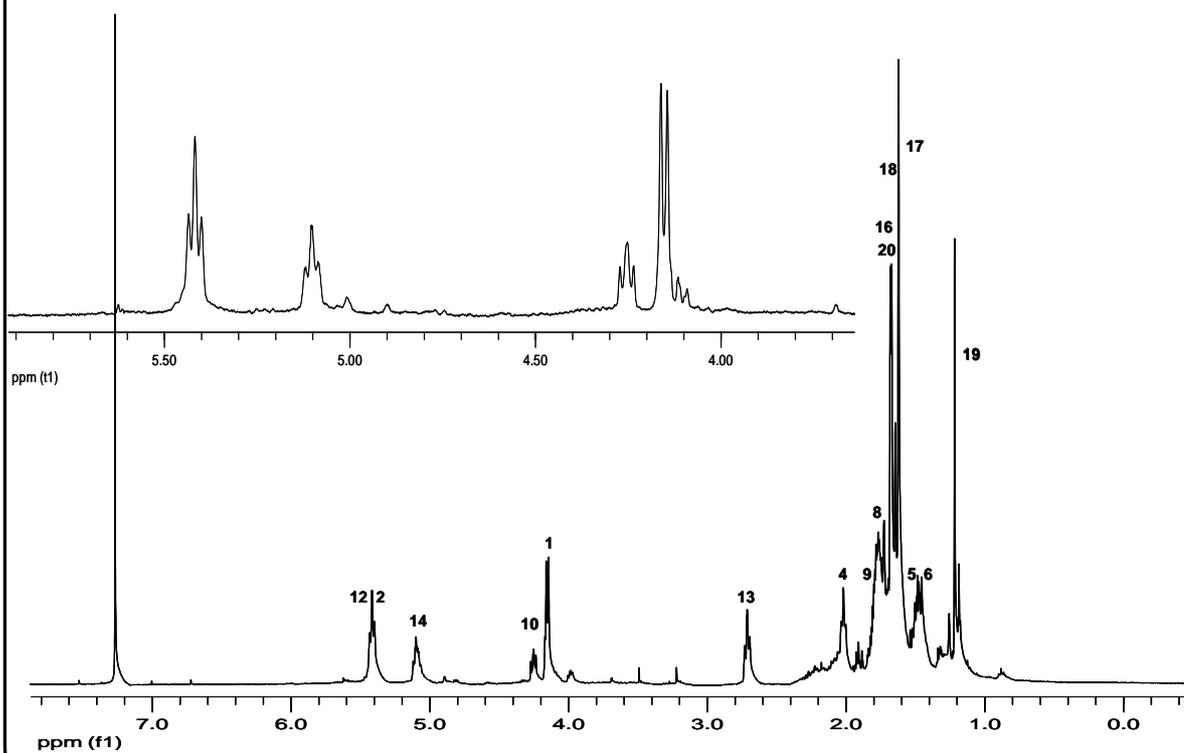
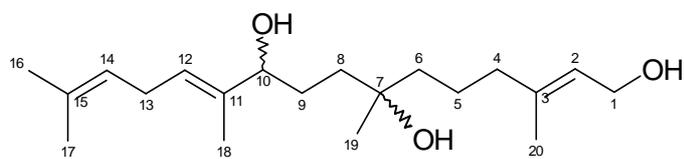
m/z--&gt;

b) Haute résolution par la méthode FAB

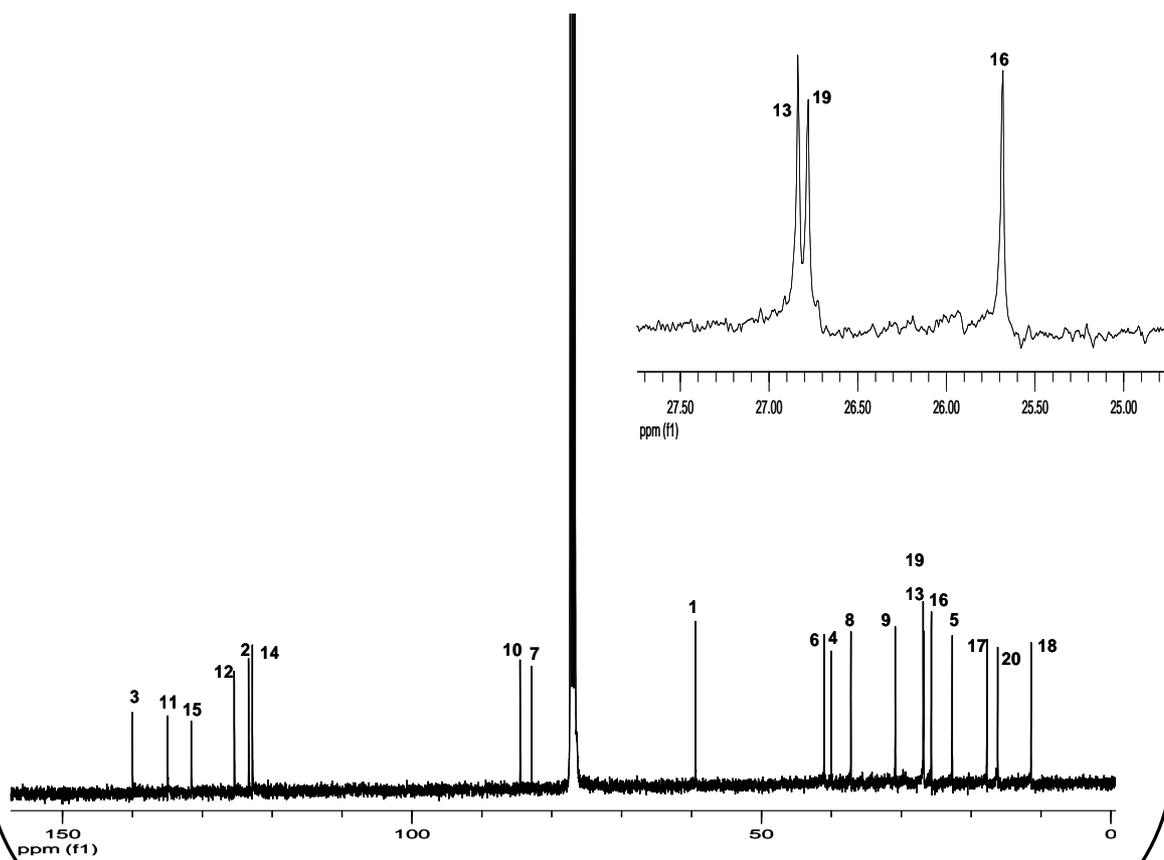
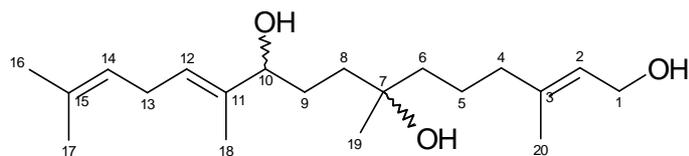
- valeur observée pour  $[M]^+ = 324,2668$
- valeur calculée : 324,2666 pour C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub> soit une masse molaire de 324 g/mol pour **B4**.

Annexe 8 : Spectre Infrarouge du produit **B4**

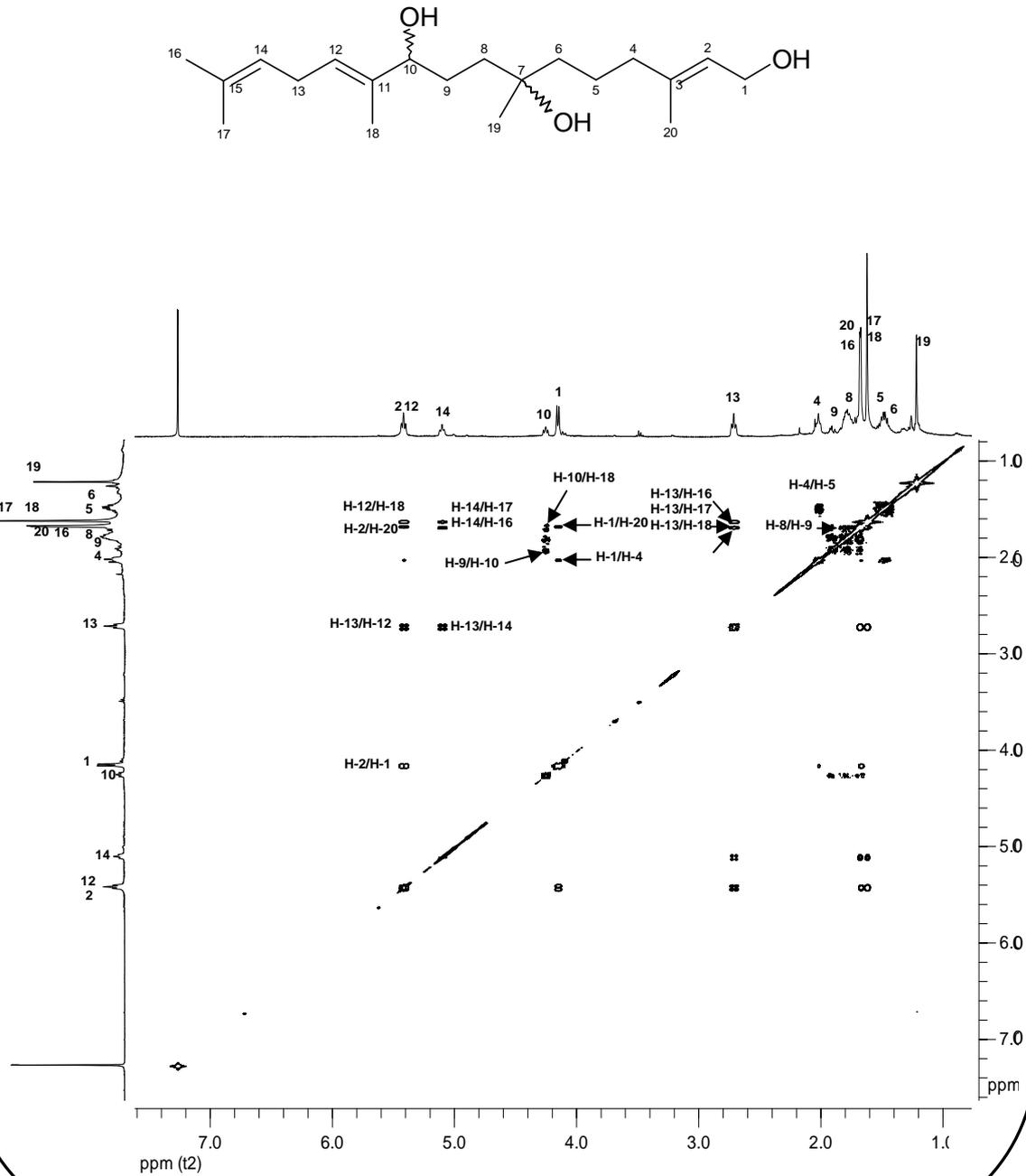
Annexe 9 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **B4**

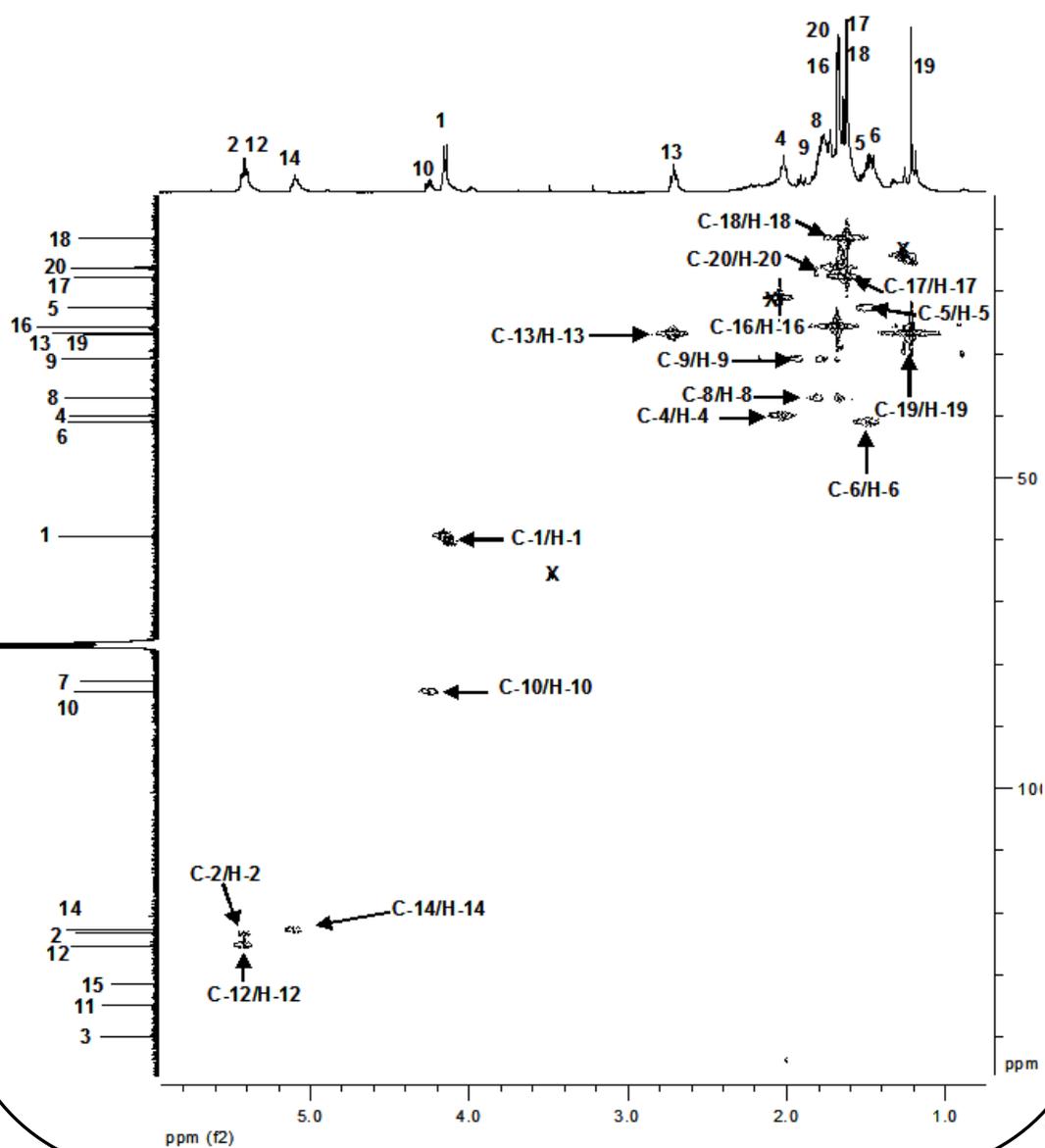
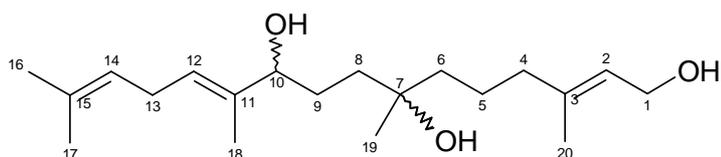


Annexe 10 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  à 100 MHz dans  $\text{CDCl}_3$   
du produit **B4**

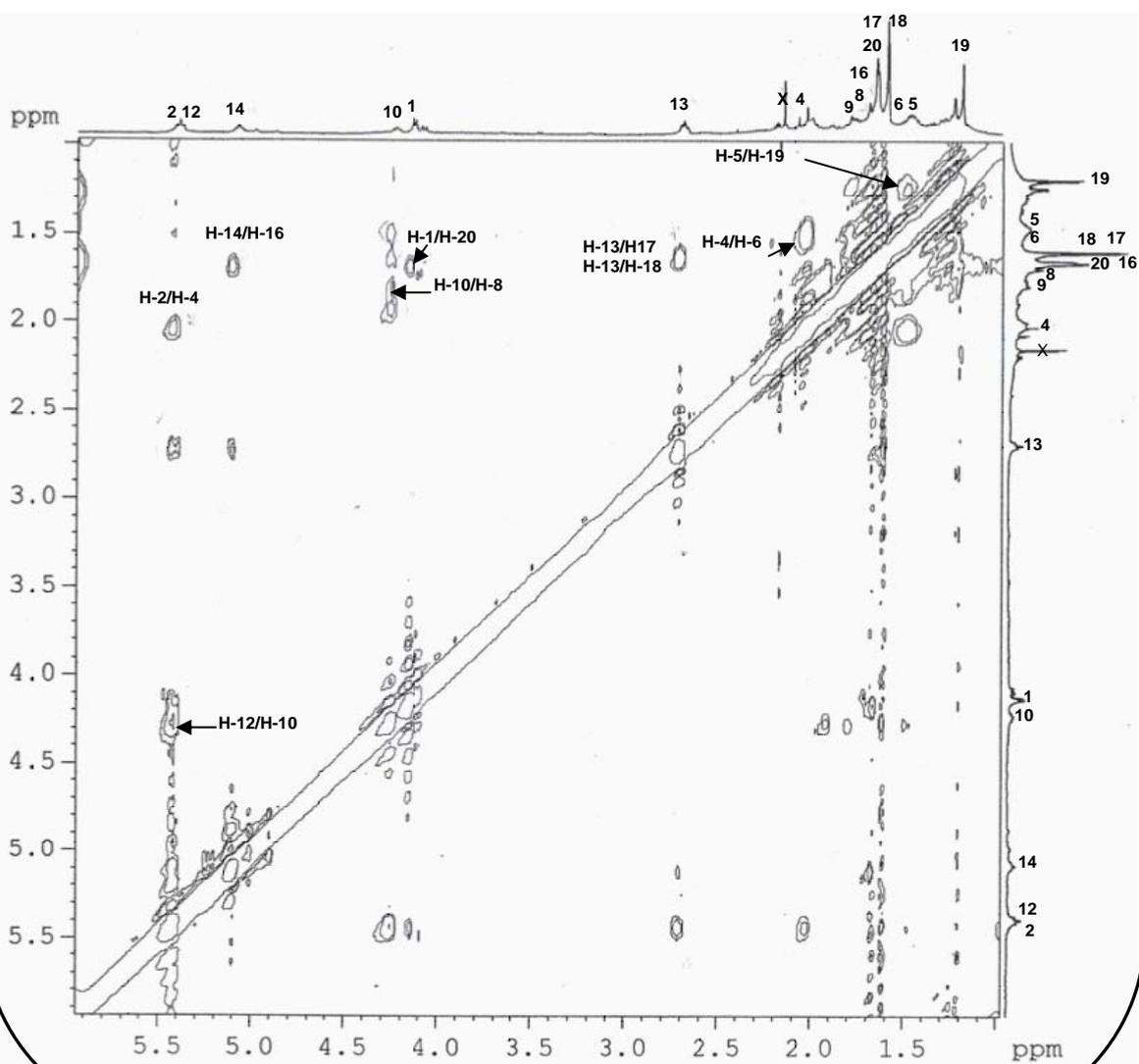
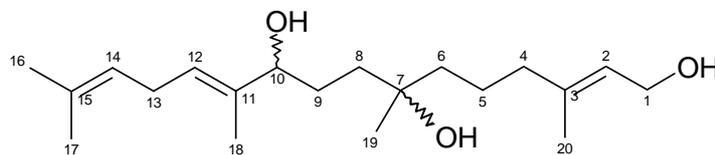


Annexe 11 : Spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **B4**



Annexe 12 : Spectre HMQC à 400 MHz dans CDCl<sub>3</sub> du produit **B4**

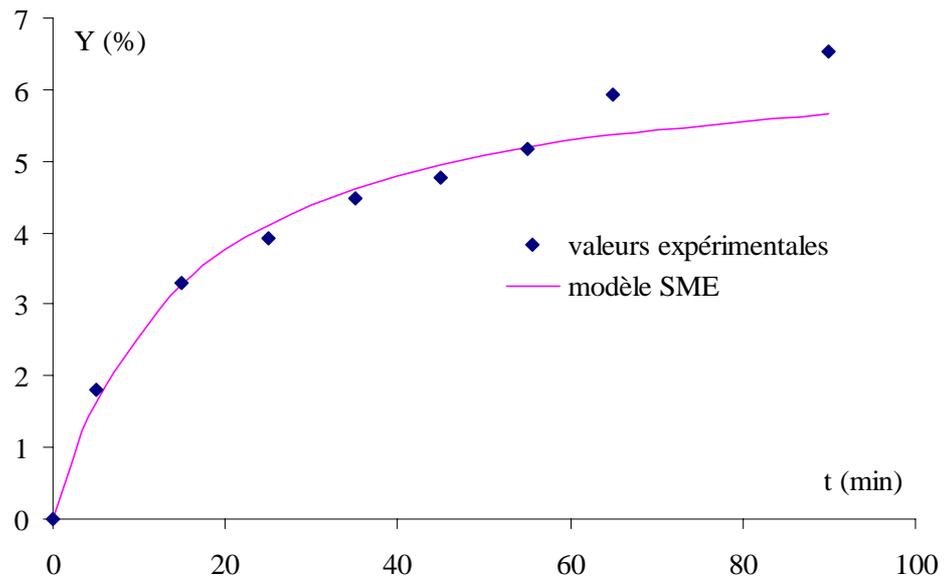
Annexe 13 : Spectre NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  à 400 MHz dans  $\text{CDCl}_3$  du produit **B4**



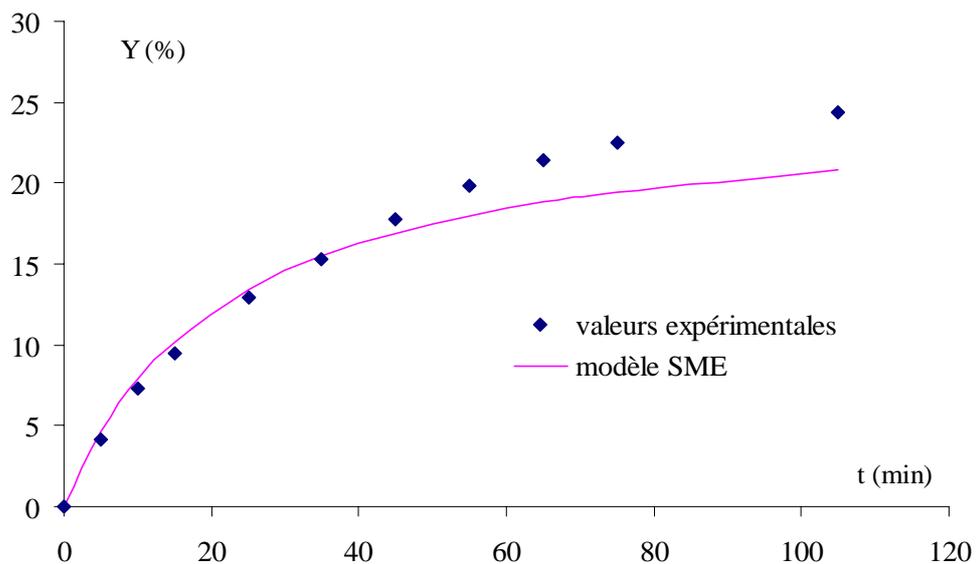
## APPENDICE D

### DIFFERENTES COURBES DE L'ETUDE CINETIQUE

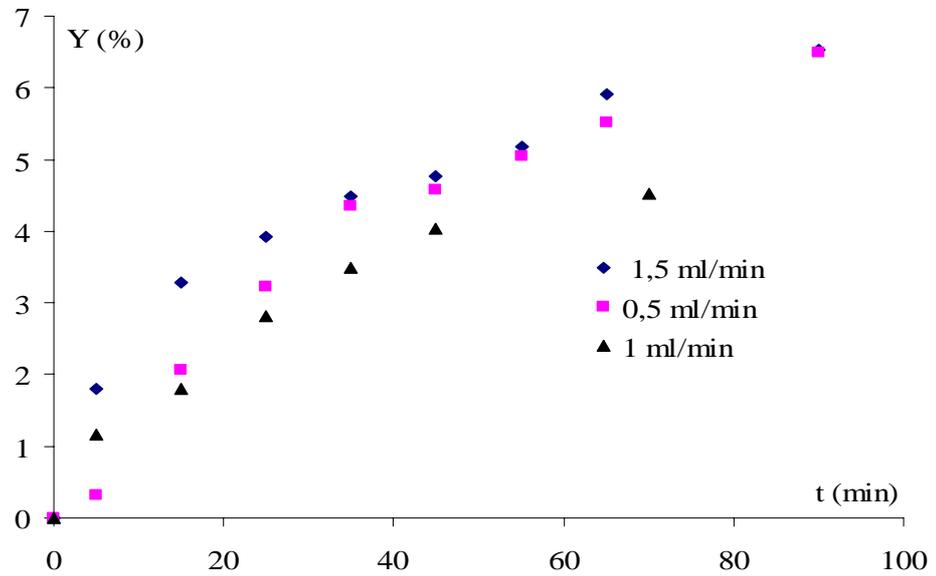
Annexe 1 : Variation du rendement en fonction du temps à P = 91 bars



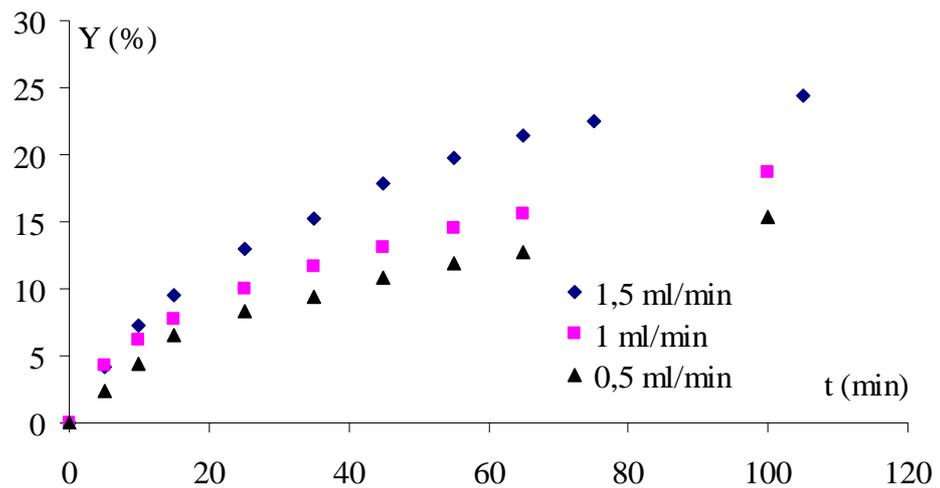
Annexe 2 : Variation du rendement en fonction du temps à P = 115 bars



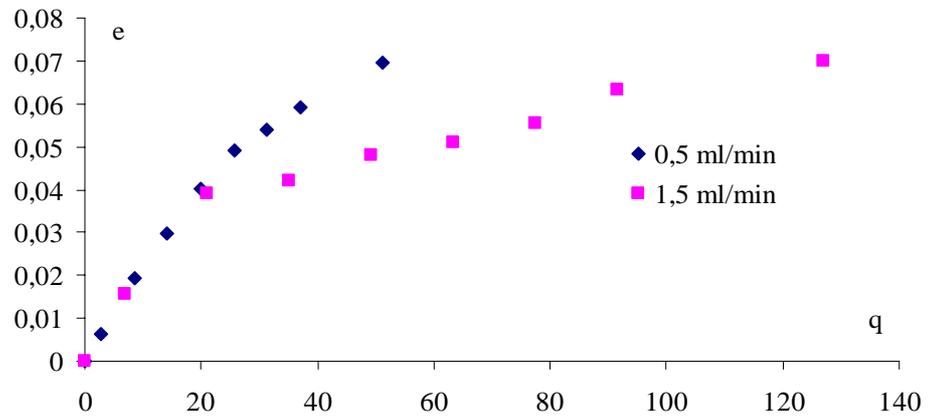
Annexe 3 : Variation du rendement en fonction du temps (P = 91 bars)



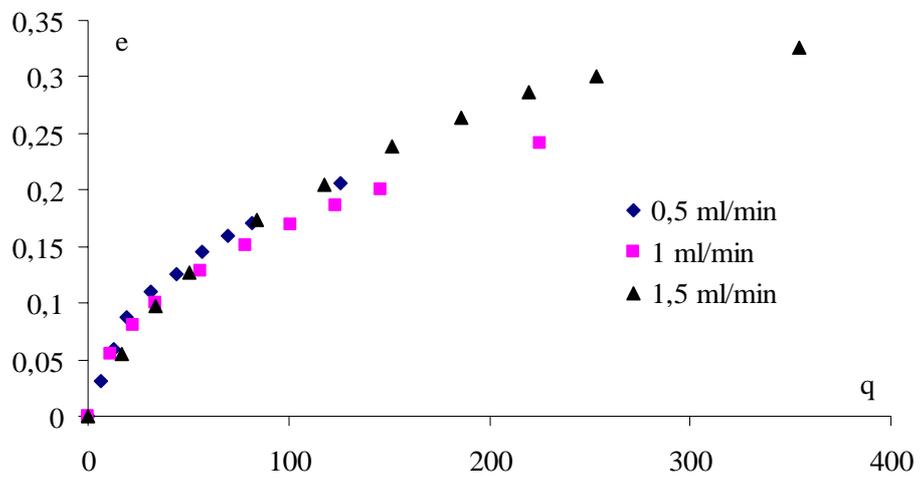
Annexe 4 : Variation du rendement en fonction du temps (P = 115 bars)



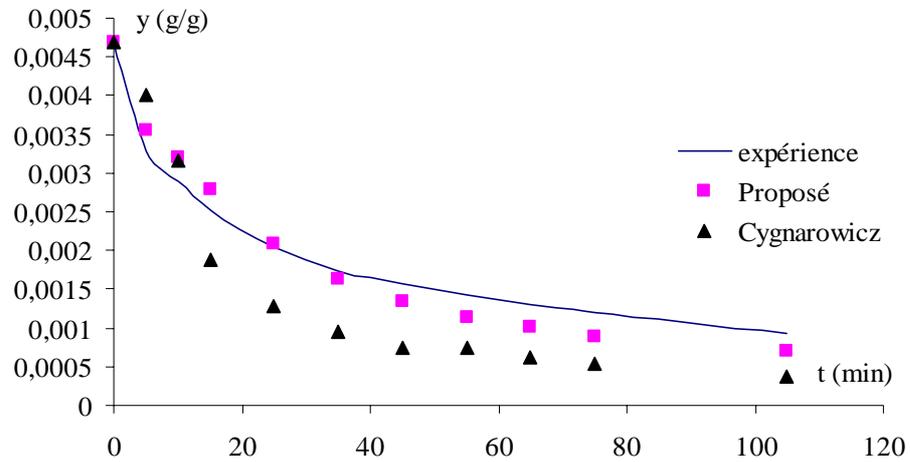
Annexe 5 : Variation de e en fonction de q à P = 91 bars



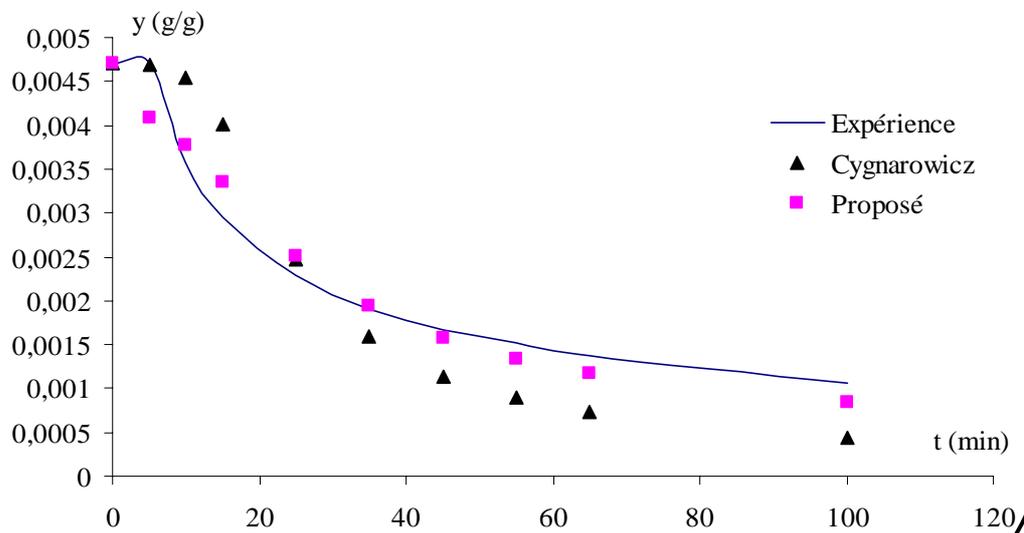
Annexe 6 : Variation de e en fonction de q (P = 115 bars)



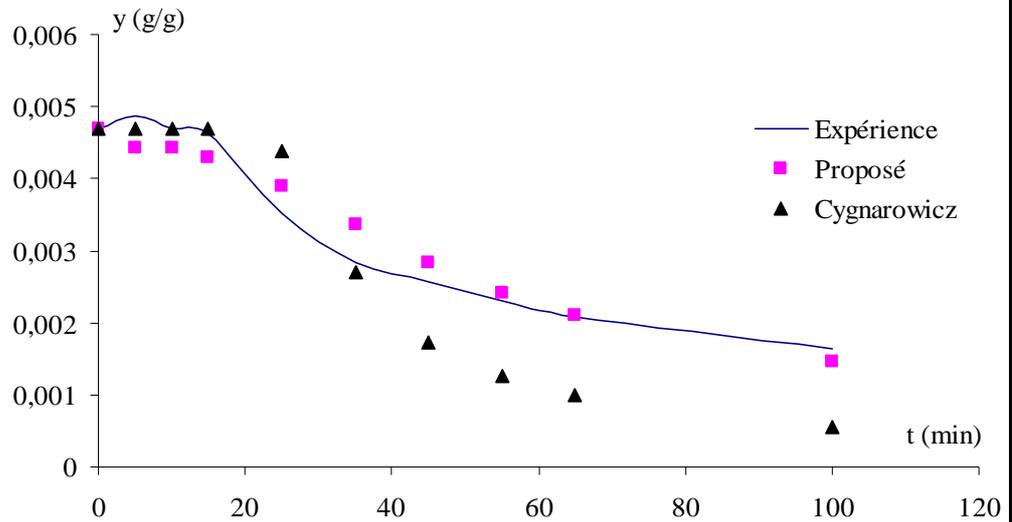
Annexe 7 : Variation de  $y$  en fonction de  $t$   
 $P = 115 \text{ bars}$  – débit =  $1,5 \text{ ml/min}$



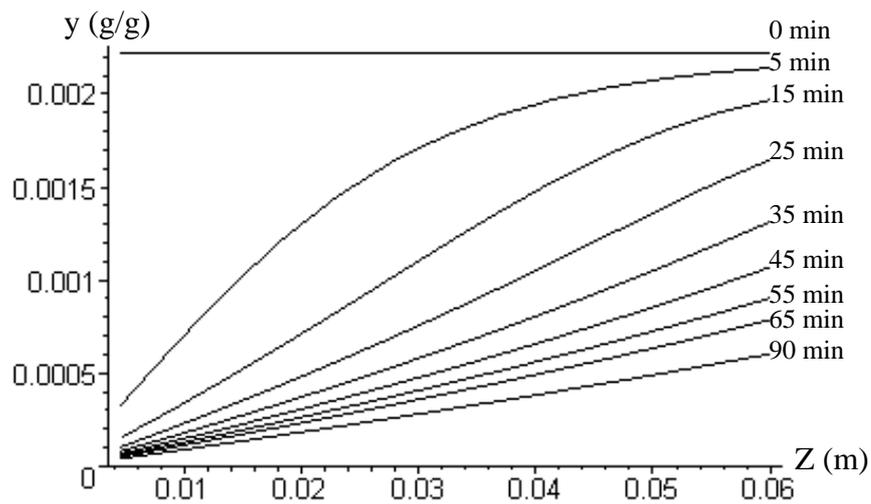
Annexe 8 : Variation de  $y$  en fonction de  $t$   
 $P = 115 \text{ bars}$  – débit =  $1 \text{ ml/min}$



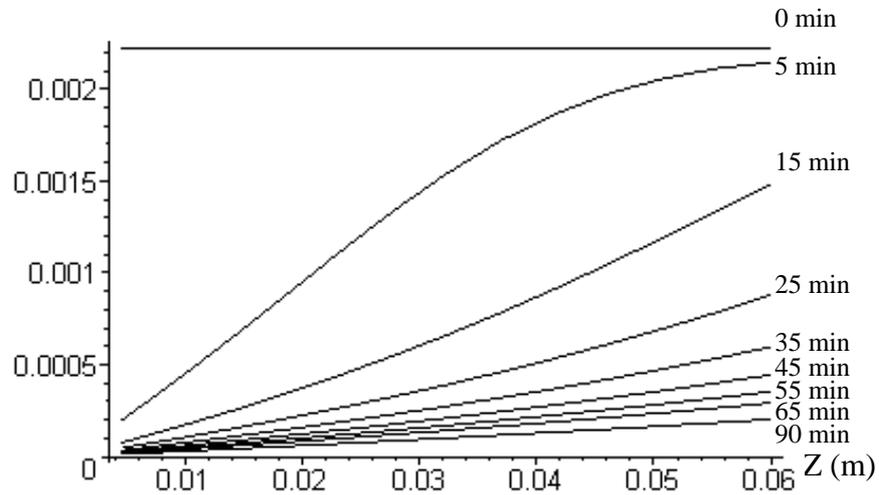
Annexe 9 : Variation de  $y$  en fonction de  $t$   
 $P = 115 \text{ bars}$  – débit =  $0,5 \text{ ml/min}$



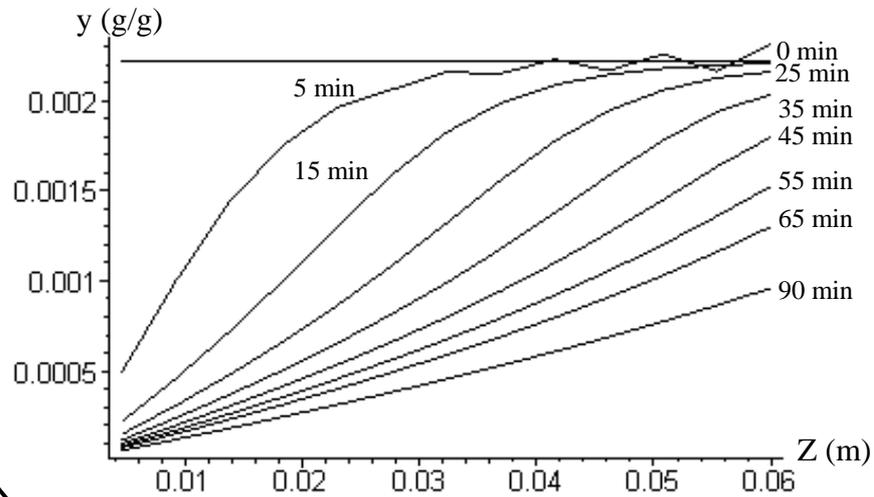
Annexe 10 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 91 \text{ bars}$  – débit =  $1,5 \text{ ml/min}$   
 Modèle proposé



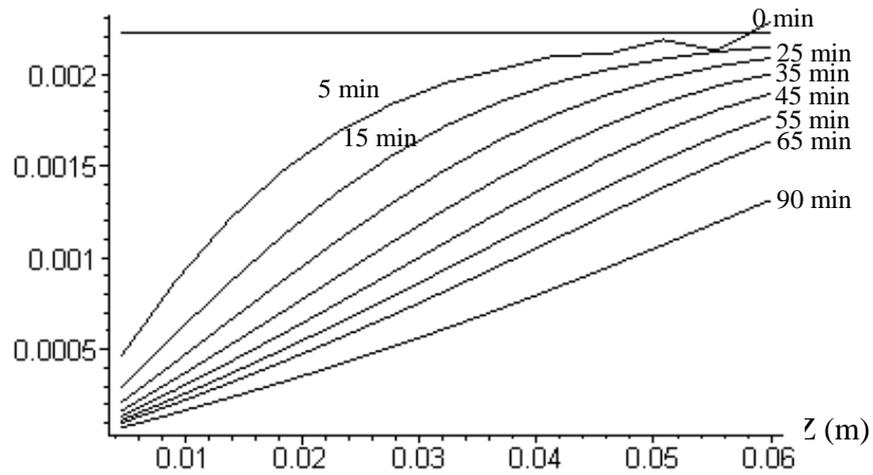
Annexe 11 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 91$  bars – débit = 1,5 ml/min  
 Modèle de Cygnarowicz



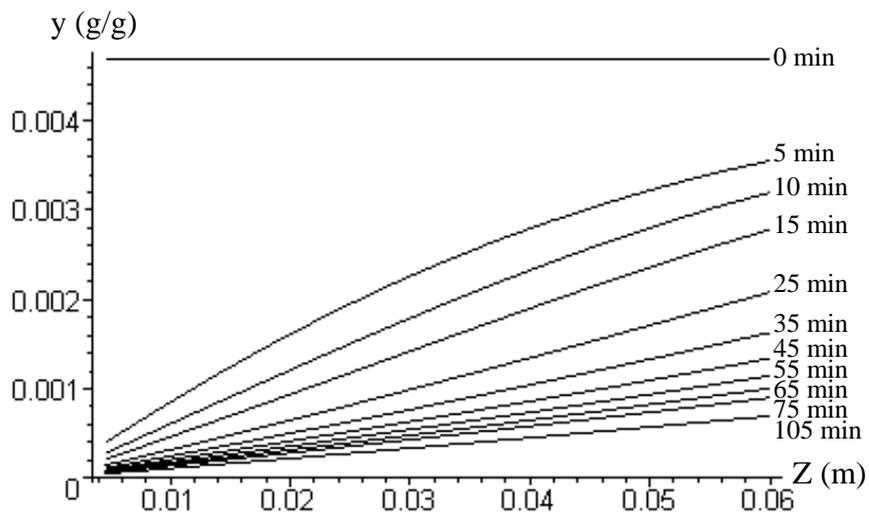
Annexe 12 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 91$  bars – débit = 0,5 ml/min  
 Modèle proposé



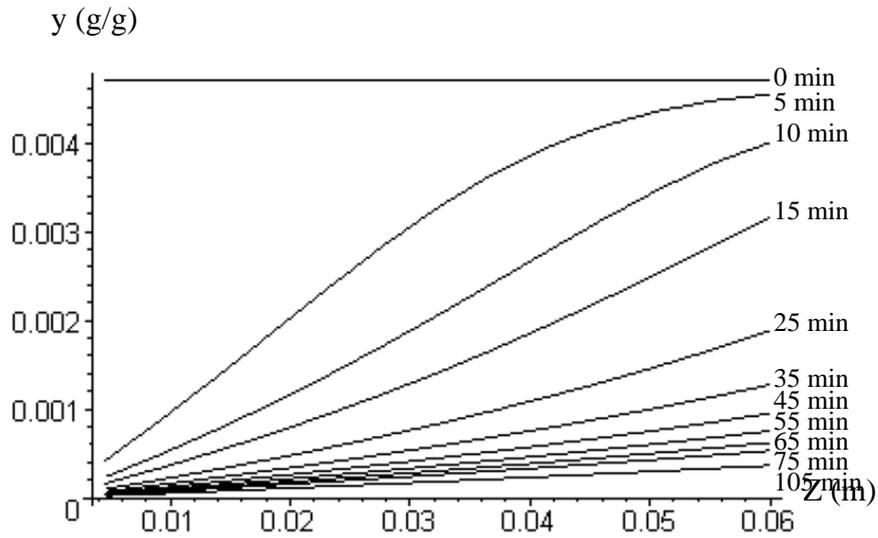
Annexe 13 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 91$  bars – débit =  $0,5$  ml/min  
 Modèle de Cygnarowicz



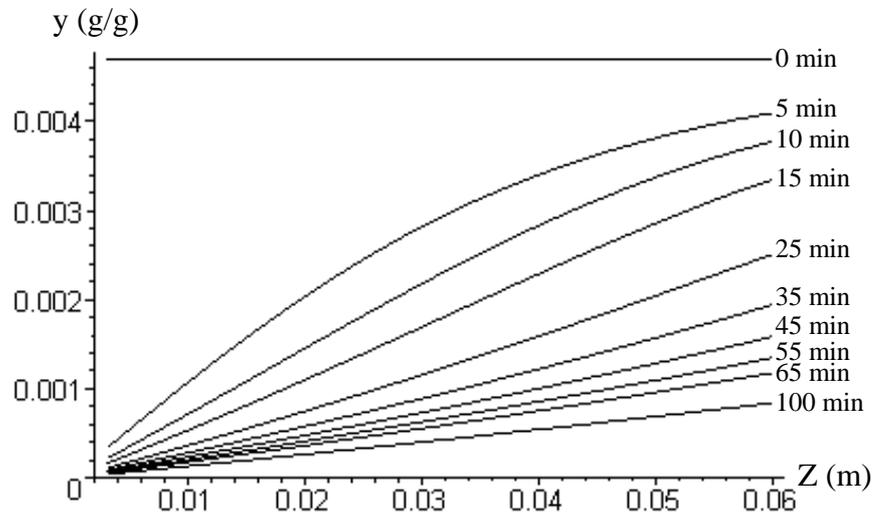
Annexe 14 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 115$  bars – débit =  $1,5$  ml/min  
 Modèle proposé



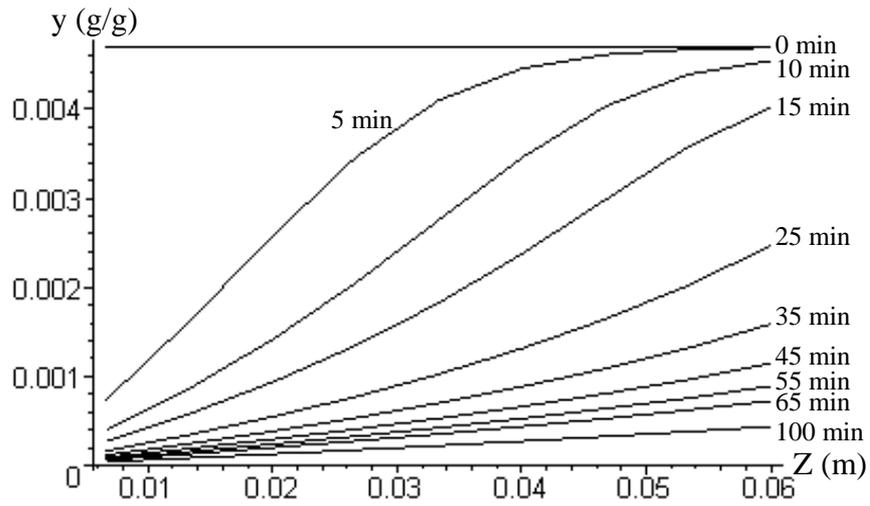
Annexe 15 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 115$  bars – débit = 1,5 ml/min  
 Modèle de Cygnarowicz



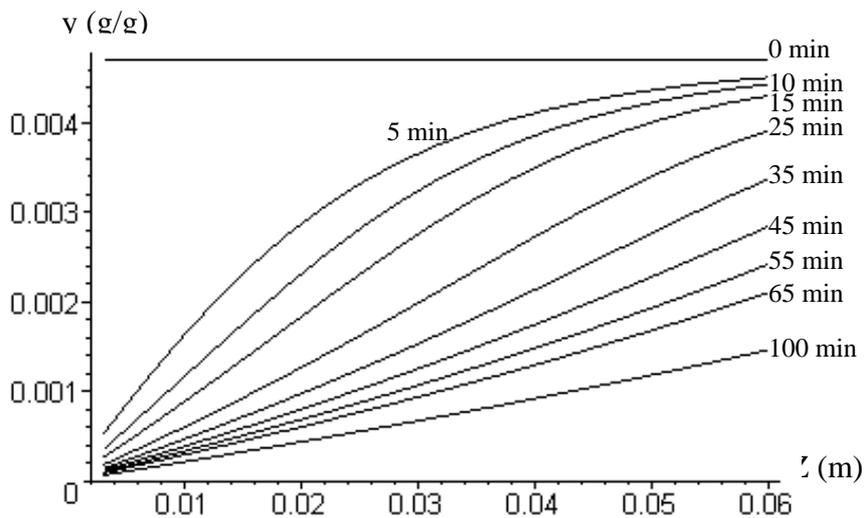
Annexe 16 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 115$  bars – débit = 1 ml/min  
 Modèle proposé



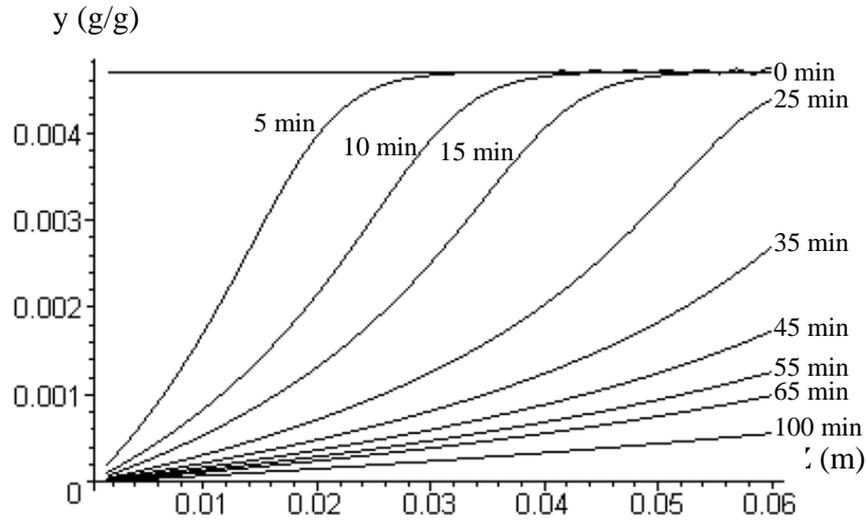
Annexe 17 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 115$  bars – débit = 1 ml/min  
 Modèle de Cygnarowicz



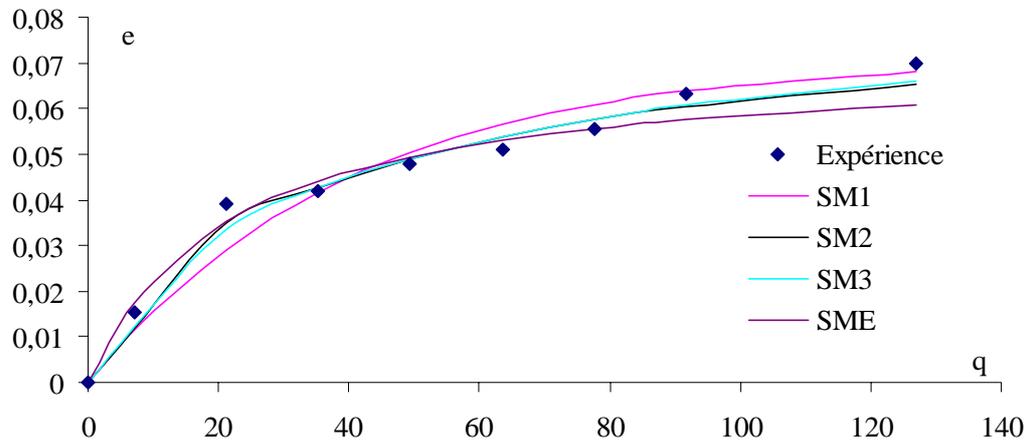
Annexe 18 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 115$  bars – débit = 0,5 ml/min  
 Modèle proposé



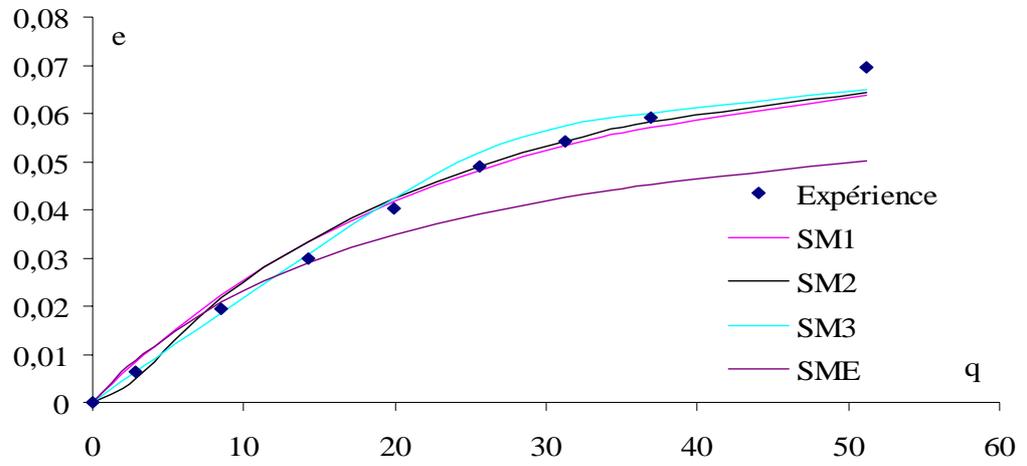
Annexe 19 : Profil de  $y$  en fonction de  $Z$  à différents instants  
 $P = 115$  bars – débit =  $0,5$  ml/min  
 Modèle de Cygnarowicz



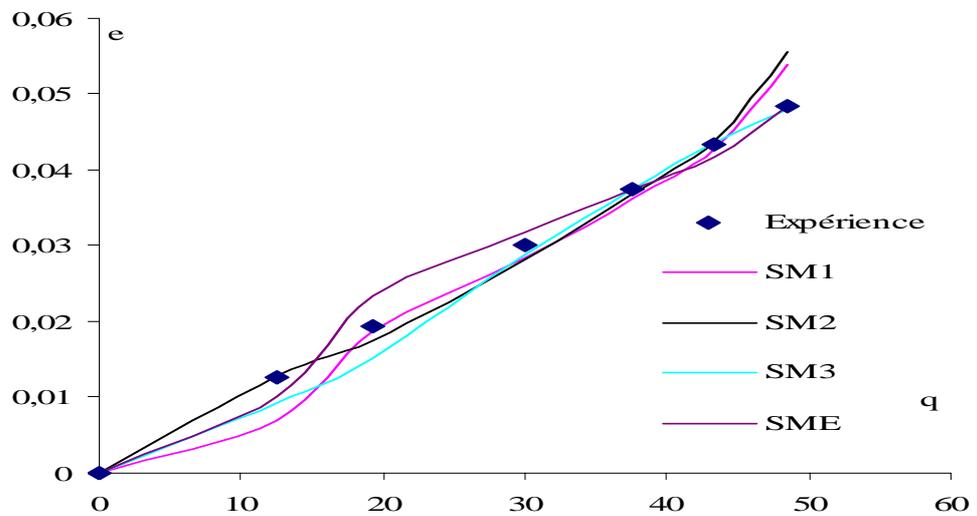
Annexe 20 : Variation de  $e$  en fonction de  $q$   
 $P = 91$  bars; débit ( $\text{CO}_2$ ) =  $1,5$  ml/min



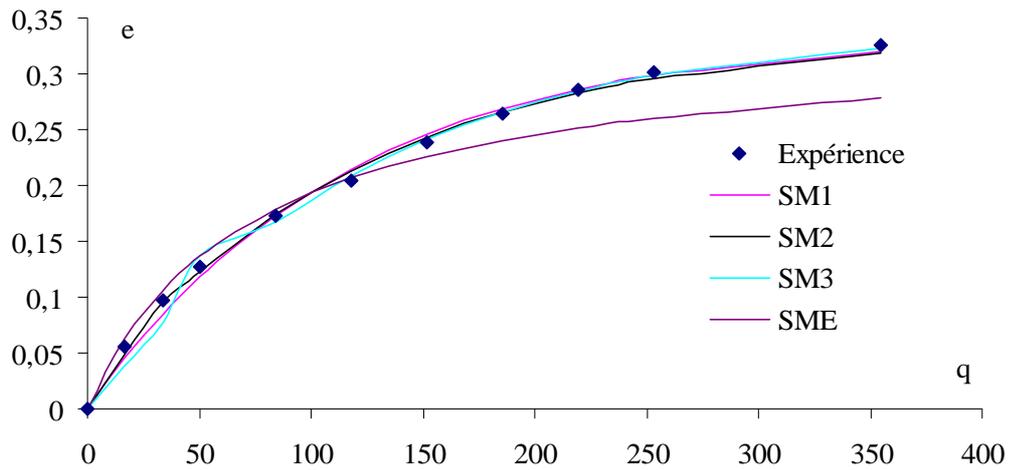
Annexe 21 : Variation de  $e$  en fonction de  $q$   
 $P = 91$  bars; debit ( $\text{CO}_2$ ) = 0,5 ml/min



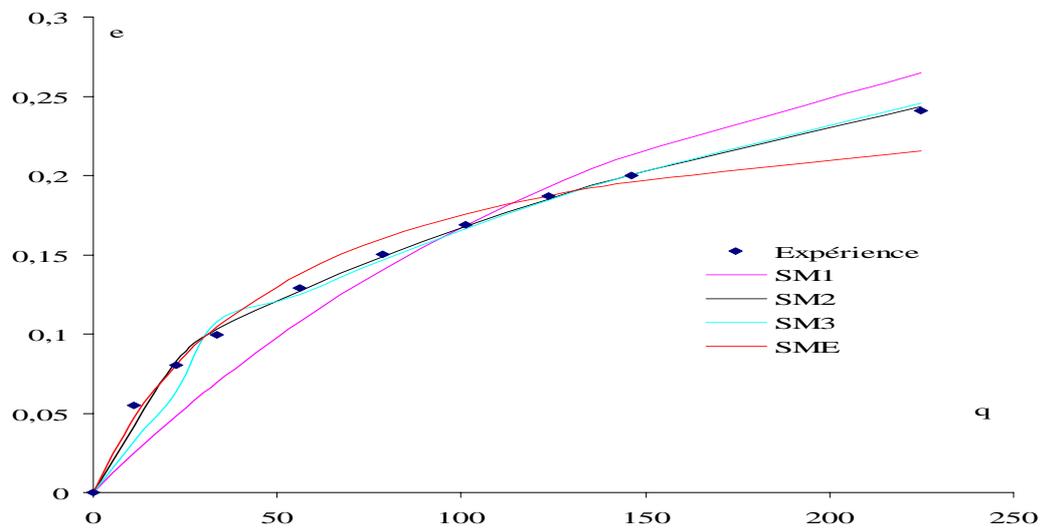
Annexe 22 : Variation de  $e$  en fonction de  $q$   
 $P = 91$  bars; debit ( $\text{CO}_2$ ) = 1 ml/min



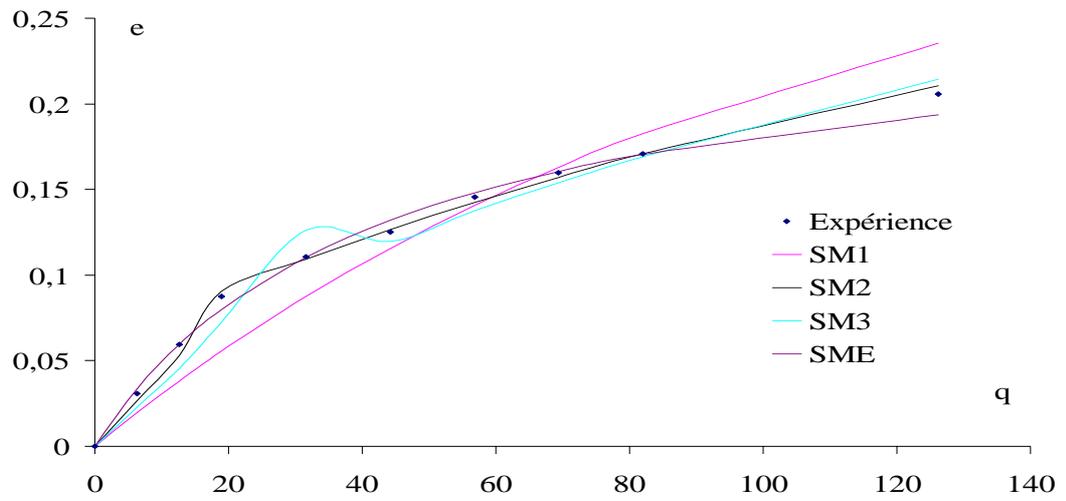
Annexe 23 : Variation de  $e$  en fonction de  $q$   
 $P = 115$  bars; débit ( $\text{CO}_2$ ) = 1,5 ml/min



Annexe 24 : Variation de  $e$  en fonction de  $q$   
 $P = 115$  bars; débit ( $\text{CO}_2$ ) = 1 ml/min



Annexe 25 : Variation de  $e$  en fonction de  $q$   
 $P = 115$  bars; débit ( $\text{CO}_2$ ) = 0,5 ml/min



## Annexe 26 : Programme de calcul réalisé avec du MAPLE

**Paramètre fixes**

```
>
rho[f]:=700:
rho[s]:=704:
a[p]:=2100:
x0:=0.3367:
y0:=yexp[1];
u:=0.306E-3;
epsilon:=0.3:
epsilonc:=0.1:
alpha:=1/(rho[f]*epsilon):
beta:=-1/(rho[s]*epsilonc):
```

**Données de discrétisation**

```
> Tmax:=texp[nops(texp)];
Nt:=Tmax/5;
dt:=evalf(Tmax/Nt);
L:=0.06:
dz:=u*dt;
Nz:=trunc(L/dz);
dz:=evalf(L/Nz);
cfl:=u*dt/dz;
j:=1:
for i from 0 to Nt do
if abs(texp[j]-i*dt)<dt/2 then k0[j]:=i;print(k0[j],k0[j]*dt,texp[j],yexp[j]);j:=j+1;
else ;
fi
od:
>
```

**Les Modèles mathématiques (expression de J) utilisés****Modèle proposé**

```
> model := New;
J := proc (y, x, h, K, xk)
a[p]*rho[f]*h*(y0-y) / ( ((x0-x)/(x0-xk))^2+K )
end proc;
```

**Modèle de Cygnarowicz**

```
> model:="Cygnarowicz";
J:=proc(y,x,h,K,xk)
a[p]*rho[f]*h*(y0-y)*exp(-K*(x0-x)/(x0-xk))
end proc;
```

**Procédure Lax-Wendroff (décritisation)**

```
> E:=proc(h,K,xk) local i,j,k,Ax,Ay,Bx,By,S,Jkm1,JAB; global y,x;
```

```

for j from 0 to Nz do y[0,j]:=y0: od: #piecewise(j*dz<L/5,1,j*dz>=L/5,0) od:
for j from 0 to Nz do x[0,j]:=x0 od:
for k from 0 to Nt do y[k,0]:=0 od:
for k to Nt do
for j from 0 to Nz do Jkm1[j]:=J(y[k-1,j],x[k-1,j],h,K,xk) od;
x[k,0]:=x[k-1,0]+beta*dt*Jkm1[0];
for j to Nz-1 do
Ay:=1/2*(y[k-1,j+1]+y[k-1,j])-u*(dt/(2*dz))*(y[k-1,j+1]-y[k-1,j])+alpha*(dt/4)*(Jkm1[j+1]+Jkm1[j]);
Ax:=1/2*(x[k-1,j+1]+x[k-1,j])+beta*(dt/4)*(Jkm1[j+1]+Jkm1[j]);
By:=1/2*(y[k-1,j]+y[k-1,j-1])-u*(dt/(2*dz))*(y[k-1,j]-y[k-1,j-1])+alpha*(dt/4)*(Jkm1[j]+Jkm1[j-1]);
Bx:=1/2*(x[k-1,j]+x[k-1,j-1])+beta*(dt/4)*(Jkm1[j]+Jkm1[j-1]);
JAB:=J(Ay,Ax,h,K,xk)+J(By,Bx,h,K,xk);
y[k,j]:=y[k-1,j]-u*(dt/dz)*(Ay-By)+alpha*(dt/2)*JAB;
x[k,j]:=x[k-1,j]+beta*(dt/2)*JAB;
od:
y[k,Nz]:=y[k-1,Nz]-(u*dt/dz)*(y[k-1,Nz]-y[k-1,Nz-1])+alpha*dt*Jkm1[Nz];
x[k,Nz]:=x[k-1,Nz]+beta*dt*Jkm1[Nz];
od:

S:=0:
for j to nops(texp) do S:=S+(yexp[j]-y[k0[j],Nz])^2
od:
S;

end proc:
>

```

### Optimisation

```

> hmin:=1E-6;hmax:=1E-4;Nh:=9;hpas:=(hmax-hmin)/Nh;
Kmin:=2;Kmax:=5;NK:=4;Kpas:=(Kmax-Kmin)/NK;
xkmin:=0.3*x0;xkmax:=0.4*x0;Nzk:=4;xkpas:=(xkmax-xkmin)/Nzk;
st:=time():minim:=E(hmin,Kmin,xkmin):temps:=time()-st;
Nombre_itération:=(Nh+1)*(NK+1)*(Nzk+1);
Estimation_Temps_d_optimisation:=Nombre_itération*temps/60;
compteur:=1;
st:=time():
for h from hmin to hmax by hpas do
for K from Kmin to Kmax by Kpas do
for xk from xkmin to xkmax by xkpas do
m0:=h,K,xk:
EE:=E(m0):
print(compteur,EE);compteur:=compteur+1:
if EE<minim then minim:=EE: m1:=m0: print("nouveau_minimum-----",minim); fi:
od:od:od:TempsOptimisation:=(time()-st)/60;
>

```

**Affichage des résultats et tracé de graphes**

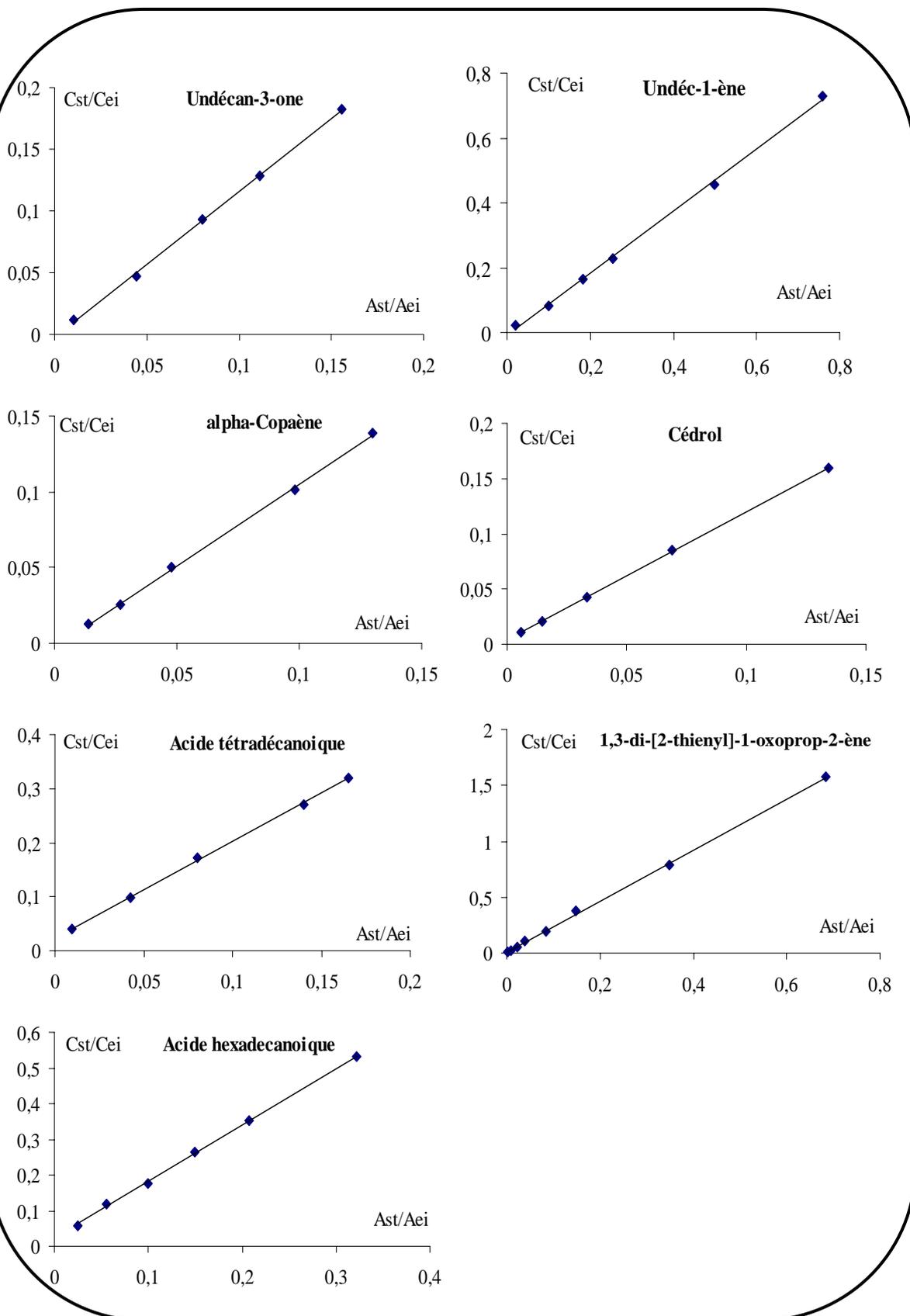
```

> #m1:=m0;
#m1:=1E-6,0.2,0.3*x0;
#TempsOptimisation:=0;
st:=time():m1;erreur:=E(m1);TempsDeCalcul:=time()-st;
printf("%s %g \n","Série",serie);
printf("%s %s \n","Modèle",model);
printf("%s %g \n","Nt=",Nt);
printf("%s %g \n","Nz=",Nz);
printf("%s %g \n","CFL=",cfl);
printf("%s %g %s\n","Temps_d_optimisation=",TempsOptimisation,"minutes");
printf("%s %g \n","Erreur=",erreur);
printf("%s %g \n","h=",m1[1]);
printf("%s %g \n","K=",m1[2]);
printf("%s %g \n","xk=",m1[3]);
printf("%s %g%s\n","Pourcentage=",m1[3]*100/x0,"%_de_x0");
printf("%s %s %s \n","Temps(minutes)","y_mesurée","y_calculée");
for i from 1 to nops(texp) do printf("%g %g %g \n",texp[i]/60,yexp[i],y[k0[i],Nz]); od;

> listplot3d([seq([seq(y[i,j],i=1..Nt),j=1..Nz]));
> G1:=listplot([seq([texp[i],y[k0[i],Nz]],i=1..nops(texp))],color=red);
G2:=listplot([seq([texp[i],yexp[i]],i=1..nops(texp))]);
display(G1,G2);
> listplot([seq([texp[i],x[k0[i],Nz]],i=1..nops(texp))],color=red);
> for i to nops(texp) do G[i]:=listplot([seq(y[k0[i],j],j=1..Nz)]):od:
GR:=seq(G[i],i=1..nops(texp));
display(GR);
> for i to nops(texp) do G[i]:=listplot([seq(x[k0[i],j],j=1..Nz)]):od:
GR:=seq(G[i],i=1..nops(texp));
display(GR);

```

**APPENDICE E**  
**COURBES D'ETALONNAGE DES STANDARDS UTILISES (ETALONNAGE INTERNE)**



## **APPENDICE F**

### **PARTIE EXPERIMENTALE**

#### 1 Extraction et Hydrodistillation

##### 1.1 Extraction aux solvants

Les extractions aux solvants sont effectuées avec le mélange chloroforme (Ref. : Carlo Erba 438603)/méthanol (Ref. : Carlo Erba 462532) (v/v : 1/1). Les algues sont grossièrement broyées dans un mortier, puis mises en contact statique avec le solvant dans un récipient (extraction batch). Le miscella obtenu est filtré sur verre fritté et le solvant est évaporé sous vide.

##### 1.2 Extraction au dioxyde de carbone supercritique

Les différentes expériences sont effectuées sur un extracteur aux fluides supercritiques de type HP 7680 A équipé d'une cartouche d'extraction de volume 7 ml (chapitre 3, figure 3.1-a), la récupération des produits se fait par l'intermédiaire d'un piège collecteur (chapitre 3, figure 3.1-b).

##### 1.3 Hydrodistillation assistée aux micro-ondes focalisées

L'appareillage utilisé est un four à micro-ondes focalisées de type Discover, d'une puissance maximale de 300 W (Fabrication CEM) (chapitre 3, figure 3.21). Un four micro-ondes a été également utilisé, il s'agit d'un soxwave 3 (chapitre 3, figure 3.31).

##### 1.4 Hydrodistillation Classique

L'appareillage utilisé est un montage de Dean-Starck modifié (chapitre 3, figure 3.23).

#### 2 Chromatographie

##### 2.1 Chromatographie sur couches minces (CCM)

Les plaques utilisées sont des feuilles plastiques recouvertes de gel de silice F<sub>254</sub> (Ref.: Merck 1.05554), pour la chromatographie à polarité de phases normale, et de silice modifiée RP-18 (Ref.: Merck 1.05559) pour la chromatographie à polarité de phases inversée. La révélation est d'abord réalisée avec une lampe UV, ensuite à l'acide sulfurique (18 N) (Ref. Carlo Erba 410306), suivie d'un chauffage à l'étuve à 100 °C.

##### 2.2 Chromatographie sur colonne ouverte

Les colonnes utilisées sont en verre, les dimensions varient en fonction de la masse d'extrait à séparer. La phase stationnaire employée, dans un rapport approximatif de 40 g pour 1 g d'extrait, est le gel de silice 60 (Ref. : Merck 1.07734 et sds 2000017). La phase mobile utilisée dans l'élution est le mélange binaire isooctane (Ref. : Carlo Erba 456732)/Acétate d'éthyle (Ref. : Carlo Erba 448256) dont la composition varie de 100 % isooctane à 100% acétate d'éthyle, ensuite par le mélange binaire acétate d'éthyle/méthanol (Ref. : Carlo Erba 414818) dont la composition varie de 100% acétate d'éthyle à 50% méthanol.

### 2.3 Chromatographie liquide haute performance à polarité de phases normale

Les expériences sont effectuées sur une chaîne chromatographique composée d'une pompe ConstaMetric 3000 (LDC analytical), d'un réfractomètre différentiel Waters 401 et d'un intégrateur Varian 4400. Deux colonnes ont été utilisées : une colonne analytique munie d'une précolonne (Ref. : Merck, Purospher® STAR Si (5µm), 250 mm x 4,6 mm N° 119463), une colonne semi-préparative munie d'une précolonne (Ref. : Merck, LiChrospher® Si 60 (5µm), 250 mm x 10,5 mm, N° 702383). L'éluant est un mélange binaire d'acétate d'éthyle (Ref. : Carlo Erba 448256) et d'isooctane (Ref. : Carlo Erba 456732).

### 2.4 Chromatographie liquide haute performance à polarité de phases inversée

Les analyses sont menées sur une chaîne chromatographique (Bio-Tek instruments) composée d'un injecteur automatique (HPLC 560 autosampler), d'un four (HPLC 582 column thermostat), d'une pompe à trois voies (system 525), d'un dégazeur (system 3493) : le pilotage des quatre compartiments, l'acquisition et le traitement des données sont réalisés au travers d'une interface par le logiciel KromaSystem 3000. Le détecteur réfractométrique utilisé est le Varian RI 4. L'éluant est un mélange ternaire acétonitrile (ref. : carlo Erba) /Méthanol (Ref. : Carlo Erba 414818) / Eau (Ultra Pure Water System , Milli-Q plus). Une colonne analytique munie d'une précolonne (Ref. : Merck, Purospher® STAR RP18 (5µm), 250 mm x 4,6 mm).

### 2.5 Chromatographie en phase gazeuse

Les expériences sont effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse HP-6890 series couplé à un spectromètre de masse HP-5972A. La colonne est une Sil 8 CB

lowbleed/MS (250  $\mu\text{m}$  x 30 m x 0,25  $\mu\text{m}$  avec 5 % phényl 95 % dimethylpolysiloxane) utilisée en mode split (1/90) (avec division).

### 3 Analyses Spectroscopiques

#### 3.1 Spectrométrie de masse

Les spectres haute résolution sont obtenus sur un spectromètre de masse haute résolution multisources MS/MS ZabSpec TOF Micromass en utilisant un mode d'ionisation FAB (LSIMS) dans une matrice de mNBA (alcool méthanitrobenzylique) au Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest à l'Université de Rennes I.

Les spectres utilisant la technique d'impact électronique sont enregistrés soit sur spectromètre Varian MAT 311 à 70eV (Université de Rennes I), soit sur un spectromètre de masse HP-5972A (Université du Sud Toulon-Var).

#### 3.2 Spectrométrie Infrarouge

Les spectres sont enregistrés sur un spectrophotomètre UNICAM Research Series FTIR. Les analytes sont dissous dans l'éther diéthylique anhydre non stabilisé (Ref.: Carlo Erba 447539) et déposés sur une pastille de KBr. Après évaporation du solvant, une seconde pastille de KBr est superposée sur la première pour obtenir un film fin.

#### 3.3 Spectrométrie ultraviolette

Les spectres sont réalisés dans le dichlorométhane (Ref. : Labosi A 4785552) sur spectrophotomètre Secoman S-750.

#### 3.4 Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire

Les expériences 1D (RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT) et 2D (COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HMQC, HSQC, HMBC et NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) sont réalisées à 400 MHz, sur un spectromètre Brüker Avance 400 à l'institut des Sciences de l'Ingénieur de Toulon-Var (ISITV) et à 500 MHz, sur un spectromètre Brüker Avance DRX-500 (Cryosonde TXI) au Centre régional de RMN de Marseille. Pour l'un des produits (**B3**), elles ont été réalisées à 250 MHz sur un spectromètre Brüker de l'Université d'Avignon, sauf pour la séquence HMBC qui a été réalisée à 400 MHz sur l'appareil de l'ISITV. Les produits analysés sont solubilisés dans le chloroforme deutérié ou l'acétone deutériée. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS (Ref. : Aldrich T2, 400-7) utilisé comme référence interne. Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz (Hz).

Les séquences utilisées lors des expériences multi-impulsionnelles sont les suivantes :

➤ **DEPT (Distortionless Enhancement Polarisation Transfer)**

Cette séquence d'impulsion de transfert de polarisation permet de distinguer les signaux des atomes de carbone suivant la nature de ceux-ci (primaires, secondaires, tertiaires) Le signe des pics dépend de l'angle de polarisation utilisé et de la nature du carbone (tableau F.1).

Tableau F.1 : Signe des pics du carbone suivant la séquence DEPT réalisée

DEPT	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH	C
$\theta = 45^\circ$	+	+	+	0
$\theta = 90^\circ$	0	0	+	0
$\theta = 135^\circ$	+	-	+	0
RMN <sup>13</sup> C	+	+	+	+

➤ **COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (Correlated SpectroscopY)**

Cette séquence de RMN bidimensionnelle qui correspond à un transfert de cohérence homonucléaire, permet de déterminer les couplages scalaires qui existent entre protons voisins. Elle remplace à elle seule toute une série de découplages réalisée sur un spectre unidimensionnel.

➤ **NOESY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY)**

Cette séquence de RMN bidimensionnelle homonucléaire est du même type que la séquence COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H. Elle se singularise de celle-ci par le fait que l'échange de magnétisation pendant le temps de mixage se fonde sur l'effet Overhauser nucléaire. Elle permet de visualiser les interactions spatiales entre protons.

➤ **COSY <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H (Correlated SpectroscopY)**

Cette séquence de RMN bidimensionnelle correspond à un transfert de cohérence hétéronucléaire, permet de déterminer les couplages qui existent entre les carbones et les protons directement liés.

➤ **HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)**

Cette séquence de RMN bidimensionnelle hétéronucléaire est du même type que la séquence COSY <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H. Elle se différencie par le fait que la détection se fait sur le proton (détection inverse), elle présente l'avantage d'être plus sensible, ce qui permet d'analyser de faibles quantités en un temps plus court.

➤ HSQC (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**orrelation)

Cette séquence de RMN bidimensionnelle hétéronucléaire est identique à la HMQC, c'est une variante mettant en jeu uniquement une cohérence simple quantum hétéronucléaire, fondée sur un transfert de polarisation INEPT direct suivi, après une période d'évolution  $t_1$ , d'un transfert INEPT inverse.

➤ HMBC (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**onnectivity)

Cette séquence de RMN bidimensionnelle hétéronucléaire est réalisée en détection inverse. C'est une séquence modifiée de la HMQC permettant la détection des couplages  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  à longue distance et par conséquent la détection des couplages entre protons et carbones quaternaires.

#### 4 Détermination de l'activité optique

➤ Polarimétrie

Les pouvoirs rotatoires spécifiques sont mesurés sur un polarimètre Prekin-Elmer 141, à 20°C pour la raie D du sodium (589 nm). Les composés sont solubilisés dans le dichlorométhane et la mesure est réalisée dans une micro-cellule de volume 1ml ( $l = 100$  mm).

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{100 \alpha 100}{c l}$$

$\alpha$  : angle de rotation  
 $c$  : concentration de l'échantillon en g/100 ml  
 $l$  : longueur de la cellule (mm)  
 $t$  : température de l'échantillon  
 $\lambda$  : longueur d'onde de la lampe

#### 5 Réaction

➤ Acétylation

Cette réaction est réalisée en ajoutant à 10 mg de mélange à purifier, 10 gouttes de pyridine et 10 gouttes d'anhydride acétique. La solution est laissée 12 heures à température ambiante après avoir été agitée pendant quelques minutes. Le traitement de la solution obtenue est effectué par l'ajout de 20 ml d'eau, puis par l'extraction à l'éther (3 fois) et par le lavage des phases étherées avec une solution de  $\text{NaHSO}_3$  à 5%, puis à l'eau jusqu'à neutralité. Les phases étherées sont finalement séchées sur  $\text{MgSO}_4$ . Les différents composés acétylés du mélange obtenu sont ensuite purifiés par CLHP avec un mélange éluant binaire AcOEt/TMP dont la composition varie selon les composés à analyser.

## APPENDICE G

### GLOSSAIRE

Autotrophique (autotrophe): organisme qui est capable d'élaborer ses propres substances organiques à partir d'éléments minéraux.

Batch : extraction en mode statique

Benthique : organisme, mobile ou fixé, vivant sur les fonds des océans.

Biotope : milieu déterminé, défini par un ensemble de conditions écologiques et hébergeant un type bien défini de peuplement.

Bryozoaire : ce sont des animaux coloniaux composés de petits individus pouvant atteindre un ou plusieurs millimètres.

Chimiotaxonomie : méthode de classement qui consiste à ranger des organismes vivants en fonction de la présence (ou de l'absence) de certains constituants chimiques caractéristiques qu'ils élaborent.

Cytologique : qui se rapporte à l'étude de la cellule

Dichotome : qualifie un axe qui se divise en deux rameaux symétriques.

Diploïde : correspond à un lot double de chromosomes dans le noyau des cellules.

Encroûtant : en forme de croûte.

Endémique : qui a une distribution géographique limitée, limitation revêtant une signification au regard de la biogéographie et de l'histoire des espèces. Cette notion s'applique aux espèces comme aux unités systématiques de rang supérieur (genres, familles....).

Flagelles : organites cellulaires en forme de fouet plus ou moins allongé, de structure complexe, assurant la locomotion des cellules mobiles. Le nombre et la disposition des flagelles sont des caractères fondamentaux de la systématique.

Foliacé : à allure de feuille ou de lame.

Fouling : processus de colonisation d'une surface solide (vivante ou non).

Gamétophyte : thalle qui produit des gamètes

Haptères : crampons

Hétérotrophiques : organisme qui se nourrit de substances organiques, ne pouvant effectuer lui-même et la synthèse de ses éléments constitutants.

Isogamie : fécondation dans laquelle les gamètes sont morphologiquement identique.

Isomorphe : se dit d'un cycle d'alternance de générations dont les générations successives sont morphologiquement semblables.

Infralittoral : étage (espace vertical du domaine benthique) compris entre l'étage médiolittoral et l'étage circalittoral.

Ion Hock-oxycarbenium : un ion oxocarbonium obtenu suite à l'action de l'enzyme hydroperoxydase faisant intervenir la réaction de Hock.

Métabolites secondaires : produits du métabolisme secondaire

Off-line : en mode discontinu

Oogamie : fécondation dans laquelle le gamète femelle est immobile tandis que le gamète mâle est flagellé.

Pérennante : qualifie une plante ou une portion de plante qui vit plus d'une année.

Photophile : litt. : « aime la lumière » ; se dit d'un organisme qui se développe dans une station bien éclairée ; par extension qualifie ce type de biotope.

Rhizoïde : poil à vocation fixatrice.

Sciaphille : litt. : « aime l'ombre » ; se dit d'un organisme qui se développe dans des stations ombragées ; par extension qualifie ce type de biotope.

Sporophytes : thalle qui produit les spores.

Spore : cellule reproductrice qui engendre directement un nouvel individu.

Sporophylle : chez certains algues brunes (Laminariales), expansion foliacée qui porte les spores.

Sore : groupement d'organes reproducteurs (sporo- ou gamétocystes) à la surface d'un thalle.

Thalle : appareil végétatif des végétaux inférieurs, caractérisé par l'absence de tige, feuilles et racines.

Unicellulaire : se dit d'un organisme constitué d'une seule cellule ;

Verticillé : ensemble de pièces (ramulles, poils, etc...) s'insérant sur un axe à un même niveau et en nombre supérieur à deux.

Zygote : œuf, cellule issue de la fusion des gamètes.

## REFERENCES

1. Kobayashi, J. and Ishibashi, M., «Comprehensive Natural Products Chemistry», Oxford: Ed. K. Mori, Pergamon, V.8, (1999), 415-520.
2. Yasumoto, T. and Murata, M., «Marine toxins», Chem. Rev., V. 93, (1993), 1897-1909.
3. Jaspars, M., Testing the Water, «Chemistry and Industry», (1999), 51-55.
4. Pettit, G. R., Herald, C. L., Doubek, D. L., Arnold, E. and Clardy, J., Isolation and structure of Bryostatin I, J. Am. Chem. Soc., V. 104, (1982), 6846-6848.
5. Sakai, R., Rinehart, K. L., Kishore, V., Kundu, B., Faircloth, G., Gloer, J.B., Carney, J.R., Namikoshi, M., Sun, F., Hughes Jr., R.G., Grávalos, de Quesada, T.G., Wilson, G.R. and Heid, R.M., «Structure-activity relationships of the didemnins», J. Med. Chem., V. 39, (1996), 2819-2834.
6. Pettit, G.R. Kamano, Y., Herald, C.L., Tuinman, A.A., Boettner, F.E., Kizu, H.Schmidt, J.M., Baczynskyj, L., Tomer, K.B. and Bontems, R., «The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: dolastatin 10», J. Am. Chem. Soc., V.109, (1987), 6883-6885.
7. Look, S.A., Fenical, W., Matsumoto, G.K. and Clardy, J., «The pseudopterosins are potent anti-inflammatory agents», J. Org. Chem., V. 51 (1986), 5141-5145.
8. Roussis, V., Wu, Z., Fenical, W., Strobel, S.A., Van Duyne, G.D. and Clardy, J., «Antiinflammatory Pseudopterosins from the Marine Octocoral Pseudopteroorgia elisabethae», J. Org. chem., V. 55, (1990), 4916-4922.
9. Faulkner, D. J., «Highlights of marine natural products chemistry», Nat. Prod.Rep., V. 17, 1-6, (2000), 1972-1999.
10. Kitagawa, I., Kobayashi, M., Katori, T., Yamashita, M., Tanaka, J., Doi, M. and Ishida, T., «Absolute stereostructure of swinholide A, a potent cytotoxic macrolide from the Okinawa marine sponge Theonela swinhoei», J. Am. Chem. Soc., V. 112, (1990), 3710-3712.
11. Ribier, J. et Godineau, J.-C., «Les algues – Connaissance, utilisation, culture», Paris : Ed. Flammarion, (1984), 281p.
12. Gayral, P. et Cosson, J., «Connaître et reconnaître les algues marines», Ouest France : (1986), 222p.
13. Lüning, K., «Seaweeds Their Environment, Biogeography, and Ecophysiology», John

- Wiley & Sons, Inc. (1990), 527p.
14. Lüning, K. and Müller, D. G., «Chemical interaction in sexual reproduction of several Laminariales (Phaeophyceae): Release and attraction of spermatozoids», *Z. Pflanzenphysiol.*, V. 89, (1978), 331-341.
  15. Lüning, K. and Dring, M. J., «Action spectra and spectral quantum yield of photosynthesis in marine macroalgae with thin and thick thalli», *Mar. Biol.*, V. 87, (1985), 119-129.
  16. Chadeffaud, M. et Emberger, L., «Traité de Botanique», Tome 1. Les végétaux non vasculaires – Paris : Ed. Masson, (1960), 103p.
  17. Feldmann, J., «Les algues. Précis de sciences biologiques : botanique», Paris : Ed. Masson, (1963), 249p.
  18. Perret-Boudouresque, M. and Seridi, H., «Inventaire des algues marines benthiques d'Algérie», GIS Posidonie publ., Marseille Fr., (1989), 117p.
  19. Boudouresque, C. F. and Boudouresque, E., Contribution à la flore des algues marines de l'Algérie, *Bull. Mus. Hist. nat. Marseille - Fr.*, V. 35, 7-92, (1969).
  20. Debray, F., «Catalogue des algues du Maroc, de l'Algérie et de la Tunisie», Librairie A. Ed. Jourdan – Alger, (1893), 78p.
  21. Montagne, C., «Cryptogames algériennes ou plantes recueillies par M. Roussel aux environs d'Alger», *Ann. Sci. Nat., Fr.*, 2, Série 2, V. 10, (1838), 268-279.
  22. Montagne, C., «Exploration scientifique de l'Algérie», Bory de Saint-Vincent et Durieu de Maisonneuve, 1846-1849, 197p. + 16 Pl.
  23. Cabioch, J., Floc'h, J.-Y., Le Toquin, A., Boudouresque, C.-F., Meinesz, A. and Verlaque, M., «Guide des Algues des mers d'Europe, Manche/Atlantique», Paris : Delachaux et Nestlé, (1992), 231p.
  24. Ross, R., «The type's species of *Bifurcaria* Stackhouse», *Journal of the Linnean Society of London (Botany)*, V. 55, (1958), 753-754.
  25. Silva, P. C., Basson, P. W. and Moe, R. L., «Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean», *University of Californian Publications in Botany*, V. 79, (1996), 1259p.
  26. South, G. R. and Tittley, I., «A checklist and distribution index of the benthic marine algae of the North Atlantic Ocean», St Andrews and London : Ed. Hunstman Marine Laboratory and British Museum (Natural History), (1986), 76p.
  27. Agardh, J. G., «Till algernes systematic femte afd», *Lunds Univ. Arsskr., Sverige*, V. 23(2), 1887, 174p.
  28. Devon, T.K and Scott A.I., «Handbook of Naturally occurring compounds : The terpenes», London : V. 2, 1972, Academic Press, 201p.

29. Culioli, G., « Isolement et détermination structurale de nouveaux diterpènes de l'algue brune *Bifurcaria bifurcata* (Velley) Ross – Chimiotaxonomie du genre *Bifurcaria* Stackhouse », Thèse de doctorat, Université de Toulon, (1999), 323p.
30. Amdur, B.H, Rilling, H. and Bloch, K., «The enzymatic conversion of mevalonic acid to squalene», *Journal of the American Chemical Society*, V.79, (1957), 2646.
31. Lyen, F., Reichert, E. and Rueff, L., «Zum biologischen Abbau der Essigsäure, Ihre Isolierung aus Hefe und ihre chemische Natur», *Jutus Liebig's Ann. Chem.*, V.1 (1951), 574.
32. Rhomer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., Sahm, H., «Glyceraldehyde 3-Phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis», *J. Am. Chem. Soc.*, 118, (1996), 2564-2566.
33. Lichtenthaler, H. K., Schwender, J., «Disch, A. and Rohmer, M., Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceed via a mevalonate-independant pathway», *EBS Letters*, V. 400, (1997), 271-274.
34. Faulkner, D.J., «Marine natural products, *Natural Product Reports*», V. 15 (2), (1998), 113–158.
35. Faulkner, D.J., «Marine natural products, *Natural Product Reports*», V.16, (1999), 155-198.
36. Faulkner, D.J., «Marine natural products, *Natural Product Reports*», V.17, (2000), 7-55.
37. Faulkner, D.J., «Marine natural products, *Natural Product Reports*», V. 18, (2001), 1- 49.
38. Faulkner, D.J., «Marine natural products, *Natural Product Reports*», V. 19, (2002), 1- 48.
39. Hanson, J. R., «Diterpenoids», *Nat. Prod. Rep.*, V. 17, (2000), 165 – 174.
40. Rho, J-R., Lee, H-S., Sim, C. J. and Shin, J., «Highly oxygenated diterpenoids from the sponge *Phorbas* sp. », *Tetrahedron*, V. 58, (2002), 9585-9591.
41. Díaz-Marrero A.R., Dorta, E., Cueto, M., San-Martín, A. and Darias, J., «Conformational analysis and absolute stereochemistry of 'spongian'-related metabolites», *Tetrahedron*, V 60, (2004), 1073-1078.
42. Mitchell, S.S., Harper, M. K. and Faulkner, D. J., «Spongiabutenolides A–D: Minor -hydroxybutenolide diterpenoids from a Philippines *Spongia* sp. », *Tetrahedron*, (1999), V. 55, 10887-10892.
43. Bremner, P. D., Simmonds, M. S. J., Blaney, W. M. and Veitch, N. C., «Neo-clerodane diterpenoid insect antifeedants from *Ajuga reptans* cv *catlins giant*», *Phytochemistry*, V 47, (1998), 1227-1232.

44. Miyaoka, H., Shimomura, M., Kimura, H. and Kim, Y. Y-S and Wataya, Y., «Antimalarial activity of kalihinol A and new relative diterpenoids from the Okinawan sponge», *Tetrahedron*, V. 54, (1998), 13467-13474.
45. Harborne, J.B., «Twenty-five years of chemical ecology», (2001), *Nat. Prod. Rep.*, V. 18, 361-379.
46. Abad, A., Agulló, C., Cuñat, A.C. and García, A.B., «Synthesis of oxygenated spongiane-type diterpenoids from carvone», *Tetrahedron Letters*, (2002), 43, 7773-7775.
47. Miyaoka, H., Shida, H., Yamada, N., Mitome, H. and Yamada, Y., «Total synthesis of marine diterpenoid kalihinene X», *Tetrahedron Letters*, V. 43, (2002), 2227-2230.
48. Schwarz, O., Brun, R., Bats, J. W. and Schmalz, H-G., «Synthesis and biological evaluation of new antimalarial isonitriles related to marine diterpenoids», *Tetrahedron Letters*, V. 43, (2002), 1009-1013.
49. Miyaoka, H., Baba, T., and al, «Total synthesis of marine diterpenoid stolonidiol», *Tetrahedron Letters*, V. 42, (2001), 9233-9236.
50. Thongphasuk, P., Suttisri, R., Bavovada, R. and Verpoorte, R., «Alkaloids and a pimarane diterpenoid from *Strychnos vanprukii*», *Phytochemistry*, V. 64, (2003), 897-901.
51. Hanson, J. R., «Diterpenoids», *Nat. Prod. Rep.*, V.18, (2001), 88-94.
52. Wang, F-P. and Liang, X-T., «C20-diterpenoid alkaloids», *The Alkaloids*, V. 59, (2002), 1-280.
53. Kuniyoshi, M., Marma, M.S., Higa, T., Bernardinelli, G. and Jefford, C. W., 3-«Bromobarekoxide, an unusual diterpene from *Laurencia luzonensis*», *Chem. Commun.*, (2000), 1155-1156.
54. Kornprobst, J.-M. and Al-Easa, H.-S., «Brominated diterpenes of marine origin», *Current Organic Chemistry*, V. 7, (2003), 1181-1229.
55. Valls, R., «Séparation, identification, étude spectroscopique de métabolites secondaires d'algues brunes (Cystoseiracées). Dosage - Variations - Chimiotaxonomie », Thèse d'état, Université d'Aix-Marseille III, (1993), 202p.
56. Biard, J.F., Verbist, J.F., Letourneux, Y. et Floch, R. «Cétols diterpéniques à activité antimicrobienne de *Bifurcaria bifurcata*», *Planta Medica*, (1980), 40, 288-294.
57. Biard, J.F., Verbist, J.F., Letourneux, Y., «Epoxyéléganolone et éléganediol, deux nouveaux diterpènes de *Bifurcaria bifurcata* Ross (Cystoseiracées) », *Tetrahedron Letters*, V. 21, (1980), 1849-1852.
58. Valls, R., Pioveti, L., Banaigs, B., Archavlis, A. and Pellegrini, M., «(S)-13-hydroxygeranylgeraniol-derived furanoditerpènes from *Bifurcaria bifurcata*», *Phytochemistry*, V. 39, (1995), 145-149.

59. Valls, R., Banaigs, B., Francisco, C., Codomier, L. and Cave, A., «An acyclic diterpènes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*», *Phytochemistry*, V. 25, (1986), 751-752.
60. Semmak, L., Zerzouf, A., Valls, R., Banaigs, B., Jeanty, G. and Francisco, C., «Acyclic diterpenes from *Bifurcaria bifurcata*», *Phytochemistry*, V. 27, (1988), 2347-2349.
61. Hougaard, L., Anthoni, U., Christophersen, C. and Nielsen, P.H., «Two new diterpenoid dihydroxy- $\gamma$ -butyrolactones from *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) », *Tetrahedron Letters*, V. 32, (1991), 3577-3578.
62. Hougaard, L., Anthoni, U., Christophersen, C. and Nielsen, P.H., «Eleganolone derived diterpenes from *Bifurcaria bifurcata*», *Phytochemistry*, V. 30 (9), (1991), 3049-3051.
63. Culioli, G., Daoudi, M., Mesguiche, V., Valls, R. et Piovetti, L., «Geranylgeraniol-derived diterpenoids from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*», *Phytochemistry*, V. 52, (1999), 1447-1454.
64. Culioli, G., Mesguiche, V., Piovetti, L. et Valls, R., «Geranylgeraniol and geranylgeraniol-derived diterpènes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*», *Biochemical Systematics and Ecology*, (1999), V. 27, 665-668.
65. Culioli, G., Di Guardia, S., Valls, R. et Piovetti, L., «Geranylgeraniol-derived diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*: Comparison with two other Cystoseiraceae species», *Biochemical Systematics and Ecology*, (2000), V. 28, 185-187.
66. Culioli, G., Daoudi, M., Ortalo-Magné, A., Valls, R. et Piovetti, L., « (S)-12-Hydroxygeranylgeraniol-derived diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*», *Phytochemistry*, V. 57, (2001), 529-535.
67. Culioli, G., Ortalo-Magné, A., Richou, M., Valls, R. et Piovetti, L., « Seasonal variation in the chemical composition of *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) », *Biochemical Systematics and Ecology*, V. 30, (2002), 61-64.
68. Culioli, G., Di Guradia, S., Valls, R. et Piovetti, L., «Geranylgeraniol derived diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*: comparison with two other Cystoseiraceae species», *Biochemical Systematics and Ecology*, V. 28, (2000), 185-187.
69. Culioli, G., Ortalo-Magné, Daoudi, M., Thomas-Guyon, H., Valls, R. and Piovetti, L., «Trihydroxylated linear diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*», *Phytochemistry*, V. 27, (2004), 2063-2069.
70. Othani, I., Kusumi, T., Kashman, Y. and Kakisawa, H., «High-field NMR application of Mosher's method. The absolute configuration of marine terpénoïdes», *Journal of the American Chemical Society*, V. 113, (1991), 4092-4096.
71. Straub, O., «Key to carotenoids – Lists of Natural Carotenoids», Ed. Birkhaeuser, Basel (1976).
72. Liaaen-Jensen, S., «Marine Natural Products», New York: D.J.Faulkner and W. H.

- Fenical, eds. Plenum, (1977), 259p.
73. Liaaen-Jensen, S., Renstrøm, B., Ramdahl, T. and Hallenstvet, M., «Carotenoids of marine Sponges», *Biochemical Systematics and Ecology*, V.10, (1982), 167-174.
  74. Vershinin, A., «Carotenoids in mollusca: approaching the functions», *Comparative Biochemistry and Physiology*, (1996), 113, 63-71.
  75. Lenel, R., Castillo, R. and Negre-Sadargues, G., «The presence of alfa-dorodexanthin in crustacea and its possible metabolic fate», *Biochem. Syst. Ecol.*, (1978), 6, 251-253.
  76. Scheuer, P. J., «Marine natural Products, Chemical and Biological Perspectives», London: Academic Press, (1978). V.II, 392p.
  77. Sandmann, G., «Carotenoid Biosynthesis and Biotechnological Application», *Archives of Biochemistry and Biophysics*, V. 385, (2001), 4-12.
  78. Liaaen-Jensen, S., «Stereochemical aspects of carotenoids», *Pure & App. Chem.*, V.69, (1997), 2027-2038.
  79. Haugan, J. A. and Liaaen-Jensen, S., «Algal carotenoids. 54. Carotenoids of the brown algae», *Biochem. Syst. Ecol.* , V. 22, (1994), 31- 41.
  - 80 Kornprobst, J. M., « Substances naturelles: Originalité – distribution – Utilisations », Paris : Ed. Tec & Doc. - Lavoisier, (2004).
  81. Bjorland, T. and Liaaen-Jensen, S., «The chromophyte Algae: Problems and Perspectives», Oxford : Eds,. Clarendon Press, (1989), pp.37-60.
  82. Haugan, J. A. and Liaaen-Jensen, S., «Naturally Occurring Stereoisomers of Fucoxanthin», *Phytochemistry*, V. 51, (1992), 1359-1361.
  83. Goodfellow, D., Moss, and al., Configuration of Carotenoid Epoxides, *Tetrahedron*, V. 40, (1973), 3925-3928.
  - 84 Bernhard, K., Moss, G. P., Toth, Gy. and Weedon, B. C. L., «Absolute Configuration of Fucoxanthin», *Tetrahedron Letters*, V. 2, (1976), 115-118.
  85. Liaaen-Jensen, S. and Egeland, E.S., *Microalgal carotenoids- Chemicals from microalgae*. London : Ed Cohen.Z Taylor and Francis, (1999).
  86. Goodwin, T. W., «The Biochemistry of carotenoids», 2<sup>nd</sup> Edition, London: Chapman & Hall (1980), V.1, 356p.
  87. Meinwald, J., Erickson, K., Hartshorn, M., Meinwald, Y. C. And Eisner, T., «Defensive mechanisms of arthropods. XXIII. An allenic sesquiterpenoid from the Grasshopper *Romalea Microptera*», *Tetrahedron Letters*, V. 25, (1968), 2959-2962.
  88. Bonnett, R., Mallams, A. K., Tee, J. L. and Weedon, B. C. L., «Fucoxanthin and Related Pigments», *Chemical Communications*, (1966), 15, 515-516.

89. Bonnett, R., Mallams, A. K., Spark, A. A., Tee, J. L. Weedon, C. L. and McCormick, A. «Carotenoids and Related Compounds. Part XX. Structure and Reactions of Fucoxanthin», *J. Chem. Soc. (C)*, (1969), 429-454.
90. De Ville, T. E., Hursthouse, M. B., Russell, S. W. and Weedon, B. C. L., «Absolute configuration of carotenoids», *Chemical Communications*, (1969), 1311-1312.
91. De Ville, T. E., Hora, J., Hursthouse, M. B., Toube, T. P. and Weedon, B. C. L., «Chemistry of allenes formed by photochemical oxidation: an X-Ray StereoCrystallographic study», *Chemical Communications*, (1970), 1231-1232.
92. Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H., «Carotenoids: Spectroscopy», Boston - Berlin : Birkhäuser Verlag-Basel, V.1B, (1995), 360p.
93. Hlubucek, J. R., Hora, J. Russell, S. W., Toube, T. P. and Weedon, B. C. L., «Carotenoids and Related Compounds. Part XXIX. Stereochemistry and Synthesis of Allenic End Group. Absolute Configuration of zéaxanthine», *J. C. S. Perkin I*, (1974), 848-852.
94. Eliel, E.L. and Wilen, S.H., « Stéréochimie des composés organiques », Londres, New York et Paris : Techniques & Documentation Ed. Lavoisier, (1996), pp 1137-1146.
95. Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and H. Pfander., « Carotenoids: Isolation and analysis », Boston et Berlin : Ed. Birkhäuser, Basel, V1A, (1995), 328 p.
96. Helmchen, G., Haas, G and Prelog, V., «Über die stereoisomeren -Phenyläthylamide der Biphenyl-2,2',6,6'-tetracarbonsäure, Molekeln mit der Punktsymmetrie D<sub>2</sub>, S<sub>4</sub>, C<sub>2</sub> und C<sub>1</sub>», *Helv. Chim. Acta.* , V. 56, (1973), 2255-2270.
97. Isoe, S., Katsumura, S., Hyeon, S. B. and Sakan, T., «Biogenetic type synthesis of Grasshopper ketone and loliolide and a possible biogenesis of allenic carotenoids», *Tetrahedron letters*, V. 16, (1971), 1089-1092.
98. Isoe, S., Hyeon, S. B., Ichikawa, H. and Katsumura, S., «The synthesis of actinidiolide and actinidol», *Tetrahedron Letters*, V. 53, (1968), 5561-5564.
99. Baumes, R., Wirth, J., Bureau, S., Gunata, Y. and Razungles, A., «Biogenesis of C<sub>13</sub>-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines», *Analytica chimica acta*, V.458, (2002), 3-14.
100. Bernhard, K., Moss, G. P., Toth, G. and Weedon, B. C. L., «Steroisomers of fucoxanthin trahedron Lett. », (1974), 3899-3902.
101. Strand, A., Kvernberg, K., Karlsen, A. M. And Liaaen-Jensen, S., «Geometrical E/Z isomer of (6R) - and (6S) - neoxanthin and biological implications», *Biochemical Systematics and Ecology*, V. 28, (2000), 443-455.
102. Baumeler, A., Eugster, C. H., « Synthese von (6R, all-E)-Neoxanthin und verwandten Allen-Carotinoiden», *Helv. Chim. Acta*, V. 75, (1992), 773-790.

103. Bjørnland, T., Englert, G., Bernhard, K. And Liaaen-Jensen, S., «Claimed 6R/6S allene isomerization in carotenoids is geometrical 9-trans/9-cis», *Tetrahedron Letters*, V.30 (1989), 577-2580.
104. Haugart, J. A., Englert, G., Glinz, E. and Liaaen-Jensen, S., «Algal Carotenoids. 48. Structural assignments of geometrical isomers of fucoxanthin», *Acta Chem. Scand.*, V. 46,(1992), 389-395.
105. Haugan, J. A. and Liaaen-Jensen, S., «Improved isolation procedure for fucoxanthin», *Phytochemistry*, V. 28, (1989), 2797-2798.
106. Refvem, T.; Strand, A.; Kjeldstad, B; Haugan, J. A., Liaaen-Jensen, S., «Stereoisomerization of allenic carotenoids- Kinetic, Thermodynamic and Mechanistic aspects», *Acta Chem. Scand.*, V. 53, (1999), 114-123.
107. Strand, A., Liaaen-Jensen, S., « First preparation and characterization of the allenic carotenoids (all-E, 6S) - and (9'Z, 6S)-neoxanthin», *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, V. 1, (2000), 595-598.
108. Zhangfei, H., Guoqiang, G., Hand, E. S., Kispert, L. D., Strand, A. and Liaaen-Jensen, S., «Iodine-catalyzed R/S isomerization of allenic carotenoids», *J. Phys. Chem. A.*, V. 106, (2002), 2520-2525.
109. Haugan, J. A., Liaaen-Jensen, S., «Isolation and Characterisation of four allenic (6'S)- Isomer of Fucoxanthin», *Tetrahedron letters*, V. 35, (1994), 2245-2248.
110. Yamano, Y., Sumiya, S., Suzuki, K., Kurimoto, Y., Koyama, Y., Shimamura, T. and Ito, M., «A novel photoproduct of peridinin, a 6S allenic isomer», *Tetrahedron Letters.*, V. 33, (1992), 2991-2994.
111. Haugan, J. A., Liaaen-Jensen, S., « Blue carotenoids. Part 2. The Chemistry of the classical colour reaction of common carotenoid 5,6-Epoxides with acid», *Acta Chemica Scandinavica*, V.48 (1994), 152-159.
112. Haugan, J. A. and Liaaen-Jensen. S., «Blue Carotenoids. Part 1. Novel oxonium ions derived from fucoxanthin», *Acta Chem. Scand.*, V.48, (1994), 68-75.
113. Haugan, J. A., Englert, G., Liaaen-Jensen, S., « Algal Carotenoids 50. Alkali lability of fucoxanthin – Reactions and Products», *Acta Chem. Scand.*, V. 46, (1992), 614-624.
114. Repeta, D., «Carotenoid diagenesis in recent marine sediments: II. Degradation of fucoxanthin to loliolide», *Geochimica et Cosmochimica*, V. 53, (1988), 699-707.
115. Valdés, L. J., «Loliolide from *Salvia divinorum*», *J. Nat. Prod.*, V. 49, (1986), 171-172.
116. Kimura, J. and Maki, N., «New loliolide derivatives from the brown alga *Undaria pinnatifida*», *J. Nat. Prod.*, V. 65, (2002), 57-58.
117. Bruneton, J., «Pharmacognosie : Phytochimie – Plantes médicinales», Londres - Paris - New York: Ed. Tec & Doc. Lavoisier, (1993), 915p.

118. Ragan, M.A. and Glombitza, K.-W., « Phlorotanins, brown algal polyphenols», in Progress in Phycological research , V.4, Biop. res Ltd, Ed.Round, F.E. and Chapman, D.J., Bristol, (1986), pp129-241.
119. Steinberg, P.D., «Effect of quantitative and qualitative variation in phenolic compounds on feeding in three species of marine invertebrate herbivores», J. Exp. Mar. Biol. Ecol., V. 120, (1988), 221-237.
120. Steinberg, P.D., Van Altena, I., « Tolerance of marine invertebrates herbivores to brown algal phlorotanins in temperate Australasia», Ecol. Monogr., V. 62, (1992), 189-222.
121. Takamatsu, S., Hodges, T.W., Rajbhandari, I., Gerwick, W.H., Hamann, M.T. and Nagle, D.G., «Marine natural products as novel antioxidant prototypes», J. Nat. Prod., V. 66, (2003), 605-608.
122. Zheng, W. and Wang, S.Y., « Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs», J. Agric. Chem., V. 49, (2001), 5165-5170.
123. Lim, S.N., Cheung, P.C.K., Ooi, V.E.C. and Ang, P.O., «Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, sargassum siliquastrum», J. Agric. Food V. 50, Chem., (2002), 3862-3866.
124. Nagayama, K., Shibata, T., Fujimoto, K., Honjo, T. and Nakamura, T., « Algicidal effect of phlorotanins from the brown alga Ecklonia kurome on red tide microalgae», Acquaculture, V. 218, (2003), 601-611.
125. Daly, J.J., Gregson, R.P., «Polyhydroxybiphenyl ethers from the brown alga *Cystophora congesta*», Australian Journal of Chemistry, V. 35, (1982), 649-657.
126. Glombitza, K.-W., Zieprath, G., Phlorotanins from the brown alga *Analipus japonicus*, *Planta Medica*, V. 55, (1989), 171, 171-175.
127. Glombitza, K.-W. and Rösener, H.-U., «Bifuhalol : ein diphenyl diphenyläther aus *Bifurcaria bifurcata*», *Phytochemistry*, V. 13, (1974), 1245-1247.
128. Glombitza, K.-W. and Sattler, E., «Trifuhalol, ein neuer triphenyldiäther aus *Halidrys siliquosa*», *Tetrahedron letters*, V. 14, (1973), 4277- 4280.
129. Glombitza, K.-W., Schnabel, C. and Koch, M., «Antibiotica aus algen. 27. Mitt. niedermolekulare phlorotannine der braunalge *Cystoseira baccata* (Gmelin) Silva -Teil II. », *Arch. Pharm. (Weinheim)*, V. 314, (1981), 602 – 608.
130. Glombitza, K.-W., Gerstberger, G., « Antibiotics from algae. 31 . Phlorotannins with dibenzodioxin structural elements from the brown alga *Eisenia arborea*», *Phytochemistry*, V. 24, (1985), 541-543.
131. Gerwick, W. and Fenical, W., «Phenolic lipids related marine algae of the order dictyotales», *Phytochemistry*, V. 21, (1982), 3, 633-637.

132. Amico, V., Currenti, R., Oriente, G., Piatelli, M. and Tringali, C., «A phloroglucinol derivative from the brown alga *Zonaria tournefortii*», *Phytochemistry*, (1981), V. 20, 6, 1451- 1453.
133. Amico, V., Nocolosi, G., Oriente, G., Piatelli, M. and Tringali, C., «A novel acylphloroglucinol from the brown alga *Zonaria tournefortii*», *Phytochemistry*, V. 21, 3, (1982), 739-741.
134. Tringali, C. and Piatelli, M., «Two chromane from the brown alga *Zonaria tournefortii*, *Tetrahedron letters*», V. 23, 14, (1982), 1509-1512.
135. Tringali, C. and Piatelli, M., «Further metabolites from the brown alga *Zonaria tournefortii*», *Gazetta Chimica Italiana*, (1982), 112.
136. Thuret, M.G., «Recherches sur la fécondation des Fucacés suivies d'observations sur les antheridies des algues», *Ann. Sci. Nat. Bot.*, V. 4, 1854, 197-214.
137. Maier, I. Muller, D.G., «Sexual phéromones in algae», *Biol. Bull.*, V. 170, (1986), 145-175.
138. Boland, W., «The chemistry of gamete attraction : Chemical structures, biosynthesis, and abiotic degradation», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, V. 92, (1995), 37-43.
139. Boland, W., Muller, D.G., «On the odor marine seaweed *Dictyopteris membranacea* ; new C11 hydrocarbons marine brown alga-III», *Tetrahedron Letters.*, V. 28, (1987), 307-310.
140. Pohnert, G. and Boland, W., «The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms», *Nat. Prod. Rep.*, V. 19, (2002), 108-122.
141. Adolph, S., Poulet, S.A. and Pohnert, G., «Synthesis and biological activity of  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -unsaturated aldehydes from diatoms», *Tetrahedron letters*, V. 59, (2003), 3003-3008.
142. Hombeck, M. and Boland, W., «Biosynthesis of the algal pheromone Fucoserratene by the fresh-water diatom *Asterionella formosa* (Bacillariophyceae) », *Tetrahedron letters*, V.54, (1998), 11033-11042.
143. Zhang, F., Endo, T., Kitagawa, R., Kabeya, H. and Hirotsu, T., « Synthesis and characterization of a novel blend of polypropylene with *Chlorella*», *J. Mater. Chem.*, V. 10, (2000), 2666-2672.
144. Neumann, C. and Boland, W., «Stereochemical on algal pheromone biosynthesis. A model study with the flowering plant *senecio isatideus* (Asteraceae) », *Eur. J. Biochem*, V. 191, (1990), 453-459.
145. Müller, D. G., Jaenicke, L., Donike, M. & Akintobi, T., «Sex attractant in a brown alga: chemical structure», *Science*, V. 171, (1971), 815-817.
146. Pohnert, G. And Boland, W., «Pericyclic reactions in nature : Synthesis and cope rearrangement of thermolabile bis-alkenylcyclopropanes from female gametes of

- marine brown algae (Phaeophyceae) », *Tetrahedron letters*, V. 53, (1997), 13681-13694.
147. Kajiwara, T. Akakabe, Y. Matsui, K. Kodama, K. Koga H. and Nagakura, T., «(+)-(3S,4S)-3-Butyl-4-vinylcyclopentene in brown algae of the genus dictyopteris», *Phytochemistry*, V. 45, (1997), 529-532.
  148. Hassett, A. J. and Rohwer, E. R., «Analysis of odorous compounds in water by isolation by closed-loop stripping with a multichannel silicone rubber trap followed by gas chromatography–mass spectrometry», *Journal of Chromatography A*, V. 849, (1999), 521-528.
  149. Kampioti, A.A. and Stephanou, E.G., «Simultaneous determination of halogenated neutral and acidic disinfection by-products in drinking water by closed-loop stripping extraction and capillary gas chromatography», *Journal of Chromatography A*, V.857, (1999), 217-229.
  150. Osemwengie, L. I. and Steinberg, S., «Closed-loop stripping analysis of synthetic musk compounds from fish tissues with measurement by gas chromatography–mass spectrometry with selected-ion monitoring», *Journal of Chromatography A*, V. 993, (2003), 1-15.
  151. Kayali-Sayadi, M. N. Bautista, J. M., Polo-Díez, L. M. and Salazar, I., « Identification of pheromones in mouse urine by head-space solid phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, V. 796, (2003), 55-62.
  152. Peppuy, A., Robert, A., Semon, E., Ginies, C., Lettere, M., Bonnard, O. and Bordereau, C., «(Z)-dodec-3-en-1-ol, a novel termite trail pheromone identified after solid phase microextraction from *Macrotermes annandalei*», *Journal of Insect Physiology*, V. 47, (2001), 445-453.
  153. Rochat, D., Ramirez-Lucas, P., Malosse, C., Aldana, R., Kakul, T. and Morin, J.-P., «Role of solid-phase microextraction in the identification of highly volatile pheromones of two Rhinoceros beetles *Scapanes australis* and *Strategus aloeus* (Coleoptera, Scarabaeidae, Dynastinae) », *Journal of Chromatography A*, V. 885, (2000), 433-444.
  154. Berger, R.G., Drawert, F., Kollmannsberger, H., Nitz, S. and Schraufstetter, B., «Novel volatiles in pineapple fruit and their sensory properties», *Agric. Food Chem.*, (1985), V. 33, 232-235.
  155. Boland, W. and Mertes, K., «Biosynthesis of algal pheromones. A model study with the composite *Senecio isatideus*», *Eur. J. Biochem.* V. 147, (1985), 83-91.
  - 156 Moore, B.S., « Biosynthesis of marine natural products : microorganisms and macroalgae», *Nat. Prod. rep.*, V.16, (1999), 653-674.
  157. Pohnert, G. and Boland, W., «Biosynthesis of the Algal Pheromone Hormosirene by the Freshwater Diatom *Gomphonema parvulum* (Bacillariophyceae) », *Tetrahedron*, V. 52, (1996), 10073-10082.

158. Hay, M.E., Piel, J., Boland, W., Schnitzler, I., «Seaweed sex pheromones and their degradation products frequently suppress amphipod feeding but rarely suppress sea urchin feeding», *Chemoecology*, V. 8, (1998), 91.
159. Yamamoto, Y., Akakabe, Y., Matsui, K., Shimizu, H. and Kajiwara, T. , «Neodictyoprolenol and Dictyoprolenol, the possible Biosynthesis Intermediates of Dictyopterenes, in the Japanese Algae Dictyopteris», *Z.Naturforsch., TeilC*, V. 56, (2001), 423-429.
160. Moore, R.E., «Chemotaxis and the odor of seaweed», *Lloydia*, V. 39, (1976), 181-191.
161. Yamada, K., Tan, H., «Tatematsu, H. and Ojika, M., Dictyoprolene and Neodictyoprolene, two new odoriferous compounds from the brown alga *Dictyopteris prolifera* : structures and synthesis», *Tetrahedron*, V. 42, (1986), 3775-3780.
162. Stratmann, K., Boland, W., Muller, D.G., «Biosynthesis of pheromones in female gametes of marine algae (phaeophyceae) », *Tetrahedron* , V. 49, (1993), 3755-3766.
163. Piel, J., «Abiotic degradation of pheromones of marine brown algae», Thèse de doctorat, Université de Bonn, (1994).
164. Roller, P., Au K. and Moore, R.E., «Isolation of S-(3-oxoundecyl)Thioacetate, Bis-(3-oxoundecyl)Disulphide, (-)-3-Hexyl-4,5-dithiacycloheptanone, and S-(trans-3-Oxoundec-4-enyl) Thioacetate from Dictyopteris», *Chemical Communications*, (1971), 273, 503-504.
165. Moore, R.E., Mistysyn, J. and Pettus, J.A., «(-)-Bis-(3-acetoxyundec-5-enyl)Disulphide and S-(-)-3-Acetoxyundec-5-enyl Thioacetate, Possible Precursors to Undeca-1,3,5-trienes in Dictyopteris», *J. C. S. Chem. Comm.*, V. 2113, (1972), 326-327.
166. Schnitzler, I., Boland, W. and Hay, M.E. «Organic sulfur compounds from Dictyopteris spp. Deter feeding by an herbivorous amphipod (*Ampithoe longimana*) but not by an herbivorous sea urchin (*Arbacia punctulata*) », *J.Chemical Ecology*, V. 24, (1998), 1715-1732.
167. Moore, R.E. and Pettus, J.A., «Dictyopterene A, an odoriferous constituent from algae of the genus Dictyopteris», *Tetrahedron lett.*, V. 46, (1968), 4787- 4790.
168. Pettus J.A. and Moore, R.E., «Isolation and structure determination of an undeca-1,3,5,8-tetraene and Dictyopterene B from algae of the genus Dictyopteris», *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1970), 1093-1094.
169. Pettus J.A. and Moore, R.E., «The isolation and structure determination of dictyopterene C' et D' from Dictyopteris. Stereospecificity in the Cope rearrangement of Dictyopterenes A and B. », *J. Am. Chem. Soc.*, (1971), 93, 3087-3088.
170. Moore, R.E., Pettus, J.A. and Mistysyn, J., «Odoriferous C11 hydrocarbons from Hawaiian Dictyopteris», *J. Org. Chem.*, (1974), 39, 2201-2207.
171. Moore, R.E., «Volatiles compounds from marine algae», *Acc. Chem. Res.*, V. 10,

- (1977), 40-47.
172. Piovetti, L., «Propriétés olfactives des algues marines», *Cryptogamie Algol.*, V. 11, (1990), 9.
173. Moore, R.E., «Dihydrotropones from Dictyopteris», *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1973), 937-938.
174. Wirth, D., Fischer-Lui, I., Boland, W., Icheland, D., Runge, T., König, W.A., Philips, I. and Clayton, M., «Unusual and novel C<sub>11</sub>H<sub>16</sub> hydrocarbons from the Southern Australian brown algae *Dictyopteris acrostichoides* (phaeophyceae) », *Helvetica Chem.*, V. 75, (1992), 734-744.
175. Irie, T., Yamamoto, K. and Masamune, T., «Sesquiterpenes from *Dictyopteris divaricata*.I», *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, V. 37, (1964), 1053-1055.
176. Kurosawa, E., Izawa, M., Yamamoto, K., Masamune, T. and Irie, T., «Sesquiterpenes from *Dictyopteris divaricata*.II. », *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, V. 39, (1966), 2509-2512.
177. Fenical, W., Sims, J., Wing, R. and Radlick, P., «Zonarène, a sesquiterpène from the brown seaweed *Dictyopteris zonaroides*», *Phytochemistry*, (1972), 11, 1161-1163.
178. Fenical, W., Sims, J., Squatrito, D., Wing, R. and Radlick, P., «Zonarol and Isozonarol, fungitoxic hydroquinones from the brown seaweed *Dictyopteris zonaroides*», *J. Org. Chem.*, V. 38, (1973), 2383-2386.
179. Fenical, W. and McConnell, O., «Chromazonarol and Isochromazonarol, new chromanols from the brown seaweed *Dictyopteris undulata* (zonaroides) », *Experientia*, V. 31, (1975), 1004-1005.
180. Suzuki, M., Kowata, N. and Kurosawa, E., «Epicubebol and related sesquiterpenoids from the brown alga *Dictyopteris divaricata*», *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, V. 54, (1981), 2366-2368.
181. Segawa, M., Yamamoto, K. and Shirahama, H., «A Germacrane – type sesquiterpene from the brown alga *Dictyopteris divaricata*», *Phytochemistry*, V. 29, (1990), 973-974.
182. Ochi, M., Kotsuki, H., Muraoka, K. and Tokoroyama, I., «The structure of yahazunol, a new sesquiterpene-substituted hydroquinone from the brown seaweed *Dictyopteris undulata* okamura», *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, V. 52, (1979), 629-630.
183. Ochi, M., Kotsuki, H., Inoue, S., Taniguchi, M. and Tokoroyama, T., « Isolation of 2,(3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrienyl)hydroquinone from the brown seaweed *Dictyopteris undulata*», *Chem. Letters*, (1979), 831-832.
184. Dave, M-N., Kusumi, T., Ishitsuka, M., Iwashita, T. and Kakisawa, H., «A piscicidal chromanol and a chromanol from the brown alga *Dictyopteris undulate*», *Heterocycles*, V. 22, (1984), 2301.
185. Kurata, K., Taniguchi, K. and Suzuki, M., Cyclozonarone, «a sesquiterpene-substituted

- benzaquinone derivative from the brown alga *Dictyopteris undulate*», *Phytochemistry*, V. 41, (1996), 749-752.
186. Kajiwara, T., Kodama, K. and Hatanaka, A., «Male attracting substance in marine brown algae from the genus *Dictyopteris*», *Bull. Jpn. Soc. Scient. Fish.*, V. 46, (1980), 771-775.
187. Boland, W. and Muller, D., «On the odor of the mediterranean seaweed *Dictyopteris membranacea*; new C11 hydrocarbons from marine brown algae. III. », *Tetrahedron letters*, V. 28, (1987), 307-310.
188. Paradossi, C., Lotti, G. and Marchini, F., « Sulla composizione dell'alga bruna *Dictyopteris membranacea*», *Agrochimica*, V. 32, (1988), 354-359.
189. Hoffman, M. and Eichenberger, W., «Lipid and fatty acid composition of the marine brown alga *Dictyopteris membranacea*», *Plant Cell Physiol.*, V. 38, (1997), 1046-1052.
190. Hoffman, M. and Eichenberger, W., «Radiolabelling studies on the lipid metabolism in the marine brown alga *Dictyopteris membranacea*», *Plant Cell Physiol.*, V. 39, (1998), 508-515.
191. Patterson, G.W., «The distribution of sterols in algae», *Lipids*, V. 6, (1971), 120-127.
192. Luque de castro, M. D., Valcarcel, M., Tena, M. T., «Analytical Supercritical Fluid Extraction», Berlin : Springer-Verlag Ed., (1994).
193. Levy, J. M. «Practical Supercritical Fluid Extraction», New York : Ed. Wiley, (1996).
194. Clifford, T., «Fundamentals of Supercritical Fluids», Oxford : Oxford University Press, (1998).
195. Luque de Castro, M. D. and Jiménez-Carmona, M. M., Where is supercritical fluid extraction going?, *Trends in analytical chemistry*, V.19, (2000), 223-228.
196. Turner, C., Eskilsson, C. S., Bjorklund, E., «Collection in analytical-scale supercritical fluid extraction», *Journal of Chromatography A*, V. 947, (2002), 1-22.
197. Vasukumar, K. and Bansal, A. K., «Supercritical fluid technology in pharmaceutical research», *CRIPS*, V. 4(2), (2003), 8-12.
198. Subra, P. and Vega, A., «Retention of some components in supercritical fluid chromatography and application to bergamot peel oil fractionation», *Journal of Chromatography A*, 771, (1997), 241-250.
199. Blum, C., Kubeczka, K-H and Becker, K., «Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry of thyme extracts (*Thymus vulgaris* L.) », *Journal of Chromatography A*, V. 773, (1997), 377-380.
200. Staub, C., «Supercritical fluid extraction and hair analysis: the situation in (1996) », *Forensic Science International*, V. 84, (1997), 295-304.

201. Song, K. M., Park, S. W., Hong, W. H., Lee, H., Kwak, S. S. and Liu, J. R., «Isolation of vindoline from *catharanthus roseus* by supercritical fluid extraction», *Biotechnol. Prog.*, 8, (1993), 583-586.
202. Henning, J. A., Core, R. J., Gardea-torresdey, J. L., «Extracting volatile compounds from single plants using supercritical fluid extraction», *Crop*, V. 34, (1994), 1120-1122.
203. Dron, A., Guyer, D. E., Lira, C. T., «Yield and quality of onion flavour oil obtained by supercritical fluid extraction and other methods», *J. Food Process. Eng.*, V. 20, (1997), 107- 124.
204. Vandana, V., Teja, A. S. and Zalkow, L. H., «Supercritical Extraction and HPLC Analysis of Taxol from *Taxus brevifolia* Using Nitrous Oxide and Nitrous Oxide + Ethanol Mixtures», *Fluid Phase Equilibria*, V. 116, (1996), 162-169.
205. Li, S. F. Y., Ong, C. P., Lee, M. L. and Lee, H. K., «Supercritical fluid extraction and chromatography of steroids with Freon-22», *Journal of Chromatography A*, V. 515, (1990), 515-520.
- 206 Klink, G., Buchs, A. and Gülacar, F. O., «Supercritical fluid extraction of fatty acids and sterols from plant tissues and sediments», *Organic Geochemistry*, V. 21, (1994), 437-441.
207. Yoda, S. K., Marques, M. O. M., Petenate, A. J. and Meireles M. A. A., « Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>+water: extraction kinetics and identification of extracted components», *Journal of Food Engineering*, V. 57, (2003), 125-134.
- 208 Basile, A., Jiménez-Carmona, M. M. and Clifford, A. A., «Extraction of Rosemary by Superheated Water», *J. Agric. Food Chem.*, V. 46, (1998), 5205-5209.
209. Modey, W. K., Mulholland, D. A., Raynor, M. W., « Analytical supercritical fluid extraction of natural products», *Phytochem. Anal.*, V. 7, (1996), 1-15.
210. Cocero, M. J. and García, J., « Mathematical model of supercritical extraction applied to oil extraction by CO<sub>2</sub> + saturated alcohol – I. desorption model», *The Journal of Supercritical Fluids*, V. 20, (2001), 229-243.
211. Li, H. and Yang, S. X., «Modelling of Supercritical Fluid Extraction by Hybrid Peng–Robinson Equation of State and Genetic Algorithms», *Biosystems Engineering*, V. 86, (2003), 17-25.
212. Maio, G.; von Holst, C.; Wenclawiak, B. W.; Darskus, R. «Supercritical Fluid Extraction of Some Chlorinated Benzenes and Cyclohexanes from Soil: Optimization with Fractional Factorial Design and Simplex», *Anal. Chem.*, V. 69(4), (1997), 601-606.
213. Barnabas, I. J., Dean, J. R., Tomlinson, W. R., Owen, S. P., «Experimental design approach for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using supercritical carbon dioxide», *Anal. Chem.*, V. 67, (1995), 2064-2069.
214. Meyer, A. and Kleiböhmer, W., «Supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic

- hydrocarbons from a marine sediment and analyte collection via liquid—solid trapping», *Journal of Chromatography A*, V. 657, (1993), 327-335.
215. Bravi, M., Bubbico, R., Manna, F. and Verdone, N., «Process optimisation in sunflower oil extraction by supercritical CO<sub>2</sub>», *Chemical Engineering Science*, V. 57, (2002), 2753-2764.
216. Yepez, B., Espinosa, M., Lopez, S. and Bolaños, G., «Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction», *Fluide Phase Equilibria*, V. 194, (2002), 879-884.
217. Budich, M., Heilig, S., wesse, T., Leibkühler, V. and Brunner, G., «Countercurrent deterpenation of citrus oils with supercritical CO<sub>2</sub>», *Journal of supercritical fluids*, V. 14, (1999), 105-114.
218. Simándi, B., Oszagyán, M., Lemberkovics, É., Kéry, Á., Kaszács, J., Thyrión, F. and Mátyás, T., «Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregan oleoresin», *Food research International*, V. 31, (1998), 723-728.
219. Baysal, T. and Starmans, D. A. J., «Supercritical carbon dioxide extraction of carvone and limonene from caraway seed», *Journal of supercritical fluids*, V. 14, (1999), 225-234.
220. Ferreira, S. R. S., Nikolov, Z. L., Doraiswamy, L. K., Meireles, M. A. A. And Petenate, A. J., «Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil», *Journal of supercritical fluids*, V. 14, (1999), 235-245.
221. Scalia, S., Giuffreda, L. and Pallado, P., «Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomille flowers and its composition with conventional methods», *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis*, V. 21, (1999), 549-558.
222. Chiu, K-L, Cheng, Y-C, Chen, J-H, Chang, C. J. and Yang, P-W., «Supercritical fluids extraction of Ginkgo gonkgoles and flavonoids», *Journal of supercritical fluids*, V. 24, (2002), 77-87.
223. Benvenuti, F. and Gironi, F., «High-pressure equilibrium data in systems containing supercritical carbon dioxide, limonene, and citral», *J. Chem. Eng. Data*, V. 46, (2001), 795- 799.
224. Francisco, J., da C. and Sivik, B., «Solubility of three monoterpenes, their mixture and eucalyptus leaf oils in dense carbon dioxide», *Journal of supercritical fluids*, V. 23, (2002), 11-19.
225. Ismadji, S. And Bhatia, S.K., «Solubility of selected esters in supercritical carbon dioxide», *Journal of supercritical fluids*, V. 00, (2002), 1-11.
226. Iwai, Y., Uno, M., Nagano, H. and Arai, Y., «Measurement of solubilities of palmitic acid in supercritical carbon dioxide and entrainer effect of water by FTIR spectroscopy», *Journal of supercritical fluids*, V. 00, (2003), 1-9.

227. Jouyban, A., Chan, H-K, Foster, N. R., «Mathematical representation of solute solubility in supercritical carbon dioxide using empirical expressions», *Journal of supercritical fluids*, V. 24, (2002), 19-35.
228. Hawthorne Marja-Liisa Rickkola, S. B., Holm, K. S. Y. And Hartonen, R. H., «Comparison of hydrodistillation and supercritical fluid extraction for the determination of essential oils in aromatic plant», *Journal of Chromatography A*, V. 634, (1993), 297-308.
229. Smith, R. M. and Burford, M. D., «Optimization of supercritical fluid extraction of volatile constituents from a model plant matrix», *Journal of Chromatography A*, V. 600, (1992), 175-181.
230. McDaniel, L. H., «Investigation of liquid trapping following supercritical fluid extraction», Thèse de doctorat, Université Blacksburg, Virginia, (1999).
231. Yang, Y., Hawthorne, S. B. and Miller, D. J., «Comparison of sorbent and solvent trapping after supercritical fluid extraction of volatile petroleum hydrocarbons from soil», *Journal of Chromatography A*, V. 699, (1995), 265-276.
232. Langenfeld, J. J., Burford, M. D., Hawthorne, S. B. and Miller, D. J., «Effects of collection solvent parameters and extraction cell geometry on supercritical fluid extraction efficiencies», *Journal of Chromatography A*, V. 594, (1992), 297-307.
233. Mulcahey, L. J. and Taylor, L. T., «Supercritical fluid extraction of active components in a drug formulation», *Anal. Chem.*, V. 64, (1992), 981-984.
234. Mulcahey, L. J., Hedrick, J. L., Taylor, L. T., «Collection efficiency of various solid-phase traps for off-line supercritical fluid extraction», *Anal. Chem.*, V. 63, (1991), 2225-2232.
235. Moore, W. N. and Taylor, L. T., «Solid Phase Trapping Mechanisms Involved in the Supercritical Fluid Extraction of Digitalis Glycosides with Modified Carbon Dioxide», *Anal. Chem.*, (1995), 67, 2030-2036.
236. Wenclawiak, B. W., Krappe, M. and Otterbach, A., «In situ transesterification of the natural pyrethrins to methyl esters by heterogeneous catalysis using a supercritical fluid extraction system and detection by gas chromatography-mass spectrometry», *Journal of Chromatography A*, V. 785, (1997), 263-267.
237. Vejrosta, J.; Karasek, P.; Planeta, J., «Analyte Collection in Off-Line Supercritical Fluid Extraction», *Anal. Chem.*, V. 71, (1999), 905-909.
238. Illés, V., Daood, H. G., Pernecki, S., Szokonya, L. and Then, M., «Extraction of coriander seed oil by CO<sub>2</sub> and propane at super- and subcritical conditions», *Journal of Supercritical Fluids*, V. 17, (2000), 177-186.
239. Ayala, R. S. and Luque de Castro, M. D., «Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils», *Food Chemistry*, V. 75, (2001), 109-113.

240. Gamiz-Gracia, L. and Luque de Castro, M. D., «Subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques», *Talanta*, V. 51, (2000), 1179-1185.
241. Rovio, S., Hartonen, K., Holm, Y., Hiltunen, R. and Riekkola, M. L., «Extraction of clove using pressurized hot water», *Fragrance Journal*, V. 14, (1999), 399-404.
242. Clifford, A. A., Basile, A., Al Saidi, S. H. R. A. «A comparison of clove buds with supercritical carbon dioxide and superheated water», *Fresenius' J. Anal. Chem.*, V. 364, (1999), 635-637.
243. Fernandez Perez, V., Jimenez Carmona, M. M. and Luque de Castro, M. D., «An approach to the static-dynamic subcritical water extraction of laurel essential oil : comparison with conventional techniques», *Analyst*, (2000), 125, 481-485.
244. Ibañez, E., Kubátová, A., Señoráns, F. J., Cavero, S., Reglero, G. and Hawthorne, S. B., «Subcritical water extraction of antioxidant compounds from Rosemary», *J. Agric. Food Chem.*, V. 51, (2003), 375-382.
245. Poletto, M. and Reverchon, E., «Comparison of models for supercritical fluid extraction of seed and essential oils in relation to the mass-transfer rate», *Ind. Eng. Chem. Res.*, (1996), V. 35, 3680-3686.
246. Reis-Vasco, E. M. C., Coelho, J. A. P., Palavra, A. M. F., Marrone, C. and Reverchon, E., « Mathematical modelling and simulation of pennyroyal essential oil supercritical fluid», *Chemical Engineering Science*, V. 55, (2000), 2917-2922.
247. Gooddarnia, I. and Eikani, M. H., «Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils : Modeling and simulation», *Chemical Engineering Science*, V. 53, (1998), 1387-1395.
248. Ferreira, S. R. S. and Meireles, M. A. A., «Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil», *Journal of food Engineering*, V. 54, (2002), 263-269.
249. Cassel, E., Frizzo, C. D., Vanderlinde, R., Atti-Serafini, L., Lorenzo, D. and Dellacassa, E., «Extraction of Baccharis oil by supercritical CO<sub>2</sub>, *Ind. Eng. Chem. Res.*, V 39, (2000), 4803-4805.
250. Reverchon, E. and Marrone, C., «Supercritical extraction of clove bud essential oil: isolation and mathematical modelling», *Chemical Engineering Science*, V. 52, (1997), 3421-3428.
251. Akgün, M., Akgü, N. A. and Dinçer, S., «Extraction and modeling of lavender flower essential oil using supercritical carbon dioxide», *Ind. Eng. Chem. Res.*, (2000), 39, 473-477.
252. Reverchon, E., Kaziunas, A. and Marrone, C., «Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of hiprose seed oil: experiments and mathematical modelling», *Chemical Engineering Science*,

- V. 55, (2000), 2195-2201.
253. Marrone, C., Poletto, M., Reverchono, E. and Stassi, A., «Almond oil extraction by supercritical CO<sub>2</sub>: experiments and modelling», *Chemical Engineering Science*, (1998), 53, 3711-3718.
  254. Reverchon, E. and Marrone, C., «Modeling and simulation of the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of vegetable oils», *Journal of Supercritical fluids*, V. 19, (2001), 161-175.
  255. Sovová, H., «Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub> – I. Modeling of extraction curves», *Chemical Engineering Science*, (1994), 49, 409-414.
  256. Reverchon, E. and Poletto, M., «Mathematical modelling of supercritical CO<sub>2</sub> fractionation of flowers concretes», *Chemical Engineering Science*, V. 51, (1996), 3741-3753.
  257. Papamichail, I., Louli, V. and Magoulas, K., «Supercritical fluid extraction of celery seed oil», *Journal of Supercritical Fluids*, V. 18, (2000), 213-226.
  258. Reverchon, E., Daghero, J., Marrone, C. and Poletto, M., «Supercritical fractional extraction of fennel seed oil and essential oil: Experiements and mathematical modelling», *Ind. eng. Chem. Res.*, V. 38, (1999), 3069-3075.
  259. Reverchon, E. and Della Porta, G., «Tuberose concrete fractionation by supercritical carbon dioxide», *J. Agric. Food Chem.*, V.45, (1997), 1356-1360.
  260. Chouchi, D., Barth, D., Reverchon, E. and Della Porta, G., «Bigarade peel oil fractionation by supercritical carbon dioxide desorption», *J. Agric. Food Chem.*, V. 44, (1996), 1100-1104.
  261. del Valle, J. M., Napolitano, P. and Fuentes, N., «Estimation of relevant mass transfer parameters for the extraction of packed substrate beds using supercritical fluids», *Ind. Eng. Chem. Res.*, V. 39, (2000), 4720-4728.
  262. Filho, C. A., Silva, C. M., Quadri, M. B. and Macedo, E. A., «Infinite dilution diffusion coefficients of linalool and benzene in supercritical carbon dioxide», *J. Chem. Eng. Data*, V.47, (2002), 1351-1354.
  263. Reverchon, E., «Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products», *Journal of Supercritical Fluids*, V. 10, (1997), 1-37.
  264. Naik, S. N., Lentz, H., and Maheshawari, R. C., «Extraction of perfumes and flavours from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid-vapor equilibrium conditions», *Fluid Phase Equilibria*, V. 49, (1989), 115-126.
  265. Barton, P., Hughes, R. E. and Hussein, M. M., «Supercritical carbon dioxide extraction of peppermint and spearmint», *J. Supercrit. Fluids*, V. 5, (1992), 157-162.
  266. Cranck, J., «The mathematics of Diffusion», Oxford: Clarendon Press, (1975), 392p.

267. Goto, M., Sato, M. and Hirose, T., «Extraction of peppermint oil by supercritical carbon dioxide», *Jpn. J. Chem. Eng.*, V. 26, (1993), 401- 407.
268. Smith, R. M., « Supercritical fluids in separation science – the dreams, the reality and the future», *Journal of Chromatography A*, V. 856, (1999), 83–115.
269. Luque de Castro, M.D. and García-Ayuso, L.E., «Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future», *Analytica Chimica Acta*, V. 369, (1998), 1-10.
270. Jenkins, T. F. and Walsh, M. E., «Instability of tetryl to Soxhlet extraction, *Journal of Chromatography A*», V. 662, (1994), 178-184.
271. Sporstøl, S., Gjøs, N. and Carlberg, G. E., «Extraction efficiencies for organic compounds found in aquatic sediments», *Analytica Chimica Acta*, V.151, (1983), 231-235.
272. Dunnivant, F. M. and Elzerman, A. W., «Aqueous solubility and Henry's law constant data for PCB congeners for evaluation of quantitative structure-property relationships (QSPRs) », *Chemosphere*, V.17, (1988), 525-541.
273. Sporstøl, S., Lichtenthaler, R. G. and Orelid, F., «Extraction efficiencies for hydrocarbons from sediments polluted by oily drill cuttings», *Analytica Chimica Acta*, V. 169, (1985), 343-347.
274. Dagnac, T., Padró, A., Rubio, R. and Rauret, G., «Optimisation of the extraction of arsenic species from mussels with low power focused microwaves by applying a Doehlert design», *Analytica Chimica Acta*, V. 364, (1998), 19-30.
275. Abu-Samra, A., Morris, J.S., Koirtyohann, S.R., «Wet ashing of some biological samples in a microwave oven», *Anal. Chem.*, V. 47, (1975), 1475- 1477.
276. Ganzler, K., Salgó, A. and Valkó, K., «Microwave extraction : A novel sample preparation method for chromatography», *Journal of Chromatography A*, V. 371, (1986), 299-306.
277. Giguere, R. J., Bray, T. L., and Duncan, S. M. and Majetich, G., «Application of commercial microwave ovens to organic synthesis», *Tetrahedron Letters*, V. 27, (1986), 4945-4948.
278. Wathey, B., Tierney, J. , Lidström, P. and Westman, J., «The impact of microwave-assisted organic chemistry on drug discovery», *Drug Discovery Today*, V.7, (2002), 373-380.
279. Varma, R. S., Clay and clay-supported reagents in organic synthesis, *Tetrahedron*, V. 58, (2002), 1235-1255.
280. Perreux, P. and Loupy, A., «A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations», *Tetrahedron*, V. 57, (2001), 9199-9223.

281. Majetich, G. and Hicks, R., «Applications of microwave-accelerated organic synthesis», *Radiation Physics and Chemistry*, V. 45, (1995), 567-579.
282. Abramovitch, R. A., Abramovitch, D. A. Iyanar K. and Tamareselvy, K., «Application of microwave energy to organic synthesis: improved technology», *Tetrahedron Letters*, V. 32, (1991), 5251-5254.
283. Gedye, R., Smith, F., Westaway, K., , Ali, H., Baldisera, L., Laberge, L. and Rousell, J., «The use of microwave ovens for rapid organic synthesis» *Tetrahedron Letters*, V. 27, (1986), 279-282.
284. Lidström, P., Tierney, J., Wathey, B. and Westman, J., «Microwave assisted organic synthesis: a review», *Tetrahedron*, V. 57, (2001), 9225-9283.
285. Franke, M., Winek, C. L. and Kingston, H. M., «Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation», *Forensic Science International*, V.81, (1996), 51-59.
286. Chee, K. K., Wong, M. K. and Lee, H. K., «Microwave-assisted solvent elution technique for the extraction of organic pollutants in water», *Analytica Chimica Acta*, V. 330, (1996), 217-227.
287. Dagnac, T., Padró, A., Rubio, R. and Rauret, G., «Optimisation of the extraction of arsenic species from mussels with low power focused microwaves by applying a Doehlert design», *Analytica Chimica Acta*, V.364, (1998), 19-30.
288. Campos, E., Barahona, E., Lachica, M. and Mingorance, M. D., « A study of the analytical parameters important for the sequential extraction procedure using microwave heating for Pb, Zn and Cu in calcareous soils», *Analytica Chimica Acta*, V.369, (1998), 235-243.
289. Tomaniová ,M., HajImagelová, J., Pavelka Jr., J., Kocourek, V., Holadová, K. and Klímová, I., « Microwave-assisted solvent extraction - a new method for isolation of polynuclear aromatic hydrocarbons from plants», *Journal of Chromatography A*, V. 827, 21-29, (1998).
290. Letellier, M., Budzinski, H., Bellocq, J. and Connan, J., «Focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes from sediments and source rocks», *Organic Geochemistry*, V. 30, (1999), 1353-1365.
291. Wathey, B., Tierney, J., Lidström, P. and Westman, J., «The impact of microwave-assisted organic chemistry on drug discovery», *Drug Discovery Today*, V. 7, (2002), 373-380.
292. Kingston, H. M. and Haswell, S. J., «Standardizing the world with microwaves», *Analytical Chemistry New & Features*, V. 1, (1998), 467-471.
293. Richter, R. C. and Link, D., « Microwave Enhanced Chemistry», *Analytical Chemistry Report*, V. 1, (2001), 30-37.
294. Chyau, C. C. and Mau, J-L., «Release of volatile compounds from microwave heating of

- garlic juice with 2,4-decadienals», *Food Chemistry*, V. 64, (1999), 531-535.
295. Pan, X., Niu, G. and Liu, H., «Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves», *Chemical Engineering and Processing*, V. 00, (2002), 1-5.
296. Hao, J-y., Han, W., Huang, S-d., Xue, B-y. and Deng, X., «Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L», *Separation and Purification Technology*, V. 28, (2002), 191-196.
297. García-Ayuso, L. E., Sánchez, M., Fernández de Alba, A. and Luque de castro, M. D., «Focused Microwave-Assisted Soxhlet: An advantageous tool for sample extraction», *Anal. Chem.*, V. 70, (1998), 2426-2431.
298. García-Ayuso, L. E., Velasco, J., Dobarganes, M. C. and Luque de castro, M. D., «Accelerated Extraction of the fat Content in Cheese Using a Focused Microwave-Assisted Soxhlet Device», *J. Agric. Food Chem.*, V. 47, (1999), 2308-2315.
299. Luque- García, J. L., Velasco, J., Dobarganes, M. C. and Luque de castro, M. D., «Fast quality monitoring of oil from prefried and fried foods by focused microwave-assisted soxhlet extraction», *Food Chemistry*, V. 76, (2002), 241-248.
300. Shu, Y. Y., Ko, M. Y. and Chang, Y. S., «Microwave-assisted extraction of ginsenosides from ginseng root», *Microchemical Journal*, V. 74, (2003), 131-139.
301. García-Ayuso, L. E. and Luque de castro, M. D., «Employing focused microwaves to counteract conventional soxhlet extraction drawbacks», *trends in analytical chemistry*, V. 20, (2001), 28-34.
302. Ericsson, M. and Colmsjö, A., «Dynamic microwave-assisted extraction coupled on-line with solid-phase extraction: determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment and soil», *Journal of Chromatography A*, V. 964, (2002), 11-20.
303. Criado, M. R., Pereiro, I. R. and Torrijos, R. C., « Optimisation of a microwave-assisted extraction method for the analysis of polychlorinated biphenyls in ash samples», *Journal of Chromatography A*, V. 985, (2003), 137-145.
304. Alfaro, M. J., Bélanger, J. M. R., Padilla, F. C. and Jocelyn Paré, J. R., «Influence of solvent, matrix dielectric properties, and applied power on the liquid-phase microwave-assisted processes (MAP) extraction of ginger (*Zingiber officinale*) », *Food Research International*, V. 36, (2003), 499-504.
305. Dagnac, T., Padró, A., Rubio, R. and Rauret, G., «Optimisation of the extraction of arsenic species from mussels with low power focused microwaves by applying a Doehlert design», *Analytica Chimica Acta*, V. 364, (1998), 19-30.
306. Letellier, M., Budzinski, H., Charrier, L. and Capes, S., «Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediment», *Fresenius J. Anal. Chem.*, V. 364, (1999), 228-237.

307. El Hattab, M. et al., «Isolation of volatile compounds from the brown alga *Dictyopteris membranacea* by focused microwave-assisted hydrodistillation», *J. Essent. Oil Res.*, V. 14, (2002), 422-424.
308. Daoudi, M., «Contribution à l'étude chimique des algues brunes des genres *Bifurcaria* et *bifurcariopsis* : Isolement et détermination structurale de nouveaux métabolites secondaires», Thèse de Doctorat d'Etat, Université Chouaib Doukkali El Jadida (Maroc), (1994), 269p.
309. Englert, G., Bjørnland, T. and Liaaen-Jensen, S., «1D and 2D NMR study of some allenic carotenoids of the fucoxanthine series», *Magnetic Resonance in Chemistry*, V. 28, (1990), 519-528.
310. Blackman, A. J. and Matthews, D. J., «Halogenated phloroglucinols from *Rhabdonia verticillata*», *Phytochemistry*, V. 21, (1982), 2141-2142.
311. SDBS database, (2003) (disponible sur : [http:// www.aist.go.jp/](http://www.aist.go.jp/)).
312. Wenkert, E., Buckwalter, B. L., Burfitt, I. R., Gašić, M. J., Gottlieb, H. E., Hagaman, E. W., Shell, F. M. and Wovkulich, P. M., «in *Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy*», New York : Ed. Levy, G. C. Wiley, V.11, (1975), 81p.
313. Sandri, J. and Viala, J., «Syntheses of all-(Z)-(8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid and all-(Z)-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid from (Z)-1,1,6,6-Tetraisopropoxy-2-hexene», *J. Org. Chem.*, V. 60, (1995), 6627-6630.
314. Viala, J. and Sandri, J., «Total stereospecific synthesis of all cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (EPA) », *Tetrahedron Letters*, V. 33 (34), (1992), 4897-4900.
315. Corey, E. J. and Wright, S. W., «Convenient method for the recovery of eicosapentaenoic acid from cod liver oil», *J. Org. Chem.*, V. 53, (1988), 5980-5981.
316. Gill, L., Valivety, R., «Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities, and application», *Trends Biotechnol.*, V. 15, (1997), 401-409.
317. Napier, J. A., «Plumbing the depths of PUFA biosynthesis: a novel polyketide synthase-like pathway from marine organisms», *Trends Plant Sci.*, V. 7, (2002), 51-54.
318. Napier, J. A. and Michaelson, L. V., «Genomic and functional characterization of polyunsaturated fatty acid biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*», *Lipids*, V. 36, (2001), 761-766.
319. Song, J. and Bangerth, F., «Fatty acids as precursors for aroma volatile biosynthesis in pre-climacteric and climacteric apple fruit», *Postharvest Biology and Technology*, (2003), V. 30, 113-121.
320. Svatoš, A., Kalinová, B. and Boland, W., «Stereochemistry of lepidopteran sex pheromone biosynthesis : a comparison of fatty acid-CoA  $\Delta$ 11-(Z)-desaturases in *Bombyx mori* and *Manduca sexta* female moths», *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, V. 29, (1999), 225-232.

321. Ohlrogge, J. B. and Jaworski, J. G., «Regulation of fatty acid and synthesis», Annual Review of Plant Physiology and Plant Biology, V. 48, (1997), 109-136.
322. Sayanova, O. V. and Napier, J. A., «Eicosapentaenoic acid : biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants», Phytochemistry, V. 65, (2004), 147-158.
323. Meyer, A., Cirpus, P., Ott, C., Zahringer, U. and Heinz, E., «Biosynthesis of docosahexaenoic acid in *Euglena gracilis* : biochemical and molecular evidence for the involvement of a  $\Delta^4$ -fatty acyl group desaturase», Biochemistry, V. 42, (2003), 9779-9788.
324. Girke, T., Schmidt, H., Zahringer, U., Reski, R., Heinz, E., «Identification of a novel  $\Delta^6$  acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*», Plant J., V. 15, (1998), 39-48.
325. Qi, B., Beaudoin, F., Fraser, T. Stobart, A. K., Napier, J. A., «Identification of a cDNA encoding a novel C18- $\Delta^9$  polyunsaturated fatty acid-specific elongation activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, *Isochrysis galbana*», FEBS Letters, V. 510, (2002), 159-165.
326. Whiting, D. A., «Natural phenolic compounds 1900-(2000): a bird's eye view of a century's chemistry», Nat. Prod. Rep., V. 18, (2001), 583-606.
327. Adam, P., Arigoni, D., Bacher, A. and Einsenreich, W., Biosynthesis of hyperforin in *Hypericum perforatum*, J. Med. Chem., V. 45, (2002), 4786-4793.
328. Zuurbier, K. Fung, S.-Y., Scheffer, J.J.C. and Verpoorte, R., «Formation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*», Phytochemistry, V. 38, (1995), 77-82.
329. Zuurbier, K. Fung, S.-Y., Scheffer, J.J.C. and Verpoorte, R., «In-vitro prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*», Phytochemistry, V. 49, (1998), 2315-2322.
330. Moore, B. S., «Biosynthesis of marine natural products: microorganisms and macroalgae», Nat. Prod. Rep., V. 16, (1999), 653-674.
331. Hofmann, M. and Eichemberger, W., «Biosynthesis of diacylglycerol-N,N,n-trimethylhormosirene in *Rhodospirillum rubrum* and evidence for lipid-linked N-methylation», J. Bacteriol., V. 178, (1996), 6140-6144.
332. Coates, R. M., Ley, D. A. and Cavender, P. L., «Synthesis and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of all-trans-geranylgeraniol and its nor analogues», Journal of Organic Chemistry, V. 43, (1978), 4915-4922.
333. Couperus, P. A., Clague, A. D. H. and Dongen, J. P. C. M., « $^{13}\text{C}$  chemical shifts of some model olefins», Organic Magnetic Resonance, V. 8, (1976), 426-431.
334. Valls, R. and Piovetto, L., «The chemistry of the Cystoseiraceae (Fucales : Pheophyceae): Chemotaxonomic relationships», Biochemical Systematics and Ecology, V. 23, (1995),

723-745.

335. Reverchon, E., Della Porta, G. and Lamberti, G., «Modelling of orange flower concrete fractionation by supercritical CO<sub>2</sub>», *Journal of Supercritical Fluids*, V.14, (1999), 115-121.
336. Reverchon, E. and Poletto, M., «Mathematical modelling of supercritical CO<sub>2</sub> fractionation of flower concretes», *Chemical Engineering Science*, V. 51, (1996), 3741-3753.
337. Lack, E. A. «Kriterion zur Auslegung von Anlagen für die Hochdruckextraktion von Naturstoffen», Ph.D. thesis, TU Graz (1985).
338. Cygnarowicz-Provost, M., O'Brien, D. J., Maxwell, R. J. and Hampson, J. W., «Supercritical – fluid extraction of fungal lipids using mixed solvents: Experiments and modelling», *Journal of Supercritical Fluids*, V. 5, (1992), 24-30.
339. Reverchon, E. and Sesti Osseo, L., «Modelling the supercritical extraction of basil oil», *Proceedings of the third symposium on supercritical fluids*, V. 2, (1994), 189-196.
340. Perrut, M., Clavier, J. Y., Poletto, M. and Reverchon, E., «Mathematical modelling of sunflower seed extraction by supercritical CO<sub>2</sub>», *Ind. Eng. Chem. Res.*, V. 36, (1997), 430-435.
341. Sovová, H., Kučera, J. and Jež, J., «Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub> – II. Extraction of grape oil», *Chemical Engineering Science*, V. 49, (1994), 415-420.
342. Sovová, H., Jež, J., Bártlová, M. and St'astová, J., «Supercritical carbon dioxide extraction of black pepper», *Journal of supercritical Fluids*, V.8 (1995), 295-301.
343. Št'astová, J., Jež, J., Bártlová, M. and St'astová, J. Sovová, H., «Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub>- III. Extraction from sea buckthorn», *Chemical Engineering Science*, V. 51, (1996), 4347-4352.
344. Sovová, H., Komers, R., Kučera, J. and Jež, J., « Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil», *Chemical Engineering Science*, V. 49, (1994), 2499-2505.
345. Cygnarowicz-Provost, M., O'Brien, D. J., Boswell, R. T. and Kurantz, M. J., «Supercritical-fluid extraction of fungal lipids : Effect of cosolvent on mass transfer rates and process design and economics», *The Journal of Supercritical Fluids*, V. 8, (1995), 51-59.
346. Onorati, A., Perotti, M. and Rebay, S., « Modelling one dimensional unsteady flows in ducts: Symmetric finite difference in schemes versus galerkin discontinuous finite element methods», *Int. J. Mech. Sci.*, V. 39, (1997), 1213-1236.
347. Joulain, D. and König, W. A., «The Atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons», Hamburg : Ed. E-B-Verlag, (1998), 892p.

348. De Rosa, S., De Giulio, A., Iodice, C. and Zavodink, N., «Sesquiterpene from the brown alga *Taonia atomaria*», *Phytochemistry*, V. 37, (1994), 1327-1330.
349. Hieda, T., Tazaki, M., Morishita, Y., Aoki, T. and Nagahama, S., «Sesquiterpene alcohols from *Chamaecyparis obtuse* leaf oil», *Phytochemistry*, V. 42, (1996), 159-162.
350. Schröder, J., Matthes, B. and Seifert, K., «Total synthesis of the marine sesquiterpene quinone (-)-cyclozonarone», *Tetrahedron Letters*, V.42, (2001), 8151-8152.
351. Rouessac, F., Rouessac, A., «Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes», Paris, Milan, Barcelone : Masson 3<sup>e</sup> édition, (1997), 372p.
352. Reverchon, E. and Della Porta, G., «Rose concrete fractionation by supercritical CO<sub>2</sub>», *The Journal of Supercritical Fluids*, V. 9, (1996), 199-204.
353. He, C. -H. and Yu, Y. -S., «New equation for infinite-dilution diffusion coefficients in supercritical and high-temperature liquid solvents», *Ind. Eng. Chem. Res.*, V. 37, (1998), 3793-3798.
354. Carlos, M., S. and Macedo, E., A., «Diffusion coefficients of ethers in supercritical carbon dioxide», *Ind. Eng. Chem. Res.*, V. 37, (1998), 1490-1498.
355. José da Cruz, F. and Björn, S., «Solubility of three monoterpenes, their mixtures and eucalyptus leaf oils in dense carbon dioxide», *Journal of supercritical fluids*, V. 23, (2002), 11-19.
356. Sovová, H., Roumiana, P., S. and Anatolii, A., G., «Essential oils from seeds: solubility of limonene in supercritical CO<sub>2</sub> and how it is affected by fatty oil», *Journal of supercritical fluids*, V. 20, (2001), 113-129.
357. Yoshio, I., Machiko, U., Hirota, N. and Yasuhiko, A., « Measurement of solubilities of palmitic acid in supercritical carbon dioxide and entrainer effect of water by FTIR spectroscopy», *Journal of supercritical fluids*, V. 28, (2004), 193-200.
358. Ismajli, S and Bhatia, S. K., «Solubility of selected esters in supercritical carbon dioxide», *Journal of supercritical fluids*, V. 00, (2002), 1-11.
359. Furuya, T. and Aryn, S., T., «The solubility of high molecular weight n-alkanes in supercritical carbon dioxide at pressures up to 50 MPa», *Journal of supercritical fluids*, V. 29, (2004), 231-236.
360. Hidenori, H., Yoshio, I. and Yasuhiko, A., «Solubilities and diffusion coefficients of high boiling compounds in supercritical carbon dioxide», *Chemical Engineering Science*, V. 56, (2001), 3027-3044.
361. Chyau, C. C. and Mau, J-L., «Release of volatile compounds from microwave heating of garlic juice with 2,4-decadienals», *Food Chemistry*, V. 64, (1999), 531-535.
362. García-Ayuso, L. E. and Luque de castro, M. D., «Employing focused microwaves to counteract conventional soxhlet extraction drawbacks», *trends in analytical chemistry*,

- V. 20, (2001), 28-34.
363. Perrut, M., «Supercritical Fluid Applications: Industrial Developments and Economic Issues», *Ind. Eng. Chem. Res.* V.39, (2000), 4531-4535.
364. Leng, R. B., «From Bench to plant : scale up speciality chemical processes directly», *Reactions and separations*, (Nov. 2004), 37-44.
365. Alonso, E., Cantero, F.J., Garcia, J., Cocero, M.J., «Scale up for a process of supercritical with adsorption of solute onto active carbon. Application to soil remediation», *J. of Supercritical Fluids*, V.24, (2002), 123-135.
366. fullana, M., Trabelsi, F. and Recasens, F., «Use of neural net computing for statistical and kinetic modelling and simulation of supercritical fluid extractors», *Chemical Engineering Science*, V.55, (2000), 79-95.
367. del Valle, J.M and Aguilera, J.M., «An improved equation for prediction the solubility of vegetable oils in supercritical CO<sub>2</sub>», *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 27, 1551-1553, 1988.
368. Puiggené, J., Larrayoz, M. A. and Recasens, F., «Free liquid-to-supercritical fluid mass transfer in packed beds», *Chem. Eng. Sci.*, 52, 195-212.