

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences

Département de Chimie

THESE DE DOCTORAT

En Chimie

CONTRIBUTION A L'ETUDE CHIMIQUE D'ALGUES MARINES
MEDITERRANEENNES : ANALYSE QUANTITATIVE DES STEROLS
DE L'EXTRAIT LIPIDIQUE PAR SPECTROMETRIE INFRAROUGE A
TRANSFORMEE DE FOURIER

Par

BOUZIDI NAIMA

Devant le jury composé de :

Mr K. Bal	Professeur à l'Université de Blida	Président
Mme Z. Houmani	Professeur à l'Université de Blida	Examineur
Mr S. Boudah	Professeur à l'USTHB	Examineur
Mme H. Seridi	Maître de conférences (A) à l'USTHB	Examineur
Mr L. Piovetti	Professeur à l'Université du Sud Toulon-Var (France)	Co-Promoteur
Mme Y. Daghbouche	Maître de conférences (A) à l'Université de Blida	Promoteur

Blida, Décembre 2009

RESUME

Cette thèse est consacrée au dosage des stérols dans des algues marines par spectrométrie IRTF et à l'étude chimique de la fraction phénolique de l'algue brune *Zonaria tournefortii*. La première partie comporte une synthèse des données bibliographiques sur les caractéristiques biologiques des espèces étudiées, les méthodes d'analyse utilisées et la composition stérolique et phénolique des algues marines. La seconde partie est consacrée au dosage quantitatif des stérols totaux, respectivement, dans l'algue rouge méditerranéenne *Asparagopsis armata* et dans les algues brunes récoltées sur les côtes algériennes (*Cystoseira sedoïdes*, *Dictyota dichotoma*, *Cladostephus spongiosus*) et sur celles de l'océan atlantique (*Bifurcaria bifurcata*) par spectrométrie IRTF, après la réaction de saponification et la préconcentration dans des cartouches de type DSC 18. Le taux de stérols (globalement déterminé en tant que cholestérol) obtenu dans l'extrait de l'algue rouge par spectrométrie IRTF est de $3,37 \pm 0,01$ %. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus par CLHP ($3,30 \pm 0,20$ %). Les études menées, d'autre part, sur les algues brunes montrent que les stérols peuvent être déterminés (globalement en tant que fucostérol) par spectroscopie IRTF sans l'utilisation de techniques chromatographiques. En utilisant la méthode développée, les valeurs obtenues de l'analyse des quatre espèces d'algues étudiées montrent que le contenu en stérols diffère d'une algue à une autre ($1,55 \pm 0,19$ à $4,53 \pm 0,30$ %). La dernière partie, réservée à l'étude chimique de la fraction phénolique des extraits lipidiques de l'algue brune *Zonaria tournefortii*, a permis de confirmer l'existence des dérivés du phloroglucinol, en particulier les acylphloroglucinols déjà décrits dans cette espèce. L'apport de ce travail concerne l'isolement, pour la première fois, de l'acide eicosapentaénoïque dans l'espèce récoltée sur les côtes algériennes. Nous avons effectué la caractérisation structurale complète de cet acide par RMN mono- et bidimensionnelle car elle n'a pas encore été décrite dans la littérature. De plus, nous avons proposé une voie de biosynthèse des acylphloroglucinols métabolisés par l'algue, à partir de la condensation du malonyl-CoA et de l'acyl-CoA de l'acide eicosapentaénoïque qui peut être considéré comme le précurseur biogénétique de ces composés.

ABSTRACT

This thesis covers the determination of sterols in marine algae by Fourier transform infrared spectrometry (FTIR) and the chemical study of the phenolic fraction of the brown alga *Zonaria tourneforti*. The first part is a bibliographic study on the biology of the studied species and methods of analysis used. Also, this part takes on the chemical composition of sterols and phenolic compounds of algae species. The second part concerns the determination of the total amount of sterols after treatment of the crude extract. The sterols are already isolated, preconcentrated on DSC 18 solid phase cartridges (SPE), and analyzed by FTIR spectrometry. In one hand, they are determined globally as cholesterol in the lipidic extract of the red alga *Asparagopsis armata*. To confirm the accuracy of the FTIR procedure, HPLC was applied to the determination of sterols in red alga. The concentration of total sterols obtained by HPLC and FTIR were $3,30 \pm 0,20$ and $3,37 \pm 0,01\%$, respectively. These are in excellent agreement. In the other hand, the sterols are determined globally as fucosterol in the lipidic extract of the Mediterranean brown algae *Cystoseira sedoïdes*, *Dictyota dichotoma*, *Cladostephus spongiosus* and in the Atlantic one *Bifurcaria Bifurcata* by FTIR spectroscopy. In the four samples of algae extracts analyzed, the concentration varied between $1,55 \pm 0,19$ and $4,53 \pm 0,30$ wt. %. The last part is devoted to the chemical study of the phenolic fraction of the brown alga *Zonaria tournefortii*, four phloroglucinol-derived phenolic metabolites previously described have been isolated (acylphloroglucinols). The eicosapentaenoic acid is isolated, for the first time, from this species. We reported the whole assignation of proton of carbon signals of this acid by 1D and 2D NMR. Also, we suggest a plausible biosynthetic pathway for the acylphloroglucinol –derivatives isolated from the alga. This hypothesis begin with the condensation of malonyl-CoA and acyl-CoA of eicosapentaenoic acid (a possible precursor of these compounds).

ملخص:

تشمل هذه المذكرة على دراسة معيارية وكيميائية لطحالب بحرية، الجزء الأول يتضمن حوصلة معطيات المراجع فيما يخص الخواص البيولوجية للطحالب المدروسة إلى جانب عرض تقنيات المعايرة المستعملة، كما تحتوي على دراسة مفصلة للتركيب السثيرولي والفينولي لمختلف الطحالب.

الجزء الثاني يشمل على معايرة كميّة السثيرولات الموجودة في مستخلص الطحلب الأحمر أسبراقوبسيس أرماتا وذلك باستعمال المطيافية ما فوق الحمراء بتحول فورمي بعد إخضاع المستخلص لمعالجة أولية تتمثل في مفاعلة تصبّن متبوعة بتركيز في خراطيش من نوع DSC-18، نسبة السثيرولات المتحصل عليها في هذه التقنية هي $3,37 \pm 0,01$ %، أما نسبة السثيرولات المتحصل عليها بواسطة الك[ماتوغرافيا السائلة تحت ضغط قوي هي $3,30 \pm 0,20$ %، أما فيما يخص الطحالب البنية للبحر المتوسط سيستوزيرا سيدوداس، دكتيوتا ديكتوما وكلاستييفيس سبونجيز، وطحالب المحيط الأطلسي بفركاريا بفركاتا فنسبة السثيرولات تتراوح ما بين $1,55 \pm 0,19$ % و $4,53 \pm 0,30$ %، وذلك باستعمال المطيافية ما فوق الحمراء بتحول فورمي.

الجزء الأخير خصّص للدراسة الكيميائية للطحلب زوناريا تورنفورتي حيث تم عزل أربع مشتقات للفينول غليسيرول تمّ الحديث عنها في المراجع إلى جانب عزل لأول مرة لحمض خماسي أيكوزا في هذا الطحلب وبكميات كبيرة مما أدى إلى استنتاج مسار محتمل لببوسنتاز مشتقات الفروروغليسنول.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le président ainsi que Mesdames et Messieurs les membres du jury :

Monsieur K. Bal, Professeur à l'Université Saad Dahlab de Blida,

Madame Z. HOUMANI Professeur à l'Université Saad Dahlab de Blida,

Monsieur S. BOUDAH Professeur à l'Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene Alger,

Madame H. Seridi Maître de conférences (A) à l'Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene Alger,

Madame Y. DAGHBOUCHE Maître de Conférences à l'Université Saad Dahlab de Blida,

Monsieur L. Piovetti Professeur à l'Université du Sud Toulon-Var (France),
qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à Mme Y. Daghbouche pour la patience qu'elle a eu avec moi au cours de ce long travail et pour le temps qu'elle m'a consacré, le suivi et les conseils qu'elle m'a sans cesse prodigués et la confiance accordée. J'aimerais remercier de la même manière Mr L. Piovetti pour son aide et ses conseils judicieux, merci profondément pour le temps consacré. Je salue aussi la souplesse et l'ouverture d'esprit de mes directeurs de thèse qui ont su me laisser une large marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche.

J'adresse un remerciement tout particulier à Mr EL Hattab pour son implication constante dans la réalisation de ce travail. Je lui sais gré de m'avoir confié ses algues et de m'avoir fait bénéficier de son expérience dans le domaine des produits naturels marins. Qu'il soit assuré de ma plus profonde reconnaissance.

Je tiens également à remercier Melle Z. Aliche pour son aide, sa confiance et son enthousiasme.

Je remercie vivement tout le personnel de la faculté des sciences pour leur amitié et l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée tout au long de ce travail

Je remercie également tout le personnel du département de chimie industrielle et tout particulièrement le personnel du laboratoire d'analyse.

Je veux sincèrement remercier les membres du laboratoire MAPIEM de l'université du Sud Toulon - Var pour l'atmosphère plus qu'agréable qu'ils contribuent à maintenir au sein de cette communauté. J'en profite pour remercier particulièrement Mr et Mme Culioli pour leur sympathie, leur amitié et l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée.

J'exprime toute ma reconnaissance à Marthe et Jean Serge pour leur amitié, leur soutien et leurs encouragements durant mon séjour en France

Je clos enfin ces remerciements en dédiant cette thèse à ma famille tout particulièrement à ma mère et à ceux que j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés et qui m'ont soutenue tout au long de ces années de travail.

TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTES DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION 15

Chapitre 1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 18

1.1 Caractéristiques biologiques et position systématique des algues étudiées 18

1.1.1 Généralités 18

1.1.2 Classification des algues 19

1.1.3 Position systématique, description, biologie, écologie des espèces étudiées et répartition phytogéographique 21

1.2 Techniques d'analyse 28

1.2.1 Extraction en phase solide 28

1.2.2 Spectroscopie Infrarouge 31

1.2.3 Méthodes chromatographiques 36

1.2.4 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) 41

1.3 Composition stérolique et phénolique des algues marines 46

1.3.1 Composition stérolique des algues marines 46

1.3.2 Composition phénolique des algues marines 61

DETERMINATION DES STEROLS TOTAUX DANS L'ALGUE

Chapitre 2 ROUGE *ASPARAGOPSIS ARMATA* PAR SPECTROMÉTRIE 70

IRTF : ÉTUDE COMPARATIVE PAR CLHP

2.1 Introduction 70

2.2 Partie expérimentale 71

2.3	Procédure générale	74
2.3.1	Traitement des échantillons	74
2.3.2	Détermination des stérols par spectrométrie IRTF	76
2.3.3	Extraction en phase solide et détermination des stérols par CLHP	76
2.4	Résultats et discussion	77
2.4.1	Spectres IRTF du cholestérol et de l'acétate de cholesteryle	77
2.4.2	Choix du solvant adéquat pour la détermination du cholestérol par spectrométrie IRTF	80
2.4.3	Sélection des conditions d'extraction en phase solide du cholestérol et de l'acétate de cholesteryle	81
2.4.4.	Détermination du taux de cholestérol par spectrométrie IRTF en utilisant la préconcentration par l'EPS	85
2.4.5.	Détermination des stérols totaux dans l'extrait de l'algue rouge par spectrométrie IRTF	86
2.4.6	Analyse des stérols totaux dans l'algue rouge <i>Asparagopsis armata</i> par CLHP	86
2.4.7	Comparaison du taux de stérols obtenu dans l'algue rouge par CLHP et par spectrométrie IRTF	92
2.5	Conclusion	93
	DETERMINATION DES STEROLS TOTAUX DANS LES	94
Chapitre 3	ALGUES BRUNES PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER	
3.1	Introduction	94
3.2	Partie expérimentale	96
3.2.1	Appareillage et réactifs	96
3.3	Procédure générale	96
3.3.1	Préparation des échantillons	96
3.3.2	Détermination des stérols par spectrométrie IRTF	97
3.4	Résultats et discussion	98
3. 4.1	Détermination du cholestérol et du fucostérol dans le CH ₂ Cl ₂ par spectroscopie IRTF	98
3.4.2.	Extraction en phase solide et détermination des stérols par spectroscopie IRTF	103

3.4.3.	Détermination des stérols totaux dans les extraits des échantillons réels des algues brunes par spectroscopie IRTF	105
3.5	Conclusion	106
Chapitre 4	ETUDE DE LA FRACTION PHENOLIQUE DE L'ALGUE BRUNE <i>ZONARIA TOURNEFORTII</i> (J. V. LAMOUREUX) MONTAGNE	107
4.1	Introduction	107
4.2	Partie expérimentale	108
4.2.1.	Appareillage et réactifs	108
4.2.2.	Procédure générale	109
4.3.	Etude chimique de la « fraction phénolique »	111
4.3.1.	Séparation par CLHP	111
4.3.2.	Etude structurale des produits isolés	112
4.4	Etude biosynthétique des acylphloroglucinols	123
4.4.1.	Biosynthèse des acides gras insaturés	124
4.4.2	Biosynthèse du malonyl-CoA	126
4.4.3	Hypothèse de biosynthèse des acylphloroglucinols et dérivés isolés de <i>Z. tournefortii</i>	127
4.5	Conclusion	129
	CONCLUSION GENERALE	130
	REFERENCES	134
	Appendice A	150
	Appendice B	151
	Appendice C	155
	Travaux réalisés	159
	Perspectives	161

LISTES DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX

LISTES DES FIGURES

Figure 1.1	Position des algues vertes, rouges et brunes parmi les lignées phylogénétiques	19
Figure 1.2	<i>Asparagopsis armata</i>	22
Figure 1.3	<i>Bifurcaria bifurcata</i>	23
Figure 1.4	<i>Cystoseira sedoïdes</i>	24
Figure 1.5	<i>Dictyota dichotoma</i>	25
Figure 1.6	<i>Cladostephus spongiosus</i>	26
Figure 1.7	<i>Zonaria tournefortii</i>	27
Figure 1.8	Types de colonnes d'extraction	29
Figure 1.9	a : Cartouche d'EPS b : Principe de l'EPS	29
Figure 1.10	Principe de l'interféromètre de Michelson (1887)	33
Figure 1.11	Représentation d'une plaque CCM	40
Figure 1.12	Comportement d'un noyau dans un champ magnétique extérieur	41
Figure 1.13	Éléments essentiels d'un spectromètre RMN	42
Figure 1.14	Squelette de base d'un stéroïde avec le système de numérotation des atomes de carbone appliqué pour la famille des cholestanes	46
Figure 1.15	Principaux stérols en C ₂₇ entrant dans la composition chimique des algues marines	47
Figure 1.16	Principaux stérols en C ₂₈ entrant dans la composition chimique des algues marines	48

Figure 1.17	Principaux stérols en C ₂₉ entrant dans la composition chimiques des algues marines	49
Figure 1.18	Stérols particuliers entrant dans la composition chimique des algues rouges	50
Figure 1.19	Principaux stérols en C ₃₀ entrant dans la composition chimique des algues marines	54
Figure 1.20	Stérols à chaîne linéaire courte entrant dans la composition chimique des algues vertes	57
Figure 1.21	Stérols glucosiques entrant dans la composition chimique des algues Marines	59
Figure 1.22	Stérols entrant dans la composition chimique d'algues marines toxiques	60
Figure 1.23	Exemples de fucols	63
Figure 1.24	Exemples de phloréthols	64
Figure 1.25	Exemples de fucophlorethols	65
Figure 1.26	Exemples de fuhalols	65
Figure 1.27	Exemples d'Eckols	66
Figure 1.28	Dérivés du phloroglucinol à partir des genres <i>Zonaria</i> et <i>Lobophora</i>	68
Figure 1.29	Dérivés du phloroglucinol à partir de <i>Zonaria tournefortii</i>	69
Figure 2.1	Montage de flux utilisé pour la détermination des stérols dans les algues	72
Figure 2.2	Montage utilisé pour la prise des échantillons et préconcentration de stérols	73
Figure 2.3	Préparation de l'extrait à partir de la matière végétale	75
Figure 2.4	Spectres IRTF de : cholestérol 10 mg ml ⁻¹ (a), d'extrait de l'algue rouge 100 mg ml ⁻¹ (b) et d'acétate de cholestéryle 10 mg ml ⁻¹ (c) préparés directement dans CH ₂ Cl ₂ sans aucun traitement préalable	78
Figure 2.5	Spectres IRTF de l'acétate de cholestéryle préparé directement dans CH ₂ Cl ₂ (a) et après saponification et extraction à travers des cartouches de type DSC 18 (b)	79

Figure 2.6	Spectres d'absorbance du mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéryle dans la proportion 9:1 préparé dans CH ₂ Cl ₂ stabilisé avec l'amylène, pour un domaine de concentration compris entre 8-25 mg.ml ⁻¹	81
Figure 2.7	Spectre IRTF de l'extrait de l' <i>Asparagopsis armata</i> dans le CH ₂ Cl ₂ sans traitement Préalable (a) et après traitement et EPS à travers des cartouches de type DSC18 et élution avec CH ₂ Cl ₂ (b)	82
Figure 2.8	Purification des stérols par CCM 1 : étalon de cholestérol, 2 : extrait de <i>A. armata</i>	87
Figure 2.9	Chromatogramme de l'extrait de l' <i>Asparagopsis armata</i>	88
Figure 2.10	Chromatogrammes d'une série de quatre étalons contenant le cholestérol et l'étalon interne (la 4-métoxy acétophénone) préparés dans l'acétate d'éthyle	90
Figure 2.11	Droite d'étalonnage des solutions étalons de cholestérol de 2.66 à 6 mg.ml ⁻¹ obtenue par CLHP directement dans l'acétate d'éthyle	91
Figure 2.12	Chromatogrammes des extraits de l'algue rouge <i>A. armata</i> sans aucun traitement (a) et après Sap. et EPS DSC18 (b), 1 : pic de l'étalon interne, 2 : pic des stérols	92
Figure 3.1	Spectres IRTF de 10 mg ml ⁻¹ de cholestérol (----) et de 10 mg ml ⁻¹ de fucostérol (—) préparés dans le CH ₂ Cl ₂ . Figure insérée : détail des bandes autour de la région à 1049 cm ⁻¹	98
Figure 3.2	Droite d'étalonnage du fucostérol purifié dans le CH ₂ Cl ₂ stabilisé avec β-amylène par spectrométrie IRTF en considérant la bande 1049 cm ⁻¹	99
Figure 3.3	Spectres d'absorbance de fucostérol préparé dans CH ₂ Cl ₂ stabilisé avec l'amylène, pour un domaine de concentration compris entre 0.7-10 mg ml ⁻¹	101
Figure 3.4	Spectres IRTF d'environ 100 mg d'extrait de chaque échantillon d'algue saponifié et préconcentré à travers des cartouches de phase solide de type DSC-18 élué avec le CH ₂ Cl ₂ stabilisé avec le β- amylène	105
Figure 4.1	Extraction de <i>Zonaria tournefortii</i> et traitement de l'extrait brut	111
Figure 4.2	Chromatogramme CLHP de la fraction phénolique	112
Figure 4.3	Produits isolés à partir de la fraction phénolique	113

Figure 4.4	Spectre HMQC à 400 MHz dans CDCl ₃ du produit <u>2</u>	118
Figure 4.5	Spectre HMBC à 400 MHz dans CDCl ₃ du produit <u>2</u>	119
Figure 4.6.	Spectre COSY ¹ H- ¹ H à 400MHz dans CDCl ₃ du produit <u>5</u>	120
Figure 4.7	Spectre HMQC à 400 MHz dans CDCl ₃ du produit <u>5</u>	121
Figure 4.8	Spectre HMBC à 400 MHz dans CDCl ₃ du produit <u>5</u>	122
Figure 4.9	Spectre de masse du produit <u>5</u> (basse résolution par impact électronique)	123
Figure 4.10	a : Passage de l'acide palmitique à l'acide stéarique b : Voies de biosynthèse des acides gras insaturés	125
Figure 4.11	Biosynthèse du malonyl-CoA et des acides gras saturés	126
Figure 4.12	Hypothèse de biosynthèse des produits <u>1</u> – <u>4</u>	128

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Répartition du domaine spectral IR	32
Tableau 1.2	Principaux isotopes exploités en RMN	41
Tableau 1.3	Signe des pics du carbone suivant la séquence DEPT réalisée	45
Tableau 2.1	Caractéristiques analytiques du cholestérol obtenues directement dans différents solvants	80
Tableau 2.2	Comparaison des droites de calibration du cholestérol obtenu directement dans CH ₂ Cl ₂ et du mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéryle obtenu après saponification et EPS à travers un support solide BondElut C18	83
Tableau 2.3	Analyse des échantillons synthétiques du cholestérol, et du mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéryle, dans une proportion 9:1 (p/p) obtenus après sap et EPS en utilisant la phase solide de type BondElut C18 avec différents solvants d'élution	84
Tableau 2.4	Analyse des échantillons synthétiques de cholestérol et du mélange de cholestérol et de cholestéryle acétate obtenus après sap. et EPS en utilisant différents type de phase d'extraction et le CH ₂ Cl ₂ / amylène comme solvant d'élution	85
Tableau 2.5	Comparaison des droites de calibration du cholestérol obtenu directement dans CH ₂ Cl ₂ et du mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéryle après sap et EPS à travers la phase solide de type DSC18	86
Tableau 2.6	Temps de rétention de l'étalon interne et du cholestérol	89
Tableau 2.7	Choix de la composition de la phase mobile	90
Tableau 3.1	Caractéristiques analytiques de fucostérol purifié et de fucostérol étalon déterminées directement dans CH ₂ Cl ₂ stabilisé avec β-amylène par spectrométrie IRTF en considérant la bande à 1049 cm ⁻¹	100
Tableau 3.2	Caractéristiques analytiques de cholestérol et de fucostérol déterminées directement dans CH ₂ Cl ₂ stabilisé avec le β-amylène par spectrométrie IRTF en considérant la bande à 1049cm ⁻¹	101
Tableau 3.3	Evaluation du facteur de correction obtenu pour la détermination du fucostérol en utilisant les droites d'étalonnage de cholestérol	102

Tableau 3.4	Rendement d'extraction de stérol libre et de stérol lié pour différentes proportions de cholestérol et d'acétate de cholestéryle	103
Tableau 3.5	Caractéristiques analytiques de cholestérol déterminées directement dans CH ₂ Cl ₂ stabilisé avec β-amylène et des étalons de solutions mélanges après sap. et EPS par spectrométrie IRTF	104
Tableau 3.6	Concentration des stérols totaux dans différentes espèces d'algues brunes	105
Tableau 4.1	Données de RMN ¹ H des produits <u>1</u> , <u>2</u> et <u>5</u>	115
Tableau 4.2	Données de RMN ¹³ C des produits <u>1</u> , <u>2</u> et <u>5</u>	116

INTRODUCTION

Le milieu marin représente une source inépuisable en espèces animales et végétales. Selon les estimations actuelles, le nombre total d'espèces marines représente environ la moitié de la biodiversité totale de la planète. Or, seulement 1% des espèces marines identifiées ont été étudiées à ce jour : l'étude des produits d'origine marine a débuté à la fin des années 1960 et a conduit à l'isolement d'environ 10000 substances. L'utilisation de molécules issues du milieu marin est relativement récente, ceci étant particulièrement dû aux faibles connaissances qu'avait l'homme du milieu marin, mais aussi aux difficultés d'y accéder. L'étude des métabolites secondaires biologiquement actifs occupe aujourd'hui une place prépondérante dans notre société puisqu'ils sont à la base de nombreux principes actifs utilisés en pharmacie, cosmétiques et parfumerie.

Le développement fulgurant de la chimie des produits naturels marins est dû, pour une bonne part, au développement des techniques de séparation chromatographiques, de spectroscopie moléculaire, notamment la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) mono et bidimensionnelle et la spectrométrie de masse haute résolution. Cette armada de techniques d'analyse a permis aux chercheurs de fractionner, séparer, isoler et caractériser des structures chimiques très complexes. Cependant, le développement de nouvelles méthodes d'analyse appropriées est indispensable et toujours nécessaire aux chercheurs travaillant dans les différents domaines de la chimie des produits naturels, que ce soit des études orientées vers la chimiotaxonomie, la recherche ou la synthèse de nouvelles substances d'intérêt pharmacologique, ou bien la variation de la composition chimique en fonction de la période d'étude (variation saisonnière) ou du lieu de récolte (variation géographique).

Le travail entrepris dans le cadre de cette thèse s'insère dans le large domaine des produits naturels marins, en se fixant un double objectif :

- Dosage des stérols totaux d'algues marines par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).
- Etude chimique d'une algue brune récoltée en Algérie : *Zonaria tournefortii*.

Le premier objectif a trait au développement des applications analytiques quantitatives de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), en employant des méthodologies simples et en explorant les possibilités qu'offre le processus de préconcentration sur un support solide. Un des problèmes de l'analyse quantitative par spectrométrie IR est la faible sensibilité de cette technique en comparaison avec d'autres techniques analytiques, ce qui ne la rend pas adéquate à un grand nombre d'applications. Ce problème est particulièrement important dans le cas des analyses des échantillons aqueux. Afin d'offrir des solutions et des alternatives aux différentes déterminations quantitatives par spectrométrie IR dans des matrices aqueuses, le couplage entre l'extraction en phase solide et la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (EPS-IRTF) a été considéré.

Le couplage exploite la grande spécificité du spectre IR et utilise les caractéristiques de l'EPS qui permet d'éliminer les produits aqueux de la matrice complexe à travers un support de phase solide. Cette opération présente un double intérêt, d'une part, aérer l'extrait souvent complexe et d'autre part, le rendre soluble dans un solvant organique adéquat, ce qui facilite la quantification des stérols par IRTF.

La problématique de la détermination des stérols totaux à partir d'extraits d'algues, en appliquant l'idée de couplage EPS-IRTF occupe deux chapitres de cette thèse. Le premier a été consacré à la détermination des stérols totaux (préalablement isolés, préconcentrés et analysés globalement en tant que cholestérol) à partir de l'extrait de l'algue rouge *Asparagopsis armata*. Dans cette partie, une étude comparative des résultats obtenus par CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) et par spectrométrie IRTF a été réalisée. Le deuxième a été dédié au développement d'une nouvelle méthode analytique pour la détermination du taux de stérols totaux (en tant que fucostérol) dans différentes espèces d'algues brunes. La méthode développée, permet de substituer le standard

fucostérol par le standard cholestérol en utilisant un facteur de correction entre les pentes des droites d'étalonnage de ces deux standards.

Le second objectif a fait l'objet d'un troisième chapitre consacré à la mise en évidence des métabolites secondaires de l'algue brune *Zonaria tournefortii* que nous avons récoltée sur les côtes méditerranéennes algériennes. Cette espèce, prélevée en Sicile, a déjà fait l'objet de travaux de la part de chercheurs italiens qui ont montré que les principaux constituants de son extrait lipidique sont des acylphloroglucinols : composés à biogénèse mixte comprenant un noyau phloroglucinol auquel est rattachée une chaîne hydrocarbonée insaturée en C20 ou C22 qui renferme une fonction cétone et parfois une fonction alcool. Cependant, le fait que la biosynthèse de ces composés de structure chimique particulière n'ait pas été décrite faute de la mise en évidence de précurseur et que cette espèce n'ait été étudiée en aucun autre lieu de récolte que la Sicile, nous a conduits à reprendre ces travaux sur des spécimens d'algue prélevés en Algérie. Le but étant, d'une part, de vérifier s'il n'existe pas chez cette espèce un phénomène de variation géographique conduisant à une modification de la structure chimique de certains de ses métabolites secondaires en fonction du lieu de récolte, comme cela se produit chez des algues brunes de la famille des Sargassacées et d'autre part, de découvrir le précurseur biogénétique des acylphloroglucinols, afin de proposer une hypothèse cohérente de biosynthèse de ces composés dans l'algue.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Caractéristiques biologiques et position systématique des algues étudiées

1. 1 1 Généralités

Les algues sont présentes dans tous les milieux, marins, dulçaquicole* et même aérien. Elles ont des formes et des dimensions très variables. Il en est de microscopiques et d'autres qui mesurent plusieurs mètres de longueurs. Dans le milieu marin, les espèces pélagiques*, constituant le phytoplancton*, côtoient les espèces benthiques (phytobentos*) [1].

La composition chimique des algues est variable, elles contiennent généralement des pigments (chlorophylles, carotènes, xanthophylles*...), des polysaccharides, des acides gras, des stérols, des dérivés terpéniques, des composés phénoliques et d'autres dérivés. Les algues ont à l'origine de multiples utilisations : alimentaire, agronomique, en cosmétiques (antirides), pharmaceutique, biotechnologique, en thalassothérapie (retour au milieu originel), en médecine "douce" ou même en médecine légale. Egalement, elles servent de modèles originaux pour des études de physiologie, de génétique, ou de biologie cellulaire [1, 2, 3].

Elles sont le plus souvent des végétaux chlorophylliens et réalisent la photosynthèse. La lumière est indispensable à leur vie, on les dit autotrophes* par photosynthèse. La température exerce une action complexe sur les algues. La variation de l'intensité de la photosynthèse entraîne une variation du pH. Tout comme la température, la variabilité de la salinité intervient sur tout les processus métaboliques et cette action se manifeste généralement dans le sens d'une perturbation menant à terme à une élimination des espèces. Il en résulte que les

milieux à salinité variable sont des milieux à faible diversité spécifique. La combinaison de différents facteurs détermine une végétation algale différente dans chacun des étages du domaine littoral [2, 3, 4].

Les algues ont des formes diverses. Leur appareil végétatif est un thalle*. Ce dernier peut être très simple, constitué d'une seule cellule, ou d'un ensemble de cellules. Le thalle est dépourvu de tissus ou d'organes spécialisés (ni de vraies racines, ni de tiges, ni de feuilles et de vaisseaux). On distinguera les thalles prostrés ou encroûtants* et les thalles dressés ou érigés. La partie dressée et l'organe de fixation sont de différentes formes: crampons, ventouses, disques, rhizoïdes*. Il existe fondamentalement deux types de reproduction chez les algues. La reproduction sexuée fait intervenir la production de gamètes* qui fusionnent pour donner naissance à un œuf (ou zygote*). La reproduction asexuée s'effectue à l'aide d'autres cellules spécialisées (spores*) qui ne fusionnent pas mais donnent directement naissance à un autre individu [4, 5].

1.1.2 Classification des algues

Les algues occupent une situation incontournable dans l'arbre du vivant. D'un point de vue biologique, les algues constituent un ensemble de procaryotes (les cyanobactéries: algues bleues) et dix ensembles d'eucaryotes*. Ces dix groupes d'algues sont, dans l'état actuel de nos connaissances, répartis suivant six ou sept lignées* évolutives. La figure 1.1 illustre la position systématique des :

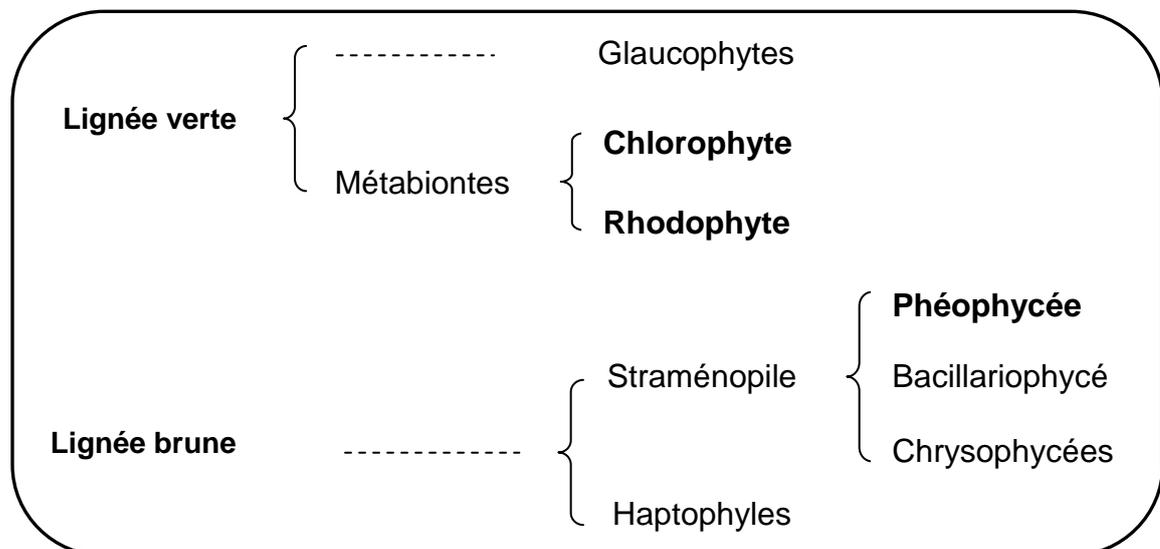


Figure 1.1 : Position des algues vertes, rouges et brunes parmi les lignées Phylogénétiques* [6]

algues vertes, rouges et brunes parmi les lignées phylogénétiques. Dans ce cadre on peut citer [2, 4- 6]:

- Les algues bleues qui sont des procaryotes munis de la paroi muréique typique de la majorité des eubactéries. Elles sont classées dans le règne des Eubacteria et sont donc considérablement éloignées des autres algues.
- Les algues vertes ou Chlorobionta qui contiennent les Chlorophyta et les Streptophyta. Elles sont de couleur verte, celle-ci est due à la nature de l'équipement pigmentaire contenu dans leurs chloroplastes*. Cette couleur verte est quelquefois masquée par la présence d'inclusions cellulaires supplémentaires chargées de carotènes. C'est ainsi que quelques chlorophytes ont une couleur rouge. Sous l'effet d'une forte insolation, d'autres peuvent devenir jaunâtres.
- Les algues rouges ou les Rhodophyta et les Glaucophyta forment les taxons frères des Chlorobionta. La couleur des Rhodophytes est extrêmement variable pour une même espèce elle varie en fonction de l'intensité de l'éclairement. Certaines Rhodophytes apparaissent ainsi noirâtres à la lumière du jour. Leur pigmentation rouge ne peut alors être mise en évidence que par l'usage d'une lumière artificielle.
- Les Glaucophyta, petits flagellés* d'eau douce aux plastes colorés en bleu par des pigments surnuméraires* appartiennent à la même lignée que les algues rouges et vertes.
- Les algues brunes (Phaeophyceae) sont placées dans un vaste ensemble contenant aussi une dizaine de lignées d'algues microscopiques caractérisées par la présence des chlorophylles a et c, des carotènes et des xanthophylles*. Cet équipement pigmentaire leur donne la couleur brune ou jaune.
- Les Cryptophyta, unicellulaires flagellés incolores ou plastes rouges ou bleus, constituent une lignée propre caractérisée par un appareil flagellaire particulier.

- Les Euglenophyceae (ou euglènes, petites algues flagellées incolores ou possédant des chloroplastes) sont réunies dans le phylum des Euglenozoa avec les Kinetoplastea.
- Les Chlorarachniophyceae sont des amiboflagellés pourvus de chloroplastes.
- Les Haptophyta, à plastes colorés en brun - doré par des caroténoïdes, forment une lignée propre caractérisée par un organe particulier : l'haptonème*.
- Les Dinophyta n'ont aucune parenté directe avec les autres algues mais sont affiliées aux sporozoa.
- Les Fungi ou Eumycota sont composés des « vrais » champignons : Chytridiomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes et Basidiomycetes ; Ces eumycètes forment, avec les méazoaires et les choanoflagellés une lignée souvent nommée « Opisthokonta ».
- Les myxomycètes, autrefois placés dans « les champignons », sont considérés par Patterson (1999) comme apparentés à certaines amibes qui, comme eux, possèdent des crêtes mitochondriales tubulaires ramifiées.
- Les plasmodiophoromycètes (Plasmodiophorea), autrefois placés dans les « champignons* » eux aussi, sont des parasites intracellulaires obligatoires des plantes terrestres. Ils forment une lignée indépendante de la couronne caractérisée par un noyau crucié pendant la division des cellules végétatives.

1.1.3 Position systématique, description, biologie, écologie des espèces étudiées et répartition phytogéographique

1.1.3.1 *Asparagopsis armata*: *Asparagopsis* armée ou Harpon de Neptune

1.1.3.1.1 Systématique :

L'espèce *Asparagopsis armata* (figure 1.2) [7, 8] appartient à :

Embranchement : Rhodophytes
 Classe : Rhodophycées.
 Sous-classe : Floridéophycées
 Ordre : Bonnemaisoniales
 Famille : Bonnemaisoniacées
 Genre : *Asparagopsis*
 Espèce : *armata* Harvey, 1855



Figure 1.2: *Asparagopsis armata*

1.1.3.1.2 Description (figure 1.2):

Algue rouge dont le thalle forme des touffes de filaments roses d'une hauteur de 10 cm environ fixés sur un stolon cylindrique; les filaments comprennent un axe sur lequel sont insérés sur quatre rangs des rameaux, les uns courts et simples, les autres ramifiés et longs. Certains de ces rameaux simples ont la forme de harpons porteurs d'épines recourbées ; ils sont capables de se rompre facilement; emportés par les vagues et les courants, s'agrippent à d'autres algues et participent à la dissémination de l'espèce (il s'agit d'un véritable bouturage). La structure est uniaxiale; une cavité centrale contenant une cellule axiale entourée d'un manchon cortical.

1.1.3.1.3 Biologie:

Végétal autotrophe, algue annuelle (cycle de développement d'un an), comprenant la succession de 3 générations différentes (cycle trigénétique hétéromorphe). La génération (gamétophyte) comprend des thalles mâles et des thalles femelles (espèce dioïque). La deuxième génération (carposporophyte) est représentée par une petite sphère blanche pédonculée. Enfin la troisième génération asexuée (sporophyte*) forme des thalles en pompons rouge violacé, filamenteux baptisés *Falkenbergia rufolanosa* (Harvey) F. Schimft 1897.

1.1.3.1.4 Écologie:

Algue qui forme une ceinture sur les rochers de l'étage infralittoral*, dans des eaux peu éclairées (espèce sciaphile*) et calmes (mode calme). Espèce d'origine australienne, apparue sur les côtes européennes en 1925 et introduite en

méditerranée en 1930 par Gibraltar. Elle se présente aussi sur les côtes de l'atlantique du nord-est.

1.1.3.2 *Bifurcaria bifurcata*

1.1.3.2.1 Systématique:

Le nom actuel de cette espèce est *Bifurcaria bifurcata* (Velley) Ross [9, 10], mais elle peut être citée sous les appellations suivantes :

Pycnophycus tuberculatus Kützinger,
Fucus tuberculatus,
Fucus bifucatus Velley in Withering,
Bifurcaria rotunda (Hudson) Papenfuss,
Bifurcaria tuberculata (Hudson) Stackhouse.

L'espèce *Bifurcaria bifurcata* (figure 1.3) appartient à :

Embranchement: Ochrophytes (Hétérochontés)

Classe: Phéophycées ou Fucophycées

Famille: Sargassacées [11, 12]

Genre: *Bifurcaria*, Ordre: Fucales

Espèce: *bifurcata* Ross 1958



Figure 1.3 : *Bifurcaria bifurcata*

1.1.3.2.2 Description:

Le thalle est formé de cordons jaunâtres simples à la base dont les ramifications alternes, cylindriques 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. Simples à la base ces frondes sont ensuite ramifiées de manière dichotome* [3, 13].

1.1.3.2.3 Biologie:

Algue autotrophe, la reproduction a lieu au printemps où l'on voit apparaître aux extrémités des renflements ou réceptacles jaunâtres qui sont hermaphrodites (ils produisent des gamètes des 2 sexes). Le thalle est donc monoïque ou bisexué. Après libération des gamètes par les ouvertures des réceptacles

(ostioles), l'œuf 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*) [3].

1.1.3.2.4 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. Cette algue supporte peu l'immersion et requiert une eau bien claire sans sédiment en suspension [13, 14].

1.1.3.3 *Cystoseira sedoides*

Cystoseira sedoides (Desfontaines) C. Agardh

1.1.3.3.1 Systématique:

L'espèce *Cystoseira sedoides* (figure 1.4) appartient à :

Embranchement : Chromophytes

Classe : Phéophycées

Ordre : Fucales

Famille : Sargassacées [11, 12]

Genre : *Cystoseira*

Espèce : *sedoides*



Figure 1.4 : *Cystoseira sedoides*

1.1.3.3.2 Description:

Algue brune, le thalle de couleur verdâtre, mesure 15 à 20 cm de haut, il est fixé au substrat rocheux par un disque basal. La tige est cylindrique, dépourvu de tophules, à sommet non saillant. La ramification est irrégulière et très dense, les rameaux primaires sont très rapprochés et courts, ce qui confère au thalle un aspect très condensé, les rameaux de dernier ordre sont feuillés. L'algue est dépourvue d'aerocystes* [15- 17].

10.1.3.3.3 Ecologie:

L'algue se rencontre dans les biotopes photophiles* de l'infralittoral de mode calme.

1.1.3.4 *Dictyota dichotoma* (*Dictyote dichotome*)

1.1.3.4.1 Systématique:

L'espèce *Dictyota dichotoma* (figure 1.5) appartient à:

Embranchement: Ochrophytes (Hétérochontés)

Classe: Phéophycées ou Fucophycées

Ordre: Dictyotales

Famille: Dictyotacées

Genre: *Dictyota*

Espèce: *dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux
1809 [7, 8, 18, 19, 20].



Figure 1.5 *Dictyota dichotoma*

1.1.3.4.2 Description:

Algue brune, en touffes, dont le thalle brun jaunâtre, haut de 10 à 14 cm pour une largeur de 2 à 8 mm, comprend une courte base aplatie et des lanières divisées dichotomiquement (longitudinalement et régulièrement en 2 parties), sans "nervure", à extrémité arrondie ou bilobée. Jeune, elle présente un phénomène d'iridescence bleutée. On rencontre souvent une forme à nombreuses lanières très étroites : *Dictyota dichotoma forme implexa* (confusion possible avec *Dilophus fasciola*).

1.1.3.4.3 Biologie:

Algue autotrophe, dont les sexes sont séparés (thalles mâles et thalles femelles): c'est une espèce dioïque; après fécondation apparaît un troisième type de thalle non sexué donnant des spores capables d'engendrer les thalles sexués. Le cycle de développement voit donc se succéder 2 générations semblables morphologiquement (cycle digénétique* isomorphe*).

1.1.3.4.4 Écologie:

Espèce annuelle, son thalle disparaît en hiver, comme les *Taonia* ou les *Ectocarpus* dans les eaux méditerranéennes et atlantiques. Algue qu'on rencontre sur les rochers éclairés (espèce photophile), peu battus de l'étage infralittoral. Elle est souvent fixée sur d'autres algues: espèce épiphyte*.

1.1.3.5 *Cladostephus spongiosus*

1.1.3.5.1 Systématique:

Actuellement le nom de cette espèce est *Cladostephus spongiosus* f. *verticillatus* [21], antérieurement cette espèce portait l'appellation *Cladostephus hirsutus* (linnaeus) [18, 22, 23], elle peut être citée sous les appellations : *Fucus hirsutus* (linnaeus) et *Cladostephus verticillatus* (Lightfoot) Lyngbye.

L'espèce *Cladostephus spongiosus* (figure 1.6) appartient à :

Embranchement : Chromophytes

Classe : Phéophycées.

Ordre : Sphacélariales.

Famille : Sphacélariacées.

Genre : *Cladostephus*.

Espèce : *spongiosus* f. *verticillatus*.



Figure 1.6 : *Cladostephus spongiosus*

1.1.3.5.2 Description:

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.

1.1.3.5.3 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* [3].

1.1.3.5.4 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 [3].

1.1.3.6 *Zonaria tournefortii*

1.1.3.6.1 Systématique:

Actuellement appelée *Zonaria tournefortii* (Lamouroux) Montagne [23], antérieurement, cette espèce portait l'appellation *Fucus tournefortii* (Lamouroux) [24], *Zonaria flava* Clément C. Agardh [25] et *Padina tournefortii* (Lamouroux) Montagne [25].

L'espèce *Zonaria tournefortii* (figure 1.7) appartient à :

Embranchement : Phæophycophytes

Classe : Phéophycées

Ordre : Dictyotales

Famille : Dictyotacées

Genre : *Zonaria*

Espèce : *tournefortii* (Lamouroux) Montagne



Figure 1.7: *Zonaria tournefortii*

1.1.3.6.2 Description:

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 [13].

1.1.3.6.3 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 [13].

1.1.3.6.4 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) [13, 26].

1.2 Techniques d'analyse

1.2.1 Extraction en phase solide

L'extraction en phase solide (EPS) a été inventée au milieu des années 1970 comme une alternative à l'extraction liquide-liquide. L'extraction en phase solide est une méthode de préparation de l'échantillon, elle consiste en l'isolement et la purification des analytes dans la solution par la sorption à travers une phase solide contenue dans des colonnes, suivie par l'élution de l'analyte avec un solvant approprié pour l'analyse instrumentale.

Le mécanisme de rétention implique une phase inverse (interaction apolaire), une phase normale (interaction polaire) ou une phase échangeuse d'ions.

Les colonnes d'extraction peuvent être des disques, des cartouches ou des seringues de type seringue barrel (figure 1.8). Les cartouches d'EPS consistent en des seringues garnies de phase solide maintenue de part et d'autre par des frittés à base de polypropylène ou de polyéthylène (figure 1.9a). La cartouche peut contenir de 50 mg jusqu'à 10 g de phase solide (packing material) et le volume de l'échantillon peut aller de 1 ml jusqu'à un 1 litre. Lors du passage de l'échantillon

dissous dans un solvant à travers le support solide, l'analyte concentré sur la phase solide est élué par un solvant adéquat (figure 1.9b) [27-29].

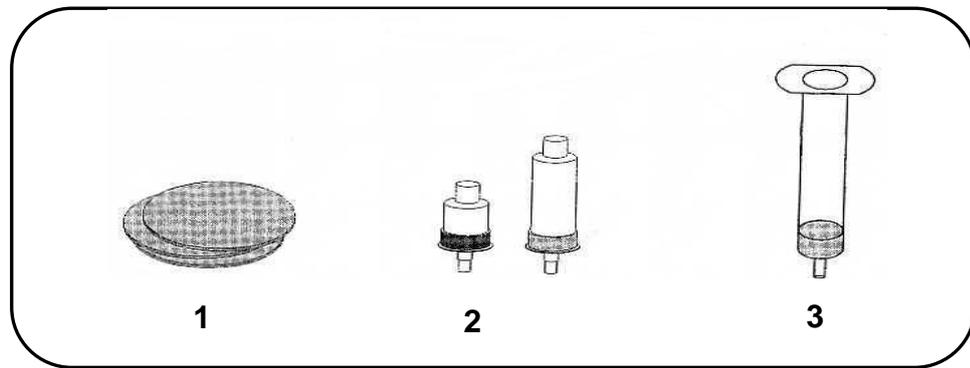


Figure 1.8 Types de colonnes d'extraction
(1) disque, (2) seringue barrel, (3) cartouche

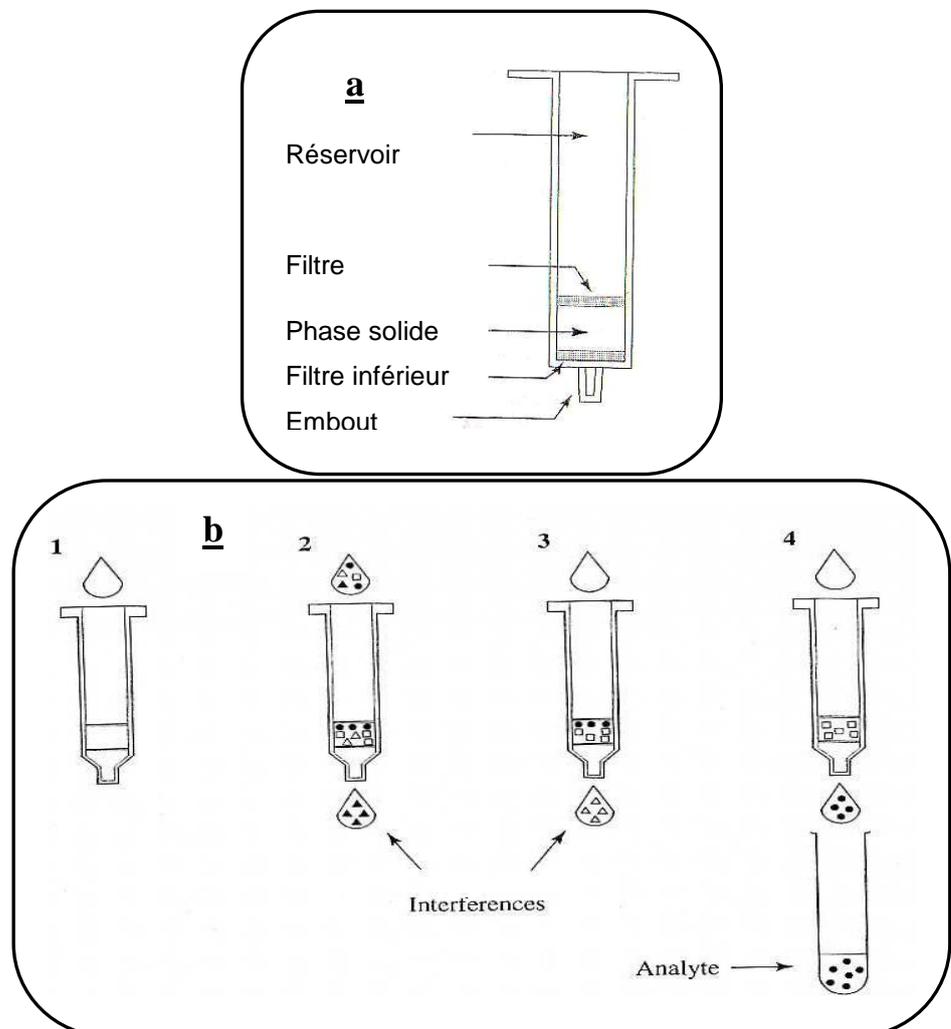


Figure 1.9 : **a** : Cartouche d'EPS , **b** : Principe de l'EPS :
 1 : Etape de conditionnement
 2 : Passage de l'échantillon à travers la phase solide et rétention
 3 : Lavage et élution sélective des interférents
 4 : Elution de l'analyte

Une étude bibliographique exhaustive (627 références) réalisée par Analytichem. International entre la période 1981-1987 [30] rapporte l'importance de l'application de l'EPS dans les différents domaines de la chimie analytique. Toutefois, nous avons noté que sur l'ensemble des travaux cités, l'analyse par IRTF-EPS n'a été rapportée que dans deux travaux, dont l'un d'eux a été consacré à l'analyse des stéroïdes [30, 31].

L'EPS représente une alternative fiable pour le traitement préalable des matrices complexes en comparaison à la chromatographie sur couche mince CCM et la chromatographie sur colonne CC [32]. Les travaux de Tippins illustrent l'utilisation de l'EPS pour la préparation, l'isolement et la purification de composés chimiques présents à l'état de trace dans différentes matrices complexes, permettant par la suite, leur analyse par chromatographie liquide à haute performance CLHP, chromatographie en phase gazeuse CG, Résonance magnétique nucléaire RMN, spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier IRTF et spectrométrie de masse SM [33]. Toivo confirme dans son travail les avantages de l'EPS par rapport à la CC et la CCM qui se résument notamment en gain de temps d'analyse et en réduction du volume de solvant utilisé, et applique la méthode sur la purification de la fraction insaponifiable de l'extrait végétal, qui est une fraction très complexe (hydrocarbures, carotènes, tocophérols, alcools linéaires, alcools triterpéniques et stérols), pour leur quantification par CG [34].

L'analyse d'un échantillon d'une huile végétale par CG, sans passer par une réaction de saponification, est réalisée après une silylation suivie d'une préconcentration des produits de dérivatisation à travers un support solide en phase normale [35, 36]. Des méthodes de couplage EPS-IRTF [33], EPS-CG et EPS-LC [34] et EPS-CG-SM [39, 40] ont été développées en flux continu ou en flux stoppé.

La flexibilité offerte par l'EPS a permis des applications diverses et variées dans la préparation des échantillons en environnement, en médecine et en pharmacie. L'EPS grâce à sa simplicité, représente une bonne alternative à l'extraction liquide-liquide pour la préparation des échantillons. En plus de l'important rendement de purification de l'analyte, l'EPS facilite l'automatisation qui

fait gagner du temps et décroît le prix de revient de la préparation de l'échantillon [27, 40, 41]. Additionnellement, l'extraction en phase solide permet le changement de solvant et le couplage avec beaucoup d'autres techniques instrumentales.

1.2.2 Spectroscopie infrarouge

La spectrophotométrie infrarouge, est un des outils les plus puissants dont dispose tout scientifique, qu'il soit chimiste, biologiste, médecin ou autre, dans l'analyse structurale et qualitative. Elle est également utilisée dans l'analyse quantitative: à l'heure actuelle, on assiste à un développement considérable et extrêmement évolué dans ce domaine pour faire face aux besoins toujours plus spécifiques vis-à-vis des problèmes écologiques, économiques et sociaux où des mesures de qualité fiables, rapides, économiques, avec le moins de préparation d'échantillons, de pollution et de risques sanitaires sont requises. Avec le développement des procédés industriels et l'augmentation de la production, de nombreux industriels s'orientent vers l'adoption de la spectroscopie infrarouge pour les analyses de routine [42].

L'existence de la radiation infrarouge a été démontrée en 1800 par Sir William Herschel, les premiers spectres IR ont été enregistrés entre 1890 et 1900, mais c'est le remarquable travail de W.W. Coblentz, commencé en 1903, qui marque le début de la spectrométrie infrarouge en tant que méthode analytique [43]. Actuellement, la spectrométrie IR connaît un nouvel essor grâce à la disponibilité de spectromètres à transformée de Fourier.

La région IR occupe une partie très importante du spectre électromagnétique entre $10\text{-}14000\text{ cm}^{-1}$, due à sa grande extension et à la différence en application et instrumentation, le domaine spectral IR est divisé en trois parties (tableau 1. 1) [44].

Tableau 1 1: Répartition du domaine spectral IR

Domaine spectral	Nombre d'ondes (cm ⁻¹)	Modes de vibration
Infrarouge lointain (FIR)	300-10 cm ⁻¹	Vibration de réseau et Métal-atome donneur
Infrarouge moyen (MIR)	4000-400 cm ⁻¹	Vibration de groupes fonctionnels
Infrarouge proche (NIR)	14000-4000cm ⁻¹	Harmonique, Combinaisons et transitions électroniques de faible énergie

La partie de la région infrarouge la plus utilisée et la plus adéquate pour l'identification des espèces, organiques principalement, et la caractérisation des structures moléculaires est l'infrarouge moyen, à cause de la richesse et la multiplicité d'informations fournies par les bandes étroites du spectre [45].

Il existe une grande variété de spectromètres IR de divers grades de complexité, mais tous basés sur le même principe. Ils contiennent tous les mêmes éléments de base que n'importe quel autre spectrophotomètre d'absorption : la source de radiation, le système optique et le détecteur. Les caractéristiques de ces derniers varient selon la zone électromagnétique considérée.

La spectrométrie infrarouge classique est basée sur l'utilisation d'un système dispersif pour séparer les différentes fréquences de la radiation. Les éléments spectraux sont mesurés successivement par l'énergie qui arrive au détecteur par unité de temps, qui est faible, cela se traduit par une faible sensibilité, une mauvaise relation signal/bruit et une vitesse d'acquisition de données faible.

Les appareils à transformée de Fourier ne contiennent aucun élément dispersif, ainsi la quantité d'énergie disponible à chaque instant est multipliée par un facteur de 100 et 200 [46] et toutes les longueurs d'ondes sont détectées et mesurées simultanément. Pour séparer les longueurs d'ondes, il faut moduler le

signal de la source de manière à ce qu'il puisse ensuite être décodé par une transformation de Fourier.

En 1887 Michelson met au point l'interféromètre (figure 1.10) dont le principe est basé sur le fait qu'un faisceau incident I_0 non modulé est partagé en deux par une séparatrice. L'un des deux est dirigé vers un miroir fixe, l'autre vers un miroir mobile perpendiculaire au premier, ces faisceaux se recombinaient sur la séparatrice en créant des interférences qui dépendent de la différence du chemin optique δ (appelé retard). L'intensité du signal $I(\delta)$ est mesurée en fonction du retard δ , ce qui génère un interférogramme. En utilisant une opération mathématique découverte en 1822 par Jean-Baptiste Fourier, il est possible de recalculer $I_0(\nu)$ pour chaque fréquence, on obtient ainsi, avec l'aide d'un ordinateur, la distribution de I_{abs} en fonction de ν , c'est à dire un spectre IR [47].

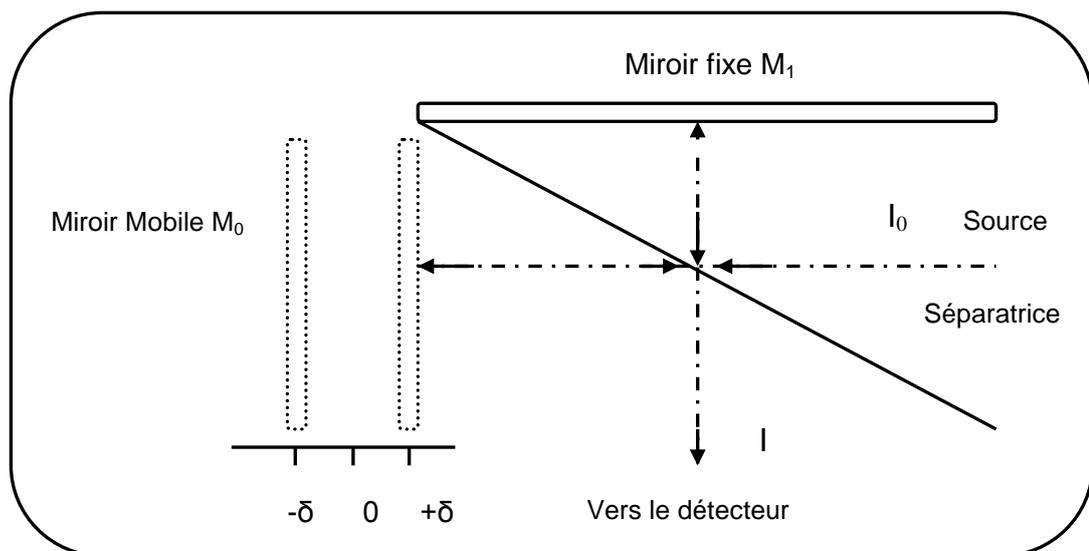


Figure 1.10 Principe de l'interféromètre de Michelson (1887) [47] (1887)

Les spectromètres à transformée de Fourier sont caractérisés par une grande sensibilité, une résolution élevée et un balayage très rapide du domaine spectral, (0,1-10 secondes), ce qui permet d'accumuler un grand nombre de spectres afin d'améliorer le rapport signal/bruit de l'ordre de 150 et de coupler la spectrométrie IRTF avec diverses autres techniques d'analyse [48].

Le grand développement de la technique IRTF est dû à son emploi tant pour l'identification qualitative que pour l'analyse quantitative et pour l'étude des structures chimiques.

L'analyse qualitative se réalise généralement en deux étapes: (1) identification des groupements fonctionnels de la substance, il existe des atlas de spectres qui peuvent être consultés à cette fin [49], (2) confirmation de la structure moléculaire par comparaison de la totalité du spectre avec celui d'un composé connu. La concordance exacte entre le spectre d'un composé de structure connue et celui d'un analyte permet d'identifier ce dernier sans aucun doute possible, du fait qu'il n'existe pas deux composés de structure différente qui ont le même spectre IR (on parle "d'empreinte digitale " du composé) [50].

Les études quantitatives sont basées sur l'utilisation de la loi de Beer-Lambert qui établit une relation entre les mesures d'absorbance et la concentration des espèces à déterminer. Des analyses quantitatives à $\pm 10\%$ sont relativement aisées à obtenir, pour des analyses plus précises ($< 1\%$ en solution) il est nécessaire d'établir une courbe d'étalonnage et de s'assurer que les spectres sont enregistrés dans des conditions optimales. Dans cette partie, trois modes de mesure peuvent être considérés: (1) mesure en mode statique (batch) où la cellule IR est, à chaque mesure, retirée de son compartiment pour son nettoyage ou son remplissage, (2) mesure en écoulement bloqué (stop flow) où les échantillons sont conservés dans des récipients distincts pendant toutes les opérations unitaires jusqu'au transfert vers le dispositif d'analyse (on utilise une pompe péristaltique pour remplir la cellule, on stoppe momentanément le flux, on obtient le spectre et on rétablit le flux pour laver la cellule avec le solvant ou la remplir avec une autre solution et ce, sans la déplacer), (3) en mode à flux continu (Flow Injection Analysis) où les diverses opérations unitaires de l'analyse s'effectuent pendant que l'échantillon circule du point d'injection jusqu'à l'unité de mesure.

Les progrès technologiques dans le domaine des détecteurs, de l'optique, de l'outil de calcul des logiciels de spectrométrie infrarouge à transformée de

Fourier et la nature particulière du spectre IR (étroitesse des pics), permettent une analyse quantitative avec un degré de spécificité que relativement peu d'autres méthodes analytiques égalent ou dépassent. Cette spécificité est particulièrement mise à profit pour le dosage de mélanges de composés organiques présentant une grande similitude ou pour l'analyse directe de composés minoritaires dans des mélanges complexes [51].

La spectrométrie infrarouge est devenue l'une des méthodes d'analyse chimique utilisée dans le plus grand nombre de disciplines scientifiques. Les synthèses bibliographiques bisannuelles sur la spectrométrie IR du Journal Analytical Chemistry indiquent les applications scientifiques, réalisées pendant les dernières années, dans tous les domaines [52-54].

L'évaluation de l'état nutritionnel des algues et de leur milieu naturel est une tâche cruciale pour beaucoup d'études écologiques et écophysologiques [55-57]. La spectrométrie infrarouge a été sollicitée comme un outil fondamental pour réaliser des études écotoxicologiques à partir de l'algue cultivée *Dunaliella tertiolecta* qui est considérée comme un biomarqueur pour estimer la toxicité des échantillons marins. Dans cette étude, l'analyse en composantes multivariées (PCA) et l'utilisation de corrélation 2D ont permis d'évaluer l'effet des polluants sur la cellule de l'algue [58]. Une nouvelle méthode non destructive basée sur l'utilisation des possibilités analytiques de la spectroscopie IRTF [59-62] et la résolution spatiale offerte par le rayonnement synchrotron et la classification hiérarchique ascendante permet de fournir des informations intéressantes sur toutes les cellules étudiées dans le milieu naturel en temps court. La première tentative pour mettre en application la spectromicroscopie dans l'étude de la composition biochimique des microalgues a été réalisée par Giornato et al. [63]. Le couplage de la microspectrométrie IRTF-synchrotron a été utilisé pour suivre et décrire les changements qui apparaissent dans les macromolécules des Euglenophytes d'eau douce *Euglina gracilis* tout en permettant la croissance et le vieillissement des lots de culture [64]. La spectrométrie IRTF a été aussi utilisée pour désigner la nature cis ou trans de la double liaison dans deux esters

méthyliques d'acide hexadécadiénoïques et un ester méthylique d'acide hexadécatriénoïque dans l'huile des microalgues [65].

1.2.3 Méthodes chromatographiques

On peut, en fait, situer en 1958 le début de la chromatographie en phase liquide avec l'introduction de l'analyse automatique des acides aminés par Spackman, Stein et Moore.

La chromatographie en phase liquide (CPL) permet d'analyser avec une grande précision une très grande variété de substances, même les composés non volatils ou thermodégradables. L'analyse peut se faire sans modification préalable de l'échantillon. Pour assurer une reproductibilité et une signification des résultats il faut, d'une part que l'échantillon soit représentatif et d'autre part, que les conditions opératoires soient stables [66].

1.2.3.1 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La grande capacité de séparation, combinée à la précision et l'exactitude, la rapidité et la simplicité a fait de la chromatographie liquide haute performance (CLHP) un outil analytique moderne très puissant. Aussi perfectionné que soit l'appareillage, le nerf de toute séparation reste la colonne chromatographique qui doit être l'objet de soins exigeants [66].

Les détecteurs fonctionnent sur des principes variés et sont équipés de microcuves à circulation ; citons les spectrophotomètres UV-visibles qui ont atteint un haut degré de perfectionnement, les spectrofluorimètres, les détecteurs électrochimiques, les réfractomètres différentiels, le couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse CL-SM, les détecteurs à barrette de diodes... La sensibilité est fréquemment de 10^{-9} g d'échantillon injecté, dans certains cas favorables on a avancé une détectabilité de 10^{-12} g (détection électrochimique d'amines aromatiques par exemple). Dans le cas d'une détection par absorptiométrie dans l'ultraviolet, la loi de Lambert-Beer n'est valable que pour un rayonnement monochromatique pour assurer la linéarité [66]. Pour la définition du

domaine de linéarité, on doit tenir compte de l'absorbance de la phase éluante à la longueur d'onde de détection du soluté [67].

Le développement considérable pris par la chromatographie est dû essentiellement à son utilisation en analyse quantitative [42]. Celle-ci repose sur la reproductibilité des séparations et sur la relation entre la masse injectée du composé dans le chromatographe et l'aire du pic correspondant sur le chromatogramme. L'analyse quantitative en CL est essentiellement une méthode comparative, aussi existe-t-il plusieurs méthodes pour déterminer les concentrations ; toutes sont basées sur la relation reliant l'aire A_i du pic de l'échantillon i élué à la masse de l'échantillon injecté m_i ; $m_i = K_i A_i$. Elles impliquent la détermination de l'aire des pics, mais se différencient par l'emploi de coefficients de proportionnalité ou de facteurs de réponse intrinsèques ou relatifs [66]. Les deux méthodes de calcul et d'étalonnage les plus utilisées sont :

a) La méthode de l'étalonnage externe:

Basée sur la comparaison de deux chromatogrammes, de la solution de référence et de l'échantillon, dans les mêmes conditions d'analyse [66]. Cette méthode, faisant appel aux coefficients de réponse absolus, donne des résultats très fiables avec les chromatogrammes actuels qui sont parfaitement stables. Le procédé consiste à préparer dans un solvant, une solution de référence $C_{réf}$ du composé qui fait l'objet du dosage. On injecte un volume V de cette solution et on repère l'aire $A_{réf}$ du pic correspondant. Ensuite dans des conditions similaires on injecte le même volume V de l'échantillon en solution, contenant le composé à doser $C_{éch}$. Soit $A_{éch}$ l'aire du pic d'éluion correspondant.

Considérant que les volumes injectés sont égaux, il y a proportionnalité entre les aires qui dépendent des masses injectées et des concentrations correspondantes, comme le montre les équations suivantes:

$$m_i = V C_i \quad \text{et} \quad m_{réf} = V \cdot C_{réf} = K \cdot A_{réf} \quad \text{et} \quad m_{éch} = V \cdot C_{éch} = K \cdot A_{éch}$$

D'où

$$C_{éch} = C_{réf} (A_{éch} / A_{réf}).$$

b) La méthode de l'étalonnage interne:

Basée sur l'utilisation du coefficient de réponse relatif du composé à doser vis-à-vis d'un marqueur introduit comme référence [66]. Elle consiste à injecter ensemble un étalon de l'échantillon à étudier (I) et l'étalon interne (E) adéquat, les aires des pics correspondants sont proportionnelles aux masses injectées, d'où l'apparition du coefficient de réponse de l'étalon (I) vis-à-vis de l'étalon interne (E).

$$K_{I/E} = C_I A_E / C_E A_I$$

Ensuite un volume quelconque d'une solution préparée à partir de l'échantillon à étudier dans laquelle a été ajoutée une quantité connue de l'étalon interne est analysé. La concentration du soluté I est déterminée à l'aide de la relation :

$$C'_I = C'_E K_{I/E} (A'_I / A'_E).$$

*** Méthode de normalisation interne :**

Elle est basée essentiellement sur le fait que tous les solutés sont élués de la colonne et que l'on connaît leurs coefficients de réponse respectifs dans les conditions considérées.

$$m_i \% = K_i A_i / \sum K_i A_i$$

1.2.3.2 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une méthode de mise en œuvre simple, ne nécessitant, en général, qu'un appareillage élémentaire et, de ce fait, très peu coûteux. Par ailleurs, dans le cas de l'analyse d'un mélange complexe, l'étude préalable par CCM peut s'avérer très utile en raison de l'existence, pour la chromatographie d'adsorption, d'une méthode de révélation quasi universelle (carbonisation par chauffage après pulvérisation d'acide sulfurique). Son développement, en tant que méthode d'analyse quantitative, est dû à la maîtrise de la reproductibilité des dépôts et de la mesure des concentrations, désormais assurée grâce aux instruments actuels.

L'existence de couches de silice greffée a élargi le domaine d'application de la CCM puisque l'on peut effectuer les séparations non seulement par

chromatographie d'adsorption, mais aussi par chromatographie de partage et de paires d'ions [66].

La séparation par CCM des constituants de l'échantillon est réalisée sur une plaque rectangulaire de verre, de plastique ou d'aluminium, de quelques centimètres de côté, et recouverte d'une fine couche (100-200 μm) de phase stationnaire accrochée sur le support, généralement du gel de silice modifié ou non.

Le développement des plaques est un processus au cours duquel l'échantillon est entraîné par une phase mobile à travers la phase stationnaire; il est analogue à l'élution en chromatographie liquide. Pour faire une séparation, on dépose un petit volume (compris entre quelques nanolitres et plusieurs microlitres) de l'étalon et de l'échantillon, à environ 1 cm du bord inférieur de la plaque sous forme d'une tâche de 1 à 3 mm de diamètre et on marque la position avec un crayon. Ce dépôt est réalisé soit manuellement, soit de manière automatique avec un capillaire à extrémité plane. La plaque est placée dans une cuve munie d'un couvercle que l'on sature par la vapeur du solvant de développement. Une extrémité de la plaque est immergée dans ce solvant, en prenant soin d'éviter tout contact direct entre l'échantillon et le solvant. Lorsque le front de solvant a parcouru la moitié ou les deux tiers de la longueur de la plaque, elle est retirée du récipient et séchée. Les positions des constituants sont finalement repérées et exprimées par le facteur de rétention R_f (figure 1.11).

Plusieurs méthodes sont employées pour localiser les constituants de l'échantillon après la séparation, ce processus est appelé la révélation. Deux méthodes courantes, qui s'appliquent à la plupart des mélanges organiques, consistent à vaporiser une solution d'iode ou d'acide sulfurique qui réagit avec les composés organiques pour donner naissance à des composés sombres. Plusieurs réactifs spécifiques (tels que la ninhydrine) sont également utilisés pour localiser des espèces plus particulières.

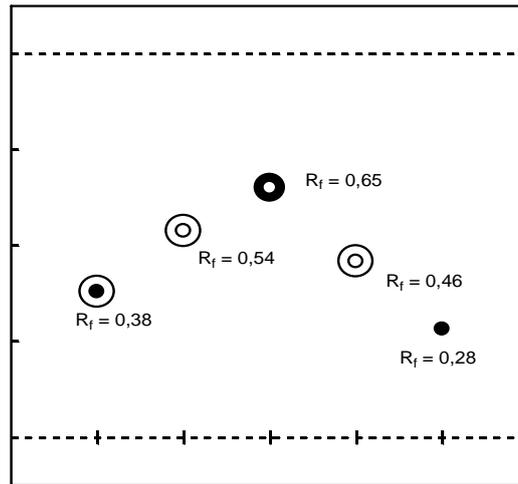


Figure 1.11 : Représentation d'une plaque CCM

Une autre méthode de détection est basée sur l'incorporation d'un matériau fluorescent à la phase stationnaire. Après développement, la plaque est examinée sous un éclairage ultraviolet. Les constituants de l'échantillon désactivent la fluorescence du matériau [42, 68].

1.2.4 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

1.2.4.1. Moment magnétique nucléaire

On sait que les électrons d'un atome possèdent un moment magnétique intrinsèque. Ce moment magnétique, qui revient à assimiler l'électron à un petit aimant, est proportionnel au nombre quantique magnétique de spin m_S , appelé en général spin de l'électron. Ce spin est quantifié et prend les valeurs $+1/2$ et $-1/2$. De même, de nombreux noyaux atomiques sont assimilables à de minuscules aimants et peuvent être caractérisés par un spin nucléaire. A l'exception de ceux qui possèdent à la fois un nombre pair de protons et de neutrons, tous les noyaux ont un spin nucléaire et donc détectable par la technique de la RMN. Le tableau 1. 2 regroupe les propriétés des principaux isotopes exploités en RMN.

Tableau 1. 2 : Principaux isotopes exploités en RMN

Noyaux	Spin (I)	Rapport gyromagnétique (γ) $s^{-1}.T^{-1}$	Abondance naturelle	Gamme de déplacement chimique (ppm)
1H	1/2	$26,75. 10^7$	99,98	0 à 15
^{13}C	1/2	$6,725. 10^7$	1,1	0 à 250
^{19}F	1/2	$25,16. 10^7$	100	-300 à 100
^{31}P	1/2	$10,83. 10^7$	100	-200 à 230
^{29}Si	1/2	$-5,314. 10^7$	4,7	-400 à 100
^{15}N	1/2	$-2,711. 10^7$	0,37	-500 à 1200

1. 2. 4. 2 Comportement d'un noyau dans un champ magnétique extérieur

Les noyaux qui présentent un moment magnétique peuvent être assimilés à de minuscules barreaux aimantés. En l'absence de champ magnétique, les vecteurs moments magnétiques occupent des directions totalement désordonnées; en présence d'un champ magnétique tous ces noyaux vont s'orienter parallèlement (β) ou antiparallèlement (α) au champ magnétique (figure 1.12). L'énergie de l'état β est plus faible que celle de l'état (α), la population de noyaux occupant cet état de plus basse énergie est donc plus élevée.

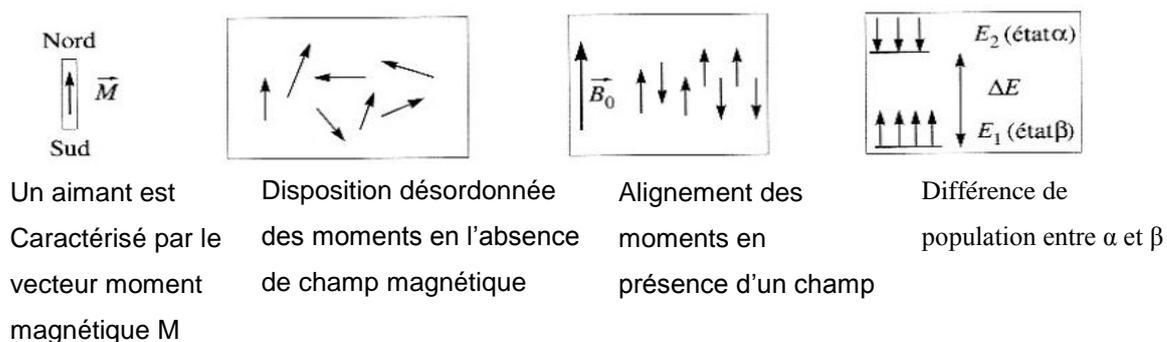


Figure 1.12: Comportement d'un noyau dans un champ magnétique

Par irradiation de fréquence ν_0 , on apporte l'énergie nécessaire pour peupler l'état α à partir de l'état β : il y a résonance. On a la relation : $E_2 - E_1 = h \nu_0$. La différence d'énergie $E_2 - E_1$ dépend de la nature du noyau atomique et est proportionnelle à l'intensité B_0 du champ magnétique. Aussi la fréquence ν_0 est reliée à B_0 par une relation appelée relation de Larmor : $\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$.

γ est le rapport gyromagnétique (tableau 1. 2). Il est caractéristique de chaque noyau. Pour le proton, la fréquence de résonance est d'environ 60 000 000 Hz (60 MHz), pour un champ magnétique de 1,4 T.

1. 2. 4. 3 Appareillage

L'échantillon est placé entre les pôles d'un électroaimant qui crée un champ magnétique B_0 . L'énergie nécessaire au passage de l'état β à l'état α est apportée par un champ magnétique B_1 perpendiculaire à B_0 et tournant autour de celui-ci à une fréquence située dans le domaine des radiofréquences (figure 1.13).

La grande majorité des appareils fonctionnent à une fréquence comprise entre 60 et 300 MHz ; mais les plus récents atteignent 800 MHz avec un champ B_0 de plus de 18 Teslas.

Les spectres de RMN sont souvent réalisés à partir de solutions. En RMN du proton, on utilise généralement des solvants non hydrogénés tels que CCl_4 , CDCl_3 , C_6D_6 , D_2O . Les valeurs des déplacements chimiques (δ) peuvent varier d'un solvant à l'autre, il est donc nécessaire d'indiquer la nature du solvant utilisé.

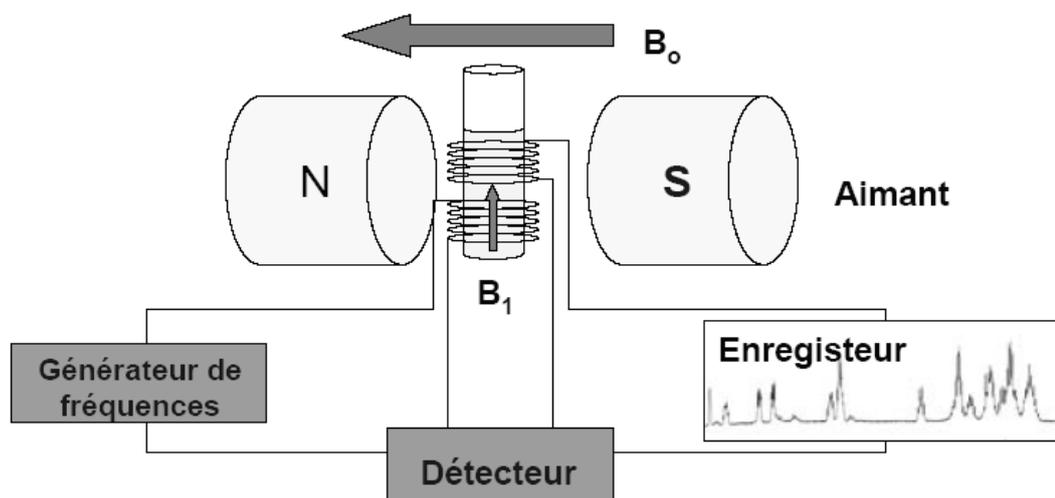


Figure 1.13 : Eléments essentiels d'un spectromètre RMN

1.2.4.4 Intérêt du signal obtenu

Si tous les noyaux d'hydrogène résonnaient à la même fréquence, la RMN ne présenterait pas d'intérêt analytique en chimie. On aurait tout au plus accès à

la densité de protons en un point (c'est ce qui est exploité en imagerie RMN). Dans la réalité, le champ imposé B_0 est modulé localement par l'environnement électronique du noyau ce qui fait que les noyaux résonnent à des fréquences différentes, dépendant de leur environnement électronique. Par ailleurs, l'intensité du signal mesuré est liée au nombre de noyaux subissant la transition, ce qui permet d'évaluer les populations relatives des différents types de noyaux. Enfin, le champ vu par le noyau est également influencé par les spins quantifiés des noyaux voisins, ce qui subdivise les niveaux d'énergie et donc les transitions possibles.

La forme du signal (nombre de pics) donne également des renseignements précieux sur l'environnement [69].

1.2.4.5. Notion de déplacement chimique en RMN du proton

δ est obtenu en divisant l'écart de fréquence entre deux pics par la fréquence de l'appareil ν_0 , c'est donc un nombre sans dimensions : $\delta(\text{ppm}) = (\Delta\nu / \nu_0) \cdot 10^6$ (le rapport $\Delta\nu/\nu_0$ étant très faible, on l'exprime en partie par million (ppm)). $\Delta\nu = \nu - \nu_{\text{ref}}$, avec ν_{ref} : fréquence de la référence. Cette dernière est choisie comme étant le TMS : tétraméthylsilane.

1.2. 4. 6 RMN du Carbone 13

Etant donné que la sensibilité est proportionnelle à l'abondance naturelle et à γ^3 , et le fait que l'isotope du carbone 13 représente environ 1%, le proton ^1H est 6400 plus sensible que le ^{13}C .

Couplage C-H : Un noyau couplé à n noyaux de spin I aura une figure de couplage comprenant $2I_{\text{total}} + 1$ raies. Dans ces conditions, on a : $C_{\text{quaternaire}}$ (C) : 1 pic (s), $C_{\text{tertiaire}}$ (CH) : 2 pics (d), $C_{\text{secondaire}}$ (CH₂) : 3 pics (t), C_{primaire} (CH₃) : 4 pics (q). Du fait de la faible abondance isotopique du ^{13}C , les couplages $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ ne sont pas décelables en RMN du ^1H et en RMN du ^{13}C respectivement.

Découplage de spin hétéronucléaire : Les couplages $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ rendent les spectres de RMN ^{13}C illisibles car trop complexes. Le découplage de spin

hétéronucléaire permet de simplifier les spectres en supprimant les couplages ^{13}C - ^1H . Tous les signaux observés sont alors des singulets. Le déplacement chimique est défini de la même manière que pour le proton avec comme référence le tétraméthylsilane auquel on attribue un déplacement chimique nul. Les tables donnant un aperçu des déplacements chimiques des principaux éléments de structure moléculaire sont disponibles.

1. 2. 4. 7 RMN multi-impulsionnelle

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 (θ) et de la nature du carbone (tableau 1. 3).

Tableau 1. 3 : Signe des pics du carbone suivant la séquence DEPT réalisée

DEPT	CH ₃	CH ₂	CH	C
$\theta = 45^\circ$	+	+	+	0
$\theta = 90^\circ$	0	0	+	0
$\theta = 135^\circ$	+	-	+	0
RMN ^{13}C	+	+	+	+

➤ **COSY ^1H - ^1H (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 ^1H - ^1H (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)**

Cette séquence de RMN bidimensionnelle homonucléaire est du même type que la séquence COSY ^1H - ^1H . 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 ^{13}C - ^1H (Correlated Spectroscopy)**

Cette séquence de RMN bidimensionnelle correspond à un transfert de cohérence hétéronucléaire, elle 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 ^{13}C - ^1H . 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 (Heteronuclear Single Quantum Correlation)**

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 (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity)**

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}C - ^1H à longue distance et par conséquent la détection des couplages entre protons et carbones quaternaires.

1.3 Composition stérolique et phénoliques des algues marines

1.3.1 Composition stérolique des algues marines

1.3.1.1 Généralités

La diversité chimique des lipides marins, spécialement les stérols, a été reconnue comme étant une source de biomarqueurs chimiotaxonomiques et phylogénétiques pour les algues marines [73, 74].

Les stérols représentent un groupe de substances dérivé d'un isopenténoïde hydroxylé polycyclique possédant la structure d'un cyclopentano-1,2-phénanthrène. Ces composés contiennent généralement un nombre total d'atomes de carbone allant de 27 à 30 et une chaîne latérale attachée au carbone 17 (C-17) (figure 1. 14). Leurs structures sont intimement liées et varient selon le degré de modification du cycle et de la variation de la chaîne latérale [32]. L'hydrocarbure saturé correspondant au cholestérol est appelé le cholestane (**1**) dont le système de numérotation vaut pour tous les stéroïdes [75]:

L'étude des stérols dans les algues est déjà ancienne [76, 77, 78] et représente actuellement un domaine important des recherches menées par les biochimistes, les cliniciens, les systématiciens et les chimistes travaillant sur les substances naturelles et dans le domaine de la synthèse organique. La

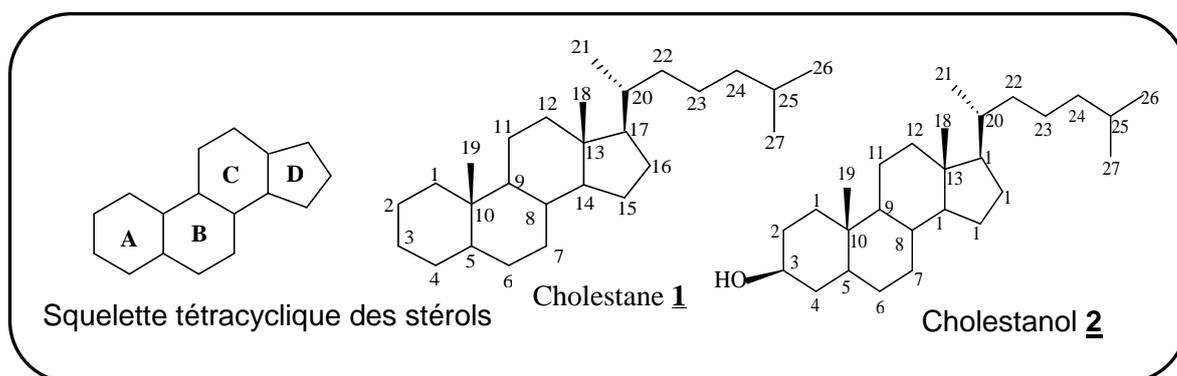


Figure 1. 14 : Squelette de base d'un stéroïde avec le système de numérotation des atomes de carbone appliqué pour la famille des cholestanes

Composition des stérols dans les algues marines a été étudiée dans différents travaux qui ont montré que les stérols en C-27 (figure 1. 15) sont les stérols majoritaires des Rhodophycées, le cholestérol (**3**) étant généralement le plus abondant [76, 79-87]. Dans les phéophycées, le fucostérol (**17**) est généralement le stérol dominant, alors que la composition stérolique des Chlorophytes, dont la

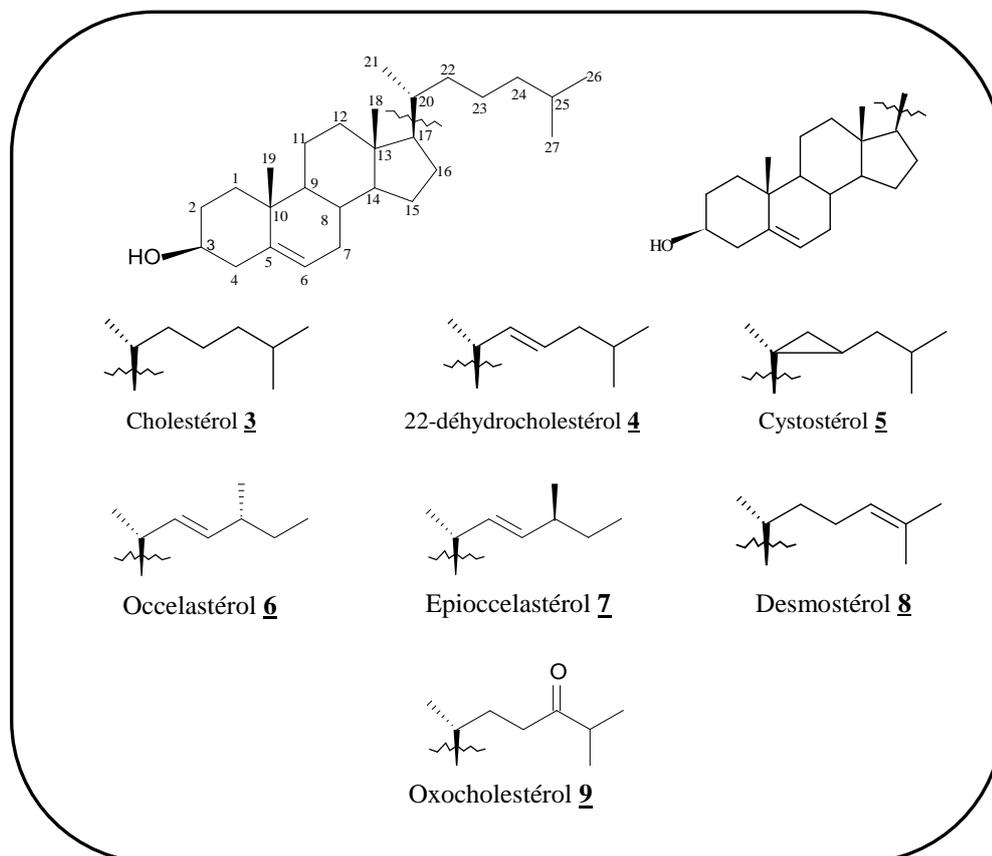


Figure 1. 15 : Principaux stérols en C₂₇ entrant dans la composition chimique des algues marines

structure est très similaire à celle des plantes terrestres, est beaucoup plus complexe et variée, elles peuvent contenir des stérols aussi divers que le clérostérol (**20**), le clionastérol (**26**), le cholestérol(**3**)... Les travaux réalisés dans ce domaine ont montré que dans chaque espèce, le stérol majoritaire est toujours accompagné d'autres stérols comme nous le décrivons dans cette synthèse bibliographique.

1.3.1.2 Stérols des algues rouges

Douze algues appartenant aux ordres Gelidiales, Cryptonemiales, Ceramiales et Gigartinales représentatives des algues marines rouges de la côte

sénégalaise ont été étudiées. L'identification des stérols a été réalisée par CG, montrant que le stérol dominant est le cholestérol (**3**) (73-94%), accompagnée en faible quantité d'autres stérols en C-27, C-28 et C-29 [79].

À côté du cholestérol deux autres stérols en C-27, le 22-déhydrocholestérol (**4**) et le desmostérol (**8**) apparaissent en quantité substantielle et peuvent être des stérols majoritaires dans certaines familles de l'ordre des Gigartinales. Le cholestanol (**2**) est le stérol majoritaire dans trois espèces de la famille des Gelidiacées. Il a été signalé que le Δ^7 cholestérol se trouve, parfois, en forte concentration dans quelques espèces d'algues rouges appartenant aux ordres Gelidiales, Cryptonemiales, Rhodymeniales et Gigartinales [81, 85, 86, 88-90]. Dans certains cas des traces de stérols en C-28 (figure 1. 16) et C-29 (figure 1. 17) ont été signalés. Il est généralement admis que les Rhodophytes ne sont pas capables de subir des réactions d'alkylation [79], cependant, plusieurs auteurs trouvent des stérols en C-28 ou en C-29 comme le 24-méthylène cholestérol (**10**), le campestérol (**11**), le brassicastérol (**14**) et le sitostérol (**22**) en quantité appréciable et parfois même comme composés majoritaires dans la famille des Amansiées [79, 83, 89-91]. Il a été aussi décrit que quelques espèces appartenant aux ordres Nemalionales, Rhodymeniales et Gigartinales contiennent des stérols avec une chaîne latérale hydroxylée [82, 92].

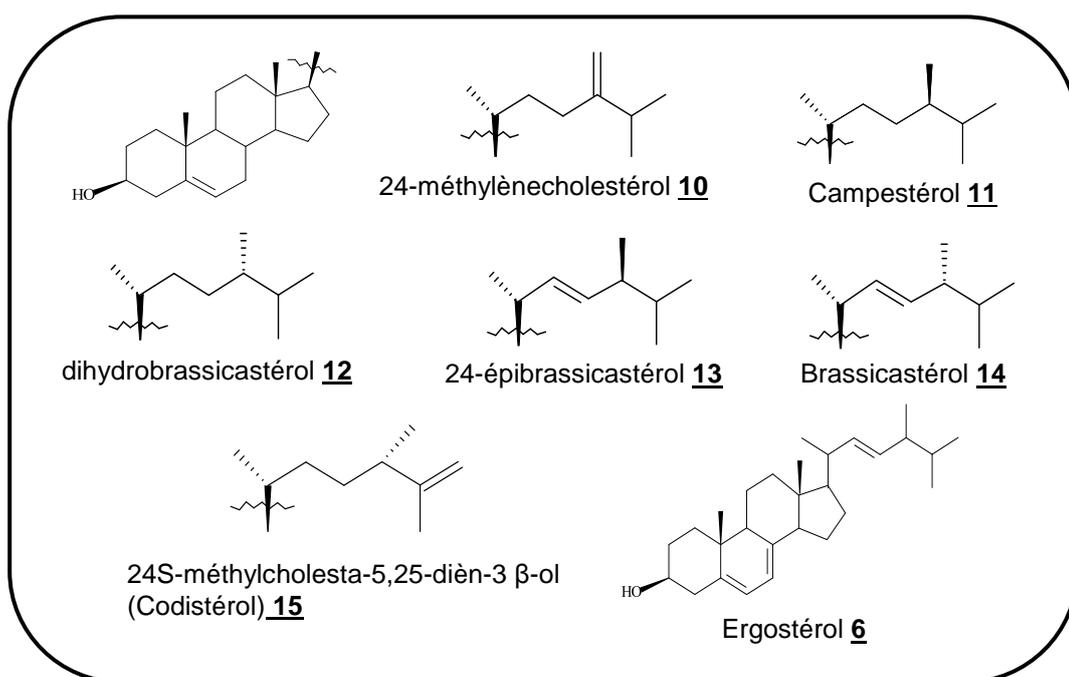


Figure 1. 16 : Principaux stérols en C₂₈ entrant dans la composition chimique des algues marines

Différents travaux ont été orientés vers la recherche de nouvelles structures dans ce domaine, deux nouveaux stérols ont été isolés à partir de l'algue rouge *Acantophora spicifera* (Vahl) (Baga, Goa, India) en plus d'un stérol connu le cholest-4-èn-3-one. Leur structure ainsi que leur stéréochimie ont été déterminées en utilisant la RMN du proton ^1H et du ^{13}C mono- et bidimensionnelle. Il s'agit du 11α -hydroxy- 5α -cholestane-3,6-dione (**27**) et du cholest-4-ène- $3\alpha,6\beta$ -diol (**30**) (figure 1. 18) [93, 94].

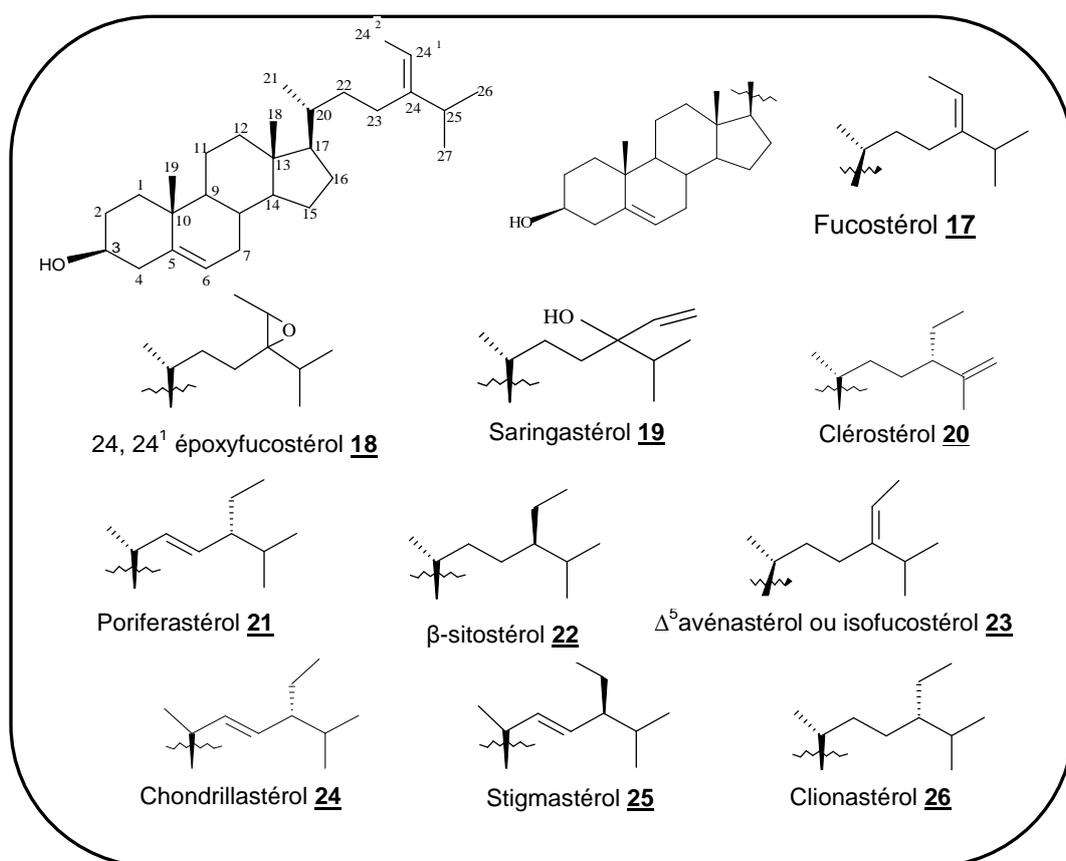


Figure 1. 17 : Principaux stérols en C_{29} entrant dans la composition chimique des algues marines

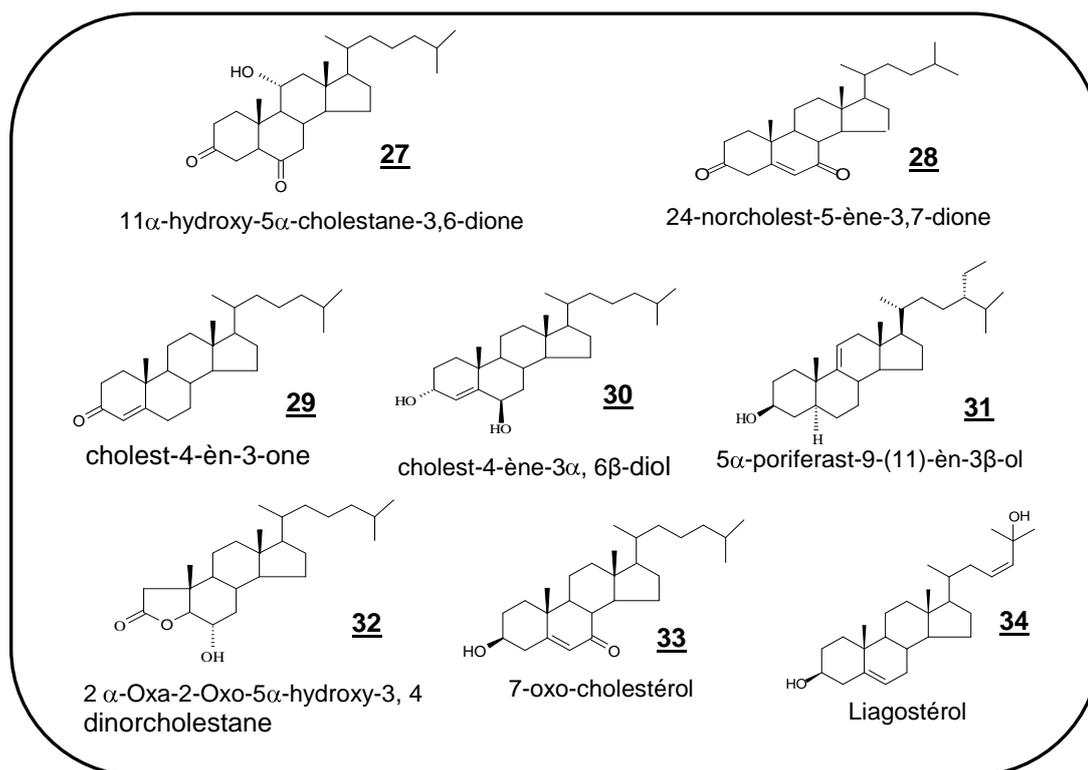


Figure 1. 18 : Stérols particuliers entrant dans la composition chimique des algues rouges

Une étude portant sur la composition stérolique a été effectuée sur une douzaine d'espèces d'algues rouges appartenant aux ordres Gelidiales, Cryptonemiales et Gigartinales. Le cholestérol est le stérol majoritaire de quatre espèces accompagné de stérols en C-26, C-28 et C-29. Des stérols tels que le 24-diméthyl-5-cholest-22-èn-3 β -ol, le cholest-22-èn-3 β -ol (**4**), le cholest-7-èn-3 β -ol, le 24 ζ -methylcholest-22-èn-3 β -ol (**11**) (Campestérol), le 24-méthylènecholest-3 β -ol (**10**), le 24 ζ -ethylcholest-22-èn-3 β -ol (clionastérol) (**26**) et l'isofucoesterol (**23**) ont également été décrits [95]. Un autre travail effectué sur dix sept espèces d'algues rouges a montré que les stérols en C-27 sont présents en quantité importante [96]. Simultanément, l'élucidation structurale du liagostérol (**34**) a également été décrite [96]. A partir des données spectrales et de réactions chimiques, un nouveau stérol : le 5 α -poriferast-9(11)-èn-3 β -ol (**31**) a été mis en évidence dans l'extrait hexanique de l'algue rouge *Gracilaria edulis* [97]. De même, l'analyse par CG-SM et par RMN du proton ^1H et du carbone ^{13}C a permis d'identifier pour la première fois un stéroïde minoritaire, le 2 α -oxa-2-oxo-5 α -hydroxy-3,4-dinorcholestane (**32**)

dans l'algue rouge *Laurencia obtusa* [98] (voir la figure 1. 18 qui donne un exemple de quelques stérols particuliers rencontrés chez les algues rouges).

La spectrométrie de masse haute résolution SMHR et la RMN du ^{13}C avec les séquences de DEPT ainsi que la RMN du ^1H , ont permis d'identifier un nouveau stérol en C_{26} . Il s'agit de la somalenone (24-norcholest-5-èn-3,7-dione) (**28**) isolée à partir de l'algue rouge *Melanothamnus somalensis* [99] (figure 1. 18). Trois autres stérols déjà connus (cholestérol (**3**), 7-oxo-cholesterol (**9**) et 24-méthylènecholestérol (**10**)) ont été identifiés pour la première fois dans cette algue [99].

Le formiate de cholestéryle a été identifié pour la première fois dans l'algue rouge *Grateloupia turuturu yamada*. L'extrait a été fractionné par chromatographie liquide (avec un gradient d'élution Hexane/AcOEt) et par CLHP préparative (100 % AcOEt). L'identification a été réalisée par la RMN du proton et du carbone. Le formiate de cholestéryle présente des caractéristiques structurales spécifiques qui peuvent être utilisées en chimiotaxonomie [100].

Les données spectrales issues de l'analyse par RMN du proton et du carbone 13 ainsi que la spectrométrie de masse à impact électronique (SMIE) ont été utilisées pour identifier les stérols de *Chondria armata* (Kütz). Cette algue contient en plus du cholestérol des stérols en C-28 et C-29 saturés et insaturés. Les stérols dominants sont le 24 β -éthylcholest-5-èn-3 β -ol (Clionastérol) (**26**) (18,02%), le 24-méthylène cholest-5-èn-3 β -ol (**10**) (11,5 %), le cholest-5-èn-3 β -ol (Cholestérol) (**3**) (12,02%), le 23 ξ -méthylcholest-5-èn-3 β -ol (9%), le 23 ξ -méthyl-5 α -cholestan-3 β -ol (6,7%), le 24 β -éthylcholest-5,22-dièn-3 β -ol (**24**) (4%). C'est le premier travail qui a porté sur les stérols libres des algues rouges du genre *Chondria* [101].

Les stérols libres de l'algue rouge *Asparagopsis armata* ont été purifiés par traitement à la digitonine, les stérols liés sont retenus sur une plaque épaisse de silice, la fraction stérolique ainsi purifiée a été injectée en chromatographie gaz-liquide (CGL) dans des conditions sélectives [102]. Le taux de stérols dans

Asparagopsis armata et son tetrasporophyte *Falkenbergia rufolanosa* (très liées du point de vue du cycle génétique) varie, respectivement, de 0,015% à 0,075% par rapport à la masse d'algue sèche. Quatre échantillons à différents stades de vie de l'algue ont été analysés par CGL et CG-SM. Cette étude montre que le cholestérol est souvent ou toujours le stérol majoritaire et que les cholesta-diène-diols (liagostérol et cholesta-5,25-diène-3 β , 24-diol) sont toujours présents [103].

1.3.1.3 Stérols des algues brunes

Le fucostérol (**17**), stérol en C-29 (figure 1. 17), considéré comme le stérol majoritaire des algues brunes, a été isolé, pour la première fois, à partir de *Fucus vesiculosus*, par Heilbron, Phipers et Wright [78]. Des quantités minoritaires de cholestérol, de 24-méthylène cholestérol, de 22-dehydrocholestérol, de 24-méthylcholesta-5,22-diène-3 β -ol (Epibrassica- stérol) (**13**) et de saringastérol (**19**) sont fréquemment détectées [78, 104-106]. Au cours de la recherche de substances biologiquement actives dans l'algue brune *Sargassum asperifolium*, une nouvelle saringastérone a été identifiée ainsi que le saringastérol. Il est à noter que le saringastérol a été identifié pour la première fois dans *Sargassum ringgoldianum* [107], mais il pourrait résulter d'une dégradation oxydative du fucostérol durant le processus de séchage de l'algue [108-110]. La CCM a été utilisée pour isoler ces composés, l'identification a été réalisée sur la base des résultats obtenus par la spectrométrie de masse à impact électronique, la spectrométrie de masse haute résolution à impact électronique (SMHRIE), La RMN du proton et celle du carbone ainsi que l'IR [111]. Une étude comparative a été réalisée sur des algues appartenant à deux ordres des phéophycées (les Fucales et les Dictyotales) en utilisant les techniques de CGL et CG-SM [112]. Elle a montré que le fucostérol et le cholestérol sont les stérols majoritaires et que la quantité de stérols chez les Fucales était 10 fois plus grande que pour les Dictyotales. En parallèle, trois nouveaux stérols ont été identifiés pour la première fois dans les algues brunes, à savoir, le 5 α -cholestan-3 β -ol (cholestanol) (**2**), l'ergosta-5,24-diène-3 β -ol (24-méthylène cholestérol) (**10**) et un stérol en C₃₀ [112].

Les stérols étudiés à partir des algues brunes *Zanardinia prototypus* Nardo et *Striaria attenuata* ont été purifiés sur des plaques de CCM préparatives de gel

de silice. Leur identification et leur quantification ont été réalisées par CGL et CG-SM. Elles ont montré qu'il existe une nette différence dans la composition des deux algues. Dans *Zanardinia prototypus* la composition en stérols est typique des algues brunes, le fucostérol (**17**) apparaît comme étant le stérol majoritaire (85%). D'autres stérols importants comme le cholestérol et le 24-méthylènecholestérol (**10**) existent à côté de quelques stérols minoritaires. Par contre, *Striaria attenuata* présente la composition suivante : fucostérol (**17**) (16%), cholestérol (**3**) (22%), 24-méthylènecholestérol (**10**) (18%), stigmastérol (**25**) (11%), sitostérol (**22**) (16%), brassicastérol (**14**) (2%) et isofucostérol (**23**) (6%) [113].

La composition stérolique de trois algues brunes *Stilophora rhizodes*, *Punctaria Latifolia* et *Punctaria plantaginea* de la mer Noire a été étudiée [114]. En utilisant les méthodes de CCM, CGL et CG-SM, dix sept stérols ont été identifiés : les principaux sont le cholestérol(**3**) et le 24-méthylène cholestérol (**10**), Le fucostérol (**17**) n'étant présent qu'en faible concentration. Les résultats obtenus ont été comparés avec des données récentes obtenues sur des algues brunes de la mer Noire conduisant à quelques propositions sur l'évolution des algues brunes [114]. Le travail effectué par M. C. Iatrides et al. a porté sur la séparation des stérols à partir de la fraction insaponifiable des extraits de trois algues brunes, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus serratus* et *Laminaria digitata*. L'insaponifiable a été fractionné par CCM puis les stérols séparés ont été analysés par CG, montrant que la composition en stérols d'*Ascophyllum nodosum* et de *Fucus serratus* sont analogues et se différencient de celle de *Laminaria digitata* [115].

Les stérols des deux algues brunes *Cystoseira barbata* et *Cystoseira crinita* ont été isolés successivement par CC et par CCM, puis analysés par CGL, et par CG-SM [116]. Cette étude a montré que la composition stérolique de ces deux algues était différente. La fraction stérolique de *Cystoseira barbata* est composée principalement de fucostérol (**17**) (95%), par contre, *Cystoseira crinita* contient en plus du fucostérol (61%) une quantité appréciable d'un stérol non usuel, il s'agit du 24-éthylcholesta-5,22-dièn-3 β -ol (Clérostérol) (**20**) (25%) [116]. En ce qui concerne *Cystoseira abies-marina*, les stérols ont été séparés après saponification

et acétylation sur des plaques de CCM. Leur analyse montre que la composition stérolique est typique de celle des algues du genre *Cystoseira*. Cette algue contient le 22-déhydrocholestérol (**4**) (à l'état de traces), le cholestérol (**3**) (0,7%), le brassicastérol (**14**) (1,2%), le 24-méthylènecholestérol (**10**) (1,1%) et le fucostérol (**17**) (96,9%) [117].

L'étude de la fraction stérolique par CLHP des algues brunes *Aureococcus anophagefferens* et *Aureoumbra lagunensis*, a permis d'isoler et de caractériser les stérols ainsi que de donner leur composition [118, 119]. *Aureococcus anophagefferens* contient le 24-méthylènecholestérol (**10**) (48%) et les deux isomères (24E) et (24Z) du 24-propylidènecholestérol (**35** et **37**) (32% et 12 %, respectivement). *Aureoumbra lagunensis* se compose du (24 E)-propylidènecholestérol (**35**) (37%, stérol dominant), du stigmastérol (**25**) (22.2%), du sitostérol (**22**) (19.2%), du cholestérol (**3**) 14.1%) et du (24R)-propylcholestérol (5,2%). La synthèse chimique de ce dernier a permis d'élucider la configuration absolue du carbone C-24. On peut supposer qu'*Aureococcus anophagefferens* soit la seule source algale de (24Z)-propylidènecholestérol (**37**), alors qu'on le rencontre dans divers invertébrés marins. Ce produit a été proposé en tant que biomarqueur chimiotaxonomique unique de l'espèce *Aureococcus anophagefferens* [118, 120]. Les deux stéréoisomères **35** et **37** sont des stérols en C-30 dont les principaux sont représentés dans la figure 1. 19.

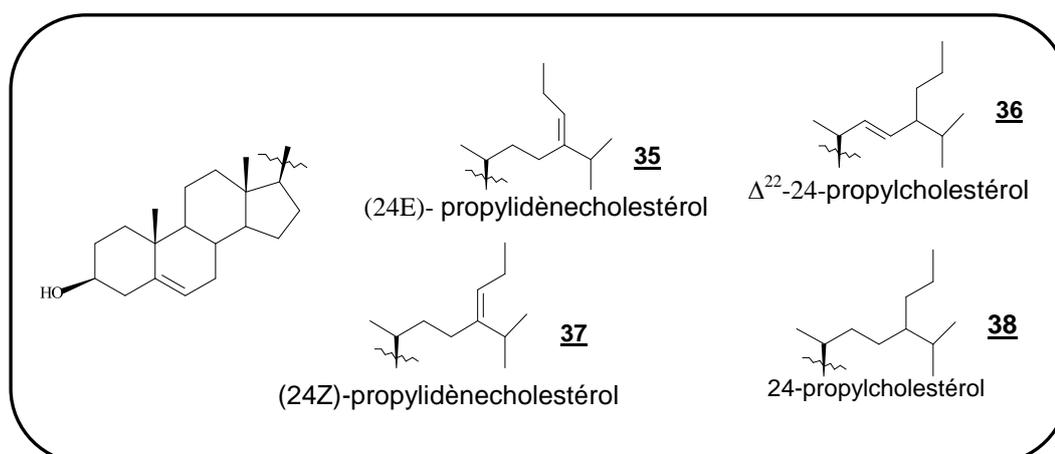


Figure 1. 19 : Principaux stérols en C₃₀ entrant dans la composition chimique des algues marines

Des travaux ont montré que l'algue brune *Padina vickersiae*, contrairement aux algues brunes, renferme une quantité appréciable de cholestérol dans les divers stades de sa croissance [121]. La variation saisonnière de la composition stérolique a été étudiée et comparée à d'autres Phéophycées appartenant au genre *Cystoseira* [121]. Une autre étude, basée sur la CLHP analytique a permis de mettre au point le dosage, à la fois des stérols et des diterpènes dans quelques espèces de la famille des Cystoseiracées [122], les stérols étant globalement analysés, dans ce cas, en tant que fucostérol. La CLHP en phase normale, en utilisant l'étalonnage interne, a été adaptée pour quantifier les stérols. Les quantités globales de stérols trouvées ont été de 1,34, 0,7 et 1,4 mg g⁻¹ d'algue sèche, respectivement pour *Bifurcaria biburcata* (Ross) (côte atlantique, Cap Blanc, Maroc), *Bifurcaria biburcata* (Ross) (côte atlantique, Casablanca, Maroc) et *Cystoseira stricta* (Mont.) Sauv. (côte méditerranéenne, Saint Aygulf, Var, France) [122]. Dans le but d'étudier la variation saisonnière de la composition chimique de *Bifurcaria biburcata* (Ross) (côte atlantique française (Roscoff)), une récolte mensuelle a été analysée. Le taux de stérols le plus important a été remarqué pendant les mois d'octobre (5,9 mg g⁻¹ d'algue sèche) et mars (4,3 mg g⁻¹ d'algue sèche) [123].

1.3.1.4 Stérols des algues vertes

Les ordres les plus primitifs des algues vertes tels que les Volvocales et les Chlorococcales contiennent une variété de stérols, généralement, en C-28 et C-29 et souvent avec une insaturation en C-22. Alors que dans les ordres de structure plus complexe comme les Ulvales, les Caulerpales et les Cladophorales, des stérols comme le clionastérol (**26**) et ceux avec double liaison en C-24 (28) sont dominants [124]. Dans des espèces d'algues vertes appartenant aux ordres Zygnematales (Desmidiaceae), il a été noté la présence de stérols avec double liaison en C-5 et en C-5 et C-22 [125]. Pour les Ulotrichales, on rencontre des stérols en C-28 et C-29 insaturés Δ^5 , accompagnés par leurs analogues $\Delta^{5,24(28)}$ dans lesquels les stérols en C-29 possèdent la configuration 24-(28) Z [125], les Volvocales renferment, pour leur part, des stérols insaturés Δ^5 et Δ^7 . Il a été décrit dans les Chlorococcales la présence de deux stérols en C-28 insaturés Δ^5 et $\Delta^{5,7,22}$ [125].

Dans treize algues vertes des côtes sénégalaises appartenant aux ordres Ulotrichales, Cladophorales et Siphonales, la chromatographie en phase gazeuse CG et la CG-SM ont été utilisées pour analyser les stérols [126]. Ces derniers ont été isolés sous forme de complexe de digitonine ou par CCM préparative (gel de silice), puis recristallisés dans le méthanol et analysés après avoir subi la réaction d'acétylation. Dans l'ordre des Ulotrichales représenté par cinq espèces d'Ulvacées, l'isofucostérol (**23**) est le stérol majoritaire, tandis que l'ordre des Cladophorales ne semble pas présenter de stérol typique. La fraction stérolique de dix espèces des Cladophorales se compose d'un mélange complexe où trois stérols : le clionastérol (**26**), le 24-méthylène cholestérol (**10**) et le cholestérol (**3**) dominant ; l'isofucostérol (**23**) a également été décrit plusieurs fois avec des taux variables. *Cladophora vagabunda* renferme un stérol à chaîne latérale courte (**39**) à l'état de traces, résultant probablement d'une dégradation oxydative (voir figure 1. 20 sur les stérols à chaîne latérale courte) [127]. Dans cette espèce, le clionastérol (**26**) est majoritaire (55,8%), suivi du 24-méthylène cholestérol (**10**) (13,5%). La concentration en cholestérol est faible (5,7%), contrairement à ce qui a été décrit pour l'espèce provenant de la mer Noire où ce dernier est majoritaire (35,7%), accompagné de 24-méthylène cholestérol(**10**) (27.5%) et de clionastérol (**26**) (13.4%). Pour les six espèces de l'ordre des Siphonales étudiées, à l'exception du genre *Codium*, le clionastérol est prépondérant [128]. Le genre *Codium* est quant à lui caractérisé par la présence du (24S)-éthylcholesta-5,25-dien-3 β -ol (clerostérol) (**20**) qui est le stérol majoritaire, suivi de son homologue le (24S)-méthylcholesta-5,25-dien-3 β -ol (codistérol) (**15**). Ces résultats sont en accord avec les travaux antérieurs rapportés sur l'espèce *Codium fragile* récoltée en deux lieux différents [129, 130]. Signalons, également dans les deux espèces de *Caulerpa*, étudiées : *Caulerpa taxifolia* et *Caulerpara racemosa*, la dominance du clionastérol (**26**) (77,5%) et la présence de quantités importantes de fucostérol (**17**) (17,1%) [126].

Les stérols totaux de l'algue verte récemment introduite en Méditerranée *Caulerpa taxifolia* ont été dosés par CLHP en phase normale. La fraction stérolique, analysée par CGL après acétylation, montre la présence d'un stérol majoritaire, le clionastérol (1,1mg/g d'algue sèche) [131], accompagné de petites

quantités de cholestérol, 24-méthyl-cholestérol (Campestérol) (**11**), 24-méthylène-cholestérol (**10**) et (24S)-ethylcholesta-5,25-dien-3 β -ol (clerostérol) (**20**). Les auteurs de cet article pensent que le clionastérol, présent dans plusieurs autres espèces du genre *Caulerpa*, peut être considéré comme un marqueur chimiotaxonomique du genre [131]. Un stérol rare en C-28 (24S-méthylcholesta-5,25-dièn-3 β -ol) (**15**) a été isolé de *Codium bursa* et son acétate a été décrit comme composé minoritaire dans la fraction stérolique de *Codium fragile*. Des études se poursuivent dans la famille des Codiaceés, dans le but d'établir des corrélations chimiotaxonomiques [132].

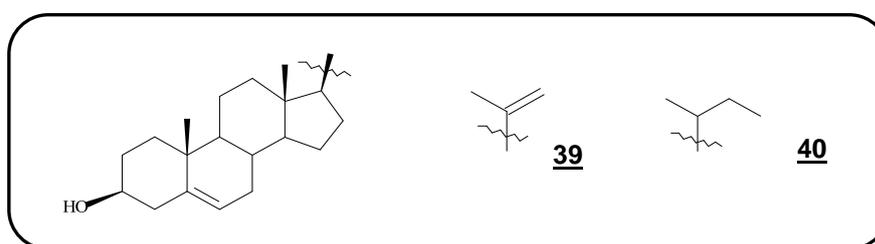


Figure 1. 20: Stérols à chaîne linéaire courte entrant dans la composition chimique des algues vertes

Des études ont été réalisées simultanément sur les stérols d'algues appartenant aux deux ou même aux trois catégories d'algues (rouges, brunes et vertes). Une méthode a été mise en œuvre pour le dosage des stérols dans cinq algues potagères (trois brunes et deux rouges) [133]. La CLHP-SM a été utilisée afin d'identifier les stérols. L'insaponifiable a été extrait par l'hexane et les stérols ont été dosés par CLHP avec détection UV (CLHP-UV). Les taux des stérols dans les algues brunes (*Himanthalia elongata*, *Undaria pinnatifida*, *Laminaria ochroleuca*) et les algues rouges (*Palmaria sp.* et *Porphyra sp.*) ont ainsi été déterminés : le fucostérol a été le stérol dominant dans les algues brunes (83 - 97%, soit 662 - 2320 $\mu\text{g g}^{-1}$ d'algue sèche), par contre le desmostérol a été le stérol prépondérant dans les algues rouges (87 - 93%, soit 187 - 337 $\mu\text{g g}^{-1}$ d'algue sèche) [133].

Les stérols de treize espèces, appartenant aux trois catégories d'algues de la mer Noire, ont été isolés à partir de l'insaponifiable par deux méthodes : en utilisant un large excès de digitonine et par la CCM préparative sur gel de silice. Ensuite, les stérols ont été acétylés et analysés par CG-SM. Le cholestérol est le

stérol majoritaire des algues rouges étudiées. Le fucostérol est le stérol dominant des algues brunes étudiées à l'exception de *Sargassum boveanum*. Pour l'algue verte *Dictyosphaeria cavernosa*, l'ergostérol (**16**) est le stérol prépondérant [134].

De même, Le taux de cholestérol (**3**) a été déterminé dans onze algues (cinq rouges, quatre vertes et deux brunes) provenant de la mer des Caraïbes. Les extraits ont été analysés par CCM et CGL. Toutes les algues étudiées comportent une quantité importante de cholestérol (**3**) à l'exception de l'algue verte *Bryopsis plumosa* [135]. Des études antérieures ont montré que le cholestérol est un stérol minoritaire dans les algues vertes à l'exception d'espèces appartenant aux ordres Cladophorales. Dans les deux espèces de *Caulerpa* étudiées : *C. racemosa* et *C. sertularioides*, la quantité de cholestérol trouvée a été comparable à celle des algues rouges. Par contre dans *Caulerpa prolifera*, le clionastérol (**26**) a été identifié comme étant le stérol majoritaire [136].

1.3.1.5 Stérols glucosiques

Pour vérifier la présence des stérols glucosiques libres et acylés dans les algues, une étude a été menée sur les trois classes d'algues [137]. Il a été montré que les algues vertes (*Ulva gigantea* et *Cladophora rupestris*), les algues rouges (*Rhodomenia palmata* et *Porphyridium sp.*) et les algues brunes (*Fucus vesiculosus* et *Ascophyllum nodosum*) contiennent, en plus des stérols libres, des stérols glucosiques et les stérols glucosiques acylés correspondants. Le taux des différentes formes de stérols est faible [137]. Par ailleurs, L. M. SAFE [138], en utilisant les résultats obtenus par G. Ourisson [128, 139] a étudié en plus des stérols lipidiques et des stérols libres, une variété de stérols solubles dans l'eau sous forme de complexes glucosiques.

Une autre étude a été réalisée sur l'extrait de *Codium iyengariide* des côtes de Karachi [140]. Elle a révélé la présence d'un nouveau stéroïde : l'iyengadione avec deux glycosides stéroïdaux (iyengaroside-A (**41**) et iyengaroside-B (**42**)) (figure 1. 21) auxquels s'ajoute le galactoside du clérostérol. L'identification structurale a été réalisée grâce à la RMN mono- et bidimensionnelle (1D et 2 D) [140].

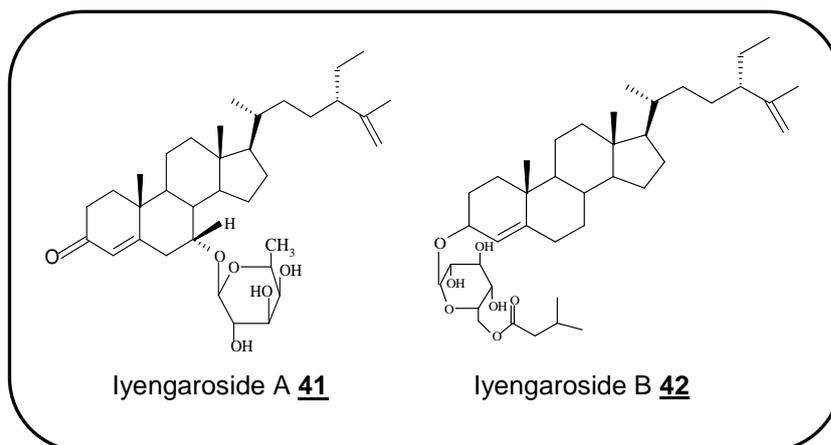


Figure 1. 21 : Stérols glucosiques entrant dans la composition chimique des algues marines

1.3.1.6 Stérols des algues toxiques

Des stérols originaux ont été isolés à partir d'algues toxiques [118, 119, 120, 141] (figure 1. 22). Suite à ces travaux, une analyse des stérols de trois algues toxiques (Dictyochophycées) a été effectuée en utilisant la CLHP en phase normale et la RMN. L'espèce *Chloromorom toxicum* possède des stérols avec un groupement éthyle sur le C-24. Les stérols majoritaires de cette algue sont le 24R-stigmasta-5,22-dièn-3 β -ol (poriferastérol) (**21**) : 83% et le (24 S)-stigmasta-5-èn-3 β -ol (clionastérol) (**26**) : 11%. Résultat obtenu après avoir étudié la stéréochimie des stérols isolés de *Chloromorom marina* et *Heterosigma akashiwo* (Raphidophycées). Dans *Karenia brevis* le dinostérol (**43**) et son analogue le 27-nor-dinostérol (**44**) coexistent. Les algues *Verrucophora farcimen* et *verrucophora verruculosa* contiennent exclusivement l'occelastérol qui est décrit pour la première fois chez une algue marine. Ce stérol rare constitue un marqueur chimiotaxonomique de ces espèces [142].

Il est à noter que le nombre de nouveaux stérols isolés est toujours croissant, et que cette classe de composés présente des activités biologiques diverses [108, 143-148].

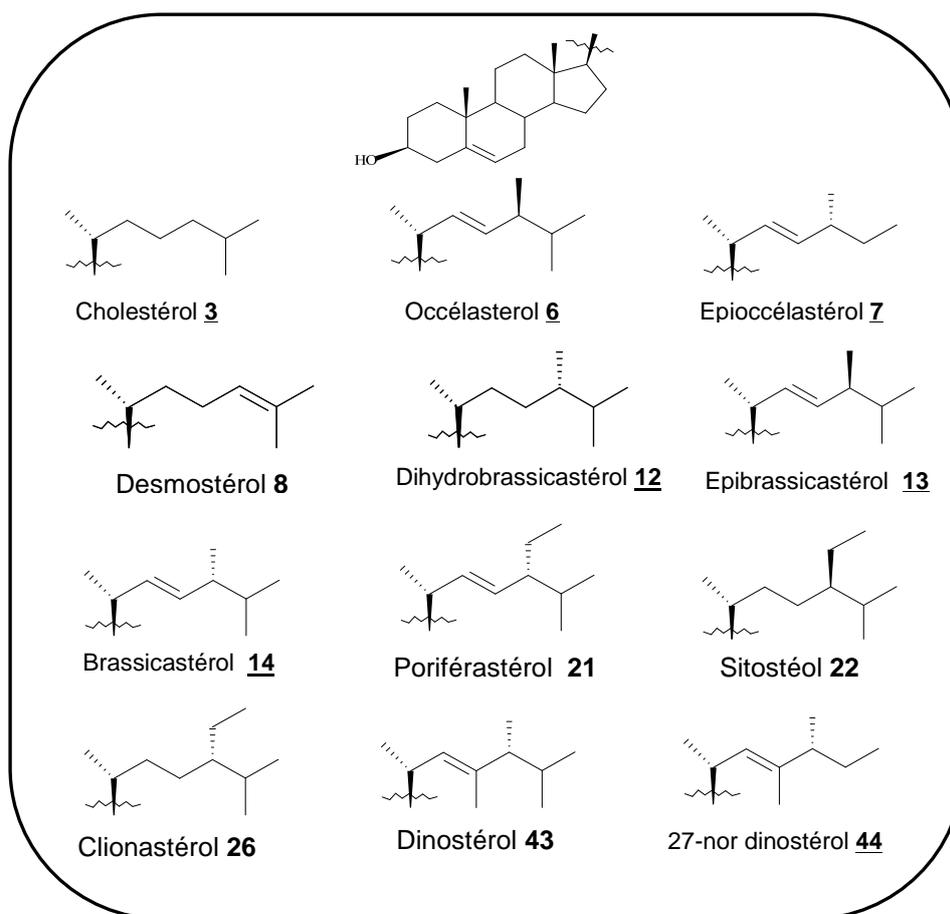


Figure 1. 22 : Stérols entrant dans la composition chimique d'algues marines toxiques

En résumé, La plupart des travaux ayant portés sur l'identification des stérols des algues marines a été effectuée par CG-SM. Il s'agit d'une technique sensible mais qui ne permet pas de préciser la configuration au niveau du C-24, d'où la nécessité d'utiliser d'autres techniques telles que la RMN [118-120]. En ce qui concerne le dosage global des stérols, les travaux sont effectués par chromatographie liquide haute performance/indice de réfraction différentiel (CLHP/IRD) en phase normale, en utilisant l'étalonnage interne [122, 123]. Néanmoins, La CLHP en phase inverse a aussi été employée pour purifier la fraction stérolique dans certains extraits d'algues [119, 120]. Les stérols ont été également identifiés par CLHP-SM. Après saponification et extraction liquide-liquide, ils sont dosés par CLHP/UV [133, 142]. Les stérols libres sont très souvent transformés en dérivés silylés ou acétylés et dosés par CG-SM ou CGL [115, 129, 130, 134].

1.3.2 Composition phénolique des algues marines

1.3.2.1 Généralités

Les composés phénoliques sont par définition des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont issus du métabolisme de l'acide shikimique et / ou de celui d'un polyacétate [149]. Ils sont très largement répandus dans le règne végétal. Ces composés phénoliques, dont seules ici les structures non terpéniques seront présentées, entrent dans la composition chimique des algues marines. Ils peuvent être des oligophénols ou des polyphénols appelés également phlorotanins. C'est au début du siècle dernier, que les premiers travaux portant sur ces molécules ont vu le jour [150]. Des travaux récents ont montré que les phlorotanins manifestent plusieurs perspectives thérapeutiques, telles que des activités antidiabétique, antioxydante, protection contre les radiations, anti-cancer, anti-VIH ainsi que des activités anti-allergiques [151-156]. De même, ces molécules interviennent surtout comme antimicrobiens et antiappétants vis-à-vis des herbivores [157, 158]. On a remarqué aussi une puissante activité algicide [159, 160], le phlorofucofuroeckol isolé à partir d'espèces du genre *Ecklonia* (*E. kurome* et *E. cava*) exerce une activité de ce type vis-à-vis des crabes et des poissons [160, 161].

1.3.2.2 Extraction, purification et analyse

Les phlorotanins sont extraits avec de l'alcool aqueux ou à l'acétone à partir d'algues fraîches ou congelées. L'extraction est réalisée de préférence sous une atmosphère inerte et sous lumière réduite. L'extraction avec l'acide sulfurique dilué ou l'acide oxalique est aussi efficace, bien qu'elle nécessite par la suite un traitement délicat. 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 et les phlorotanins sont récupérés par extraction à l'acétate d'éthyle. Les polyphénols ayant une très grande affinité à l'oxygène de l'air, une acétylation ou une peracétylation préalable semble être préliminaire à toute étude. Les phlorotanins acétylés ou peracétylés sont purifiés par CLHP et par 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. L'élucidation structurale est réalisée grâce aux techniques spectrométriques

classiques (SM, RMN, FTIR et UV-Visible) [161]. Une seule fois l'élucidation structurale d'un phlorotanin a été réalisée par rayons X [162].

1.3.2.3 Structure chimique et source

Les dérivés phénoliques issus des algues brunes peuvent être divisés en deux groupes :

- Les dérivés monophénoliques,
- Les dérivés polyphénoliques (phlorotanins).

1.3.2.3. 1 Les dérivés monophénoliques

Les monophénols comme l'indique le nom ne contiennent qu'une seule unité phénolique avec un, deux ou trois groupements hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction. Ils peuvent être classés en trois groupes :

a) Les dérivés du phénol :

Ils sont de deux types : lipidiques [163] ou bromés [148, 163-166].

b) Les dérivés du résorcinol :

Ils sont caractérisés par une substitution en méta du groupement phénolique [167].

c) Les dérivés du phloroglucinol :

Divers dérivés du phloroglucinol ont été isolés à partir d'espèces appartenant aux genres *Cystophora* [167, 168] et *Zonaria* [169-171].

1.3.2.3.2 Les dérivés polyphénoliques (phlorotanins)

Les phlorotanins sont issus de couplages radicalaires, carbone-carbone ou carbone-oxygène à partir du phloroglucinol. Ceux-ci peuvent être classés en cinq groupes.

1.3.2.3.2.1 Fucols

Ce sont des dehydrooligomères simples du phloroglucinol. Ils sont obtenus par des liaisons aryl-aryl de phloroglucinol. Des exemples de Fucols sont décrits

dans la figure 1. 23. Il convient de citer le difucol (**1**) isolé de *Fucus vesiculosus*, le trifucol (**2**) de *Fucus spiralis* [150] et le tetrafucol B (**3**) de *Analipus japonicus* [172]. Des fucols dont le noyau phloroglucinol est halogéné (**4**) ont été aussi décrits dans *Analipus japonicus* [172].

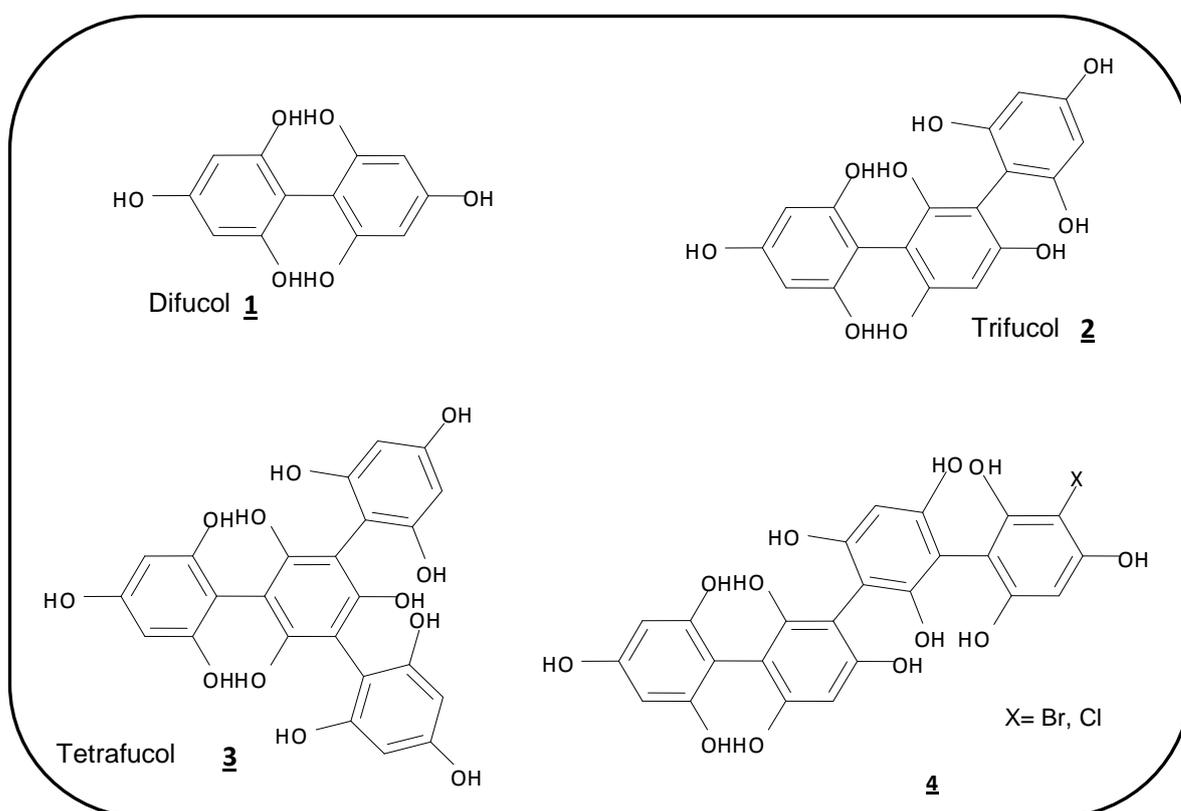


Figure 1.23 : Exemples de fucols

1.3.2.3.2.2 Phloréthols

Ce sont des dehydrooligomères 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* conduisent rapidement à un très grand nombre de structures dès que le nombre de noyaux phloroglucinol augmente (figure 1. 24).

Un système de nomenclature particulier permet de repérer les positions ortho et para des cycles consécutifs les uns par rapport aux autres [150]. Les composés les plus simples de ce groupe sont le diphloréthol (**5**) isolé de *Bifurcaria bifurcata*, le triphloréthol A (**6**) de *Cystophora congesta* et le triphloréthol B (**7**) de *Cystophora granulata*.

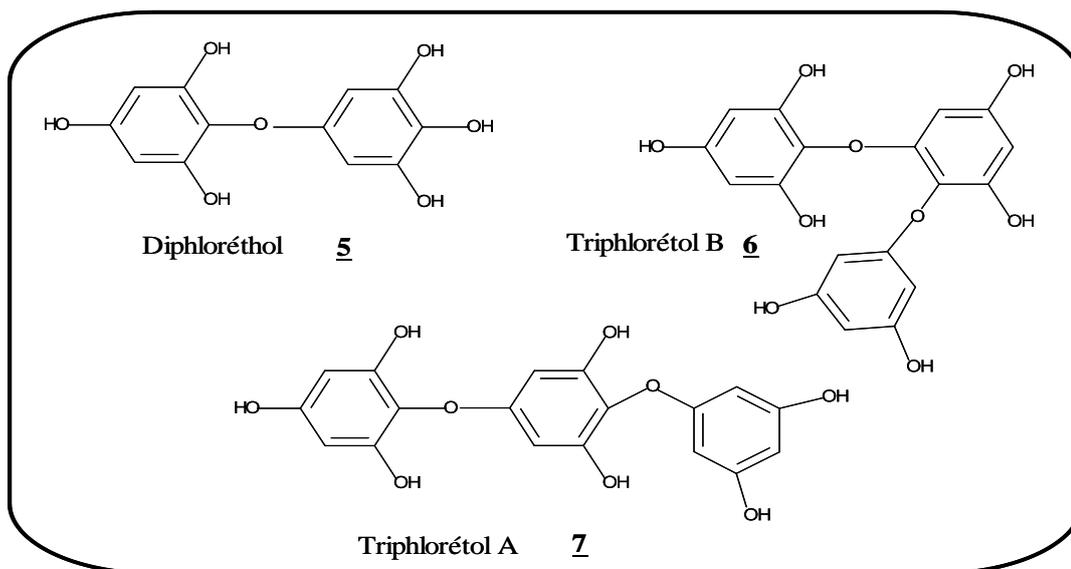


Figure 1. 24 : Exemples de phloréthols

1.3.2.3.2.3 Fucophloréthols

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. Trois exemples sont donnés dans la figure 1. 25 : le fucophloréthol A (**8**) (*Fucus vesiculosus*), le fucotriphloréthol F (**9**) (*Durvillea antarctica*) [150] et le fucodiphloréthol G (**10**) (*Ecklonia cava*) [161].

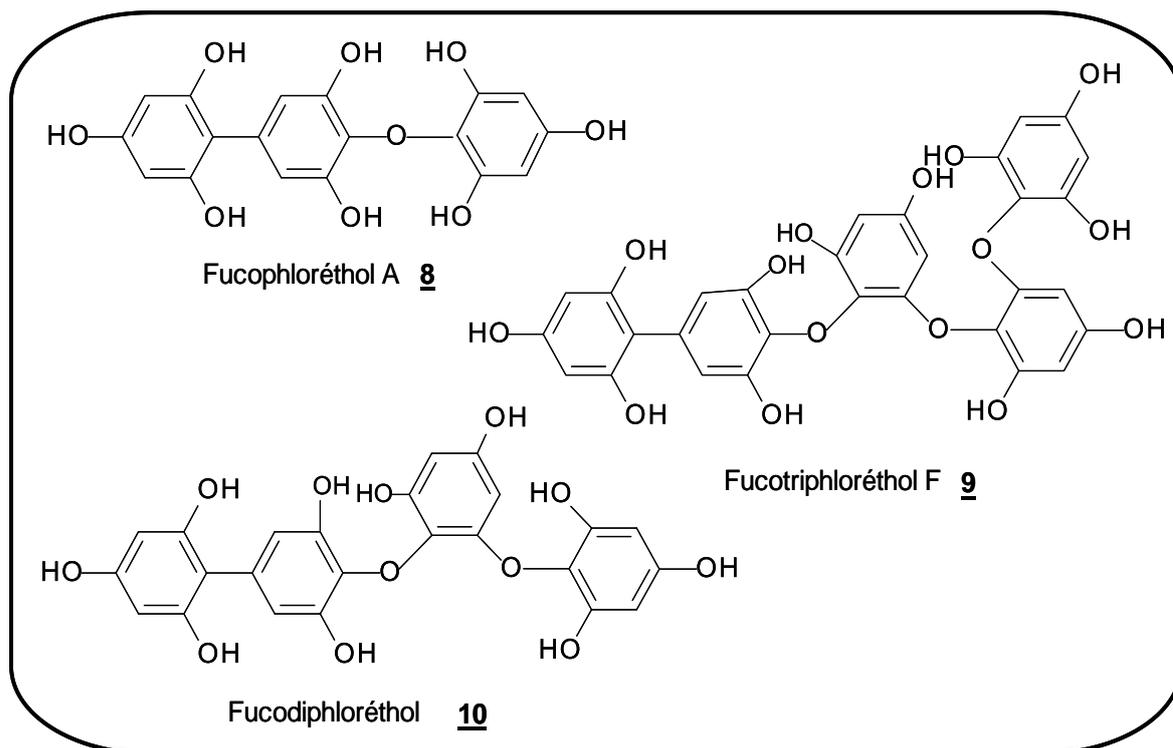


Figure 1. 25 : Exemples de fucophlorethols

1.3.2.3.2.4 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 (**11**) isolé à la fois dans *Bifurcaria bifurcata* [173] et dans *Halidrys siliquosa* [174]. On a isolé aussi le tétrafuhalol C (**12**) de *Cystoseira baccata* [175] (figure 1. 26).

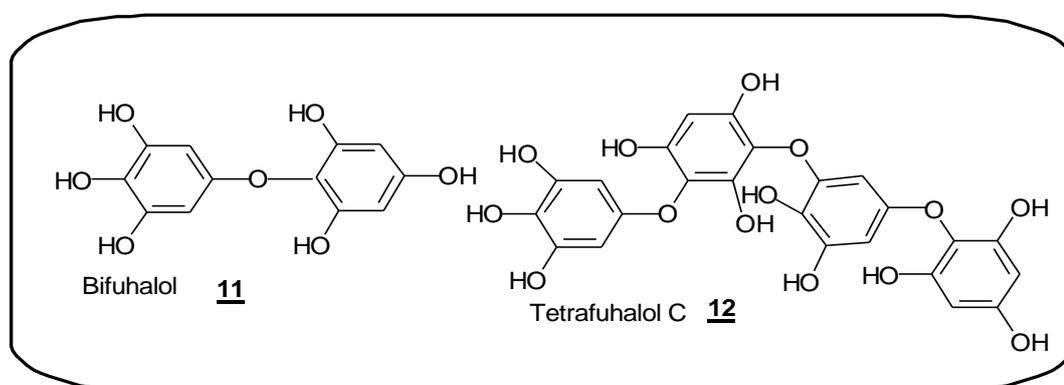


Figure 1. 26 : Exemples de fuhalols

1.3.2.3.2.5 Eckols

Ce sont des dehydrooligomères d'au moins trois unités de phloroglucinol, 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). Des exemples d'eckols sont donnés dans la figure 1. 27. Il s'agit d'un eckol (**13**) isolé d'*Ecklonia kurome* [176], de l'eckol **14** isolé d'*Eisenia arbora* [177], et des 8, 8'-bieckol (**15**) [178], 6, 6'-bieckol (**16**) et du dieckol (**17**) isolés d'*Ecklonia cava* [161].

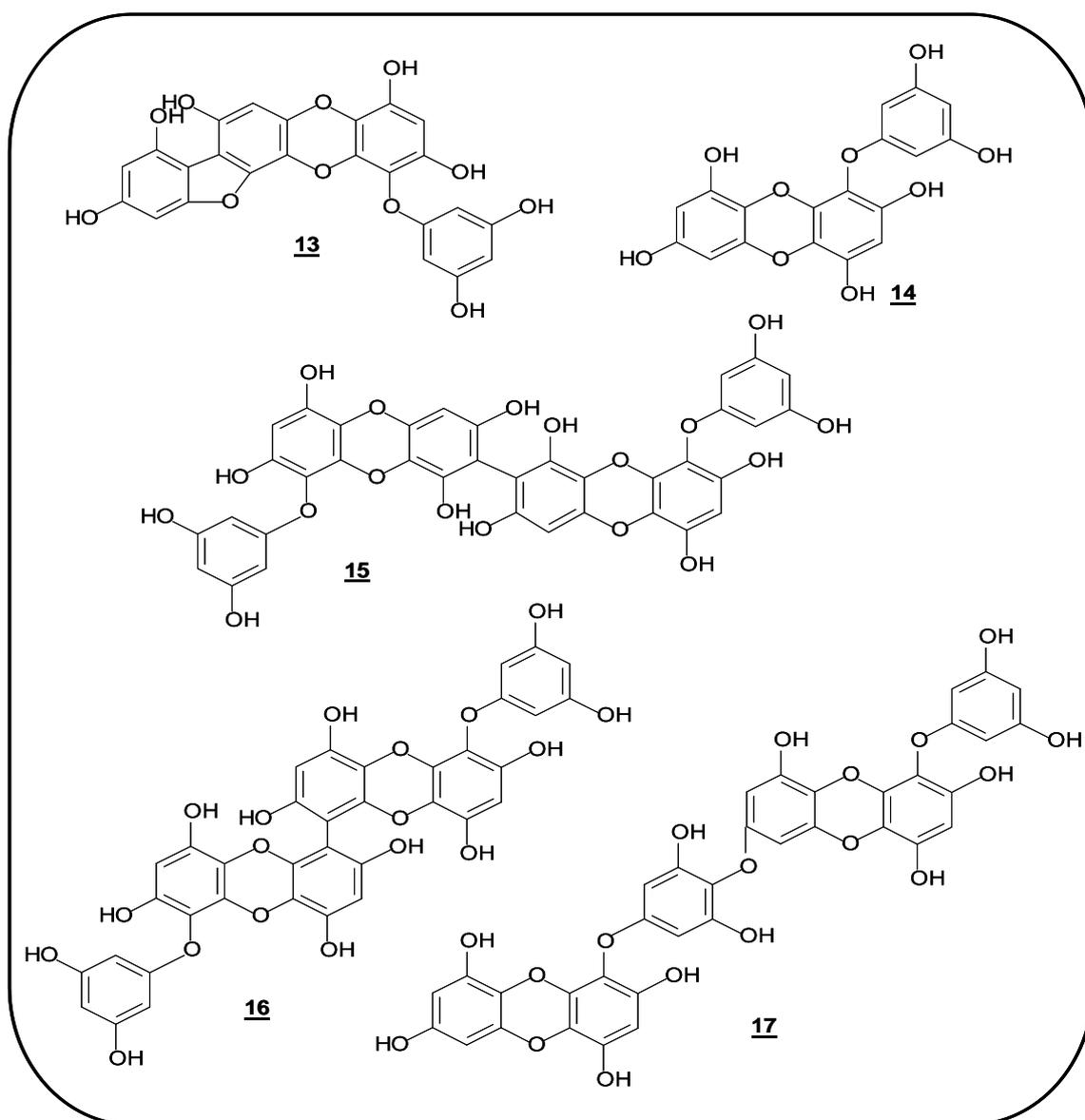


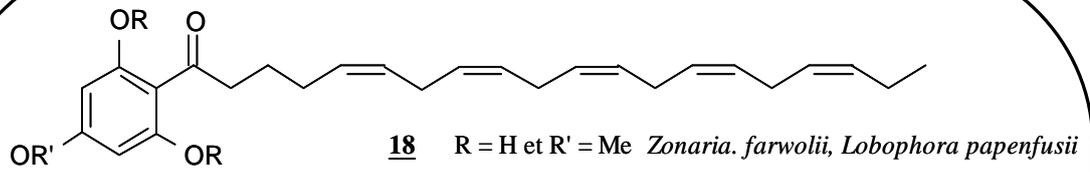
Figure 1. 27 : Exemples d'Eckols

1.3.2.3.3 Autres dérivés du phloroglucinol : Etat des connaissances sur la Composition chimique des genres *Zonaria* et *Lobophora*

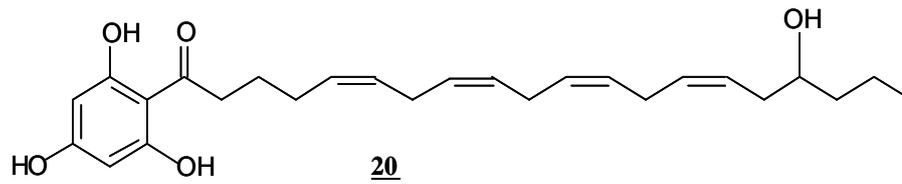
L'étude des métabolites secondaires de certaines espèces des genres *Zonaria* et *Lobophora* a permis d'isoler des dérivés du phloroglucinol. Il s'agit en fait d'un couple radicalaire C-C simple entre le phloroglucinol et une chaîne carbonée portant une fonction cétone et/ou alcool.

Les travaux de W. Gerwick et al [170] sur les espèces *Z. farwolii* (Setchell and Gardner) récoltée sur les côtes sud de la Californie et *Z.diesingiana* (J.Agardh) de l'herbier Fukuoka du Japon, ont permis d'isoler trois nouveaux produits (**18-20**) (figure 1. 28).

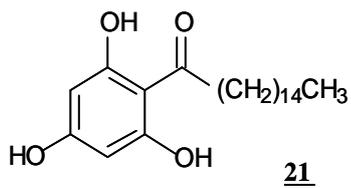
Deux autres dérivés du phloroglucinol (**21** et **23**) ont été isolés à partir de l'espèce *Lobophora papenfussii* récoltée sur les côtes nord-ouest de l'Islande [170] et deux autres dérivés (**22** et **24**) sont reportés dans le livre de J. M. Kornprobst [180]. L'espèce *Zonaria* de méditerranée appelée *Zonaria tournefortii* (Lamouroux) a fait l'objet de travaux de la part de V. Amico [169, 171] et C. Tringali [179, 181]. 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 (**24 - 29**) à partir de l'extrait lipidique traité par la soude (figure 1. 29). Ce traitement permet de concentrer les phénols.



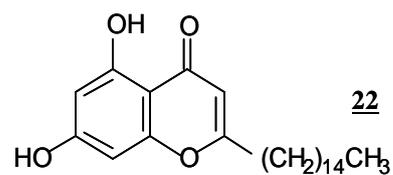
19 R = R' = H *Z. diesingiana**, *Z. crenata*, *Z. farlowii*, *Z. angustata*⊠, *Z. turneriana*



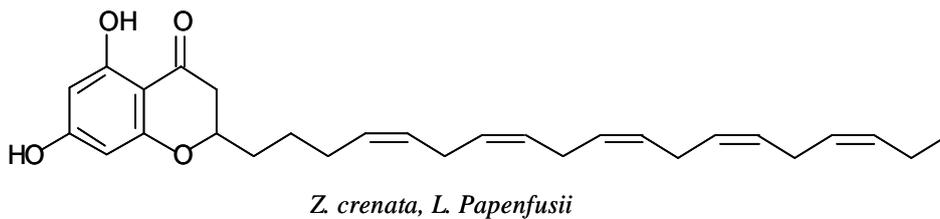
Z. turneriana, *Z. crenata*, *Z. angustata*, *Z. diesingiana**, *L. Papenfusii*



Z. diesingiana, *Z. farlowii*, *L. Papenfusii*



Z. crenata



Z. crenata, *L. Papenfusii*

*: composé majoritaire
⊠: composé minoritaire

Figure 1. 28 : Dérivés du phloroglucinol à partir des genres *Zonaria* et *Lobophora*

CHAPITRE 2

DETERMINATION DES STEROLS TOTAUX DANS L'ALGUE ROUGE *ASPARAGOPSIS ARMATA* PAR SPECTROMETRIE IRTF : ETUDE COMPARATIVE PAR CLHP

2.1 Introduction

De nombreuses études portées sur la répartition des stérols dans diverses classes d'algues ont été décrites [97, 99, 113, 115, 135]. La composition des stérols fournit de l'information intéressante sur les deux plans chimiotaxonomique et écologique [115, 182]. Des études bibliographiques ont révélé que le principal stérol d'algues rouges est généralement le cholestérol et que dans certains autres travaux le cholestérol a été le seul stérol présent [135, 182].

Actuellement, la procédure typique d'isolement des stérols à partir d'algues est basée sur l'extraction de la fraction lipidique brute avec un mélange de dichlorométhane et de méthanol suivie de saponification [183]. La fraction insaponifiable est généralement analysée par des méthodes chromatographiques. La chromatographie en phase gazeuse est très utile pour la détermination de la composition des stérols au sein de la fraction stérolique [184, 91, 185, 80]. De plus, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase normale [122] et en phase inverse [118, 119, 186], ont, également, été utilisés pour séparer et purifier la fraction stérolique d'algues. Des efforts récents pour la découverte de nouveaux stérols d'algues ont été concentrés sur le développement des procédures d'isolement, de techniques de purification et de l'utilisation de différentes méthodes d'analyse [98, 116, 146]. Toutefois, il existe peu de travaux antérieurs sur l'utilisation de la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) qui a, généralement, été utilisée comme méthode complémentaire pour l'identification des stérols d'algues. Sekkal et al. ont utilisé la spectrométrie

infrarouge comme une technique de base pour l'élucidation de la structure d'un polysaccharide dans une algue rouge [187], c'est la seule application de la spectrométrie infrarouge dans ce domaine.

Le principal objectif de la présente étude a été l'élaboration d'une nouvelle procédure pour la détermination du taux des stérols contenus dans l'algue rouge *Asparagopsis armata* par spectrométrie IRTF, après séparation en utilisant l'extraction à travers des cartouches de phase solide.

Comme le cholestérol est le stérol principal dans la fraction stérolique de l'extrait liquide de cette algue [103], les stérols ont été déterminés globalement sous forme de cholestérol. En outre, les résultats obtenus par spectrométrie IRTF ont été soigneusement vérifiés et comparés avec ceux obtenus par CLHP.

2.2 Partie expérimentale

2.2.1. Appareillage et réactifs

2.2.1.1 Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Un spectromètre Infrarouge à transformée de Fourier de marque Mattson (Madison, WI, USA) modèle IRTF Genesis II a été utilisé pour effectuer des mesures dans l'intervalle de nombre d'ondes $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Le système est équipé d'un détecteur sulfate triglicine deutéré (DSTG) à température stabilisée, d'une séparatrice de radiation en KBr, d'une fonte type globar et d'un système de processus digital (SPD). Les spectres ont été obtenus à une résolution nominale de 4 cm^{-1} et en accumulant 15 balayages par spectre.

Le travail a été réalisé avec un système à écoulement bloqué en modifiant au niveau de notre laboratoire une cellule conventionnelle en une cellule de flux. L'avantage d'une telle cellule est d'éviter les inconvénients relatifs au nettoyage et au remplissage des cellules conventionnelles, de minimiser la consommation des solvants organiques et le temps d'analyse (15-60 s). Dans le système à écoulement bloqué, on remplit la cellule en utilisant une pompe péristaltique, on

stoppe momentanément le flux, on obtient le spectre et on rétablit le flux pour laver la cellule avec le solvant ou la remplir avec une autre solution.

Le montage de la figure 2. 1 a été utilisé pour effectuer les mesures dans l'infrarouge moyen, en employant des fenêtres de fluorure de calcium (CaF_2) et un entretoise de Téflon de 0.5 mm d'épaisseur. Les tubes de connection sont en téflon de diamètre intérieur de 0.8 mm et le chargement est réalisé en utilisant des tubes de chlorure de polyvinyle de diamètre intérieur de 2.79 mm et en fixant un débit de 1.5 ml mn^{-1} .

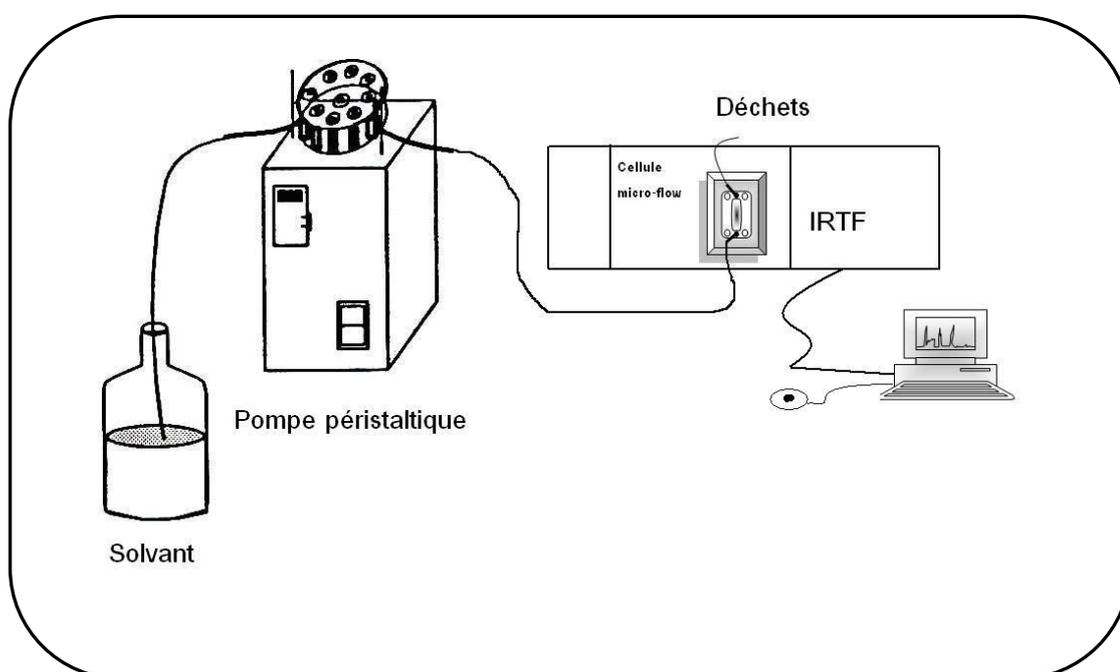


Figure 2. 1 : Montage de flux utilisé pour la détermination des stérols dans les algues

2. 2. 1. 2 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les plaques CCM utilisées sont des feuilles plastiques de dimensions $5 \times 10 \text{ cm}$ recouvertes de gel de silice Si 60 (Merck). L'élution est réalisée avec un mélange de solvants, acétate d'éthyle isooctane dans les proportions: 50:50 (v/v). La révélation est effectuée avec l'acide sulfurique 18N (Carlo Erba) suivi d'un passage à l'étuve à 100°C .

2. 2.1.3 Chromatographie liquide haute performance

Les analyses chromatographiques sont menées sur une chaîne chromatographique composée d'une pompe Consta metric 3500, d'un système de détection: réfractomètre Waters 401 (Paris, France) et d'un intégrateur Varian 4400. La technique employée est la chromatographie à polarité de phases normale : la silice est la phase stationnaire de la colonne analytique (Purospher® STAR Si 5µm 250 mm × 4.6 mm), précédée d'une précolonne. La valve d'injection est manuelle et la boucle utilisée est de 20 µl.

2.2.1.4 Extraction en phase solide

Les échantillons saponifiés sont préconcentrés dans des cartouches de phase solide de type C18 (Merck), Bond Elut C18 (Varian) et la DSC18 (Supelco), avec un volume de 6 ml et contenant 1 g de phase solide (les particules sont de taille environ 50µm et une surface spécifique de 480 m² g⁻¹ pour la DSC18) utilisant une pompe péristaltique de marque Desaca (Heidelberg, Allemagne) de six canaux ce qui permet le chargement simultané de plusieurs échantillons (figure 2.2).

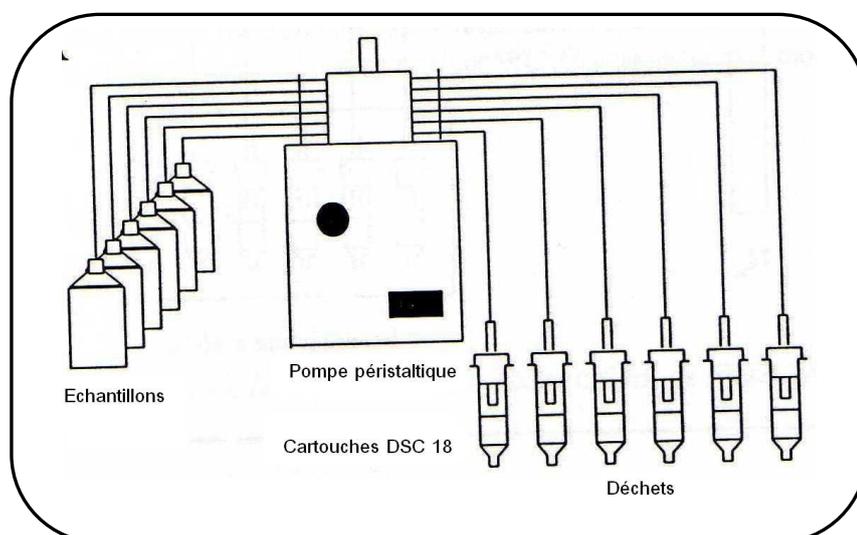


Figure 2.2: Montage utilisé pour la prise des échantillons et préconcentration de stérols

2.2.1.5 Réactifs

Tous les réactifs utilisés sont de grade analytique. La 4-méthoxyacetophenone, le cholestérol, l'acétate de cholestéryle et l'hydroxyde de potassium ont été obtenus auprès de Merck (Darmstadt, Allemagne). L'acétate

d'éthyle (AcOEt), le 2, 2, 4-triméthyl pentane (TMP) isooctane) de grade CLHP analytique, le méthanol le chloroforme ont été obtenus auprès de Carlo Erba (Milan, Italie). Le dichlorométhane de grade analytique, stabilisé par l'amylène ou l'éthanol, de Panreac (Barcelone, Espagne) et l'éthanol, de Prolabo (Fontenaysous-Bois, France) ont été également utilisés.

2.3 Procédure générale

2.3.1 Traitement des échantillons

2.3.1.1 Préparation de l'extrait

L'algue utilisée a été récoltée au niveau du complexe touristique « la corne d'or » de la ville de Tipaza. L'identification a été faite au niveau du laboratoire de biologie marine de l'U.S.T.H.B. L'échantillon utilisé au cours de la présente étude a été récolté durant le mois de juin de l'année 2002. L'algue a subi un triage manuel pour éliminer les épiphytes susceptibles de contaminer l'extrait. Ensuite, elle est rincée et essorée. Le quantité d'eau est évaluée en utilisant l'appareil de Dean Stark. Une quantité de 14 g d'algue essorée a été mélangée avec 160 ml de toluène et portée à ébullition à reflux pendant 1 heure. Après décantation La quantité d'eau existante est environ 70 %.

L'extrait est obtenu par la macération de 200 g d'algue essorée dans un mélange de 2 l: méthanol - chloroforme 1:1 (v/v) pendant Trois jours, le miscella extrait-solvant est filtré sur du verre fritté (d'une porosité d'environ 30 μm) sous vide afin d'éliminer toutes les poussières et les particules dues à la dégradation de la matière végétale. Suivi par l'évaporation à sec du solvant. Le marc a subi trois à quatre lavages afin d'épuiser la matière végétale. Le rendement global en extrait est de 0.6%. Cette procédure est résumée sur l'organigramme de la figure 2.3. L'extrait organique ainsi obtenu a été saponifié avant d'être soumis à l'analyse par spectrométrie IRTF et CLHP.

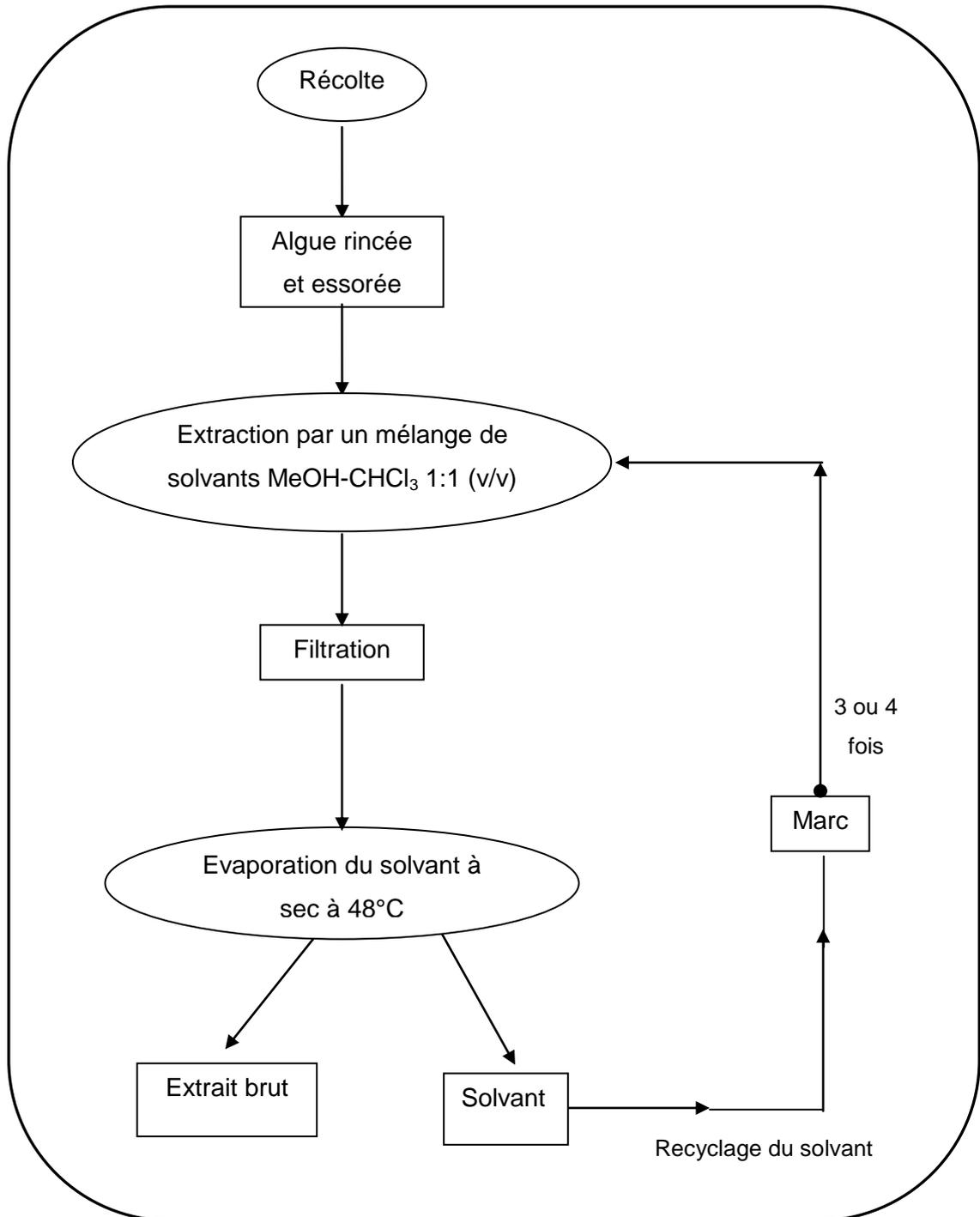


Figure 2. 3 : Préparation de l'extrait à partir de la matière végétale

2.3.1.2 Réaction de saponification

Comme les esters de stérols sont sensibles à la réaction de saponification, en présence d'une base forte, une quantité précise de l'extrait organique avec 40ml d'une solution de potasse KOH 1 M est chauffé à 90°C à reflux pendant une heure. Une fois refroidi jusqu'à la température ambiante, 40 ml d'eau distillée sont

ajoutés à l'extrait saponifié. Les stérols se trouvant dans le mélange réactionnel sont retenus dans un support de phase solide (EPS) avant leur analyse par IRTF et CLHP.

2.3.1.3 Extraction en phase solide

Le mélange réactionnel est passé à travers des cartouches de phase solide de type DSC18 préalablement conditionnées avec 2 ml de méthanol suivie de 1 ml d'eau distillée. L'élution est réalisée avec 4 fractions de 1 ml de dichlorométhane stabilisé avec l'amylène. L'extrait est passé à travers le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) afin d'éliminer toute trace d'eau. Par la suite l'extrait est évaporé à sec. Le résidu est dilué dans le solvant adéquat à l'analyse.

2.3.2 Détermination des stérols par spectrométrie IRTF

100 mg d'extrait organique, préalablement saponifiés, sont retenus à travers 1g de phase solide de type DSC18 (silice octadécyle) et élués avec quatre portions de 1 ml de CH_2Cl_2 stabilisé avec l'amylène. Le résidu est séché avec Na_2SO_4 et évaporé à sec, le résidu final obtenu est dilué dans le dichlorométhane jusqu'à un volume final de 1 ml, les spectres IRTF sont enregistrés par rapport à un *background* stabilisé préalablement dans les mêmes conditions instrumentales avec une cellule remplie de solvant pur utilisé pour l'élution. Finalement, on mesure les valeurs maximales d'absorbance des stérols à 1049 cm^{-1} , corrigées avec une ligne de base stabilisée entre $1000\text{-}1079\text{ cm}^{-1}$. Pour traiter les spectres on a utilisé un macro qui donne les valeurs d'absorbance à la bande sélectionnée, exprimées en terme de la hauteur du pic ou de l'aire du pic de toute la série des spectres obtenus lors des mesures.

Les valeurs d'absorbance corrigées sont extrapolées dans la droite de calibration obtenue pour des solutions de mélanges, contenant de 0.8 à 25 mg ml^{-1} d'étalons traités de la même manière que les échantillons réels.

2.3.3 Extraction en phase solide et détermination des stérols par CLHP

La séparation chromatographique des extraits organiques a été réalisée dans le mode isocratique en utilisant une phase mobile constituée d'un mélange

d'isooctane (2,2,4 triméthyl pentane) et d'acétate d'éthyle de 87:13 (v / v) avec un débit de 1 ml min^{-1} , un volume d'injection de $20 \mu\text{l}$ et la 4-methoxyacétophenone comme étalon interne.

Pour établir la droite d'étalonnage, $20 \mu\text{l}$ de la 4-methoxyacétophenone dans AcOEt de concentration de 2 mg ml^{-1} ont été introduits dans chaque solution étalon de cholestérol préparée dans le même solvant. $20 \mu\text{l}$ de la solution ainsi obtenue, où la concentration de l'étalon cholestérol varie entre 2,66 et 6 mg ml^{-1} , ont été injectés. Le rapport de l'aire du pic de l'analyte à l'aire du pic de l'étalon interne a constitué le paramètre analytique.

Pour la détermination du taux de stérols dans l'extrait de l'algue rouge *Asparagopsis armata*, cent quatre-vingt-dix milligrammes d'extrait organique, précédemment saponifiés ont été extraits à travers une cartouche d'extraction de phase solide DSC18, élués avec quatre portions de 1 ml de dichlorométhane stabilisé avec l'amylène. Le résidu est séché avec Na_2SO_4 et évaporé à sec. $36,6 \text{ mg}$ du résidu obtenu sont dissous dans l'AcOEt pour un volume final exact de $458 \mu\text{l}$ exactement, afin d'obtenir une solution de concentration de 80 mg ml^{-1} (concentration comprise dans le domaine de concentration préalablement établi).

Dans des conditions identiques, la solution d'extrait de l'algue ainsi obtenue a été mélangée avec $20 \mu\text{l}$ d'étalon interne et a été directement injectée dans le système CLHP.

2.4 Résultats et discussion

2.4.1 Spectres IRTF du cholestérol et de l'acétate de cholesteryle

La figure 2. 4 montre les spectres IRTF des solutions étalons de cholestérol (figure 2. 4 a), d'un échantillon d'extrait brut de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (figure 2. 4. b) et d'acétate de cholestéryle (figure 2.4.c) préparées directement dans le dichlorométhane sans traitement préalable.

Comme on peut le constater, tous les spectres montrent des bandes intenses dans la région entre 2935 et 2850 cm^{-1} à cause des groupes CH_2 et CH_3 .

Le cholestérol présente également une bande intense à 1049 cm^{-1} qui correspond à l'alcool secondaire C-OH ainsi que des bandes à 3602 et 3679 cm^{-1} caractéristiques de la fonction OH. L'acétate de cholestéryle présente une bande intense à 1725 cm^{-1} , caractéristique de groupement carbonyle, une bande à 1261 cm^{-1} , caractéristique du groupement C-O et un second groupement O-C à 1032 cm^{-1} [188]. Cette bande d'acétate de cholestéryle à 1032 cm^{-1} disparaît après la réaction de saponification et laisse apparaître les bandes caractéristiques de cholestérol à 1049 , 3602 et 3679 cm^{-1} (figure 2. 5). A cet effet la bande à 1032 cm^{-1} peut être utilisée pour confirmer l'absence ou la présence des stérols liés après la réaction de saponification.

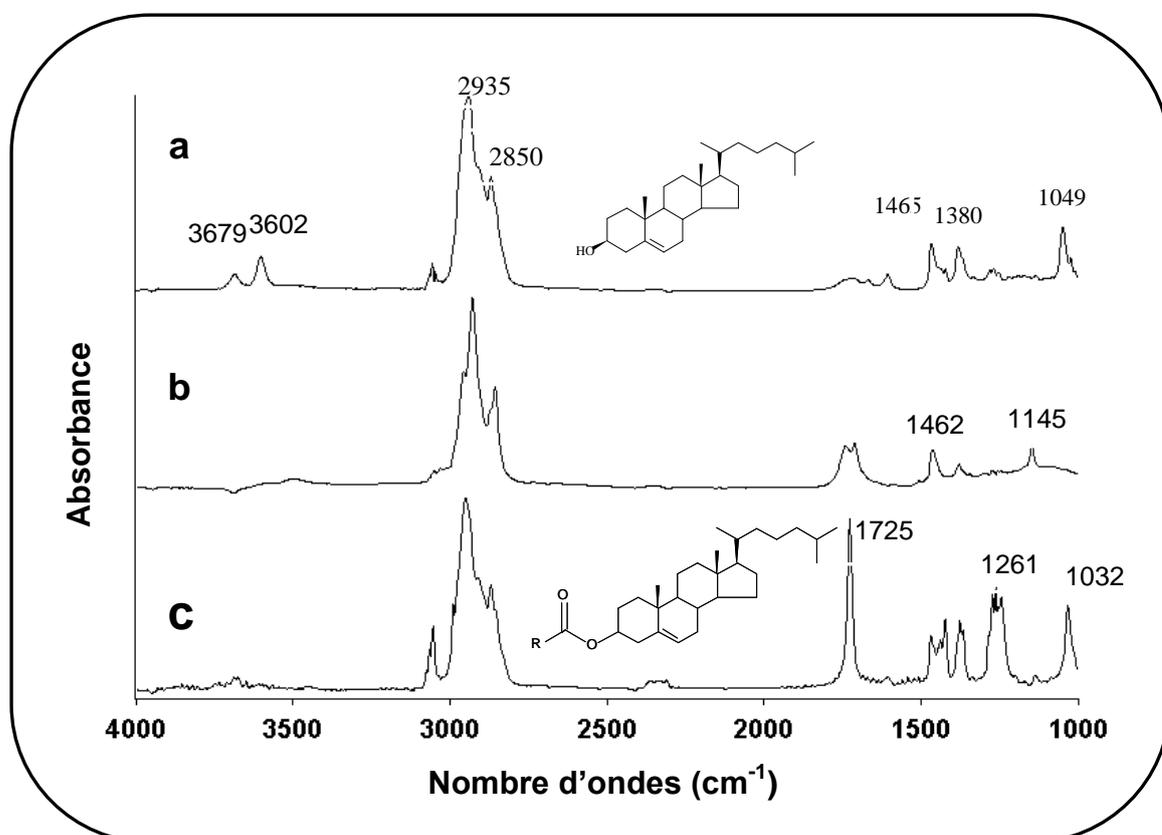


Figure 2.4 : Spectres IRTF de : cholestérol 10 mg ml^{-1} (a), d'extrait de l'algue rouge 100 mg ml^{-1} (b) et d'acétate de cholestéryle 10 mg ml^{-1} (c) préparés directement dans CH_2Cl_2 sans aucun traitement préalable

Conditions expérimentales: Chemin optique 0.5 mm ; résolution nominale 4 cm^{-1} ; nombre de balayage 15; vitesse de l'interféromètre 0.6329 cm.s^{-1} ; *Background* de la cellule remplie de CH_2Cl_2 stabilisé avec l'amylène

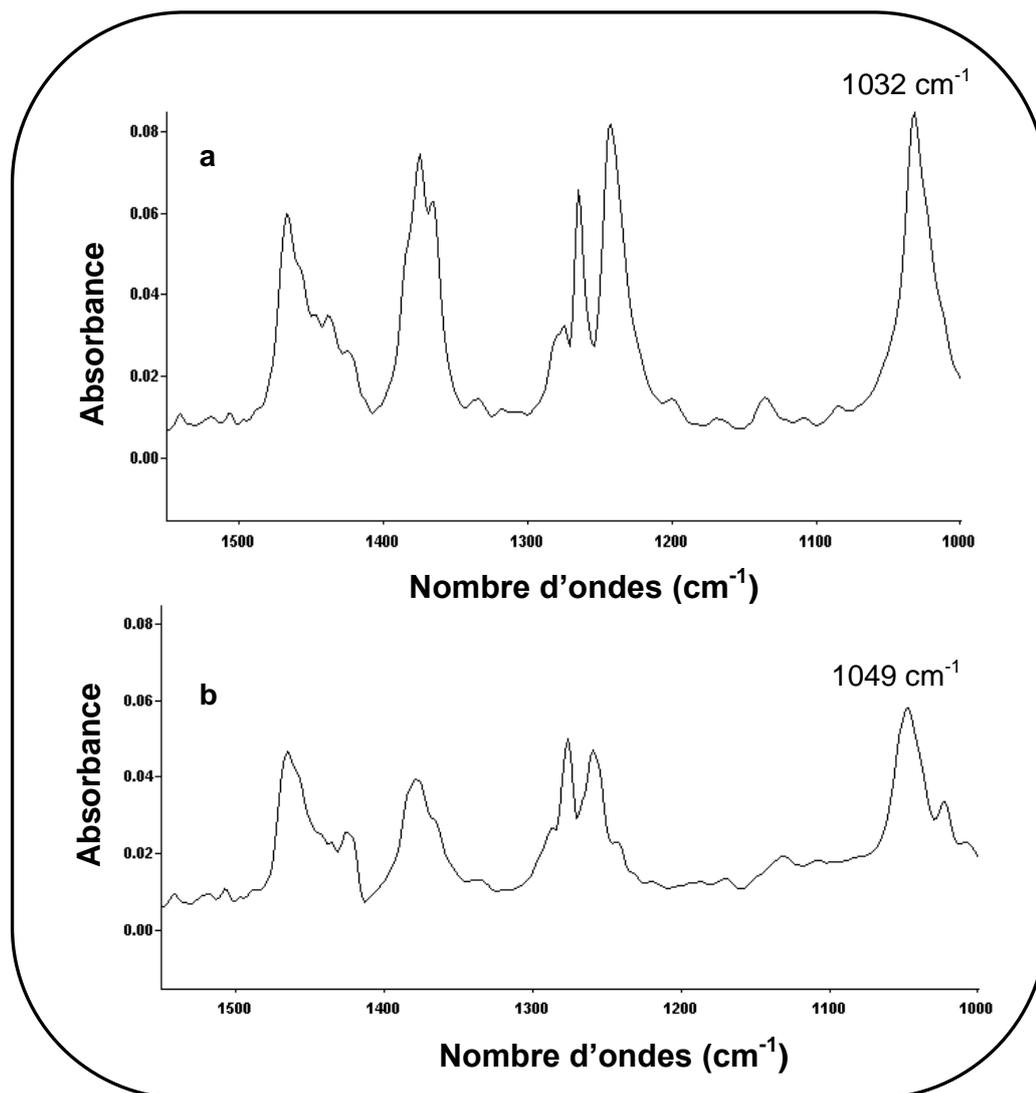


Figure 2.5 : Spectres IRTF de l'acétate de cholestéryle préparé directement dans CH₂Cl₂ (a) et après saponification et extraction à travers des cartouches de type DSC 18 (b)

En comparant les spectres des solutions étalons (figure 2.4 a) avec ceux d'un échantillon réel (figure 2.4.b), on peut constater que la détermination directe de cholestérol dans l'algue rouge par spectrométrie IRTF pourrait être difficile. Dans cette étude où l'échantillon est très complexe, les mesures d'absorbance à 1049 cm⁻¹ ont été obtenues après saponification puis préconcentration de la fraction insaponifiable. Les valeurs d'absorbance, à la fois pour l'ol : les échantillons et les standards, ont été corrigées avec une ligne de base entre 1079 et 1000 cm⁻¹.

2.4.2 Choix du solvant adéquat pour la détermination du cholestérol par spectrométrie IRTF

Afin de déterminer le taux de cholestérol dans l'algue rouge *A. armata* par spectrométrie IRTF, les caractéristiques analytiques du cholestérol dans les deux solvants CH_2Cl_2 ou CHCl_3 soit stabilisés par de l'amylène ou de l'éthanol ont été obtenues. Le tableau 2. 1 montre que le CH_2Cl_2 stabilisé par de l'amylène est le solvant approprié, en fournissant une faible limite de détection (environ $10 \mu\text{g ml}^{-1}$), une très bonne déviation standard relative (1,2 %) et une bonne linéarité de la courbe d'étalonnage ($r = 0.9999$).

Tableau 2. 1 : Caractéristiques analytiques du cholestérol obtenues directement dans différents solvants

Solvant/Stabilisant	Paramètres	Max : 1049 cm^{-1} L.B. : $1000\text{-}1079 \text{ cm}^{-1}$
CH_2Cl_2 /amylène	Droite de calibration	$0.00234+0.01743\text{C}$
	Coefficient de corrélation (r)	0.9999
	Limite de détection ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	10.5
	D.S.R (%) (n=10)	1.2
CH_2Cl_2 /Ethanol	Droite de calibration	$0.00228+0.01660\text{C}$
	Coefficient de corrélation (r)	0.9999
	Limite de détection ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	21.9
	D.S.R (%) (n=10)	0.19
CHCl_3 /Amylène	Droite de calibration	$0.00225+0.01455\text{C}$
	Coefficient de corrélation (r)	0.9998
	Limite de détection ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	18.2
	D.S.R. (%) (n=10)	0.11
CHCl_3 /Ethanol	Droite de calibration	$0.00892+0.00886\text{C}$
	Coefficient de corrélation (r)	0.9985
	Limite de détection ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	37.0
	D.S.R (%) (n=10)	2.3

C: Concentration en mg ml^{-1} , Domaine de concentration $0.7\text{-}22.5 \text{ mg ml}^{-1}$, **D.S.R (%)**: Déviation Standard Relative (pour $\text{C} = 10.28 \text{ mg ml}^{-1}$), **L.D**: limite de détection en $\mu\text{g ml}^{-1}$ obtenu pour un niveau de confiance de 99.6 % ($k = 3$).

La figure 2. 6 illustre les spectres d'absorbance pour une série de solutions des deux étalons préparés dans la proportion 9 :1 dans le CH_2Cl_2 stabilisé avec l'amylène, et ce, dans un domaine de concentration pris entre 0.8 et 25 mg ml^{-1}

On a vérifié, au cours de cette étude, que les valeurs des aires des pics ne peuvent pas être utilisées pour les déterminations quantitatives

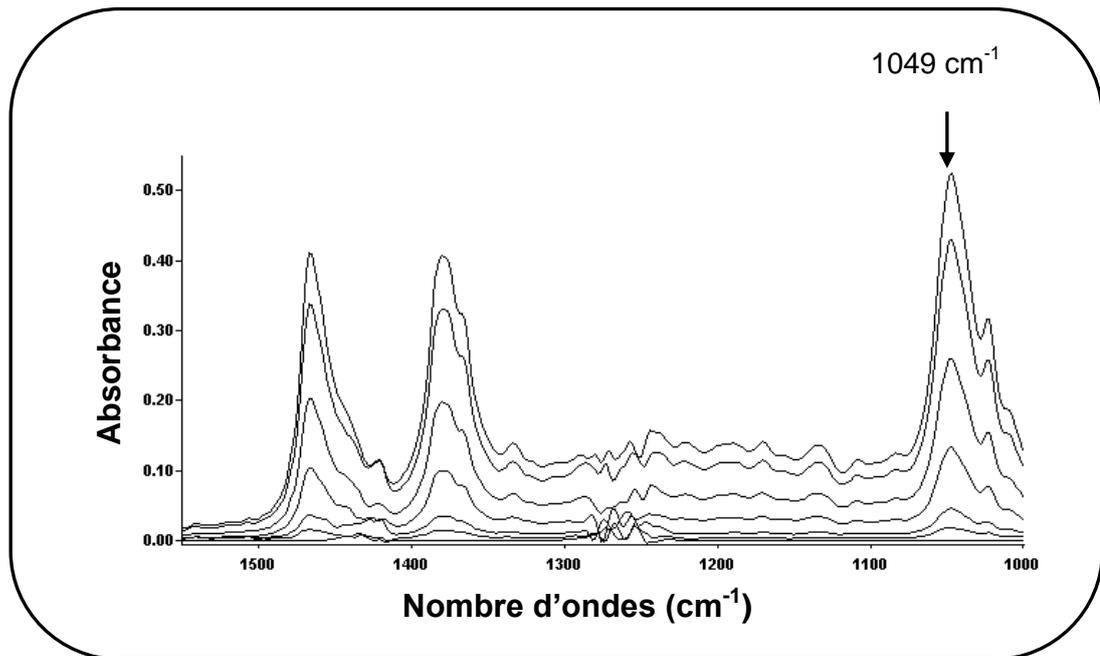


Figure 2.6 : Spectres d'absorbance du mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéryle dans la proportion 9:1 préparé dans CH_2Cl_2 stabilisé avec l'amylène, pour un domaine de concentration compris entre 8-25 mg.ml^{-1}

2.4.3 Sélection des conditions d'extraction en phase solide du cholestérol et de l'acétate de cholestéryle

Comme on peut le constater dans la figure 2. 7, la détermination directe du taux de cholestérol à partir d'un extrait d'algue rouge dissous dans CH_2Cl_2 n'est pas possible en raison de la présence de l'acétate de cholestéryle et d'autres composants de la matrice. La saponification de l'extrait, transforme les esters de cholestéryle en cholestérol libre mais elle produit la dilution de l'analyte, en plus le milieu aqueux n'est pas adéquat pour l'analyse par spectrométrie IRTF. C'est ainsi qu'on a utilisé l'extraction en phase solide suivi de l'élution avec le solvant comme

une technique de séparation et de préconcentration pour l'analyse du cholestérol total après la préalable saponification.

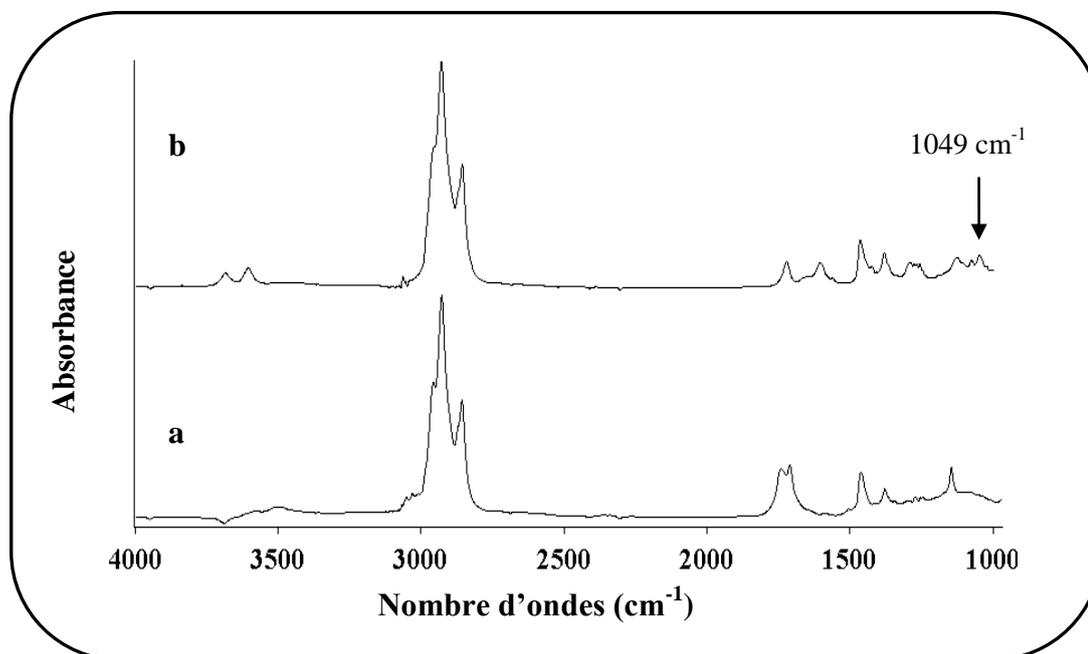


Figure 2.7 : Spectre IRTF de l'extrait de l'*Asparagopsis armata* dans le CH_2Cl_2 sans traitement Préalable (a) et après traitement et EPS à travers des cartouches de type DSC18 et élution avec CH_2Cl_2 (b)

Il y a lieu de noter que dans cette partie de l'étude, le background établi avec le solvant pur a été considéré au lieu du background établi avec le blanc analytique (une solution qui a subi toute la procédure développée et qui contient le solvant et tout les réactifs utilisés lors de l'analyse, à l'exception de l'analyte lui-même) car ce dernier a fourni des caractéristiques analytiques insatisfaisantes.

Il a été rapporté dans la littérature une grande variation dans la composition stérolique d'algues, ce qui pourrait s'expliquer par les variations saisonnières ou géographiques [79, 99]. A cet effet, pour évaluer le processus de saponification et d'extraction en phase solide dans la détermination du taux de cholestérol par spectrométrie IRTF, des échantillons synthétiques de cholestérol et d'acétate de cholestéryle préparés dans des proportions arbitraires 9 :1 (p/p) ont été saponifiés et extraits à travers des cartouches de phase solide type BondElute C18. Les

résultats obtenus pour les échantillons sont extrapolés dans la droite de calibration obtenue pour des étalons de cholestérol préparés directement dans le CH_2Cl_2 .

Tableau 2. 2 : Comparaison des droites de calibration du cholestérol obtenu directement dans CH_2Cl_2 et du mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéryle obtenu après saponification et EPS à travers un support solide BondElut C18

Paramètres	Cholestérol préparé directement dans CH_2Cl_2	Mélange après sap. et EPS
Droite de calibration	$0.00289 + 0.01772\mathbf{C}$	$0.00111 + 0.01149\mathbf{C}$
Coefficient de corrélation (r)	0.9999	0.9970
Limite de détection ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	11,1	51,2
D.S.R (%) (n=10)	0,25	0,33
Domaine de conc. (mg ml^{-1})	0,7-22,5	0,8-25
Rendement d'extraction (%)		65

C: Concentration en mg ml^{-1} . **D.S.R (%) :** Déviation Standard Relative (pour $\mathbf{C} = 10.28 \text{ mg ml}^{-1}$ de cholestérol et $\mathbf{C} = 12 \text{ mg ml}^{-1}$ de mélange), **L.D:** limite de détection en $\mu\text{g ml}^{-1}$ obtenue pour un niveau de confiance de 99.6 % ($k = 3$).

Conditions expérimentales: Résolution nominale: 4 cm^{-1} , nombre de balayage minimum égale à 15 spectres, parcours optique: 0.5 mm, background de la cellule remplie avec le solvant de dilution.

Les résultats résumés dans le Tableau 2. 2 montrent que l'extraction du cholestérol à partir de la fraction insaponifiable des solutions étalons traitées reste incomplète. Dans ce contexte, il faut noter que pour obtenir le taux de stérols libres et liés, l'équation de la droite d'étalonnage des solutions aqueuses d'un mélange a été comparée avec celle obtenue pour le cholestérol dissous dans CH_2Cl_2 . En fait, la récupération de cholestérol peut être estimée à 65% en comparant les pentes des deux droites de calibration.

Dans le but d'optimiser le taux de récupération obtenu du processus rétention-élution à travers un support solide, deux séries d'expérience ont été réalisées afin de choisir le solvant d'élution adéquat et le type de phase solide approprié pour retenir quantitativement le cholestérol.

2.4.3.1 Choix du solvant d'élution

Une série d'échantillons synthétiques, contenant $10,0 \text{ mg ml}^{-1}$ de cholestérol ou de $11,1 \text{ mg ml}^{-1}$ d'un mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéryle a été analysée par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier après saponification et EPS en utilisant une phase solide de type BondElut C18 avec différents solvants d'élution. Les résultats sont résumés dans le tableau 2. 3. Les pourcentages de récupération du processus élution- rétention sont calculés en extrapolant les valeurs d'absorbance trouvées dans la droite de calibration obtenue avec des étalons préparés dans le même solvant d'élution.

Tableau 2.3 : Analyse des échantillons synthétiques du cholestérol, et du mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéryle, dans une proportion 9:1 (p/p) obtenus après sap et EPS en utilisant la phase solide de type BondElut C18 avec différents solvants d'élution

Solvant /Stabilisant	Récupération (%) de :	
	Cholestérol	Mélange (9:1)
CH₂Cl₂ /amylène	70±6	66±5
CH₂Cl₂ /Ethanol	74±7	61±4
CHCl₃ /Amylène	54±6	51±4
CHCl₃ /Ethanol	55±3	46±7

Concentrations: 10 mg ml^{-1} pour le cholestérol, 11.1 mg ml^{-1} pour le mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéryle, valeur moyenne \pm déviation standard de deux mesures indépendantes.

De cette façon, les résultats montrent que le dichlorométhane stabilisé avec l'amylène est approprié autant pour la détermination IRTF que pour L'EPS du cholestérol et ses esters.

2.4.3.2 Choix de la phase solide d'extraction

Une série d'expériences a été réalisée pour sélectionner la phase solide la plus convenable pour l'extraction de la fraction stérolique à partir de la phase insaponifiable. Différents phase de cartouches d'EPS commercialisées de type C18 (silice octadécyle), ont été testées. Les résultats résumés dans le tableau 2. 4 montrent que seulement la DSC 18 a retenu quantitativement le cholestérol ainsi que le mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéryle.

Tableau 2. 4 : Analyse des échantillons synthétiques de cholestérol et du mélange de cholestérol et de cholestéryle acétate obtenus après sap. et EPS en utilisant différents type de phase d'extraction et le CH₂Cl₂/amylène comme solvant d'élution

Type de la phase solide	Récupération (%) de :	
	Cholestérol	Mélange (9 :1)
Bond Elut C18	72±4	
DSC18	92±7	92±8
C18	68±4	

Concentrations: 10 mg.ml⁻¹ pour le cholestérol, 11.1 mg.ml⁻¹ pour le mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéryle, valeur moyenne ± déviation standards de deux mesures indépendantes.

2.4.4. Détermination du taux de cholestérol par spectrométrie IRTF en utilisant la préconcentration par l'EPS

Après avoir réalisé la réaction de saponification d'un mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéryle dans la proportion 9:1 (voir paragraphe 2.3.1.2), le cholestérol a été extrait et préconcentré en utilisant des cartouches contenant 1 g de phase solide DSC18, préalablement conditionné avec le méthanol et l'eau (figure 2.7.b). Les résultats obtenus montrent que le rendement du processus élution-rétention correspond à 86% (tableau 2. 5). Ces résultats ont été obtenus par comparaison des droites de calibration des solutions de cholestérol obtenues directement dans le CH₂Cl₂ et des solutions aqueuses d'un mélange saponifié préalablement, et préconcentré sur des cartouches types DSC18 et élué avec CH₂Cl₂. Les résultats obtenus montrent la nécessité de traiter les étalons de la même manière que les échantillons réels afin de déterminer quantitativement le cholestérol à partir de la fraction insaponifiable.

Tableau 2. 5: Comparaison des droites de calibration du cholestérol obtenu directement dans CH₂Cl₂ et du mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéyle après sap et EPS à travers la phase solide de type DSC18

Paramètres	Solutions de Cholestérol dans CH ₂ Cl ₂	Mélange après sap. et eps
Droite de calibration	0.00234 + 0.01743C	0.00197 + 0.01501C
Coefficient de corrélation (r)	0.9999	0.9995
Limite de détection (µg ml ⁻¹)	10,5	12,8
D.S.R (%)	1,2	0,28
Domaine de conc. (mg ml ⁻¹)	0.7-25	0.7-25
Rendement d'extraction-élution (%)		86

C: Concentration en mg ml⁻¹. **D.S.R (%) :** Déviation Standard Relative (pour C =10.28 mg ml⁻¹ de cholestérol et C =12 mg ml⁻¹ de mélange), **L.D:** limite de détection en µg ml⁻¹ obtenue pour un niveau de confiance de 99.6 % (k = 3).

Conditions expérimentales: Résolution nominale: 4 cm⁻¹, nombre de balayage minimum égale à 15 spectres, parcours optique:0.5 mm, background de la cellule remplie avec le solvant de dilution.

2.4.5. Détermination des stérols totaux dans l'extrait de l'algue rouge par Spectrométrie IRTF

Une centaine de milligrammes de l'extrait de l'algue rouge, *A. armata*, préalablement filtrée et préparée comme décrit dans le paragraphe 2.3.1. ont été analysées par spectrométrie IRTF en mode flux bloqué « stop flow ». Le spectre d'un échantillon réel obtenu après le traitement est indiqué dans la figure 2.7.b. L'échantillon d'extrait réel soumis au même traitement que les solutions étalons contenant un mélange de cholestérol et d'acétate de cholestéyle dans la proportion 9:1 (p/p), donne un taux de stérols dans l'extrait de l'algue rouge de 3,37 ± 0,01%, ce qui montre une très bonne précision.

2.4.6 Analyse des stérols totaux dans l'algue rouge *Asparagopsis armata* par CLHP

Pour confirmer l'exactitude de la procédure développée par spectrométrie IRTF, la chromatographie liquide haute performance a été appliquée pour la

détermination des stérols dans l'algue rouge, suivant la procédure indiquée dans le paragraphe 2. 3.3.

2.4.6.1 Analyse des stérols par CCM

L'extrait obtenu est analysé par chromatographie sur couches minces (CCM), la séparation est effectuée sur une plaque en plastique (figure 2. 8) recouverte d'une couche mince et adhérente de silice finement divisée, Dans le système binaire AcOEt / TMP : 50/50. La révélation des analytes est mise en évidence par pulvérisation d'acide sulfurique (18N) et passage à l'étuve (100 °C) pendant 8 min (L'analyse de ces plaques montre l'existence des stérols dans l'extrait par l'apparition d'une tache rose de facteur de rétention R_f 0.728.

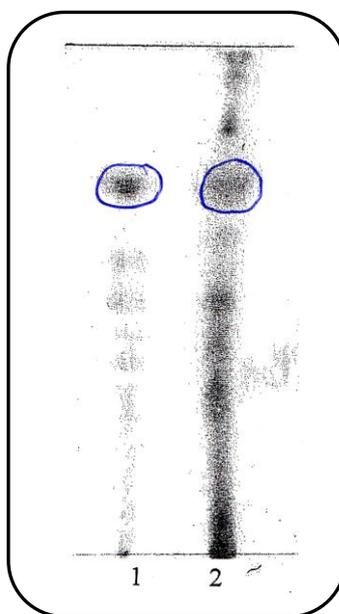


Figure 2.8 : Purification des stérols par CCM

1 : étalon de cholestérol, 2 : extrait de *A. armata*

2.4.6.2 Analyse qualitative des stérols dans l'extrait brut de *Asparagopsis armata* par CLHP

Les stérols sont repérés sur le chromatogramme CLHP de l'extrait brut au même temps de rétention $t_r = 12.2$ min qu'un étalon (cholestérol) injecté dans les mêmes conditions opératoires, c'est la preuve que le composé en question est présent à une concentration supérieure à la limite de détection du système (figure 2. 9).

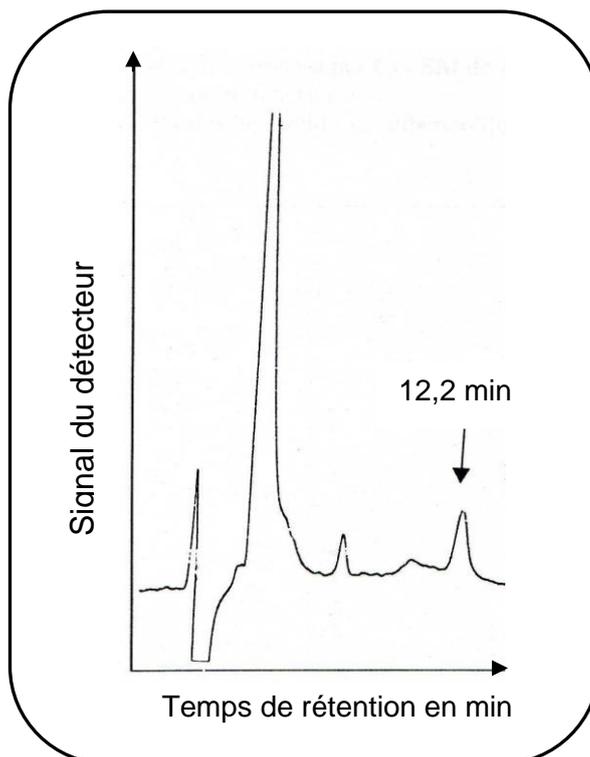


Figure 2. 9 : Chromatogramme de l'extrait de *Asparagopsis armata*

2.4.6.3 Choix de l'étalon interne

Pour choisir un étalon interne bien adapté à cette étude, différentes substances non présentes dans l'échantillon à analyser sont testées (tableau 2. 6). Dans cette méthode, une quantité soigneusement mesurée d'un étalon interne est introduite dans chaque étalon et dans chaque échantillon. Le mélange ainsi constitué est injecté dans le chromatographe liquide.

Le tableau 3. 6 montre que le méthyle-2 butanol, la cholestenone, l'hydroxy-4 benzaldehyde et la vanilline donnent des pics proches de celui du cholestérol mais ils sont mal résolus par rapport au pic du chromatogramme de l'extrait. Les deux acides donnent des pics très larges en CLHP ce qui donne lieu à une mauvaise résolution par rapport aux pics du chromatogramme de l'échantillon. Le phloroglucinol présente un temps de rétention relativement long et loin de celui de l'étalon interne. Seulement la 4- methoxy acétophénone donne un pic proche de celui du cholestérol et en même temps bien séparé des pics de tous les autres constituants présents dans l'extrait.

Tableau 2. 6 Temps de rétention de l'étalon interne et du cholestérol

Etalon interne	t _R du Cholestérol (mn)	t _R de l'étalon interne (mn)	Interférence avec les pics de l'extrait
<i>methyl-2 butanol</i>	11.1	8.36	+
<i>cholestenone</i>	11.1	4.55	+
<i>phloroglucinol</i>	11.1	40.0	–
<i>hydroxy-4 benzaldehyde</i>	11.1	13.7	+
<i>vanilline</i>	11.1	14.8	+
<i>Acide hydroxy-4 methoxy-3 cinnamique</i>	11.1	5.51-11.0	+
<i>Acide hydroxy-4 Benzoïque</i>	11.1	12.1-27.1	+
<i>Methoxy-4 acetophenone</i>	11.1	7.88	–

+: Interférence avec les pics de l'extrait. – : Pas d'interférence avec les pics de l'extrait.
 Conditions opératoires: débit: 1 ml.mn⁻¹, T=30°C, volume injecté: 20µl, V_{AcOEt}/V_{TMP} = 13:87 (v/v).

2.4.6.4 Sélection de la composition de la phase mobile pour la séparation chromatographique

La composition de la phase mobile est choisie de telle sorte que cette dernière présente une polarité proche de celle de l'analyte et en même temps différente de la polarité de la phase stationnaire. Un compromis judicieux entre la résolution et le temps d'analyse est obtenu en utilisant une phase stationnaire polaire, et comme phase mobile un mélange d'AcOEt et TMP dans une proportion de 13/87 (v : v). L'étalon interne choisi est la méthoxy-4 Acétophénone (tableau 2. 7).

Tableau 2. 7 Choix de la composition de la phase mobile

<i>Étalon interne</i>	$V_{\text{AcOEt}}/V_{\text{TMP}}$ (ml / ml)	t_R du Cholestérol (mn)	t_R de l'étalon interne(mn)	Interférence avec les pics de l'extrait
<i>hydroxy-4 benzaldehyde</i>	25:75	7.02	7.69	–
<i>hydroxy-4 benzaldehyde</i>	20:80	7.80	9.54	+
<i>hydroxy-4 benzaldehyde</i>	13:87	12.38	18.45	+
<i>Methoxy-4 acetophenone</i>	40:60	4.73	4.58	+
<i>Methoxy-4 acetophenone</i>	15:85	11.11	7.88	+
<i>Methoxy-4 acetophenone</i>	13:87	12.38	8.95	–

+ : Interférence avec les pics de l'extrait, –: Pas d'interférence avec les pics de l'extrait

2.4. 6. 5 Calibration des pics par CLHP

La figure 2. 10 montre les chromatogrammes obtenus pour une série de

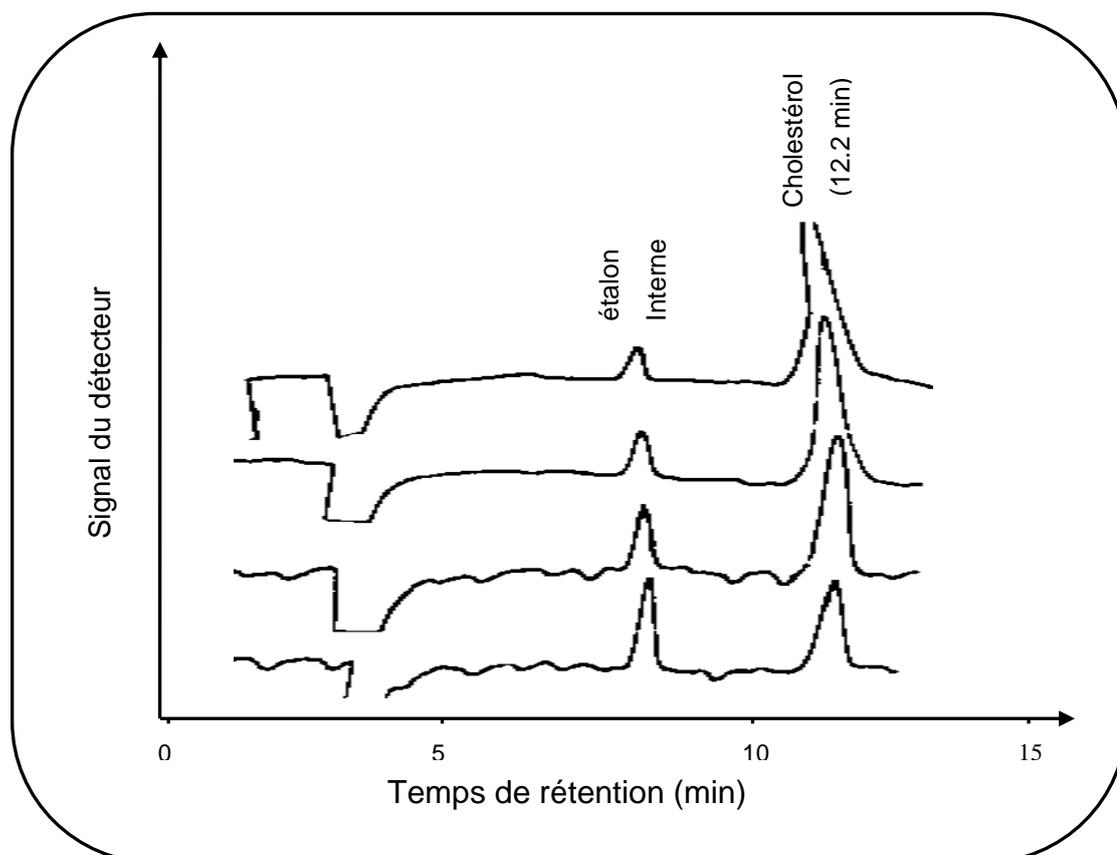


Figure 2. 10: Chromatogrammes d'une série de quatre étalons contenant le cholestérol et l'étalon interne (la 4-méthoxy acétophénone) préparés dans l'acétate d'éthyle.
Conditions opératoires: Débit: 1 ml/mn, volume injecté 20 μ l, $T_{\text{détecteur}} = 30^{\circ}\text{C}$, e.i: éthyloxy-4 acetophnone, $V_{\text{AcOEt}}/V_{\text{TMP}} = 13:87$ (v/v), colonne de silice (Purospher[®] STAR Si).

quatre solutions contenant le cholestérol comme étalon, qui a été élué à 12,2 min, et la 4-méthoxy acétophénone, comme standard interne, qui a été éluée à 8,8 min.

L'équation de la droite d'étalonnage ainsi obtenue pour un domaine de concentration de cholestérol allant de 2,66 à 6 mg ml⁻¹ est de la forme $C = 1.29A + 0,211$, avec un coefficient de corrélation, de 0,9987 et une déviation standard relative de 7,5 % pour une concentration de 12 mg ml⁻¹ (figure 2. 11).

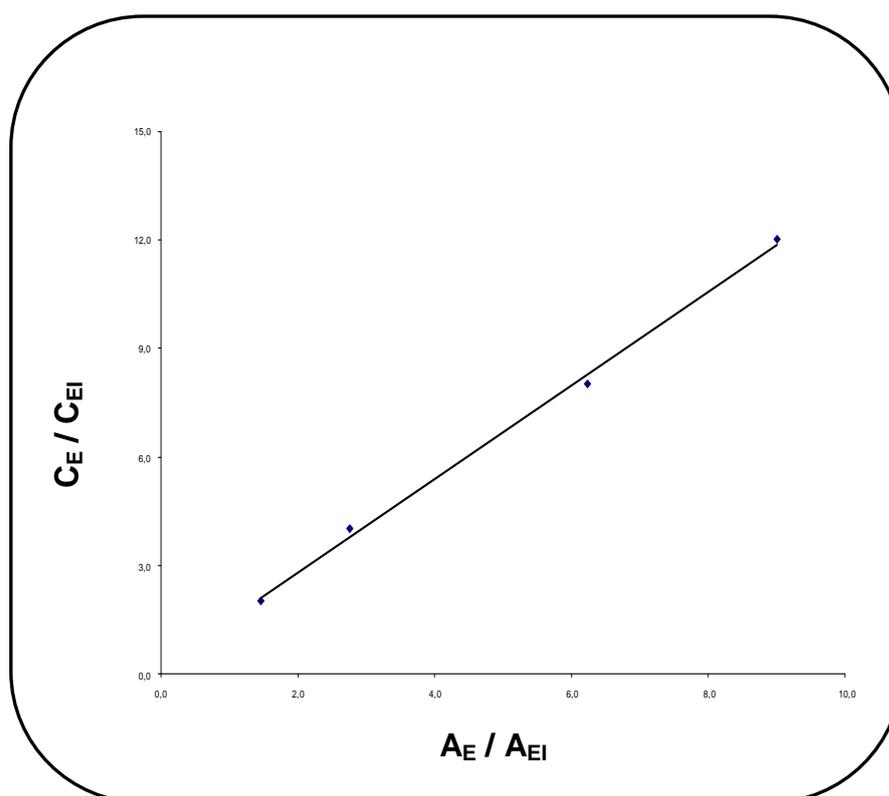


Figure 2. 11 : Droite d'étalonnage des solutions étalons de cholestérol de 2.66 à 6 mg.ml⁻¹ obtenue par CLHP directement dans l'acétate d'éthyle

Conditions opératoires: Débit: 1 ml/mn, volume injecté 20µl, T_{détecteur} = 30°C, e.i: méthoxy-4 acetophnone, V_{AcOEt}/V_{TMP} = 13:87 (v/v), colonne de silice (Purospher® STAR Si).

2.4.6.6 Détermination du taux de cholestérol de l'algue rouge asparagopsis armata par CLHP

La figure 2.12 montre les deux chromatogrammes obtenus, pour un échantillon de l'extrait de l'algue rouge dissout directement dans AcOEt (a) et un échantillon du même extrait après avoir subi la réaction de saponification et l'extraction en phase solide à travers des cartouches type DSC18 (b). A partir de

ces données les quantités de stérol libre et de stérols totaux trouvés sont respectivement, $1,5 \pm 0,4\%$ et $3,3 \pm 0,2\%$.

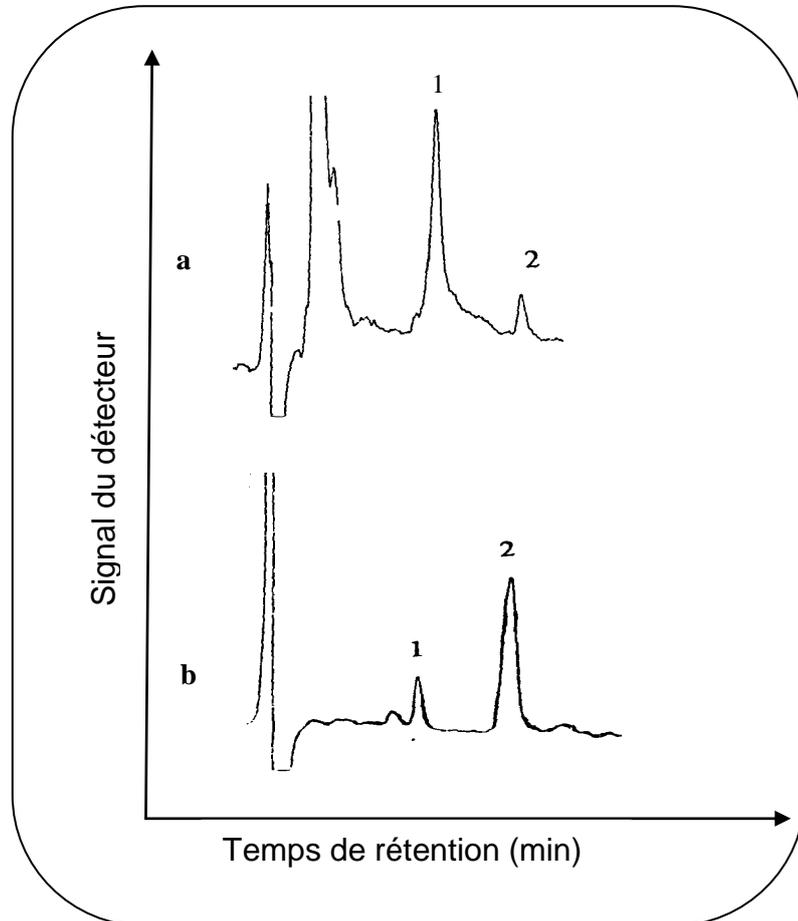


Figure 2. 12 : Chromatogrammes des extraits de l'algue rouge *A. armata* sans aucun traitement (a) et après Sap. et EPS DSC18 (b), 1 : pic de l'étalon interne, 2 : pic des stérols

Cette étude nous a permis de déterminer, pour la première fois, les stérols dans l'algue rouge *Asparagopsis armata* par CLHP en phase normale en utilisant la méthode de l'étalonnage interne.

2.4.7 Comparaison du taux de stérols obtenu dans l'algue rouge par CLHP et par spectrométrie IRTE

Les taux de stérols totaux obtenus dans l'algue rouge *Asparagopsis armata* après la réalisation de la réaction de saponification suivie de l'extraction en phase solide sur des cartouches type DSC18, par CLHP en utilisant l'étalonnage interne

et par spectrométrie IRTF en considérant la bande spécifique du cholestérol à 1049 cm^{-1} stabilisée avec une ligne de base entre 1000 et 1079 cm^{-1} , ont été respectivement $3,3 \pm 0,2$ et $3,37 \pm 0,01\%$. Ces résultats sont en excellent accord.

2.5 Conclusion

Les études menées ont montré que le taux des stérols totaux dans l'extrait de l'algue rouge *Asparagopsis armata* peut être déterminé par spectrométrie IRTF après saponification et extraction en phase solide à travers des cartouches de phase solide de type DSC18. La détermination peut être effectuée en considérant la bande d'absorbance spécifique à 1049 cm^{-1} corrigée avec une ligne de base stabilisée entre 1000 et 1079 cm^{-1} . La méthode ainsi proposée est facile, rapide, reproductible et donne des valeurs similaires à celles obtenues par CLHP.

CHAPITRE 3

DETERMINATION DES STEROLS TOTAUX DANS LES ALGUES BRUNES PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER

3.1 Introduction

La distribution de la composition des stérols majoritaires dans les algues marines macroscopiques a été utilisée pour la classification chimiotaxonomique des trois principales divisions d'algues Chlorophycées, Rhodophycées et Pheophycées [79, 113, 126, 134]. Les stérols de trois membres d'un nouveau taxon algal appartenant au pelagophycées, ont été également examinés [118].

Des études biologiques récentes ont montré que les stérols et leurs dérivés possèdent des activités biologiques. Des stérols cytotoxiques contre différentes lignées cellulaires cancéreuses ont été isolés chez l'algue brune de Formose (*Turbanaria ornato*) [146] et le phytostérol saringasterol a été isolé à partir de diverses algues brunes [109], il est confirmé qu'il présente une activité antituberculeuse et peut être utilisé dans le développement de médicaments contre la tuberculose.

D'un point de vue Chimiotaxonomique, les données de la littérature montrent que les stérols majoritaires dans les algues rouges sont des composés en C27 et le cholestérol apparait en quantité importante. Le desmostérol et le 22 *E* déhydrocholestérol sont présents en quantités importantes et peuvent être même les stérols majoritaires dans la classe des Gigartinales. Chez les algues brunes, le fucostérol est le stérol dominant, le cholestérol n'est présent qu'avec de faibles quantités.

Pour les algues vertes, il n'existe pas un seul stérol représentant, le stérol dominant semble varier selon l'ordre et même au sein de la même famille [135].

Il faut noter, également, que la proportion de stérols dans les algues peut varier au cours du cycle de vie et de ce fait, des variations saisonnières ont été étudiées [189, 123].

Plusieurs méthodes ont été rapportées pour la détermination quantitative des stérols dans les algues. Une méthode générale pour la détermination de métabolites secondaires dans des algues brunes utilise la chromatographie en phase liquide haute performance à polarité de phase normale (CLHP) [122]. Un couplage CLHP-CLHP et CG-SM par ionisation chimique a été décrit pour la détermination des esters de stérols dans des algues vertes [190]. Des algues rouges, vertes et brunes ont été étudiées pour leur teneur en cholestérol par CG [117, 135, 191].

Il a été également proposé une méthode CLHP avec détection UV pour la quantification des stérols dans diverses algues comestibles dans les trois familles Chlorophycées, Rhodophycées et phéophycées [133].

L'un des domaines de recherche dans notre laboratoire implique l'utilisation de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier IRTF dans le but de développer de nouvelles méthodes pour la détermination des métabolites secondaires dans des algues après saponification et séparation en utilisant des cartouches d'EPS. Récemment, nous avons développé une méthode d'analyse pour la détermination du taux de stérols dans l'algue rouge *Asparagopsis armata* par spectrométrie IRTF [192].

L'objectif principal du présent travail est le développement d'une nouvelle méthode analytique pour la détermination des stérols dans les algues brunes par spectroscopie IRTF sachant que le fucostérol est le stérol majoritaire dans cette catégorie d'algues. Il faut noter également que le fucostérol est un étalon qui coûte cher et par conséquent il est difficilement disponible. Une méthode indirecte utilisant le cholestérol comme étalon a été proposée.

3.2 Partie expérimentale

3.2.1 Appareillage et réactifs

Un spectromètre Type (Shimadzu (Beyne-Heusay, Germany) model 8900 a été utilisé pour obtenir des spectres IRTF dans la gamme 4000-400 cm^{-1} . Le système a été équipé d'un détecteur sulfate triglicine deutéré (DSTG) à température stabilisée, d'une séparatrice de radiation en KBr, d'une fonte type globar et d'un système de processus digital (SPD). Les spectres ont été obtenus à une résolution nominale de 4 cm^{-1} et en accumulant 20 balayages par spectre. Toutes les mesures ont été effectuées en utilisant une cellule de micro-flux 555 avec des fenêtres en CaF_2 et un chemin optique de 0,5 mm.

Tous les réactifs utilisés sont de grade analytique. Le cholestérol, l'acétate de cholestéryle et l'hydroxyde de potassium ont été obtenus auprès de Merck (Darmstadt, Allemagne). Le méthanol et le chloroforme de grade analytique ont été obtenus auprès de Carlo Erba (Milan, Italie). Le dichlorométhane de grade analytique, stabilisé par l'amylène ou l'éthanol, de Panreac (Barcelone, Espagne) et l'éthanol, de Prolabo (Fontenaysous-Bois, France) ont été également utilisés.

Pour la filtration des extraits d'algues, du verre fritté de type (Darmstadt, Allemagne) a été utilisé. Des cartouches commerciales de phase solide de type Octadécyle DSC18 de marque Supelco (Ballefont, USA), avec un volume de 3 ml contenant 500 mg de phase solide dont la taille des particules est d'environ 50 μm et la surface spécifique est de 480 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, ont été également utilisées pour la préconcentration des stérols.

3.3 Procédure générale

3.3.1 Préparation des échantillons

Les échantillons d'algues brunes *Cladostephus spongiosus*, *dictyota dichotoma* et *cystoseira sedoides* ont été, respectivement, récoltés durant les mois de Mai 2001 et Juillet 2005 sur les côtes sud de la méditerranée en Algérie au niveau du complexe touristique « la corne d'or » de la ville de Tipaza. L'algue brune *Bifurcaria bifurcata* a été récoltée en Décembre 2003 sur les côtes atlantiques du

Maroc dans la ville d'el Oualidia. Les échantillons ont été soumis, après récolte, à un triage manuel afin d'éliminer les épiphytes et autres organismes susceptibles de contaminer la nature chimique de l'extrait, suivi d'un rinçage à l'eau douce et d'un séchage à l'air, à l'abri de la lumière.

La procédure liée à la saponification et à l'extraction des stérols à partir des extraits d'algues a été réalisée en considérant les conditions expérimentales décrites dans le chapitre précédent (chapitre 2).

200 g de chaque espèce d'algues ont été stockés dans un mélange de 2 L : méthanol chloroforme 1:1 (v / v) pendant 48 h, les solutions obtenues «miscellas» sont filtrées sur du verre fritté (d'une porosité d'environ 30 μm) sous vide suivi par l'évaporation à sec du solvant. Le marc a subi trois lavages afin d'épuiser la matière végétale. Les extraits organiques obtenus ont été saponifiés et préconcentrés avant d'être analysés par spectroscopie IRTF.

3.3.2 Détermination des stérols dans les algues brunes par spectroscopie IRTF

100 mg de l'extrait organique des algues brunes, précédemment saponifiés, sont passés à travers des cartouches d'extraction contenant 500 mg de phase solide de type DSC18 préalablement conditionnées avec 3 ml de méthanol suivis de 2 ml d'eau distillée. Les stérols retenus sur la phase solide sont élués avec 5 portions de 1 ml de dichlorométhane stabilisé avec amylène. L'extrait est passé à travers le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) afin d'éliminer toute trace d'eau, avant d'être évaporé à sec. Le résidu est dilué dans 1 ml de dichlorométhane et les spectres IR ont été enregistrés à une résolution de 4 cm^{-1} avec l'accumulation de 20 spectres, en considérant le background de dichlorométhane obtenu dans les mêmes conditions spectrales.

Les valeurs maximales d'absorbance des stérols ont été obtenues en mesurant la hauteur de pics à la bande 1049 cm^{-1} , corrigées avec une ligne de base stabilisée entre 1014-1060 cm^{-1} . Les valeurs d'absorbance corrigées ont été extrapolées dans la droite d'étalonnage correspondante obtenue pour un mélange contenant des solutions de cholestérol et d'acétate de cholestéryle préparées dans la proportion 5:5 (p/p) dans un domaine de concentration qui varie de 0,7 à 10 mg ml^{-1} ,

traitées de la même manière que les échantillons réels. Afin d'évaluer le taux de fucostérol dans les algues brunes en utilisant des étalons de cholestérol, un facteur de 1,259 a été employé. Ce facteur représente le rapport entre les pentes de droites d'étalonnage trouvées en utilisant des étalons de fucostérol et de cholestérol, préparées directement dans le dichlorométhane stabilisé avec le β -amylène.

3.4 Résultats et discussion

3. 4.1 Détermination du cholestérol et du fucostérol dans le CH_2Cl_2 par spectroscopie IRTF

3.4.1.1 Spectres IRTF du cholestérol et du fucostérol dans CH_2Cl_2

La figure 3.1 montre les spectres d'absorption de cholestérol et de fucostérol préparés dans le CH_2Cl_2 . Les deux étalons présentent des bandes caractéristiques à 3600 cm^{-1} qui correspondent à la vibration du groupement O-H de l'alcool libre, entre 2950 et 2850 cm^{-1} vibration asymétrique de la bande C-H des groupements $-\text{CH}_2-$ et $-\text{CH}_3$, à 1444 cm^{-1} vibrations C=C et C-H, à 1372 cm^{-1} interaction de déformation O-H et élongation C-O dans le groupement C-O-H et à 1049 cm^{-1} qui correspond à la vibration de C-O secondaire dans le groupement C-O-H. Ainsi, les mesures de l'absorbance de la hauteur du pic à cette dernière bande corrigée avec une ligne de base stabilisée entre 1060 - 1014 cm^{-1} ont été utilisées dans cette étude pour déterminer les stérols.

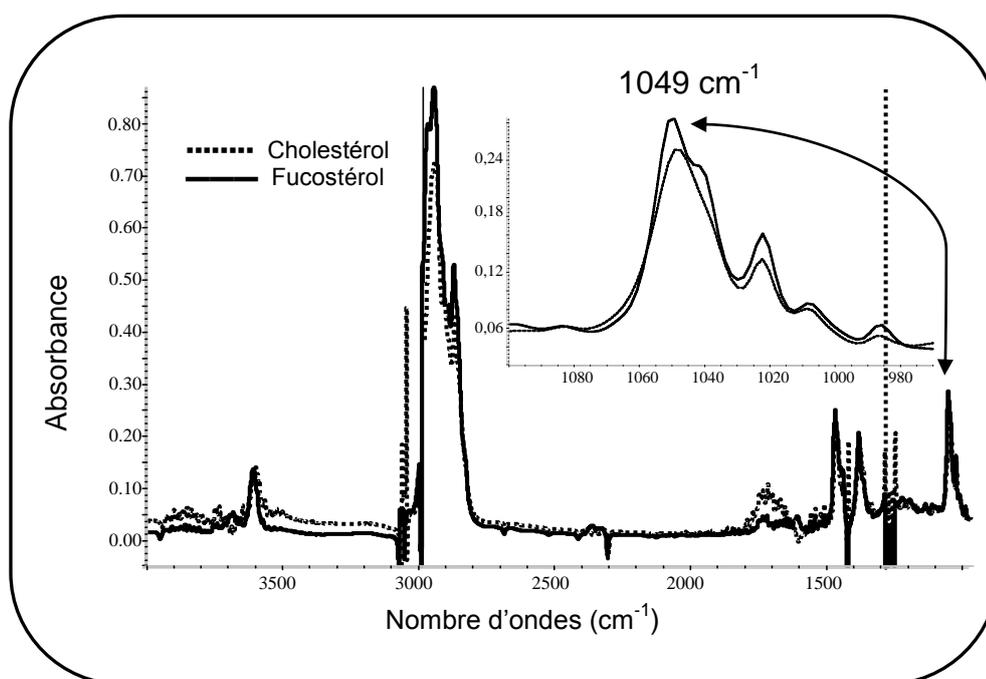


Figure 3.1: Spectres IRTF de 10 mg ml^{-1} de cholestérol (----) et de 10 mg ml^{-1} de fucostérol (—) préparés dans le CH_2Cl_2 . Figure insérée :détaille des bandes autour de la région à 1049 cm^{-1}

3. 4. 1.2 Taux de purification du fucostérol à partir de l'extrait d'algue brune

Comme le fucostérol est un standard qui coûte cher (1000 fois le prix de cholestérol) et en plus qui n'est pas disponible, on a pensé à le purifier à partir d'algues brunes afin de l'utiliser dans la préparation des solutions étalons pour l'établissement des droites d'étalonnage. Au niveau du laboratoire d'accueil en France, une équipe avec laquelle nous collaborons, travaillant sur l'identification structurale d'une cystoseire a isolé à partir de cette algue une quantité de 100 mg de fucostérol.

La droite d'étalonnage du fucostérol purifié préparé directement dans CH_2Cl_2 a été établie par spectrométrie IRTF (figure 3. 2) et ses caractéristiques analytiques sont illustrés dans le tableau 3.1.

Comme on peut le voir, le rendement de purification qui est de l'ordre de 78 % ne permet pas l'utilisation du fucostérol purifié pour les différentes déterminations, d'où la nécessité de chercher une autre alternative pour substituer le fucostérol.

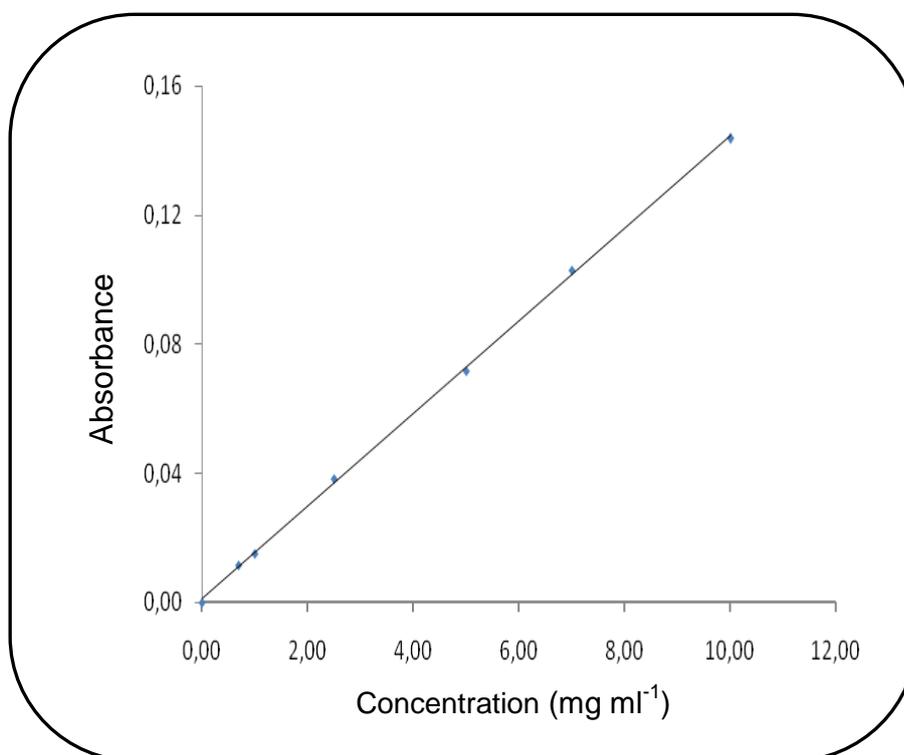


Figure 3.2 : Droite d'étalonnage du fucostérol purifié dans le CH_2Cl_2 stabilisé avec β - amyène par spectrométrie IRTF en considérant la bande 1049 cm^{-1}

Tableau 3. 1 Caractéristiques analytiques de fucostérol purifié et de fucostérol étalon déterminées directement dans CH_2Cl_2 stabilisé avec β -amylène par spectrométrie IRTF en considérant la bande à 1049 cm^{-1}

Paramètres	Fucostérol	Fucostérol purifié
Droite d'étalonnage	$0.0004 + 0.0186 C$	$0.0010 + 0.0143 C$
coefficient de Correlation	0.9999	0.9998
L. D. ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	2.7	2.09
D. S. R. % (n=10)	0.11	0.08
Rendement de purification (%)		78

Conditions Experimentales: **C:** Concentration en mg.ml^{-1} , **D. S. R.** en %: Deviation Standard Relative ($C = 5\text{ mg.ml}^{-1}$ de stérols). **L. D.:** Limite de Détection en $\mu\text{g ml}^{-1}$ obtenu pour un niveau de confiance de 99.6 % ($k = 3$), Résolution nominale: 4 cm^{-1} , nombre de balayage minimum égale à 20 spectres, parcours optique: 0.5 mm , fenêtres en CaF_2 , bande à 1049 cm^{-1} stabilisée avec une ligne de base entre 1014 et 1060 cm^{-1} .

3.4.1.3 Etablissement d'un facteur de correction pour utiliser le cholestérol comme étalon dans la détermination du fucostérol

Cette étude est basée sur l'idée de substituer le fucostérol (stérol majoritaire dans les algues brunes [133] par le cholestérol lors des différentes déterminations. Pour le faire correctement, il faut établir une relation entre les signaux obtenus, au nombre d'onde de mesure sélectionné, pour les deux stérols en tenant compte des différences de sensibilité indiquées par les spectres de la figure 3. 1.

La figure 3.3 illustre les spectres d'absorbance pour une série de solutions des étalons de fucostérol préparées directement dans CH_2Cl_2 stabilisé avec l'amylène, et ce, dans un domaine de concentration compris entre 0.7 et 10 mg ml^{-1}

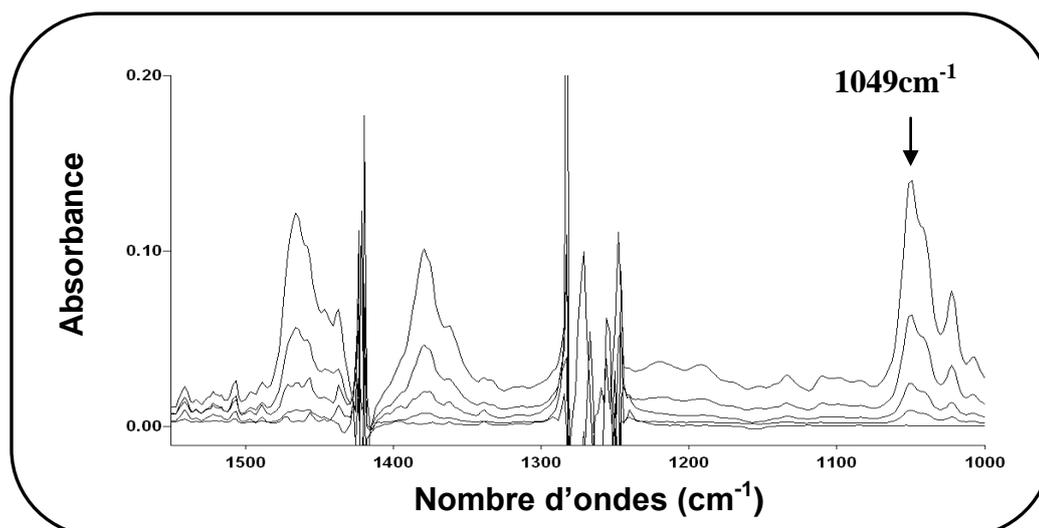


Figure 3.3 : Spectres d'absorbance de fucostérol préparé dans CH_2Cl_2 stabilisé avec l'amylène, pour un domaine de concentration compris entre $0.7\text{-}10 \text{ mg ml}^{-1}$

Le tableau 3.2 montre les caractéristiques analytiques des droites d'étalonnage pour le fucostérol et le cholestérol obtenues dans le CH_2Cl_2 stabilisé avec le β -amylène. Une très bonne déviation standard relative de 0,1%, une faible limite de détection, d'environ $3 \mu\text{g ml}^{-1}$, et une bonne linéarité des droites d'étalonnage ont été obtenues.

Tableau 3. 2 Caractéristiques analytiques de cholestérol et de fucostérol déterminées directement dans CH_2Cl_2 stabilisé avec β -amylène par spectrométrie IRTF en considérant la bande à 1049 cm^{-1}

Paramètres	Cholesterol	Fucostérol
Droite d'étalonnage	$0.0007 + 0.0148C$	$0.0004 + 0.0186C$
coefficient de Corrélation	0.9999	0.9999
L. D. ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	2.7	2.7
D. S. R. % (n=10)	0.05	0.11
Domaine de Conc. (mg.ml^{-1})	0.7-10	

Conditions Experimentales: C: Concentration en mg.ml^{-1} , D. S. R. en %: Deviation Standard Relative ($C = 5 \text{ mg.ml}^{-1}$ de stérols). L. D.: Limite de Détection en $\mu\text{g ml}^{-1}$ obtenu pour un niveau de confiance de 99.6 % ($k = 3$), Résolution nominale: 4 cm^{-1} , nombre de balayage minimum égale à 20 spectres, parcours optique: 0.5 mm , fenêtres en CaF_2 , la bande à 1049 cm^{-1} est sélectionnée et stabilisée avec une ligne de base entre 1014 et 1060 cm^{-1} .

Le rapport entre les deux pentes des droites d'étalonnages de fucostérol et de cholestérol préparées directement dans le CH_2Cl_2 stabilisé avec le β - amyène est de 1.259.

Les résultats du tableau 3.3 illustrent la stabilité du facteur de correction établi et ce, en considérant les deux pentes des droites d'étalonnage des deux étalons obtenues dans une même session. Les valeurs obtenues présentent un écart type de 0.003.

Tableau 3. 3 Evaluation du facteur de correction obtenu pour la détermination du fucostérol en utilisant les droites d'étalonnage de cholestérol

Droite d'étalonnage du fucostérol	Droite d'étalonnage du cholestérol	facteur de Correction	
0.0001 + 0.01871C	0.0006 + 0.01488C	1.257	1.259 ± 0.003
0.0004 + 0.01875C	0.0007 + 0.01489C	1.260	
0.0004 + 0.01855C	0.0006 + 0.01481C	1.253	
0.0000 + 0.01865C	0.0007 + 0.01478C	1.261	
0.0003 + 0.01875C	0.0007 + 0.01476C	1.260	
0.0005 + 0.01876C	0.0005 + 0.01488C	1.261	

3.4.2. Extraction en phase solide et détermination des stérols par spectroscopie IRTF

La détermination des stérols totaux dans les algues, nécessite une réaction de saponification de l'extrait dans le but de transformer les stérols liés en stérols libres, suivie par une extraction en phase solide pour la séparation et la préconcentration des stérols totaux [192]. Travaillant dans ces conditions, la calibration standard et l'addition standard fournissent des valeurs comparables de la pente d'étalonnage. Cela montre que la méthode de détermination des stérols par spectroscopie IRTF basée sur la saponification et l'extraction en phase solide est indépendante de l'effet de matrice. Il a été démontré que cette stratégie permet une récupération quantitative du taux de stérols totaux dans les échantillons d'algues rouges et fournit des résultats aussi précis que ceux obtenus par CLHP.

3.4. 2.1 Récupération des stérols libres et estérifiés

Il a été signalé dans la littérature de grandes différences dans la composition des stérols d'algues, ce qui pourrait s'expliquer par les variations saisonnières ou géographiques [79], mais en outre, par des problèmes dans les méthodes utilisées, pour déterminer les stérols totaux, en fonction de la relation entre les stérols libres et estérifiés. A cause de cela, nous avons évalué la procédure proposée, pour la détermination des stérols totaux dans les algues, en étudiant la récupération des échantillons synthétiques préparés dans des proportions différentes entre le cholestérol libre et estérifié. Une série d'échantillons synthétiques, contenant $10,0 \text{ mg ml}^{-1}$ de mélanges de cholestérol et de l'acétate de cholestéryle dans des proportions différentes (p/p), ont été analysés après la réaction de saponification et l'extraction en phase solide en utilisant des cartouches de type DSC-18. Le tableau 3. 4 montre que quelle que soit la proportion entre les stérols libres et estérifiés, le pourcentage de récupération trouvé par la méthode proposée est d'environ 100%. Les résultats ont été obtenus par extrapolation des valeurs d'absorbance obtenues dans la droite d'étalonnage (obtenue à partir du cholestérol). Les étalons étant traités de la même manière que les échantillons (voir tableau 3. 2).

Tableau 3. 4 Rendement d'extraction de stérol libre et de stérol lié pour différentes proportions de cholestérol et d'acétate de cholestéryle

p_{chol} / p_{chol-acet}	10/0	9/1	7/3	6/4	5/5	0/10
Rendement (%)	98	100	100	103	102	101

Le poids du stérol total ajouté est 10 mg.

3.4.2.2 Caractéristiques analytiques de toute la procédure développée pour la détermination des stérols dans les algues par spectroscopie IRTE

Des échantillons synthétiques ont été saponifiés et préconcentrés à travers des cartouches d'EPS tel que décrit dans la partie expérimentale. La limite de détection de la méthode dans les conditions précitées est d'environ $0,9 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ avec une valeur de la déviation standard relative de 0,9 % calculée pour 10 analyses indépendantes d'un échantillon de concentration de 5 mg ml^{-1} . Le rendement total du processus d'élution-rétention correspond à 98%, comme l'illustre les résultats

regroupés dans le tableau 3.5. Ces éléments montrent que la procédure mise au point est adaptée pour l'analyse des échantillons réels.

Tableau 3. 5 Caractéristiques analytiques de cholestérol déterminées directement dans CH_2Cl_2 stabilisé avec β -amylène et des étalons de solutions mélanges après sap. et EPS par spectrométrie IRTF

Paramètres	Cholestérol	Etalons préparés de la même manière que les échantillons
Droite d'étalonnage	$0.0007 + 0.0148C$	$0.0057 + 0.0146C$
coefficient de Correlation	0.9999	0.9915
L. D. ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	2.7	0.9
D. S. R. % (n=10)	0.05	0.9
Domaine de Conc. (mg ml^{-1})	0.7-10	

Conditions Experimentales: **C:** Concentration en mg.ml^{-1} , **D. S. R.** en %: Deviation Standard Relative ($C = 5 \text{ mg.ml}^{-1}$ de stérols). **L. D.:** Limite de Détection en $\mu\text{g ml}^{-1}$ obtenu pour un niveau de confiance de 99.6 % ($k = 3$), Résolution nominale: 4 cm^{-1} , nombre de balayage minimum égale à 20 spectres, parcours optique: 0.5 mm, fenêtres en CaF_2 , la bande à 1049 cm^{-1} est sélectionné et stabilisée avec une ligne de base entre 1014 et 1060 cm^{-1} .

3.4.3. Détermination des stérols totaux dans les extraits des échantillons réels des algues brunes par spectroscopie IRTF

Les stérols totaux chez les algues brunes, étant globalement analysés, dans ce cas, en tant que fucostérol, la détermination du taux a été effectuée en considérant environ 100 mg d'extrait de chaque espèce d'algue brune, préalablement filtré et préparé comme indiqué dans la partie expérimentale. Les spectres IRTF des échantillons réels obtenus après traitement de sont présentés dans la figure 3. 4. On peut constater que tous les échantillons d'extraits présentent un maximum à la bande 1049 cm^{-1} avec la même pente que des solutions de fucostérol.

Les données trouvées pour les échantillons d'algues brunes sont résumées dans le Tableau 3. 6. Comme on le voit, la concentration de stérols totaux dans les échantillons analysés varie entre $1,55 \pm 0,19\%$ et $4,53 \pm 0,3\%$ avec une très bonne répétabilité pour trois analyses indépendantes de l'échantillon.

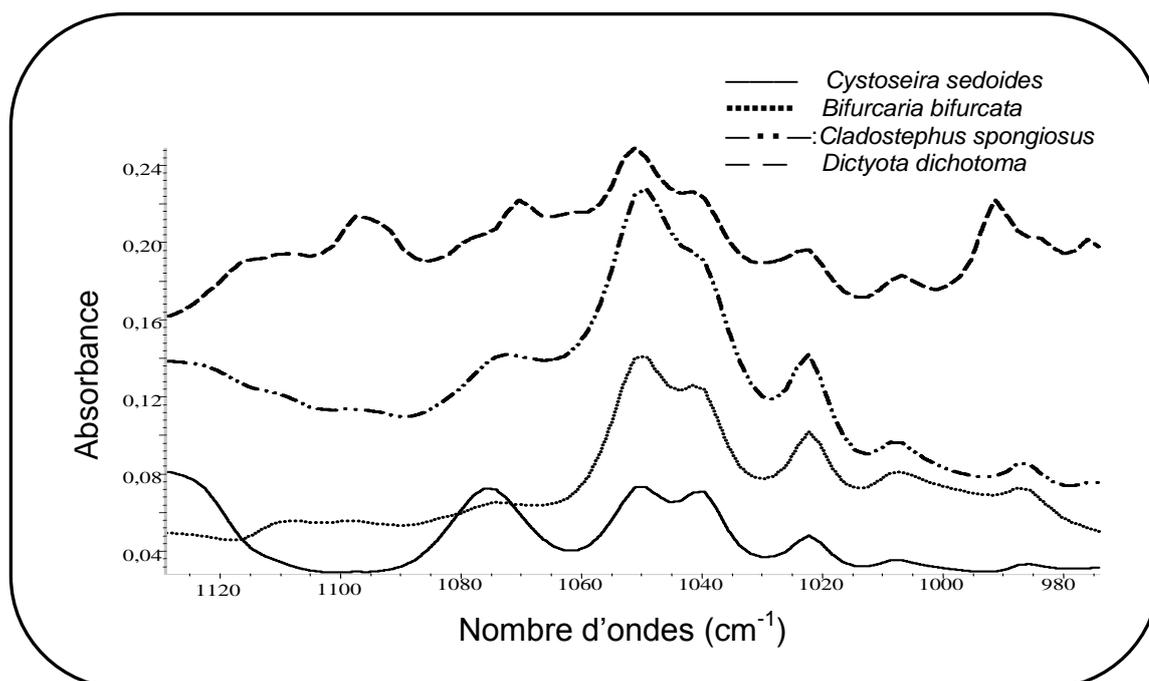


Figure 3.4 : Spectres IRTF d'environ 100 mg d'extrait de chaque échantillon d'algue saponifié et préconcentré à travers des cartouches de phase solide de type DSC-18 élué avec le CH_2Cl_2 stabilisé avec le β - amyliène

Tableau 3. 6 Concentration des stérols totaux dans différentes espèces d'algues brunes

Algue	Masse d'extrait (mg)	Concentration (mg ml^{-1})	% stérols totaux (p/p)
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	137	3.85 ± 0.18	2.52 ± 0.12
<i>Cladostephus spongiosus</i>	107	4.85 ± 0.30	4.53 ± 0.30
<i>Dictyota dichotoma</i>	100	1.81 ± 0.20	1.81 ± 0.20
<i>Cystoseira sedoides</i>	102	1.58 ± 0.19	1.55 ± 0.19

Valeurs indiquées pour trois analyses indépendantes \pm la déviation standard correspondante. Le pourcentage de stérols est rapporté à l'extrait d'algue.

3.5 Conclusions

Les études menées montrent que les stérols peuvent être déterminés rapidement et d'une manière précise et exacte dans les algues brunes par spectroscopie IRTF après saponification et préconcentration à travers des cartouches de phase solide type DSC-18. La détermination est réalisée en utilisant des solutions étalons de cholestérol (traitées de la même manière que Les

échantillons réels) et en considérant un facteur de correction pour évaluer le taux de stérols totaux dans ces échantillons d'algues dont le stérol majoritaire présent est le fucostérol et ce, sans l'utilisation de techniques chromatographiques. En utilisant la méthode développée, les valeurs obtenues de l'analyse des quatre espèces d'algues étudiées montrent que le contenu des stérols diffère d'une algue à une autre. Suite à cette étude, la spectroscopie IRTF prouve qu'elle est une bonne et rapide alternative pour la détermination des stérols dans différentes variétés d'algues marines.

CHAPITRE 4
ETUDE CHIMIQUE DE LA FRACTION PHENOLIQUE ISOLEE A PARTIR DE
L'ALGUE BRUNE *ZONARIA TOURNEFORTII* (J. V. LAMOUREUX)
MONTAGNE

4. 1. Introduction

L'algue brune *Zonaria tournefortii* (J. V. Lamouroux) Montagne est connue pour accumuler les acylphloroglucinols et leurs dérivés décrits dans le chapitre 1 (composés phénoliques des algues marines : page 61). Ces métabolites ont été étudiés essentiellement par l'équipe italienne d'Amico et Piattelli [169, 171, 179, 181] sur une espèce de *Z. tournefortii* récoltée en Sicile. Leur présence est également signalée, non seulement, chez des espèces de Dictyotacées du pacifique, telles que *Z. farlowii* Setchell & N. L. Gardner, *Z. desingiana* J. Agardh, *Lobophora papenfussii* (W. R. Taylor) Fargaly [170], mais aussi chez des Sargassacées (ordre Fucales) du genre *Cystophora* J. Agardh qui n'ont aucun lien taxonomique avec les espèces précédentes [167, 168].

Pour notre part, nous avons entrepris, en collaboration étroite avec notre laboratoire d'accueil français, de reprendre l'étude des acylphloroglucinols de *Z. tournefortii*, non pas sur l'espèce sicilienne déjà étudiée [169, 171, 179, 181], mais sur celle que nous avons récoltée sur la côte algérienne (« La Corne d'Or », Tipaza). C'est la première fois que cette espèce est récoltée en ce lieu, en vue d'une étude chimique.

L'objectif de ce travail est double :

- (1) – vérifier s'il n'existe pas, chez *Z. tournefortii*, un phénomène de variation géographique conduisant à une modification de la structure chimique de certains de ses métabolites secondaires en fonction du lieu de récolte de l'algue, comme cela

existe dans le cas des méroditerpènes de *Cystoseira amentacea* var. *stricta* [193] et des diterpènes de *Bifurcaria bifurcata* [193, 194],

(2) – mettre en évidence, dans cette algue, le précurseur biogénétique des acylphloroglucinols et leurs dérivés, afin de proposer une hypothèse cohérente de biosynthèse de ces composés.

4. 2. Partie expérimentale

4. 2. 1. Appareillage et réactifs

4. 2. 1. 1. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

Les analyses de CLHP à polarité de phases normale (analytique et semi-préparative) sont menées sur une chaîne chromatographique composée d'une pompe Constamétric 3000 (LDC Analytical), d'un système de détection réfractométrique (Waters 410) et d'un intégrateur Varian 4400. La silice est la phase stationnaire de la colonne utilisée. A l'échelle analytique, il s'agit d'une colonne Merck, Purospher® STAR Si (5 µm) 250 mm x 4,6 mm, précédée d'une précolonne. A l'échelle semi-préparative, il s'agit d'une colonne Merck, Lichrospher® Si 60 (5 µm) 250 mm x 10,5 mm, précédée d'une précolonne. Dans les deux cas, la boucle utilisée est de 20 µL.

Les analyses de CLHP à polarité de phases inversée sont réalisées sur une chaîne chromatographique (Bio-tek instruments) composée d'un injecteur automatique (HPLC 560 auto sampler), d'un four (HPLC 582 column thermostat), d'une pompe à trois voies (system 525) et 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. La silice greffée en C18 est la phase stationnaire de la colonne analytique utilisée [HyPURITY C₁₈ (5µm) 250 mm x 4,6 mm] qui est précédée d'une précolonne. La boucle utilisée est de 20 µL.

L'éluant utilisé en CLHP à polarité de phases normale est un mélange binaire d'acétate d'éthyle (réf. : Carlo Erba 448256) et d'isooctane (TMP) ayant pour réf. : Carlo Erba 446732. En ce qui concerne la CLHP à polarité de phases inversée,

les solvants utilisés sont : l'acétonitrile (réf. : Carlo Erba 414646), le méthanol (réf. : Carlo Erba 414818) et l'eau (Ultra Pure Water System, Milli-Q plus).

4. 2. 1. 2. Spectroscopie moléculaire

Dans ce chapitre, nous avons utilisé essentiellement les techniques de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et de spectrométrie de masse (SM).

En SM, nous avons utilisé la technique par impact électronique à 70 eV, soit avec un spectromètre Varian MAT 311 (Université de Rennes I), soit sur un spectromètre HP-5972A (Université du Sud Toulon-Var).

En ce qui concerne la RMN, les expériences unidimensionnelles (RMN ^1H , RMN ^{13}C et DEPT) et bidimensionnelles (homonucléaire : COSY ^1H - ^1H et hétéronucléaires : HMQC, HSQC et HMBC) sont réalisées à haut champ (400 MHz) sur un spectromètre Brüker Avance 400 à l'Institut des Sciences de l'Ingénieur de l'Université du Sud Toulon-Var (voir chapitre 1 sur la RMN, pages 40 à 45). Les spectres de RMN sont réalisés sur des échantillons en solution dans le chloroforme deutérié et les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS, réf. : Aldrich T₂, 400-7) utilisé comme référence interne. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz (Hz).

4. 2. 1. 3. Polarimétrie

Le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]$ est mesuré sur un polarimètre Perkin Elmer 141, à 20°C pour la raie D du sodium (589 nm). Le composé est solubilisé dans le dichlorométhane et la mesure est réalisée dans une microcellule de volume 1 mL et de longueur 100 mm. $[\alpha]$ est ensuite calculé avec la formule suivante : $[\alpha]_{\lambda}^t = 100 \cdot \alpha \cdot 100 / c \cdot l$, où α = angle de rotation, c = concentration de l'échantillon en g/100 mL, l = longueur de la cellule en mm, t = température de l'échantillon et λ = longueur d'onde de la lampe utilisée.

4. 2. 2. Procédure générale

4. 2. 2. 1. Préparation des échantillons

L'algue étudiée (*Zonaria tournefortii*) a été récoltée en mai 2001, sur le littoral méditerranéen, au niveau du complexe touristique « La Corne d'Or » à Tipaza

(Algérie). Un échantillon de cette algue récoltée à une profondeur de 2 à 3 mètres a été conservé dans une solution de formol à 5 % et identifié par le Dr. B. de Reviere qui a déposé un spécimen de cette espèce (n° PC 011419) dans l'herbier du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.

L'algue a subi, après récolte, un tri manuel afin d'éliminer les épiphytes et autres organismes susceptibles de contaminer la nature chimique de l'extrait. Ce dernier est suivi d'un rinçage à l'eau douce et d'un séchage à l'air, à l'abri de la lumière.

4. 2. 2. 2. Extraction

L'extrait brut est obtenu (fig. 4. 1) par le stockage de 160 g d'algue sèche dans 1 L d'un mélange de solvants $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1/1 : v/v). Le rendement d'extraction est de 2,5 % (défini comme étant le rapport de masse de l'extrait obtenu sur la masse d'algue sèche). Cet extrait, solubilisé dans l'éther, est ensuite neutralisé avec une solution aqueuse de potasse 0,5 N, dans le but de séparer les produits phénoliques sous forme de phénates, solubles en phase aqueuse. 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 ensuite acidifiée par une solution d'acide sulfurique 0,5 N, puis extraite à l'éther. La solution obtenue est lavée à l'eau jusqu'à pH neutre puis séchée sur MgSO_4 et le solvant évaporé, conduisant à un extrait (figure 4. 1) contenant des acides carboxyliques et des phénols que nous avons appelé « fraction phénolique ». Celle-ci représente 71,5 % de l'extrait brut.

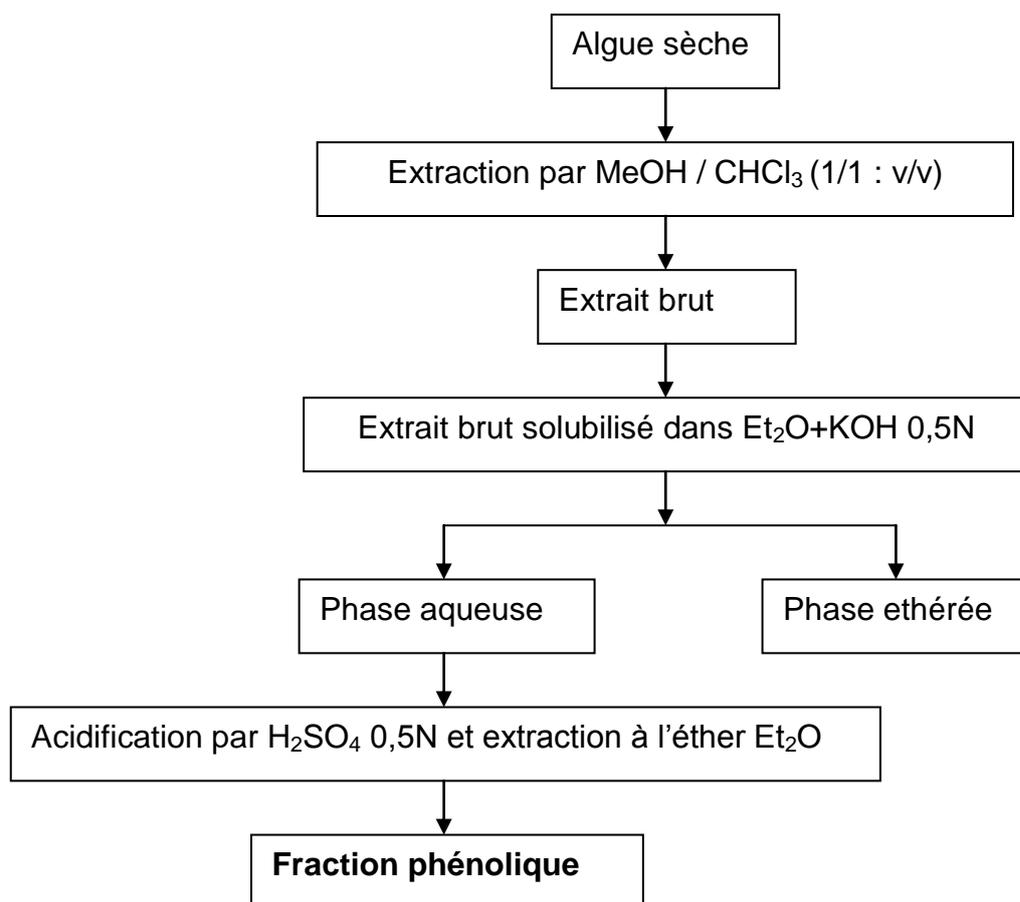


Figure 4. 1 : Extraction de *Zonaria tournefortii* et traitement de l'extrait brut

4. 3. Etude chimique de la « fraction phénolique »

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 de spectroscopie moléculaire (RMN essentiellement).

4. 3. 1. Séparation par CLHP

La fraction phénolique (4 g) a été analysée par CLHP semi-préparative à polarité de phases normale, avec l'éluant AcOEt/isooctane : 3/7 (figure 4. 2), ce qui a permis de récupérer cinq fractions principales. La fraction 5 (426 mg) a été soumise à une analyse par CLHP analytique à polarité de phases normale (éluant : AcOEt/isooctane 3/7), conduisant à l'isolement de 20 mg du produit **1** (fig. 4. 3). Il est décrit comme étant le produit phénolique majoritaire dans la même espèce récoltée en Sicile [169]. Pour notre part, nous l'avons purifié à partir d'un mélange de produits lipidiques où il est minoritaire.

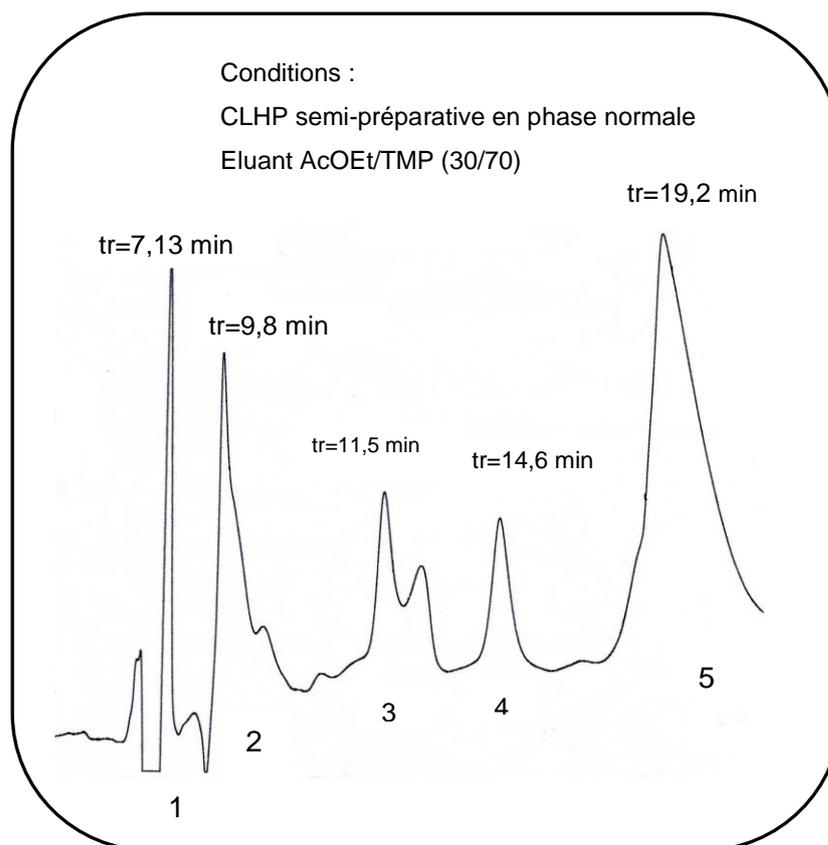


Figure 4.2 Chromatogramme CLHP de la fraction phénolique

La séparation de la fraction 4 (187 mg) par CLHP analytique à polarité de phases inversée, avec l'éluant MeCN/H₂O : 6/4, a permis l'isolement du produit **2** (20 mg), (figure. 4. 3). Les fractions 2 (109 mg) et 3 (180 mg) ont été étudiées par CLHP analytique à polarité de phases inversée. L'éluant MeCN/MeOH/H₂O : 4,7/4,0/1,3 a permis d'isoler les produits **3** (40 mg) et **4** (36 mg) à partir de la fraction 3 (figure. 4. 3). Dans les mêmes conditions, le produit **5** (30 mg) a été isolé de la fraction 2 (figure 4. 3).

4. 3. 2. Etude structurale des produits isolés

La caractérisation structurale a été effectuée par analyses des données spectroscopiques (essentiellement RMN ¹H, RMN ¹³C mono et bidimensionnelles) et comparaison avec la littérature : les composés **1** et **2** sont deux acylphloroglucinols préalablement décrits dans *Z. tournefortii* récoltée en Sicile [169, 171], de même que **3** et **4** qui sont deux dihydroxychromanones dérivées de **1** [179, 181]. En ce qui concerne le composé **5**, il est décrit pour la première fois dans cette espèce et nous l'avons identifié comme étant l'acide (tout *Z*)-

5,8,11,14,17-icosapentaénoïque. Les attributions des signaux de RMN ^{13}C n'étant pas données dans la littérature [195, 196, 197], nous avons réalisé la caractérisation complète de ce composé par RMN mono et bidimensionnelle, additionnée de la spectrométrie de masse par impact électronique.

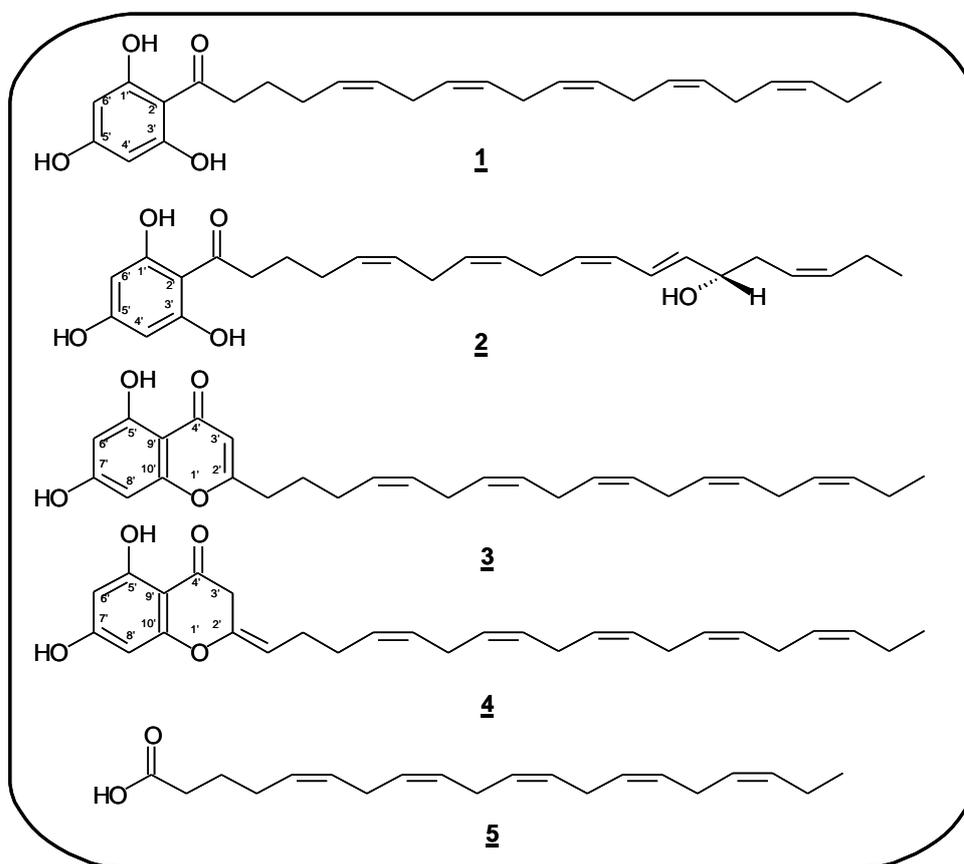


Figure 4. 3 : Produits isolés à partir de la fraction phénolique

Pour les quatre autres produits rencontrés chez *Z. tournefortii*, on a d'abord constaté que les signaux de RMN ^1H et ^{13}C de **3** et **4** ont des valeurs strictement identiques à celles reportées dans la littérature [179, 181]. Cela nous a conduits à ne pas présenter leur caractérisation structurale dans ce manuscrit. Par contre, les acylphloroglucinols **1** et **2**, présentant des différences avec la littérature au niveau des attributions des signaux de RMN ^{13}C [169, 171], font l'objet d'une description complète de leur étude structurale.

4. 3. 2. 1 Etude structurale du produit 1

L'analyse structurale du produit **1** par RMN ^1H et ^{13}C , comparée aux données bibliographiques [169], permet de conclure qu'il s'agit de

l'acylphloroglucinol : (tout *Z*)-2'-eicosa-5,8,11,14,17-pentaénoylphloroglucinol - de formule brute $C_{26}H_{34}O_4$ et de masse molaire 410 g/mol - déjà décrit dans la littérature [169]. En particulier, le spectre RMN du proton (tableau 4. 1) met clairement en évidence le système pentaénique non conjugué $[(-CH=CH-CH_2)_4CH=CH-]$ sous forme de deux multiplets centrés à δ 5,35 ppm (10H, m) pour les protons éthyléniques et à δ 2,82 ppm (8H, m) pour les CH_2 bis-allyliques. La RMN du carbone (tableau 4. 2) met en évidence des carbones sp^2 comprenant : un signal correspondant à une fonction carbonyle à δ 205,75 ppm et des signaux à δ 161,93 (3C), δ 104,91 et δ 95,76 ppm (2C) attribués aux atomes de carbone du noyau phénolique. Les autres signaux sp^2 résonnent à δ 132,13, δ 129,60, δ 128,61, δ 128,41, δ 128,22 (2C), δ 128,00(2C), δ 127,91 et δ 127,01 ppm. Huit méthylènes sont observables à δ 43,45, δ 26,85, δ 25,63 (4C), δ 24,38, δ 20,55ppm et un groupement méthyle à δ 14,26 ppm. La nature *Cis* (*Z*) des doubles liaisons de la chaîne latérale est confirmée par la valeur du glissement chimique à δ 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 [198].

La RMN 2D (séquences HMQC et HMBC) effectuée sur l'acide eicosapentaénoïque entièrement *Z* (**5**), (voir figures. 4. 7 et 4. 8), nous a permis de préciser les attributions des signaux des protons et des carbones répertoriés dans les tableaux 4. 1 et 4. 2. Cela nous a conduits, notamment, à interchanger les valeurs des δ des C-3 et C-4 dans la référence [169].

Tableau 4. 1 : Données de RMN ^1H des produits **1**, **2** et **5**

N° H	1	Ref. [169] ^a	2	Ref [171] ^c	5	.Ref.[196] ^e
	^1H CDCl_3 400 MHz δ (ppm)	^1H $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}^{\text{D}}$ 270 MHz δ (ppm)	^1H CDCl_3 400 MHz δ (ppm)	^1H $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}^{\text{D}}$ 270 MHz δ (ppm)	^1H CDCl_3 400 MHz δ (ppm)	^1H CDCl_3 300 MHz δ (ppm)
1'	--	--	--	--	--	--
2'	--	--	--	--	--	--
3'	--	--	--	--	--	--
4'	5,86 s large	6,00 s	5.87 s	6,37 s	--	--
5'	--	--	--	--	--	--
6'	5,86 s large	6,00	5.87 s	6,37 s	--	--
1	--	--	--	--	--	--
2	3,06 t (7)	3,21 t (7)	3.04 t (7)	3,37 t (7)	2,36 t (7)	2,35 t (7,5)
3	1,76 quint (7)	1,84 quint. (7)	1.73 quint. (7)	1,93 quint. (7)	1,71 quint. (7)	1,71 m
4	2,16 q (7)	2,19 q (7)	2.13 q (7)	2,21 q (7)	2,13 q (7)	2,12 m
5	5,29-5,45 m	5,35 m	5.29 - 5.47 m	5,35-5,44 m	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m
6	5,29-5,45 m	5,35 m	5.29 - 5.47 m	5,35-5,44 m	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m
7	2,76-2,88 m	2,85 m	2.78 t large	2,98 t large (7)	2,77-2,90 m	2,72-2,89 m
8	5,29-5,45 m	5,35 m	5.29 - 5.47, m	5,35-5,44 m	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m
9	5,29-5,45 m	5,35 m	5.29 - 5.47, m	5,35-5,44 m	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m
10	2,76-2,88 m	2,85 m	2.92 q (7)	2,98 t large (7)	2,77-2,90 m	2,72-2,89 m
11	5,29-5,45 m	5,35 m	5.29- 5.47 m	5,44 m	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m
12	5,29-5,45 m	5,35 m	5.97 t (11)	6,10 t (10,5; 16)	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m
13	2,76-2,88 m	2,85 m	6.58 dd (11; 15)	6,85 dd (10,5; 16)	2,77-2,90 m	2,72-2,89 m
14	5,29-5,45 m	5,35 m	5.71 dd (6,5; 15)	5,97 dd (6; 16)	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m
15	5,29-5,45 m	5,35 m	4.31 q (6,5)	4,50 q (6)	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m
16	2,76-2,88 m	2,85 m	2.37 m	2,55 m	2,77-2,90 m	2,72-2,89 m
17	5,29-5,45 m	5,35 m	5.58 dt (6,5; 10,5)	5,64 ddd (8)	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m
18	5,29-5,45 m	5,35 m	5.29 - 5.47 m	5,46 m	5,28-5,46 m	5,28-5,46 m
19	2,08 quint. (7)	2,07 quint (7)	2.05 quint. (7)	2,04 quint. (7)	2,06 quint. (7)	2,12 m
20	0,97 t (7)	0,97 t (7)	0.95 t (7)	0,91 t (7)	0,97 t (7)	0,96 t (7,5)

Les constantes de couplage entre parenthèses sont exprimées en Hz.

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

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

^a : Valeurs de RMN ^1H de la ref. [169] ajoutées pour comparaison

^b : L'effet de solvant explique certaines différences de δ avec **1**.

^c : Valeurs de RMN ^1H de la ref. [171] ajoutées pour comparaison.

^d : L'effet de solvant explique certaines différences de δ avec **2**.

^e : Valeurs de la ref. [196] ajoutées pour comparaison.

Tableau 4. 2 : Données de RMN ^{13}C des produits 1, 2 et 5

N° C	<u>1</u>	Ref. [169] ^a	<u>2</u>	Ref. [171] ^c	<u>5</u>
	^{13}C CDCl_3 100 MHz δ (multiplicité)	^{13}C CDCl_3 20,1 MHz δ (multiplicité)	^{13}C CDCl_3 100 MHz δ (multiplicité)	^{13}C CDCl_3 20,1 MHz δ (multiplicité)	^{13}C CDCl_3 100 MHz δ (multiplicité)
1'	161,93 (s)	164,03 (s)	162.80 (s)	164,21 (s)	--
2'	104,91 (s)	104,94 (s)	104.85 (s)	105,18 (s)	--
3'	161,93 (s)	164,03 (s)	162.80(s)	164,21 (s)	--
4'	95,76 (d)	95,46(d)	95.60 (d)	96,01 (d)	--
5'	161,93 (s)	162,58 (s)	163.82 (s)	163,31 (s)	--
6'	95,76 (d)	95,46 (d)	95.60 (d)	96,01 (d)	--
1	205,75 (s)	206,84 (s)	206.38 (s)	207,09 (s)	179,04 (s)
2	43,45 (t)	43,35 (t)	43.21 (t)	43,36 (t)	33,24 (t)
3	24,38 (t)	26,77 ^b (t)	24.52 (t)	27,02 ^d (t)	24,50 (t)
4	26,85 (t)	24,29 ^b (t)	26.94 (t)	24,77 ^d (t)	26,45 (t)
5	129,60 (d)	129,71 (d)	129.65 (d)	129,90 (d)	129,02 (d)
6	128,61 (d)	129,10 (d)	128.82 (d)	129,17 (d)	128,76 (d)
7	25,63 (t)	25,56 (t)	25.52 (t)	25,75 (t)	25,63 (t)
8	128,41 (d)	128,74 (d)	128.34 (d)	128,69 (d)	128,57 (d)
9	127,91 (d)	128,07 (d)	127.57 (d)	127,96 (d)	127,88 (d)
10	25,63 (t)	25,56 (t)	26.10 (t)	26,24 (t)	25,63 (t)
11	128,23 (d)	128,56 (d)	126.16 (d)	126,62 (d)	128.14 (d)
12	128,00 (d)	128,38 (d)	134.40 (d)	134,76 (d)	128.06 (d)
13	25,63 (t)	25,56 (t)	123.08 (d)	123,41 (d)	25,63 (t)
14	128,22 (d)	128,56 (d)	135.84 (d)	136,04 (d)	128.14 (d)
15	128,00 (d)	128,38 (d)	72.48 (d)	72,82 (d)	128.24 (d)
16	25,63 (t)	25,56 (t)	35.09 (t)	35,22 (t)	25,63 (t)
17	127,01 (d)	127,16 (d)	127.16 (d)	127,60 (d)	127,01 (d)
18	132,13 (d)	132,20 (d)	131.01 (d)	131,36 (d)	132,05 (d)
19	20,55 (t)	20,40 (t)	20.76 (t)	20,40 (t)	20,56 (t)
20	14,26 (q)	14,87 (q)	14.22 (q)	14,15 (q)	14,28 (q)

Les déplacements chimiques δ sont donnés en ppm par rapport au TMS. Les multiplicités, données entre parenthèses, sont déduites des séquences DEPT et HMQC (s : singulet ; d : doublet ; t : triplet ; q : quadruplet).

^a : valeurs de RMN ^{13}C de la ref. [169] ajoutées pour comparaison.

^b : ces deux valeurs doivent être interchangées dans la ref.[169].

^c : valeurs de RMN ^{13}C de la ref. [171] ajoutées pour comparaison.

^d : ces deux valeurs doivent être interchangées dans la ref. [171].

4. 3. 2. 2. Etude structurale du produit **2**

L'analyse des données spectroscopiques de RMN du proton et du carbone du produit **2** comparées à celles fournies par la bibliographie [170, 171] montre qu'il s'agit du (5Z,8Z,11Z,13E,15S,17Z)-2'-eicosa-15-hydroxy-5,8,11,13,17-pentaénylphloroglucinol déjà décrit dans la littérature [171].

Le spectre RMN du proton (tableau 4. 1) comparé à celui de **1**, 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 δ 4,31 ppm (H-15). Ce proton est couplé, à la fois, aux protons méthyléniques H-16 et au proton éthylénique H-14 ($J_{H-14/H-15} = J_{H-15/H-16} = 6,5$ Hz). H-14 est lui-même lié à un second proton éthylénique (H-13) avec une constante de couplage $J_{H-13/H-14}$ dont la valeur de 15 Hz est caractéristique de deux protons en position *trans* sur double liaison éthylénique. On en déduit 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 (δ 5,97 ppm, 1H, t, 11 Hz) par rapport à ce qui est observé pour **1** (δ 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 déplacement chimique du carbone méthylénique C-19 en RMN ^{13}C (δ 20,76 ppm dans le tableau 4. 2) qui est identique à celle trouvée dans **1** où la chaîne pentaénique est entièrement *Z* (tableau 4. 2).

Précisons que la stéréochimie du carbone chiral en C-15 a été déterminée comme étant *S*, par les auteurs de la référence [171], par isolement de l'acide *S*(-) malique à partir des produits résultant de l'ozonolyse de ce produit. Pour **2**, cette stéréochimie est confirmée par la valeur et le signe de son pouvoir rotatoire spécifique : $[\alpha]_D^{20} = + 8,5^\circ$ (CH_2Cl_2 ; c 0,2), qui sont analogues à ceux donnés dans la littérature ($+ 8,3^\circ$) [171].

Pour notre part, nous avons confirmé les attributions des signaux de RMN reportés dans les tableaux 4. 1 et 4. 2 avec les séquences de RMN bidimensionnelle HMQC et HMBC (figures 4. 4 et 4. 5), notamment au niveau de la partie de structure qui diffère de 1. Cela nous a conduits à corriger certaines attributions de la référence [171] : δ C-3 et δ C-4 en RMN ^{13}C sont à interchanger comme pour 1.

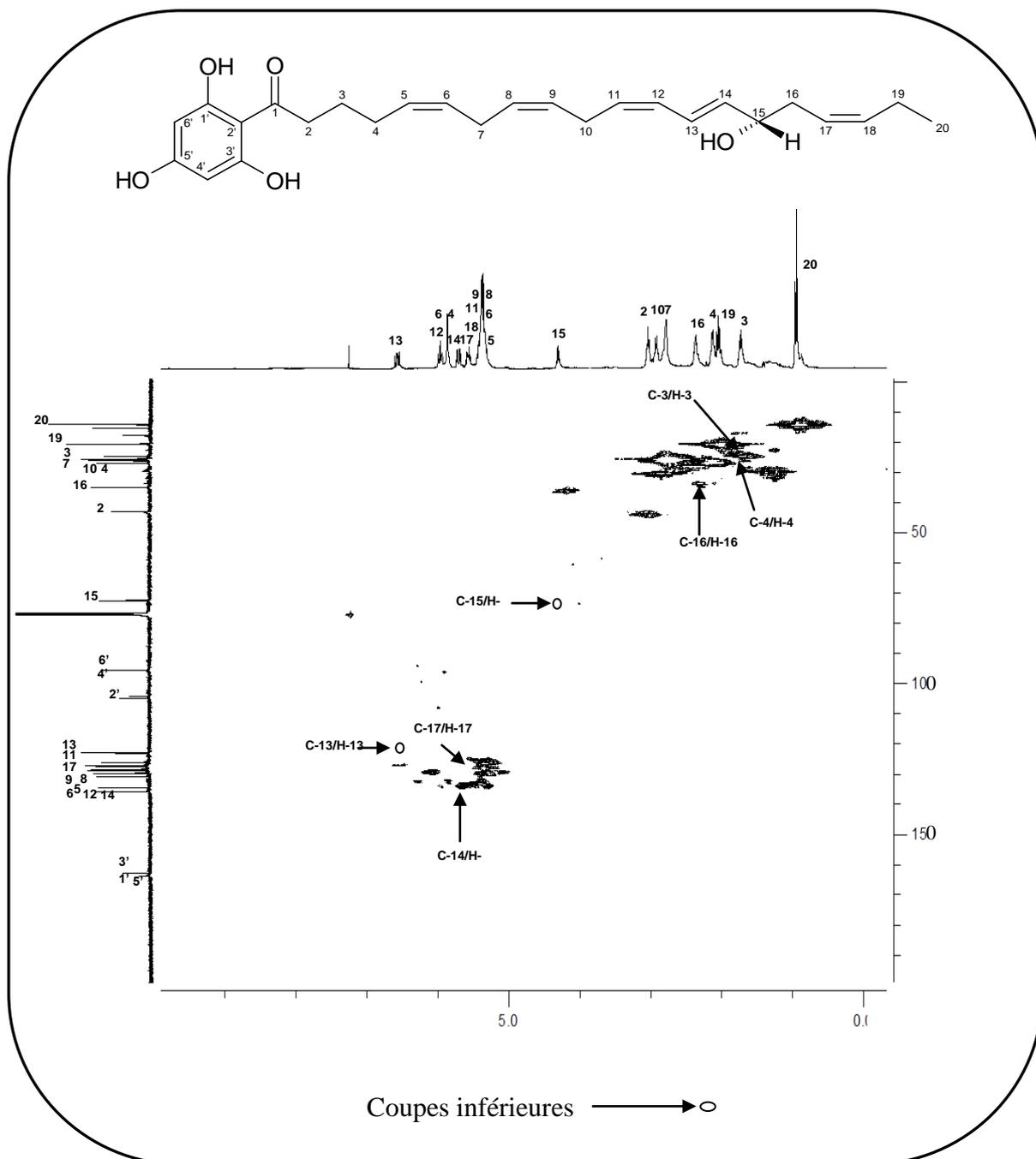


Figure 4.4: Spectre HMQC à 400 MHz dans CDCl_3 du produit 2

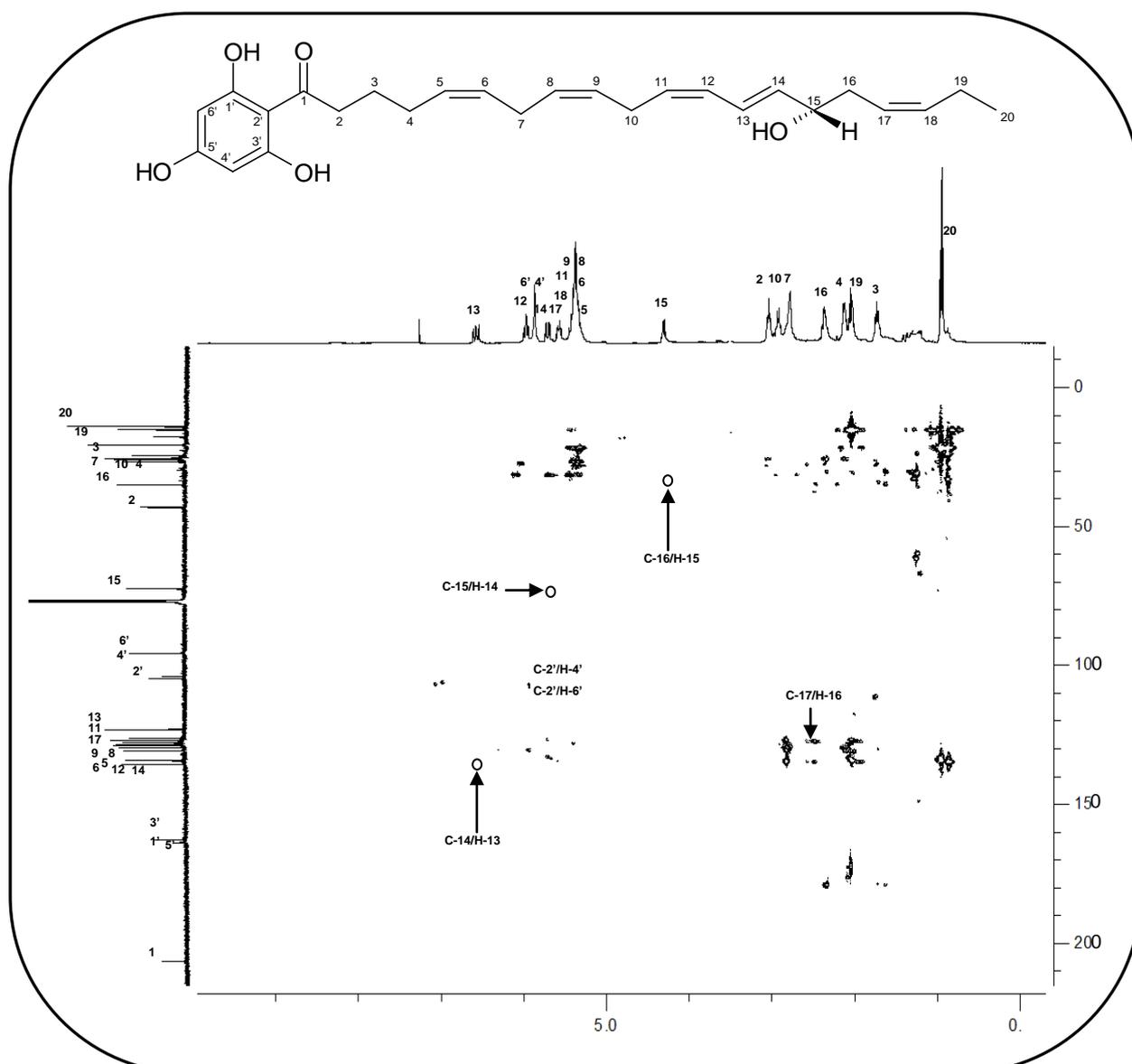


Figure 4. 5: Spectre HMBC à 400 MHz dans CDCl_3 du produit **2**

4.3.2.3. Etude structurale du produit **5**

La comparaison des données spectrales de RMN ^1H et ^{13}C (tableaux 4. 1 et 4. 2) et de spectrométrie de masse avec celles de la bibliographie [195-197] permet de conclure qu'il s'agit de l'acide (tout *Z*)-5,8,11,14,17-icosapentaénoïque. En particulier, on retrouve, à partir du carbone 3, les signaux de RMN répertoriés pour la chaîne latérale de **1**. Les attributions des carbones et des protons données dans les tableaux 4. 1 et 4. 2 ont été confirmées par RMN bidimensionnelle (COSY ^1H - ^1H , HMQC et HMBC, figures : 4. 6 à 4. 8). Le spectre de masse par impact électronique obtenu par CG-SM (figure 4. 9), confirme cette structure avec un pic ionique moléculaire 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 déplacements chimiques des atomes de carbone ne sont pas précisées. Les valeurs sont données sous la forme suivante dans la référence [196] :

RMN ^{13}C : δ 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 (CH₂), 26,5 (CH₂), 25,6 (3CH₂), 25,5 (CH₂), 24,5 (CH₂), 20,6 (CH₂), 14,3 (CH₃).

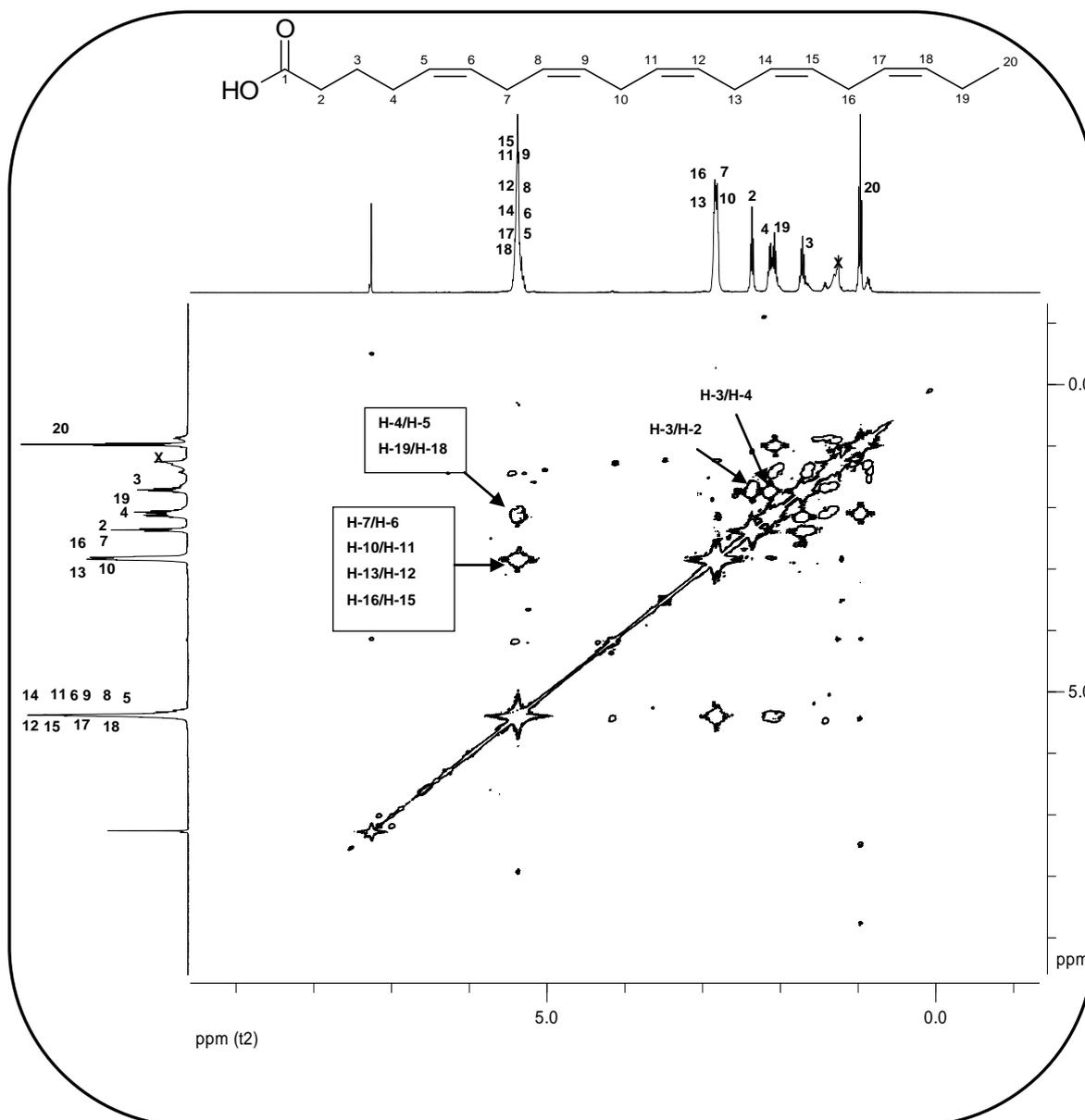


Figure 4. 6 : Spectre COSY ^1H - ^1H à 400MHz dans CDCl_3 du produit **5**

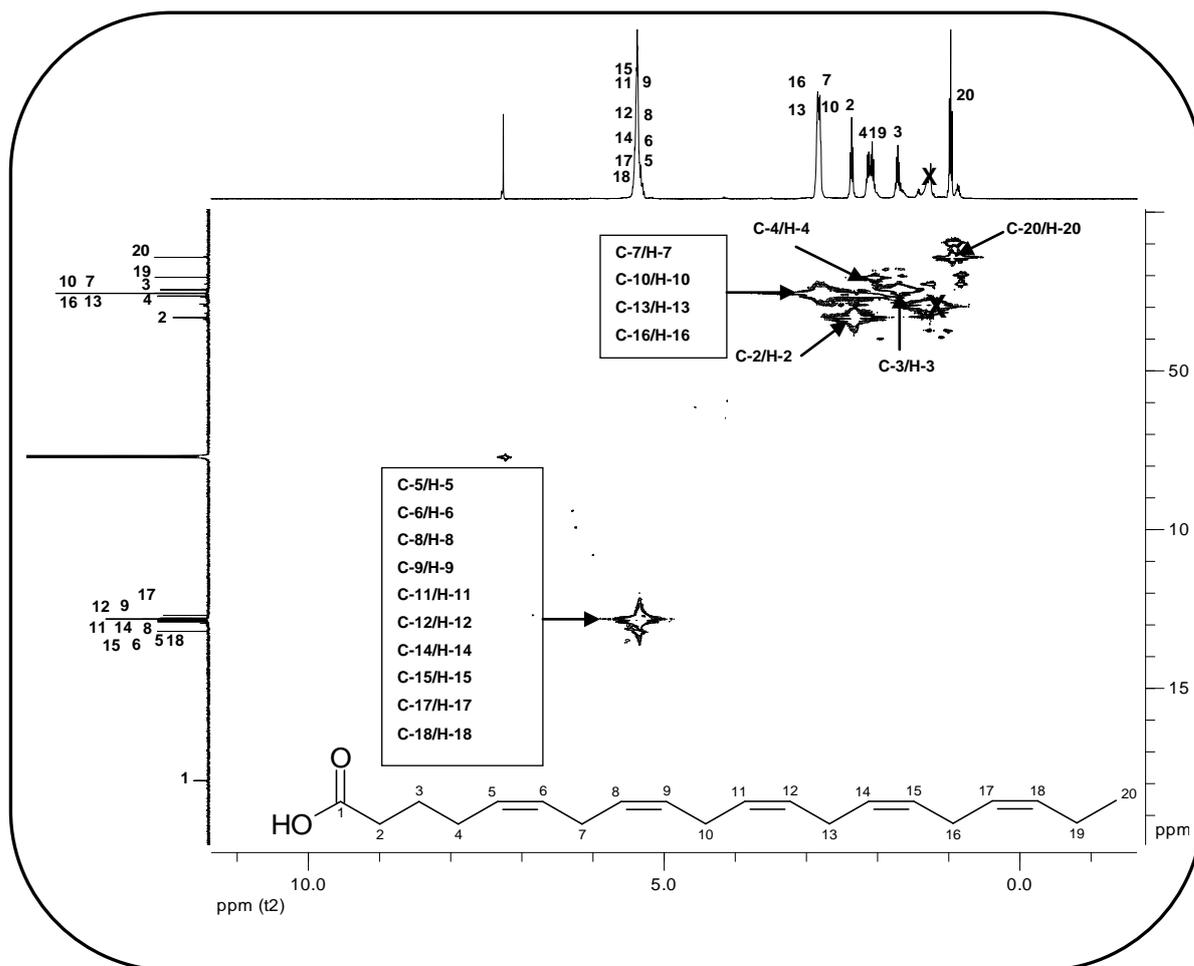


Figure 4. 7 : Spectre HMQC à 400 MHz dans CDCl₃ du produit **5**

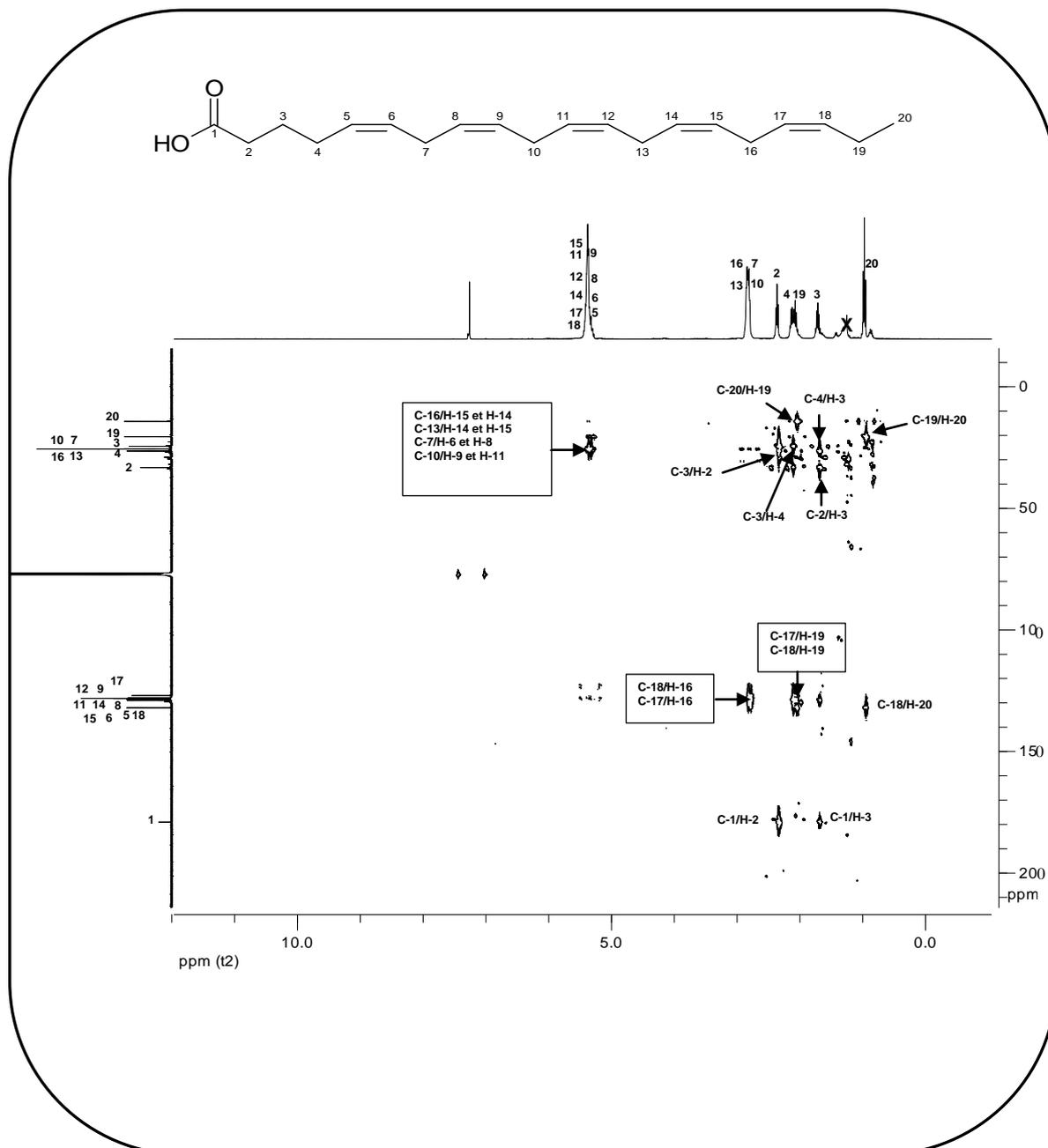


Figure 4. 8 : Spectre HMBC à 400 MHz dans CDCl₃ du produit **5**

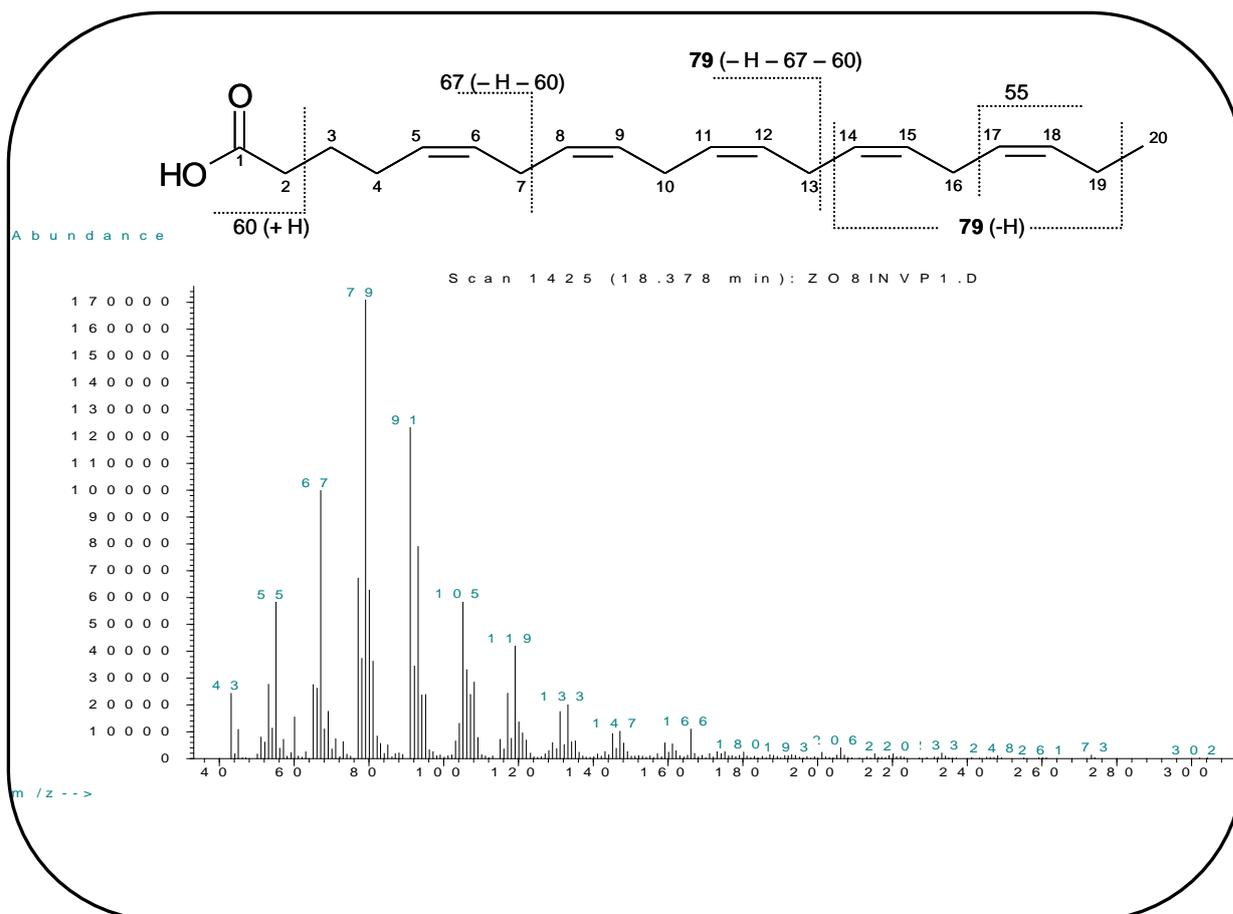


Figure 4 9: Spectre de masse du produit **5** (basse résolution par impact électronique)

4. 4. Etude biosynthétique des acylphloroglucinols

Les acylphloroglucinols que nous avons identifiés dans l'algue brune *Z. tournefortii* sont des composés à biogénèse mixte comprenant un noyau phloroglucinol auquel est rattachée une chaîne lipidique dérivée de l'acide (tout *Z*)-5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque (**5**). Etant donné que nous avons isolé cet acide pour la première fois de *Z. tournefortii*, en même temps que les acylphloroglucinols et leurs dérivés, nous avons pensé que **5** devait certainement jouer, dans l'algue, le rôle de précurseur biogénétique de ces composés.

Ces observations nous ont conduits à réfléchir sur une hypothèse de biosynthèse des acylphloroglucinols et dérivés rencontrés chez *Z. tournefortii*, dans laquelle le produit de départ serait le coenzyme A du composé **5** (**5**-CoA).

Avant de rentrer dans les détails de cette étude, il nous a semblé utile de rappeler la biosynthèse des acides gras insaturés (incluant celle du composé **5**), ainsi que de celles du malonyl-CoA et des acides gras saturés.

4. 4. 1. Biosynthèse des acides gras insaturés

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 [199]. La voie de biosynthèse conventionnelle commence par une Δ^6 désaturation des deux acides 18 : 2 $\Delta^{9,12}$ (LA : acide linoléique) et 18 : 3 $\Delta^{9,12,15}$ (ALA : acide α -linoléique) en produisant respectivement l'acide γ -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 Δ^5 produit l'acide arachidonique (AA ou eicosatetraénoïque) avec le premier et l'acide eicosapentaénoïque (EPA : **5**) avec le second, (figures. 4. 10 a et b). Cette voie 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 Δ^4 -desaturase à partir de l'algue unicellulaire marine (microalgue) *Thraustochytrium* sp. et d'une microalgue d'eau douce *Euglena gracilis* [200].

Bien que d'une façon générale, les plantes supérieures ne peuvent pas métaboliser les acides gras insaturés en C20, beaucoup d'organismes inférieurs ont la possibilité d'en produire [201]. Récemment, Qi et al [202] ont isolé la Δ^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 [200].

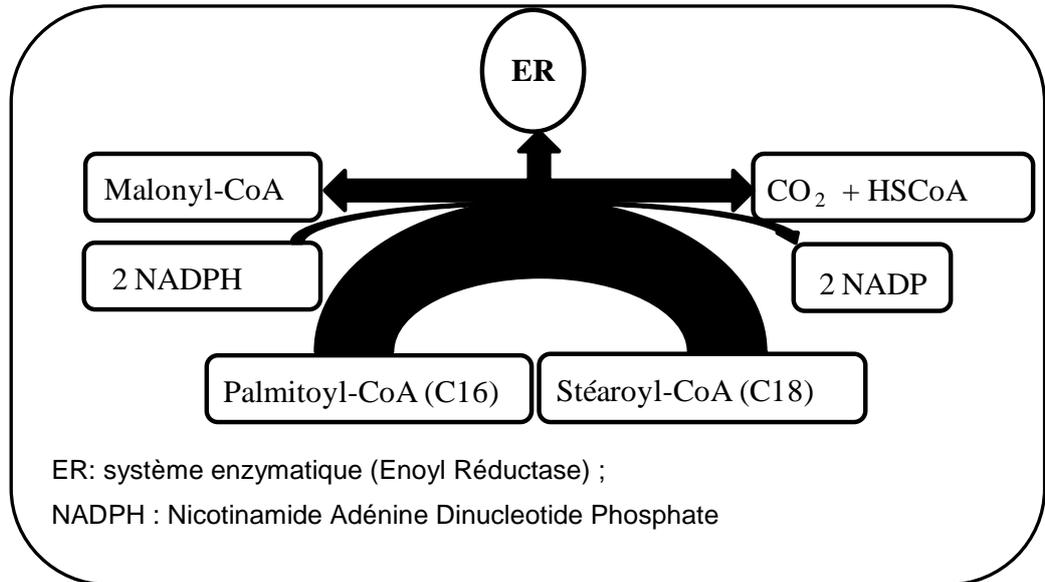


Figure 4. 10 b : Voies de biosynthèse des acides gras insaturés

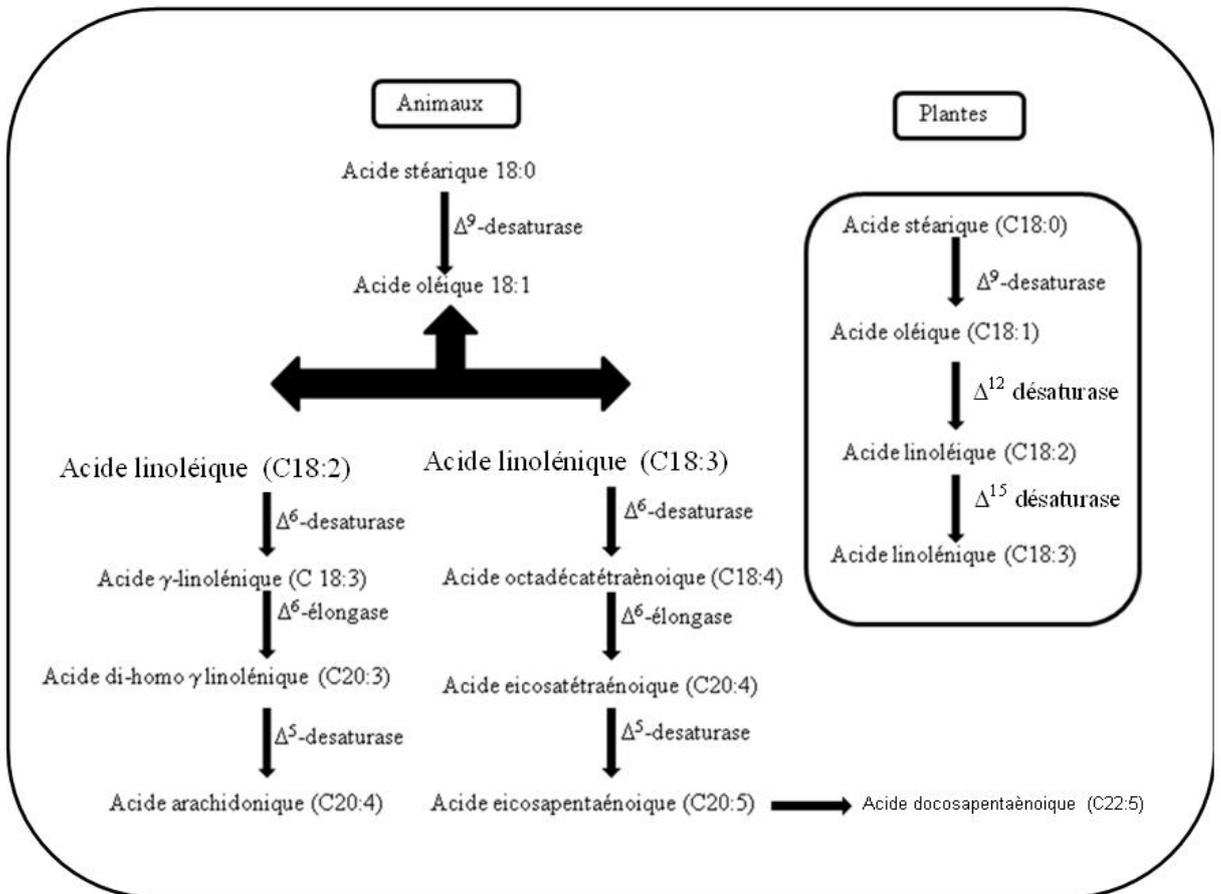


Figure 4.10a : Passage de l'acide palmitique à l'acide stéarique

4.4. 2 Biosynthèse du malonyl-CoA

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 [203] (figure 4. 11). 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 [203].

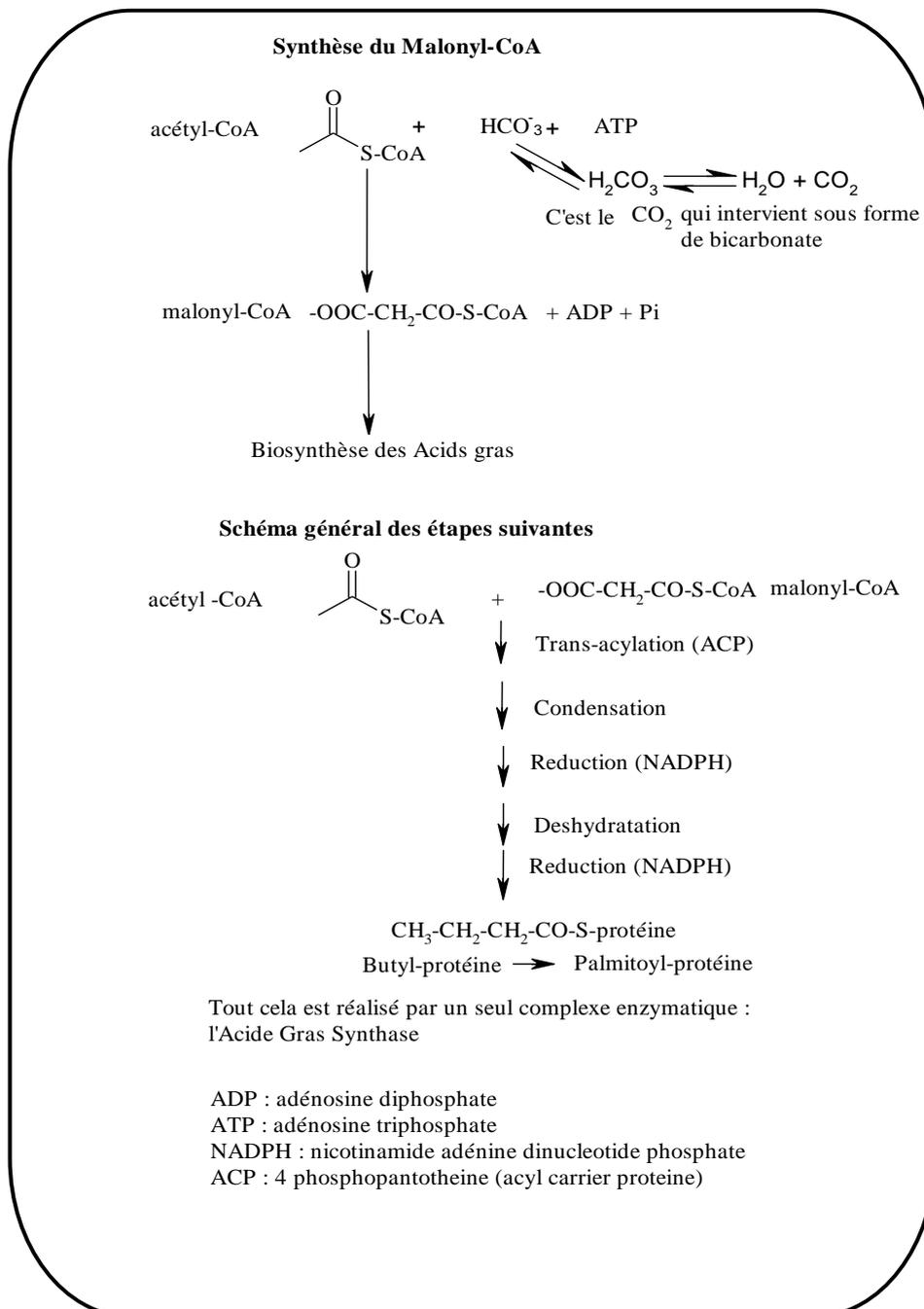


Fig. 4. 11 : Biosynthèse du malonyl-CoA et des acides gras saturés

La première étape de la biosynthèse des acides gras consiste en l'obtention du malonyl-CoA, elle est suivie des étapes qui mènent aux différents acides gras (figure 4. 11). L'augmentation de la chaîne carbonée 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 de l'acide palmitique (C 16) à l'acide stéarique (C 18) est illustré dans la figure 4. 10a.

4.4.3 Hypothèse de biosynthèse des acylphloroglucinols et dérivés isolés de *Z. 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 (1 et 2) ou 22 atomes de carbone (3 et 4) avec 5 doubles liaisons. Cette constatation oriente l'hypothèse de biosynthèse vers l'utilisation en tant que précurseur de l'acide eicosapentaénoïque (d'autant plus que ce dernier n'est autre que le produit 5 que nous avons isolé dans l'algue).

L'hypothèse de biosynthèse que nous proposons est fondée sur des travaux publiés récemment [204, 205]. Il s'agit d'une biosynthèse de type « polycétide » faisant intervenir, pour commencer, la condensation du malonyl-CoA et de l'acyl-CoA dérivé de 5 (5-CoA). Cette condensation conduit, en présence de PKS (PolyKetide Syntase), à la formation de deux intermédiaires : un tétracétide et un pentacétide. Le tétracétide subit ensuite une Cyclisation de Claisen C₁-C₆ qui permet l'obtention du composé 1 [204], (figure 4. 12). Ce dernier peut être oxygéné pour donner le produit 2. Il s'agit d'une oxygénation enzymatique qui implique l'action d'une ω-6 lipoxygénase (LOX) [206, 207] et permet l'introduction du groupement hydroxyle en position 15, avec déplacement de la double liaison de C₁₄-C₁₅ à C₁₃-C₁₄. Concernant les produits 3 et 4, ils sont obtenus à partir du pentacétide par deux cyclisations intramoléculaires successives, suivies d'une déshydratation [205]. La première cyclisation est une condensation de Claisen C₁-C₆ conduisant à un acylphloroglucinol renfermant deux fonctions carbonyles, la deuxième est une cyclisation intramoléculaire C₁₀-O-C₂ qui permet la formation de l'unité dihydroxychromanone des composés 3 et 4, après déshydratation (figure 4. 12).

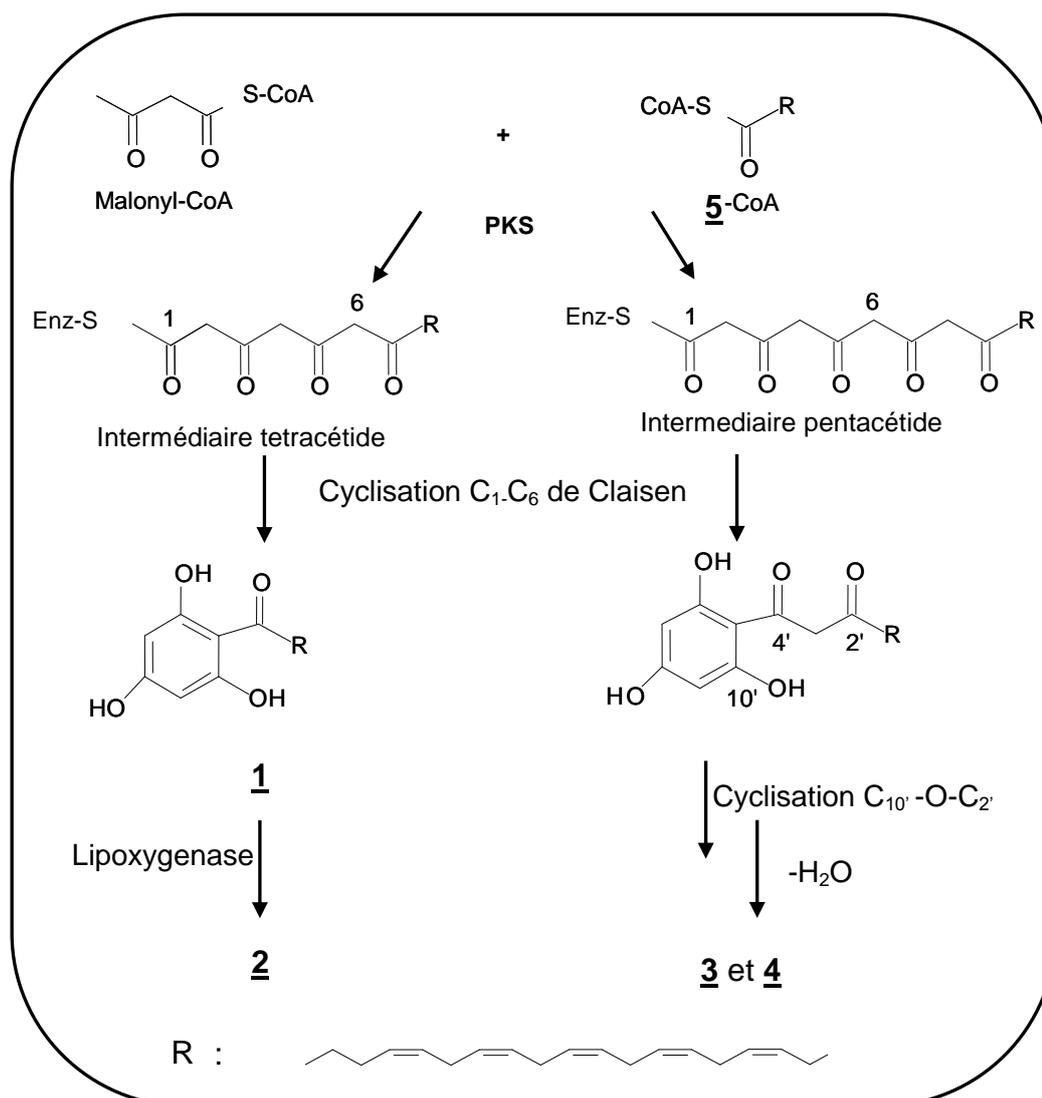


Figure 4. 12 : Hypothèse de biosynthèse des produits **1** – **4**
(Enz : enzyme ; PKS : polyketide synthase)

La diversité moléculaire rencontrée dans les produits biosynthésés par *Z. tournefortii* peut s'expliquer par la différence du nombre d'élongations dans la chaîne carbonée des deux polycétides (**3** et **4** ont deux atomes de carbone de plus que **1** et **2**) et par la localisation de la déshydratation finale, conduisant à la formation d'une double liaison éthylénique, respectivement, entre C₂'-C₃' pour **3** et C₂'-C₁ pour **4** (figure 4. 3).

4. 5. Conclusion

Les extraits lipidiques de *Zonaria tournefortii* récoltée en Algérie présentent une composition en composés phénoliques similaire à ceux de la même espèce étudiée par Amico [169, 171] et Tringali [179, 181] en Sicile, suggérant qu'à l'inverse de certaines algues brunes étudiées (*Cystoseira amantacea* var. *stricta* [193] et *Bifurcaria bifurcata* [193, 194] par exemple), il ne semble pas y avoir de variation géographique de la composition en métabolites secondaires dans les extraits organiques de cette espèce (aucune modification de leur structure chimique n'est constatée).

Les principaux métabolites secondaires identifiés, au cours de ce travail, sont des composés à biogénèse mixte renfermant un noyau phloroglucinol auquel est rattachée une chaîne lipidique en C20 (**1** et **2**) ou en C22 (les dihydroxychromanones **4** et **5** dérivées de **1**). Leur identification a été réalisée par comparaison de leurs données de RMN avec celles de la littérature, ce qui nous a permis de compléter l'étude structurale des acylphloroglucinols **1** et **2**, et de corriger certaines attributions de glissements chimiques en RMN ¹³C.

Il faut noter toutefois, la mise en évidence, pour la première fois, de l'acide eicosapentaénoïque (**5**) dans cette espèce. Cet acide joue probablement le rôle de précurseur biogénétique des acylphloroglucinols et de leurs dérivés dihydroxychromanoniques qui sont métabolisés par l'algue. Dans cette optique, nous avons proposé une hypothèse de biosynthèse cohérente de ces composés à partir de la condensation du malonyl-CoA et de l'acyl-CoA dérivé du composé **5** (figure. 4. 12).

CONCLUSION

Notre mémoire a été consacré, d'une part, au dosage des stérols totaux dans des algues marines par spectrométrie IRTF et d'autre part, à l'étude chimique de l'algue brune *Zonaria tournefortii* (algue méditerranéenne récoltée sur les côtes algériennes), Le contenu global de ce travail est réparti sur quatre chapitres distincts qui ont été développés de la façon suivante :

(1) - synthèse bibliographique portant sur : (a) les espèces d'algues étudiées (caractéristiques biologiques et position systématique), (b) la description des techniques d'analyse et leur utilisation, (c) la composition stérolique et phénolique des algues marines,

(2) - dosage des stérols totaux dans l'algue rouge *Asparagopsis armata* par spectrométrie IRTF, associé à une étude comparative par CLHP,

(3) - dosage par spectrométrie IRTF des stérols totaux dans les algues brunes *Bifurcaria bifurcata*, *Cladostephus spongiosus*, *Dictyota dichotoma* et *Cystoseira sedoides*,

(4) – Etude chimique de la fraction phénolique de l'algue brune *Zonaria tournefortii* (J. V. Lamouroux) Montagne.

Nos travaux personnels sont répertoriés dans les chapitres 2, 3 et 4.

Les chapitres 2 et 3 regroupent les résultats concernant le dosage des stérols totaux dans les algues marines, respectivement rouges et brunes, par spectrométrie IRTF.

Le fait que la détermination directe des stérols totaux à partir des extraits d'algues par spectrométrie IRTF soit impossible, vu la complexité de la matrice, nous a conduits à proposer un traitement préalable de l'extrait d'algue où les stérols sont d'abord isolés par saponification puis préconcentrés dans des cartouches de phase solide de type DSC18 (EPS). Les résultats obtenus ont montré que le couplage entre l'EPS et la spectrométrie IRTF est une voie valide pour augmenter la sensibilité analytique de détermination quantitative pour ces types de dosages.

La prépondérance d'un type de stérol dans la composition stérolique globale de chaque grande famille d'algues marines, exige le choix du standard adéquat pour établir les droites de calibration dans les dosages par spectrométrie IRTF. De ce fait, les stérols ont été analysés globalement sous forme de cholestérol dans le cas des algues rouges, pour lesquelles ce stérol est majoritaire et sous forme de fucostérol dans le cas des algues brunes, pour lesquelles c'est ce dernier qui est prépondérant.

Les étalons de cholestérol, traités de la même manière que les échantillons à doser, sont soit, directement utilisés pour déterminer le taux de stérols dans l'algue rouge *asparagopsis armata* (algue méditerranéenne récoltée sur les côtes algériennes), soit employés avec un facteur de correction pour évaluer le taux de stérols dans les algues brunes (*Bifurcaria bifurcata* récoltée sur les côtes atlantiques marocaines, *Cladostephus spongiosus*, *Dictyota dichotoma* et *Cystoseira sedoides* récoltées sur les côtes méditerranéennes algériennes). Ce facteur de correction représente le rapport entre les pentes des droites d'étalonnage du fucostérol et du cholestérol obtenues en solution dans le dichlorométhane.

La spectrométrie IRTF a été effectuée en considérant les valeurs d'absorbance à la bande spécifique 1049 cm^{-1} corrigées avec une ligne de base stabilisée soit entre 1000 et 1079 cm^{-1} ou 1014 - 1060 cm^{-1} .

Pour comparaison, les stérols des algues marines ont été analysés par CLHP en phase normale en utilisant l'étalonnage interne, une technique maîtrisée et

généralement utilisée pour ce type de dosage. Les résultats obtenus par les deux méthodes sont en parfaite concordance, ce qui confirme la fiabilité de notre méthode de dosage par spectrométrie IRTF. L'ensemble de l'étude montre qu'il s'agit d'une méthode fiable, reproductible, rapide et aisée à mettre en œuvre.

Le chapitre 4, consacré à l'étude chimique des extraits lipidiques de l'algue brune *Zonaria tournefortii* récoltée en Algérie, a permis de montrer que ces derniers présentent une composition en composés phénoliques similaire à ceux de la même espèce étudiée par Amico et Tringali en Sicile, suggérant qu'à l'inverse de certaines algues brunes étudiées (*Cystoseira amantacea* var. *stricta* et *Bifurcaria bifurcata* par exemple), il ne semble pas y avoir de variation géographique de la composition en métabolites secondaires dans les extraits organiques de cette espèce (aucune modification de leur structure chimique n'est constatée).

Les principaux métabolites secondaires identifiés, au cours de ce travail, sont des composés à biogénèse mixte renfermant un noyau phloroglucinol auquel est rattachée une chaîne lipidique en C20 (**1** et **2**) ou en C22 (les dihydroxychromanones **4** et **5** dérivées de **1**). Leur identification a été réalisée par comparaison de leurs données de RMN avec celles de la littérature, ce qui nous a permis de compléter l'étude structurale des acylphloroglucinols **1** et **2**, et de corriger certaines attributions de glissements chimiques en RMN ^{13}C .

Il faut noter toutefois, la mise en évidence, pour la première fois, de l'acide eicosapentaénoïque (**5**) dans cette espèce. Nous avons réalisé la caractérisation structurale complète de ce composé par RMN mono et bidimensionnelle car elle n'avait pas encore été décrite dans la littérature, bien qu'il s'agisse d'un produit connu. En particulier, les attributions des signaux de RMN C^{13} sont maintenant parfaitement bien définies.

Cet acide joue probablement le rôle de précurseur biogénétique des acylphloroglucinols et de leurs dérivés dihydroxychromanoniques qui sont métabolisés

par l'algue. Dans cette optique, nous avons proposé une hypothèse de biosynthèse cohérente de ces composés à partir de la condensation du malonyl-CoA et de l'acyl-CoA dérivé du composé 5.

L'ensemble des résultats auxquels nous sommes parvenus dans ce chapitre 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 δ/δ homonucléaires (COSY ^1H - ^1H) et hétéronucléaires directes (HMQC, HSQC) ou longues distances en détection inverse (HMBC) ont aussi été un élément essentiel dans la caractérisation structurale des métabolites décrits.

REFERENCES

1. Ribier, J. et Godineau, J- C., « Les algues », Ed. Flammarion, la maison rustique, Paris, (1984).
2. Boudouresque, C. F., Meinesz, A. et Verlaque, M., dans «Guide des algues des mers d'Europe : méditerranée», Ed. Delachaux et Niestlé, Paris (1992).
3. Gayral, P., Cosson, J., «Connaître et reconnaître les algues marines», Ed. Ouest-France, (1986).
4. Kornprobst, J. M., «Substances naturelles d'origine marine», Ed. Tec & Doc. Lavoisier, Paris, (2005).
5. De Reviers, B., « Biologie et phylogénie des algues», Ed. Belin, Paris, (2002).
6. Lecointe, G. et Le Guyader, H., «Classification phylogénétique du vivant», Ed. Belin Paris, (2001).
7. Feldmann, J., « Contribution à la flore algologique marine de l'Algérie. Les algues de Cherchell», Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord. Algérie, V. 22, (1931a), 179-254.
8. Feldmann, J., « Contribution à l'étude de la flore marine de profondeur sur les côtes d'Algérie», Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord. Algeria, V. 34, (1943b), 150-167.
9. Ross, R., «The type's species of *Bifurcaria Stackhouse*», J. Linn. Soc. Lond. Bot., V. 55, (1958), 753-754.
10. Silva, P. C., Basson, P. W. and Moe, R. L., « Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean», Univ. Calif. Publ. Bot., V. 79, (1996).
11. Rousseau, F. and De Reviers, B., «Phylogenetic relationships within the Fucales (Phaeophyceae) based on combined partial SSU + LSU rDNA sequence data», Eur. J. Phycol., V. 34, (1999), 53-64.
12. Cho, G. Y., Rousseau F., De Reviers B., Boo S. M., «Phylogenetic relationships within the Fucales (Phaeophyceae) assessed by the photosystem I coding psa A sequences.», Phycologia, V. 45, (2006), 512-519.
13. Cabioc'h, J., Floc'h, J.-Y. et Le Toquin, A. dans «Guide des Algues des mers d'Europe : Manche/Atlantique», Ed. Delachaux et Niestlé, Paris (1992).
14. Lüning, K., «Seaweeds Their Environment, Biogeography, and Ecophysiology», Ed. John Wiley & Sons, Inc. (1990).

15. Feldmann, J., « Une nouvelle espèce de *Cystoseira* (fucales de sargassées) de côtes d'Algérie», Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord. Algérie, V. 35, (1944), 7-10.
16. Feldmann, J., «la flore marine de l'Afrique du Nord», C. R. Acad. Sci. séances Soc. Biogéogr., Fr., V. 243, (1951), 103-108.
17. Hamel, G., «Phéophycées de France», Fascicule V, Ed. Imp. Wolf, Rouen, (1939).
18. Debray, F., «Catalogue des algues du Maroc, de l'Algérie et de la Tunisie», Librairie A Jourdan édit., (1897).
19. Debray, F., «Liste des algues marines et d'eau douce récoltées jusqu'à ce jour en Algérie», Bull. Sci. Fr. Belg., V. 1 (1897), 1-19.
20. Feldmann-Mazoyer, G., « Ecologie et répartition des Céramiacées méditerranéennes», J. Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord. Algérie, Vol. 32, (1941c), 62-78.
21. El Hattab, M., Culioli, G., Valls, R., Richou, M. and Piovetti, L., «Apo-fucoxanthinoids and loliolide from the brown alga *Cladostephus spongiosus* f. *verticillatus* (Heterokonta, Sphacelariales)», Biochem. Syst. Ecol., V. 36, (2008), 447-451.
22. Perret-Boudouresque, M. et Seridi H., «Inventaire des algues marines benthiques d'Algérie», GIS Posidonie publ., Marseille Fr., (1989).
23. Boudouresque, C. F., et Boudouresque, E., « Contribution à la flore des algues marines de l'Algérie », Bull. Mus. Hist. nat. Marseille - Fr., V. 35, (1969), 7-92.
24. 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.
25. Montagne, C., «Exploration scientifique de l'Algérie», Ed. Bory de Saint-Vincent et Durieu de Maisonneuve, (1846-1849).
26. Nizamuddin, M., «Contribution to the marine algae of Lybia. Dictyotales», Bibliotheca phycologica, Germ., V. 54, (1981), 1-122.
27. Thurman, E. M. and Mills, M. S., «Solid phase extraction: Principles and practice», Ed. Willey Interscience, New York, (1998).
28. Ebeler, S.E. and Ebeler, J.D. «SPE methodologies for the separation of lipids», INFORM, V. 7, (1996), 1094-1103.
29. Varian *Handbook*, «Extracciò en fase sòlida», (1994).
30. Analytichem. International, «Tratamiento de muestras mediante extracciò en fase sòlida», *Catàlogo general*, V. III, (1990).

31. Zief, M., Crane, L.J. and Horvath, J., «Preparation of steroid samples by solid-phase extraction», *Am. Lab.*, V.14 (1982), 120-130.
32. Abidi, S. L., «Chromatochraphy analysis of plant sterols in foods and vegetable oil», *J. Chromatogr. A*, V. 935, (2001), 173-201.
33. Tippins, B., «Solid phase extraction: sample preparation for HPLC, GC, NMR, FTIR and MS», *American Laboratory News*, V. 8, (1987).
34. Toivo, J., Piironen, V., Kalo, P. And Varo, P., «Gas chromatographic determination of major sterols in edible oils and fats using solid-phase extraction in sample preparation», *Chromatographia*, V. 48, (1998), 745-750.
35. Bello A., C., «Rapid isolation of the sterol fraction in edible oils using a silica cartridge», *J. AOAC INT75*, V. 75(6), (1992), 1120-1123.
36. Lechner, M., Reiter, B., and Lorbeer, E., « Determination of tocopherols and sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis», *J. Chromatogr. A.*, V. 857, (1999), 231-238.
37. Daghbouche, Y., Garrigues, S. and de la Guardia, M., «Solid phase preconcentration-Fourier Transform infrared spectrometric determination of carbaryl and 1-naphtol», *Anal. Chim. Acta*, V. 314, (1995), 203-212.
38. Barcelo, D. and Hennion, M-C., «On line sample handling strategies for the trace level determination of pesticides and their degradation products in environmental waters», *Anal. Chim. Acta*, V. 318, (1995), 1-41.
39. Hennion, M. and Pichon, V., «Solid-phase extraction of polar organic pollutants from water», *Environ. Sci. and tech.*, V. 28, (1994), 576-583.
40. Fiorentino, G., Spaccini, R. and Piccolo, A., « Separation of molecular constituents from humic acid by solid phase extraction following a transesterification reaction», *Talanta*, V. 68, (2006), 1135-1142.
41. Hubert, Ph., Chiap, P, Moors, M, Bourguignon B., Massart D. L. and Crommen, J., «Know-ledge-based system for the automated solid-phase extraction of basic drugs from plasma coupled with their liquid chromatographic determination: application to the biodetermi-nation of β -receptor blocking agents», *J. Chromatogr. A*, V. 665, (1994), 87-99.
42. Skoog, D. A., West, D. M. and Holler, F. J., «Chimie analytique», Ed. De boeck, (1991).
43. Herzberg, G. and Reinhold, V. N, «Infra-red and Raman Spectra of polyatomic molecules», Van Nostrand Reinhold, New York, (1945).
44. Smith, A. L, «Applied Infrared Spectroscopy», Ed., John Wiley and Sons, New York (1979).

45. Silverstein, R M. and Clayton Bassler, G., « Identification spectrométrique des composés organiques », Ed. Masson et Cie Gauthier-Villars Paris (1998).
46. Jacquinet, P., «Characteristics common to the new methods of interferometric spectroscopy ; the factor of merit», *J. phys. Radium*, V. 19 (3), (1958), 223-229.
47. Robinson, J.W., Skelly, Frame E. M.and Frame II G. M., « Undergraduate instrumental analysis», Ed. Marcel Dekker (6th edition), (2005).
48. Low, M. J. D., « Infrared Fourier transform spectroscopy», *Anal. Chem.*, V. 41, (1969), 97–108.
49. Lide, Jr. D. R., “Status Report on Critical Compilation of Physical Chemical Data”, *Annual Review of Physical Chemistry*, V. 24, 1973, 135-158.
50. Lettington A.H., «Infrared Technology and Applications», SPIE-proceedings, Ed. Bellingham WA, London, UK, (1990), V. 1320[Note(s): IX-484 p.].
51. Colthup, N. B., L. H., Wiberly, S. E., «Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy», Ed. Academic Press (3rd edition) (1990).
52. Averett, L. A. and Griffiths, P. R., « Method to Improve Linearity of Diffuse reflection Mid-Infrared Spectroscopy», *Anal. Chem.*, 78 (23), (2006), 8165–8167.
53. Cotte, M., Welcomme E., Solé, V. A., Salomé, M., Menu, M., Walter, Ph., and Susini J., «Synchrotron-Based X- ray spectromicroscopy used for the study of an atypic micrometric pigment in 16 th centry painting», *Anal. Chem.*, V. 79(18), (2007), 6988–6994.
54. Shao, L. and Griffiths, P. R., «Correcting Nonlinear Response of Mercury Cadmium Telluride Detectors in Open Path Fourier Transform Infrared Spectrometry», *Anal. Chem.*, V. 80(13), (2008), 5219- 5224.
55. Beardal, I J. and Giordano, M., «Ecological applications of algal CCMs and their Regulation (review)», *J. Funct. Plant. Biol.*, V. 29(2-3), (2002), 335-347.
56. Giordano, M. and Hell, R. «mineral nutrition in photolithotrophs: cellular Mechanisms controlling growth in terrestrial and aquatic habitats (review)», *Recent Res. Dev. Plant physiol.*, V. 2, (2001), 95-123.
57. Stuart, B., «Biological applications of infrared spectroscopy», Ed. John Wiley and sons, New York, (1997).
58. Mecozzi, M., Pietroletti, M. and Di Mento, R., «Application of FTIR spectroscopy In ecotoxicology studies supported by multivariate analysis and 2D correlation spectroscopy», *Vibrational Spectroscopy*, V. 44(2), (2007), 2228-2235.
59. Noirci, A., Hell, R., Giordano, M., «Sulfur and primary production in aquatic environments: and ecophysiological perspective», *Photosyn. Res.*, V. 85, (2005), 409-417.

60. Jamin, N., Dumas, P., Moncuit, J., Fridman, W.-H., Teillaud, J.-I., Car G. L., Williams G. P., «Highly resolved chemical imaging of living cells using synchrotron infrared microspectrometry», *J. Proc. Natl. Acad. Sci.*, V. 95, (1998), 4837-4840.
61. Jamin, N., Miller, L., Moncuit, J., Fridman, W.-H., Dumas, P. and Teillaud J., «Chemical heterogeneity in cell death: combined synchrotron IR and fluorescence microscopy studies of single apoptotic and necrotic cells», *Biopolymers*, V. 72 (5), (2003), 366-373.
62. Diem, M., Boydston-white, S., Chiriboga, L., «Infrared spectroscopy of cells and tissues: shining light onto a novel subject», *J. Spectrosc.*, V. 53(4), (1999), 148-161.
63. Giornato, M., Kansiz, M., Heraud, P., Beardall, J., Wood, B. and McNaughton D., «Fourier transform infrared-spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* Bacillariophyceae», *Phycologia* V. 37(2), (2001), 271-279.
64. Hirschmugl, C. J, El Bayarri, Z., Bunta, M., Holt, J. B. and Giordano, M., «Analysis of the nutritional of algae by Fourier transform infrared chemical imaging», *Infrared Physics & Technology*, V. 499, (2006), 57-63.
65. Viron, C., Saunois, A., André, P., Perly, B. and Lafosse, M., «Isolation and identification of unsaturated fatty acid methyl esters from marine micro-algae», *Anal. Chim. Acta*, V. 409, (2000), 257-266.
66. Rosset, R., Claude, M. et Jardy, A., «Manuel pratique de chromatographie en phase liquide», 2^{ème} Ed. Masson, Paris, (1982).
67. Katz, E., « Quantitative analysis using chromatographic techniques», Ed. John Wiley & Sons, (1992).
68. Rouessac F., Rouessac A., «Analyse chimique», 5^{ème} édition, Ed. Dunod, (2000).
69. Anderson, R. J., Bendell D. J. and GroundWater P. W., «Organic Spectroscopic Analysis», The royal society of chemistry (R.S.C), Ed. Cambridge, (2004).
70. Breitmaier, E., « Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: Practical Guide», Ed. John Wiley & Sons, Ltd., (2002).
71. Keeler, J. «Understanding NMR Spectroscopy», Ed. Wiley, (2002).
72. Sanders, K. M. J., Constable, E. C. et Hunter, B. K., «Modern NMR Spectroscopy», Ed. Oxford University Press, (1989).
73. Kerr, R. G. and Baker, B. J., «Marine sterols», *Nat. Prod. Rep.*, V. 8, (1991), 465-497.

74. Volkman, J. K., Barrett, S. M. Blackburn, S. I., Mansour, M. P., Sikes, E. L., Gelin, F., «Microalgal biomarkers: a review of recent research developments», *J. Org. Geochem.*, V. 29, (1998), 1163-1179.
75. Allinger, D. J., Cava L. B. and Johnson, S., «Chimie organique», Tome 3, Ed. McGraw-Hill, Paris, (1975).
76. Tsuda, K., Akagi, S. and Kishida, Y., « Discovery of cholesterol in some red algae », *Science*, V. 126, (1957), 927-928.
77. Tsuda, K., Akagi, S., and Kishida, Y. « Steroids studies VIII. Cholesterol in some red algae », *Chem. Pharm. Bull.*, V. 6, (1958), 101-104.
78. Heilbron, I. M., Phipers, R. F., Wright, H. R., «Chemistry of the algae; the algal sterol fucosterol », *J. Chem. Soc.* V. 133, (1934), 572-576.
79. Aknin, M., Miralles, J. and Kornprobst, J. M., «Sterol and fatty acid distribution in red algae from the Senegalese coast », *Phytochemistry*, V. 96 B (3), (1990), 559-563.
80. Artaud, J., Iatrides, M. C., Tisse, C., Zahra J. P. et Estienne, « Etudes chromatographiques et spectroscopiques de stérols, application aux stérols d'algues », *J. Analysis*, V. 8, (1980), 277-286.
81. Combres, A., Bianchini, J.P. et Gaydou, E. M., « Composition en acides gras et en stérols d'algues rouges de l'océan indien », *Océanol. Acta*, V. 9, (1986), 339-342.
82. Fattorusso, E., Magno, S., Santacrose, C., Sica, D., Impellizeri, G., Mangiafico, S., Oriente G., Piatteli M., and Sciuto S., «Sterols of some red algae», *Phytochemistry*, V. 14, (1975), 1579-1582.
83. Gibons, G. F., Goad, L. j. and Goodwin, T. W., «the sterols of some marine red algae», *Phytochemistry*, V. 6, (1967), 677-683.
84. Goad, L. J., «The sterols of some marine invertebrates. In *Marine Natural Products, Chemical and Biological Perspectives* », (Edited by Sheuer P. J.), V. II, (1978), 75-172.
85. Goldberg, A. S., Hubby, C., Cobb, D., Millard, P., Ferrara, N., Galid G., Premuzic E. T. and Gaffney J. S., «Sterol distribution in red algae from the waters of eastern Long Island», *Bot. Mar.*, V. 25, (1982), 351-355.
86. Matsuhira, B. and Urzua, A., «sterols of some chilean algae », *Biochem. Syst. Ecol.*, V. 12, (1984), 145-147.
87. Patterson, G. W., «The distribution of sterols in algae», *Lipids* V.6, (1971), 120-127.
88. Chardon-Loriaux, I., Morisaki, M. and Ikekawa, N., « Sterol profiles of red algae »,

- Phytochemistry, V.14, (1976), 723-725.
89. Fattorusso, E., Magno, S., Santacrose, C, Sica, D., Impellizeri, G., Mangiafico, S., Oriente, G., Piatteli, M., and Sciuto, S., «Constituents of red algae. Part III Sterols of Mediterranean Florideophyceae», *Biochem. Syst. Ecol.*, V. 4, (1976), 135-138.
 90. Alcaide, A. M., Barbier, M., Potier, P., Magueur, A. M. et Teste, J., «Nouveaux résultats sur les stérols des algues rouges», *Phytochemistry*, V. 8, (1969), 2301-2303.
 91. Combaut, G., Codomier, L., Teste, J., and Petersen, M., «The occurrence of C-28 sterols in red algae», *Phytochemistry*, V. 20, (1981), 2036-2037.
 92. Kabore, S. A. Combaut, G., Vidal, J. P., Codomier, L., Passet, J., Girard, J. P. and Rossi, J. C., «Sterols of the red alga *Rissoella verruculosa*», *Phytochemistry*, V. 22, (1983), 1239-1240.
 93. Prakash, OM, Roy, R., Bhakuni, D.S., Wahidalla, S. and Kamat, S.Y, «2D-NMR studies of novel steroid from the red alga *Acantophora spicifera*», *J. Nat. Prod.* V. 52(4), (1989), 686-692.
 94. Wahidalla, S, D'Souza, L.,and Govenker, M. « Lipid constituents of the red alga *Acantophora spicifera* », *Phytochemistry*, V. 48 (7), (1998), 1203-1206.
 95. Chardon-Loriaux, I., Morisaki, M. and Ikekawa, N., « Sterol profiles of red algae », *Phytochemistry*, V. 15(5), (1975), 723-725.
 96. Morizaki, N., kiddooka, S. and Ikekawa, N., «Studies on steroids, XXXIX, Sterol profiles of red algae», *Chem. Pharm. Bull.*, V. 24 (12), (1976), 3214-3216.
 97. Das, B., Venkateswarlu, Y., Srinivas, K. V. N. S. and Rama Rao, A. V., «5 α -poriferast-9(11)-en-3 β -ol from the marine red alga, *gracilaria edulis*», *Phytochemistry*, V. 31 (3), (1992), 1054-1055.
 98. Kobayashi, M. and Murata, O., «Marine sterols. 2a-oxa-2-oxo-5 α -hydroxy-3, 4-dinorcholestane from the Arabian sea red alga *laurencia obtusa*», *Tetrahedron*, V. 33 B(4), (1992), 519-520.
 99. Ahmed, V. U., Memon, A. H., Shaiq Ali, M., Perveen, S., and Shameel, M., «Somalenone, a C26 sterol from the marine red alga *Melanothamnus somalensis*», *Phytochemistry*, V. 42, (1996), 1141-1143.
 100. Plouguerné, E., Kikuchi, H., Oshima, Y., Deslandes, E., Stiger-pouvreau, V., «Isolation of Cholest-5-en-3-olformate from the red alga *Grateloupia turuturayamada* and its chemotaxonomic significance», *Biochem. System. Ecol.*, V. 34, (2006), 714-717.
 101. Govenkar, M. B., Wahidulla, S., «Free sterols of the red alga *Chondria armata* (ktz.) Okamura», *Bot. mar.* V. 43, (2000), 201-204.

102. Bruneau, Y., "Contribution a l'étude chimique des constituants d'une algue rouge *Asparagopsis Armata* (Harv.) et de son tetrasporophyte *falkenbergia rufolanosa* (Harv.) schmitz", Thèse de Doctorat 3^{ème} cycle, Université des sciences et techniques du Languedoc, Centre Universitaire de Perpignan, (Juin 1977), 143p.
103. Combaut, G., Bruneau, Y, Codomier, L. and Teste, J., «Comparative sterols composition of the red alga *Asparagopsis armata* and its tetrasporophyte *falkenbergia rufolanosa*», J. Nat. Prod., V. (42)2, (1979), 150-151.
104. Ikekawa, N., Morizaki N., Tsuda K. and Yoshida T., « Sterol compositions in some green algae and brown algae», Steroids, V. 12 (1), (1968), 41-48.
105. Doyle P. J., Patterson, G. W., «Sterols of some Chesapeake Bay algae», Comp. Biochem. Physiol., V. 41B, (1972), 355-358.
106. Amico, V., Oriente, G., Piattelli, M. and Tringali, C., «Amino acids, sugars and sterols of some Mediterranean brown algae», Biochem. System. Ecol., V. 4 (3), (1976), 143-146.
107. Ikekawa, N., Studa, K., and Morizaki, N., «Saringasterol: new sterol from brown algae», Chemistry and Industry, (1966), 1179-1180.
108. Catalan, C. A. N., Kokke, W. C. M. C., Duque, C., Djerassi, C., «Synthesis of (24R)-and (24S)-5,28-Stigmastadien-3 β -ol and Determination of the Stereochemistry of their 24-Hydroxy Analogues, the Saringasterols», J. Org. Chem., V. 26, (1983), 5207-5214
109. Wächter, G. A., Franzblau, S. G., Montenegro, G., Hoffmann, J.J., Maiese, W. M and Timmermann, B. N., «Inhibition of Mycobacterium tuberculosis growth by saringasterol from *Lessonia nigrescens*», J. Nat. Prod. V. 64, (2001), 1463-1464.
110. D'Auria, M. V., Minale, L., Riccio, R., «Polyoxygenated Sterols of Marine Origin», Chem. Rev. V. 93, (1993), 1839-1895.
111. Ayyad, S-E. N., Sowellim, S. Z. A., El Hosini, M. S. and Abo-Atia, A., «The structural determination of a new steroidal metabolite from the brown alga *sargassum asperifolium*», J. Z. Naturforsch., V. 58, (2003), 333-336.
112. Fleury, B.G, Pereira, M.V.G., Da Silva, J.R.P, Kaisan, M., Teixeira, V.L. and Kelecom, A. «Stérols from brazilian marine brown algae», Phytochemistry, V. 37 (5), (1994), 1447-1449.
113. Stefanov, K., Dimitrova-Konaklieva, St., Frette, X., Christova, D., Nikolova, Ch. and popov S., «Sterols and acylglycerols in the brown algae *Zanardinia Prototypus Nardo* and *Striaria Attenuata* (Grev.) from the black sea», Bot. Mar., V. 43, (2000), 141-145.
114. Kamenarska, Z. G., Dimitrova-Konaklieva, S.D, Stevanov, K. L and Popov, S. ,

- S., «A comparative study on the sterol composition of some brown algae from the black sea», J. Serb. Chem. Soc. V. 68(4-5), (2003), 269-275.
115. Iatrides, M. C., Artaud, J., Derbesy, M. et Estienne, J., « Identification de constituants lipidiques dans des algues brunes source d'alginate », Ann. Fals. Exp. Chim., V.71 N° 768, (1978), 337-338.
116. Milkova, T., Talev, G., Christov, R., Dimitrova-Konaklieva, S. et Popov, S., «Sterols and volatiles in *Cystoseira Barbata* and *Cystoseira crinita* from the black sea», Phytochemistry, V. 45 N° 1, (1997), 93-95.
117. Moreno, P., Petkov, G., Ramazanov, Z. and Garcia, G., «Lipids, fatty acids and sterols of *Cystoseira abies-marina*», Bot. Mar., V. 41, (1998), 375-378.
118. Giner, J. L. and Boyer, G. L., «Sterols of the brown tide alga *Aureococcus anophagefferens*», Phytochemistry, V. 48(3), (1998), 475-477.
119. Giner, J. L., and Li, X. and Boyer, G. L., « Sterols composition of *Aureoumbra Lagunensis* the texas brown tide alga », Phytochemistry, V. 57, (2001), 787-789.
120. Giner J.-L., and Li, X. «Stereospecific synthesis of 24-propyl cholesterol isolated from texas brown tide», Tetrahedron, V. 56, (2000), 9575-9580.
121. Combaut, G., Yacoubou, A., Piovetti, L. and Kornprobst, J. M., «Sterols of the Senegalese brown alga *Padina vickersiae*», Phytochemistry, V.24, (1985), 618-619.
122. Piovetti, L., Deffo P., Valls, R. and Peiffer, G., «Determination of sterols and diterpenoids from algae (Cystoseiraceae)», J. chromatogr., V. 588, (1991), 99-105.
123. Culioli, G., Ortalo-Magné, A., Richou, M., Valls, R., Piovetti, L., «Seasonal variation in the chemical composition of *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae)», Biochem. Syst. Ecol., V. 30, (2002), 61-64.
124. Patterson, G.W., Mckenna, K. C., Lusby, W. R. and Bisson, M. A., «Sterols of the charophyceae», J. Nat. prod., V. 54 (4), (1991), 1141-1143.
125. Cranwell, P. A., Jaworski, G. H. M. and Bickley, H. M., «Hydrocarbons, sterols, esters and fatty acids in six freshwater chlorophytes», Phytochemistry, V. 29(1), (1990) 145-151.
126. Aknin, M., Moellet-Nzaou, R., Kornprobst, J. M., Gaydou, E. M., Samb, A. and Miralles J., «Sterols composition of twelve chlorophyceae from the Senegalese coast and their chemotaxonomic significance», Phytochemistry, V.12, (1992), 4167-4169.
127. Elenkov, I., Georgieva T., Hadjieva, P., Dimitrova-Konaklieva, St. and Popov, S., «Terpenoids and sterols in *Cladophora Vagabunda*», Phytochemistry, V. 38(2), (1994), 457-459.

128. Brandt, R. D., Ourisson, G. and Pryce, R. J., «Specific water solubilisation of cholesterol by light grown.», *Biochemical and physical research communications*, V. 37 N° 3, (1969), 399-403.
129. Rubinstein, I. and Goad, L. J., «Sterols of siphonous marine alga *Codium fragile*», *Phytochemistry*, V. 13, (1974), 481-484.
130. Aratani, T., Okano, M., Funaki, Y., Mizui, F., «Seasonal variation of sterol, Hydrocarbon, and fatty acid fractions in *Codium fragile*(Sur.) Hariot », *Bulletin of the Japanese Society of scientific Fisheries*, V. 47(3), (1981), 391-395.
131. Valls, R., Artaud, J., Archavlis, A., Vicente, N. et Piovetti, L., «Composition stérolique de l'extrait de *Caulerpa taxifolia* récemment introduite en Méditerranée», *Océanologica Acta*, V.17 (2), (1994), 223-226.
132. Giovani, R. and Toscano, M. A., « the isolation and characterization of (24S) – 24-methylcholesta-5-25-dien-3 β -ol from the siphonous marine alga *Codium bursa*», *J. Nat. Prod.*, V. 46, (1983), 187-189.
133. Sanchez-Machado, D. I., Lopez-Hernandez, J., Paseiro-Lozada, P. and Lopez-Cervantes, J., «An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds», *J. Biomed. Chromatogr.*, V. 18, (2004), 183-190.
134. Al Easa, H. S., Kornprobst, J. M., and Rizk, A. M., «Major sterol composition of Some algae from Qatar», *Phytochemistry*, V. 39, (1995), 373-374.
135. Govindan, M., Hodge, J. D., Brown, K. A. and Nunez-Smith, M., «Distribution of cholesterol in Caribbean marine algae», *Steroids*, V. 58, (1993), 178-180.
136. De Napoli, L., Magno, S., Mayol, L. and Novellino, E., «Sterol composition of some mediterranean green algae», *Phytochemistry*, V. 21, (1982), 1993-1994.
137. Duperon, R., Thiersaut, M., Duperon, P., « Occurrence of steryl glycosides and acylated steryl glycosides in some marine algae», *Phytochemistry*, V. 22(2), (1983), 535-538.
138. Safe, L. M., Wong, C. J. and Chandler, R. F, J., « Sterols of Marine Algae », *J. Pharm. Sciences*, V. 63, (1974), 464-466.
139. Rohmer, M., Ourisson, G. and Brandt, R. D., «Hydrosoluble complexes of sterols, sterols esters and their precursors from *Zea mays* L.», *J. Eur. Biochem*, V. 31, (1972), 172-179.
140. Shaiq Ali, M., Saleem, M, Yamdagni, R., Ashfaq Ali, M., « Steroid and antibacterial Steroidal glycosides from marine green alga *Codium iyengarii* borgesense », *Nat. Prod. Lett.*, V. 16, (2002), 407-413.
141. Giner, J. L, Faraldos, J. A. and Boyer, G. L, « Unique sterol of the toxic dinoflagellate *Karenia brevis* (Dinophyceae): a defensive function for unusual

- marine sterols?», *Phycologia*, V. 39, (2003), 315-319.
142. Giner, J. L., Zhao, H., and Tomas, C., «Sterol and fatty acids of three harmful algae previously assigned as *Chattonella*», *Phytochemistry*, V. 69, (2008), 2167-2171.
 143. Sheu, J-H., Liaw C-C., and Duh, C-Y., «Oxygenated Clerosterols isolated from the marine alga *Codium arabicum*», *J. Nat. Prod.*, V. 58(10), (1995), 1521-1526.
 144. Sheu, J-H., Huang, S-Y., and Duh, C-Y., «Cytotoxic Oxygenated Desmosterols isolated from the red alga *Galaxaura marginata* », *J. Nat. Prod.*, V. 59(10), (1996), 23-26.
 145. Sheu, J-H., Huang, S-Y, Wang, G.-H and and Duh, C.-Y., «Study on Cytotoxic Oxygenated Desmosterols Isolated from the Red Alga *Galaxaura marginata* », *J. Nat. Prod.*, V. 60 (1997), 900-903.
 146. Sheu, J-H., Wang, G.-H., Sung, P.-J., Chiu, Y.-H. and Duh. C.-Y., «Cytotoxic sterols from the Formosan brown alga *Turbinaria ornato*», *Planta Med.*, V. 63, (1997), 571-572.
 147. De Almeida Leone, P., Redburn, J., Hooper, J. N.A., and Quinn, R. J., «Polyoxygenated dysidea sterols that inhibit the binding of [I125] IL-8 to the human recombinant IL-8 receptor type A», *J. Nat. Prod.*, V. 63, (2000), 694-697.
 148. Atta-Ur-Rahman, Choudhary M.I., Majeed, A., Shabbir, M., Ghani, U. and Shameel M., «A succinylanthranilic acid ester and other bioactive constituents of *Jolyna Laminarioides*», *phytochemistry*, V. 46, (1997), 1215-1218.
 149. Bruneton, J., «Pharmacognosie : Phytochimie-Plantes médicinales», Londres-Paris-New York: Ed. Tec & Doc. Lavoisier, (1993).
 150. Ragan, M.A. and Glombitza, K-W., « Phlorotanins, brown algal polyphenols», in *Progress in Phycological research*», *Biop. Res. Ltd*, Ed. Round, F.E. and Chapman, D.J., Bristol, V. 4, (1986).
 151. Dellabella, M., Milanese, G., Muzzonigro, G., «Randomized trial of the efficacy of tamsulosin, nifedipine and phloroglucinol in medical expulsive therapy for distal ureteral calculi. », *J. Urol.*, V. 174(1), (2005), 167-174.
 152. Rosa, A., Deina, M., Atzeri, A., Corona, G., Incani, A., Melis, M. P., Appendino, G. M., Dessi A., « Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated alpha-pyrone-phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* chemico-biological interactions », *Chem. Biol. Inter.*, V. 165, (2007), 117-126.
 153. Zhang, R., Kang, K. A., Piao, M. J., Ko, D. O., Wang, Z. H., Lee, I. K., Kim, B. J., Jeong, I. Y., Shin, T., Park, J. W. , Lee, N. H., and Hyun, J. W., «Eckol protects V79-4 lung fibroblast cells against γ -ray radiation-induced apoptosis via the

- scavenging of reactive oxygen species and inhibiting of the c-Jun NH2-terminal kinase pathway », *Eur. J. Pharmacol.*, V. 591, (2008), 114-123.
154. Hashida, W., Tanaka, N., Kashiwada, Y., Sekiya, M., Ikeshiro, Y. and Takaishi, Y., «Tomoeones A-H, cytotoxic phloroglucinol derivatives from *Hypericum ascyron*», *Phytochemistry*, V. 69, (2008), 2225-2230.
155. Khan, M. T. H., and Ather, A., « Potentials of phenolic molecules of natural origin and their derivatives as anti-HIV agents », *Biotec., Ann. Rev.*, V. 13, (2007), 223-264.
156. Le, Q. T., Li, Y., Qian, Z., J., Kim, M. M., and Kim, S. K., « Inhibitory effects of polyphenols isolated from marine alga *Ecklonia cava* on histamine release », *Process Biochemistry*, V.44, (2009), 168-176.
157. Steinberg, P. D., «Effect of quantitative and qualitative variation in phenolic Compounds on feeding in three species of marine invertebrate herbivores», *Exp. Mar. Biol. Ecol.*, V. 120, (1988), 221-237.
158. Steinberg, P.D., and Van Altena, I., « Tolerance of marine invertebrates herbivores to brown algal phlorotannins in temperate Australasia», *Ecol. Monogr.*, V. 62, (1992), 189-222.
159. 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 Chem.*, V. 50, (2002), 3862-3866.
160. Nagayama, K., Shibata, T., Fujimoto, K., Honjo, T. and Nakamura, T., « Algicidal Effect of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* on red tide microalgae», *Acquaculture*, V. 218, (2003), 601-611.
161. Yong L., Zhong-Ji Q., Bomi R., Sang-Hoon L., Moon Moo K., and Se-Kwon K., « chemical components and its antioxidant properties in vitro: an edible marine brown alga, *Ecklonia cava*», *J. Biorg. & Medicin.chem.*, V. 17, (2009), 1963-1973.
162. Daly, J.J., Gregson, R.P., «Polyhydroxybiphenyl ethers from the brown alga *Cystophora congesta*», *Aust. J. Chem.*, V. 35, (1982), 649-657.
163. Kazlauskas, R., Mulder, J., Murphy, P. T. and Wells, R. J., «New metabolites from The brown algae *Caulocystis cephalornithos*», *Aust. J. Chem.*, V. 47, (1980), 2097-2101.
164. Whitfield, F. B., Helidoniotis, F., Shaw, K. J. and Svoronos, D., «Distribution of bromophenols in species of marine algae from eastern Australia», *J. Agric. Food Chem.*, V. 47, (1999), 2367-2373.
165. Whitfield, F. B., Shaw, K. J. and Walker, D. I., « The source of 2, 6-dibromophenols, the cause of the iodoform taint in Australian prawns», *J. Water sci. and Tech.*, V. 25(2), (1992), 131-138.

166. Pedersen, M., Saenger, P. and Fries, L., «Simple brominated phenols in red algae», *Phytochemistry*, V. 13, (1974), 2273-2279.
167. Gregson, R. P., Kazlauskas, R., Murphy, P. T. and Wells, R. J., «New metabolites from the brown alga *cystophora torulosa*», *Aust. J. Chem.*, V. 30, (1977), 2527-2532.
168. Kazlauskas, R., King, L., Murphy, P. T. Warren, R. G. and Wells, R. J., «New metabolites from the brown algal genus *Cystophora*», *Aust. J. Chem.*, V. 34, (1981), 439-447.
169. Amico, V., Currenti, R., Oriente, G., Piatelli, M. and Tringali, C., «A phloroglucinol derivative from the brown alga *Zonaria tournefortii*», *Phytochemistry*, V. 20(6), (1981), 1451-1453.
170. Gerwick, W. and Fenical, W., «Phenolic lipids related marine algae of the order Dictyotales», *Phytochemistry*, V. 21, (1982), 3, 633-637.
171. 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.
172. Glombitza, K.-W., and Zieprath, G., «Phlorotannins from the brown alga *Analipus japonicus*», *Planta Med.*, V. 55, (1989), 171, 171-175.
173. Glombitza, K.-W. and Rösener, H-U., «Bifuhalol: ein diphenyl diphenyläther aus *Bifurcaria bifurcata*», *Phytochemistry*, V. 13, (1974), 1245-1247.
174. Glombitza, K.-W. and Sattler, E., «Trifuhalol, ein neuer triphenyldiäther aus *Halidrys siliquosa*», *Tetrahedron Lett.*, V. 14, (1973), 4277- 4280.
175. 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.
176. Fukuyama, Y., Kodama, M., Miura, I., Kinzio, Z., Mori, H., Nakayama, Y. and Takahashi, M., «Eckols, novel phlorotannins with a dibenzo-p-dioxin skeleton possessing inhibitory effect on α 2-macroglobulin from the brown alga *Ecklonia kurome* Okamura», *Chem. Lett.*, (1985), 739-742.
177. Glombitza, K.-W., and Gerstberger, G., « Antibiotics from algae. 31 Phlorotannins With dibenzodioxin structural elements from the brown alga *Eisenia arborea*», *Phytochemistry*, V. 24, (1985), 541-543.
178. Fukuyama, Y., Miura, I., Kinzio, Z., Mori, H., Kido, M., Nakayama, Y., Takahashi, M., and Ochi M., «Antiplasmin inhibitor. V. Structure of novel dimeric eckols isolated from the Brown alga *Ecklonia kurome* Okamura», *Chem pharm. Bull.*, V. 37, (1989), 2438-2440.

179. Tringali, C. and Piatelli, M., «Two chromanes from the brown alga *Zonaria tournefortii*», *Tetrahedron lett.*, V. 23, 14, (1982), 1509-1512.
180. Rizk, A. M., Al Easa, H. S. and Kornprobst, J. M., «The phytochemistry of the macro and blue green algae of the Arabian gulf», Ed. Faculty of science, University of Qatar (Doha), QNL 28/2000, (1999).
181. Tringali, C. and Piatelli, M., «Further metabolites from the brown alga *Zonaria tournefortii*», *Gazetta Chimica Italiana*, V. 112, (1982), 465-468.
182. Barbier, M., «Introduction à l'écologie chimique», édition Masson, Paris, 1976.
183. Combaut, G., «*Methods of plant analysis*», edition H.F Linsken and J. F. Jackson, V. 13 , Berlin (1986).
- 184 .Combaut, Y. Bruneau, G. Jeanty, C. Francisco, J. Teste et L. Codomier, «Contribution chimique à l'étude de certains aspects biologiques d'une phéophycée de profondeur *Cystoseira zosteroides*», *Phycologia* V. 15, (1976), 275-282.
185. Francisco, C., Combaut, G., Teste, J. and Maume, B. F., «Étude des stérols d'algues brunes du genre *Cystoseira*: Identification par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse», *Biochim. Biophys. Acta* V. 487, (1977), 115-121.
186. Cheng, B. and Kowal J., «Analysis of adrenal esters by reversed phase high performance liquid chromatography», *Lipid. Res.* V. 35, (1994), 1115.
187. Sekkal, M., Deelerck, C., Huvenne, J. P., Legrand, P., Sombert, B. and Verdus, M. C., «Direct structural identification of polysaccharides from red algae by FTIR microspectrometry II: identification of the constituents of *Gracilaria verrucosa*», *J. Mikrochim. Acta*, V. 112, (1993), 11.
188. Lin-Vien, D., Colthup, N. B., Fateley, W. G. and Grasselli, J. G., «Infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules», Academic press, London, (1991).
189. Patterson, G. W., «Sterols of algae», *Physiology and biochemistry of steroids*, V. 11, (1991), 118-157.
190. Rezanka, T., « Analysis of sterol esters from alga and yeast by high-performance liquid chromatography and capillary gas chromatography-mass spectrometry with chemical ionization » , *J. Chromatogr.*, V. 598, (1992), 219-226.
191. Ebrahimzadeh, H., Niknam, V. and Maassoumi, A. A., «The sterols of *Astragalus* Species from. Iran: GLC separation and quantification», *Biochem. Syst. Ecol.*, V. 29, (2001), 393-404.
192. El Hattab, N., Daghbouche, Y., El Hattab, M., Piovetti, L., Garrigues, S., de la

- Guardia, M., «FTIR-determination of sterols from the red alga *Asparagopsis armata*: Comparative studies with HPLC», J. Talanta, V. 68, (2006), 1230-1235.
193. 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.
194. 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.
195. Sandri, J. and Viala, J., «Syntheses of all-(Z)-5,8,11,14,17-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.
196. Viala, J. and Sandri, J., «Total stereospecific synthesis of all cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (EPA) », Tetrahedron Lett., V. 33 (34), (1992), 4897-4900.
197. Corey, E. J. and Wright, S. W., «Convenient method for the recovery of eicopentaenoic acid from cod liver oil», J. Org. Chem., V. 53, (1988), 5980-5981.
198. Wenkert, E., Buckwalter, B. L., Burfitt, I. R., Gasic, 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.
199. 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.
200. 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 Δ^4 -fatty acyl-group desaturase», Biochemistry, V. 42, (2003), 9779-9788.
201. Girke, T., Schmidt, H., Zahringer, U., Reski, R., Heinz, E., «Identification of a novel Δ^6 acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*», Plant J., V. 15, (1998), 39-48.
202. Qi, B., Beaudoin, F., Fraser, T. Stobart, A. K., Napier, J. A., «Identification of a cDNA encoding a novel C18- Δ^9 polyunsaturated fatty acid-specific elongation activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, *Isochrysis galbana*», FEBS Letters, V. 510, (2002), 159-165.
203. Ohlrogge, J. B. and Jaworski, J. G., «Regulation of fatty acid and synthesis», Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, V. 48, (1997), 109-136.
204. Ghosh, R., Chhabra, A., Phatale, P. A., Samrat, S. K., Sharma, J., Gosain, A,

- Mohanty, D., Saran, S. and Gokhale, R. S., "Dissecting the functional role of polyketide syntases in *Dictyostelium Discoideum*: Biosynthesis of the differentiation regulating factor 4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol", J. Biol. Chem., V. 283 (17), (2008), 11348-11354.
205. Morita, H., Kondo, S., Oguro, S., Noguchi, H., Sugio, S., Abe, I., Kohno, T., "Structural insight into chain-length control and product specificity of Pentaketide chromone synthase from *Aloe arborescens*", Chem. Biol., V. 14, (2007), 359-369.
206. Moore, B. S., «Biosynthesis of marine natural products: microorganisms and macroalgae», Nat. Prod. Rep., V. 16, (1999), 653-674.
207. Hofmann, M. and Eichemberger, W., «Biosynthesis of diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhormosirene in *Rhodoabcter sphaeroides* and evidence for lipid-linked N-methylation», J. Bacteriol., V. 178, (1996), 6140-6144.

APPENDICE A
LISTE DES ABREVIATIONS

A	absorbance
AcOEt	acétate d'éthyle
CC	chromatographie sur colonne
CCM	chromatographie sur couche mince
CG	chromatographie en phase gazeuse
CG-SM	chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CHCl ₃	chloroforme
CLHP	chromatographie liquide haute performance
CLHP-UV	chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie Ultra-Violette
CLHP-SM :	chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse
EPS	extraction en phase solide
IRTF	spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
MeOH	méthanol
m	masse
min	minute
RMN	résonance magnétique nucléaire
Sap	saponification
TMP	triméthyl pentane
C	concentration
K	coefficient de proportionnalité
R _f	rapport frontal
t _r	temps de rétention
λ	longueur d'onde
$\bar{\nu}$	nombre d'ondes
ε	coefficient d'absorption molaire
[α]	Pouvoir rotatoire spécifique

APPENDICE B

GLOSSAIRE

Aérocyste. Vésicule remplie de gaz

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.

Benthos. Ensemble des organismes aquatiques vivant en relation étroite avec le fond marin (s'oppose à pelagos, ensemble des organismes en suspension dans l'eau de mer).

Biomarqueur. Indicateur biochimique

Biotope. Milieu déterminé, défini par un ensemble de conditions écologiques et hébergeant un type bien défini de peuplement.

Champignons. Désigne divers organismes biologiques sans chlorophylle, pas ou peu mobiles. Ils font partie des Eucaryotes.

Chlorobionta. Organisme vert.

Chlorophyta. Incluent les algues vertes marines et une grande partie des algues d'eau douce et aériennes.

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.

Crampons. Haptères.

Cyanobactéries. Algues bleues

Chloroplaste Plaste coloré en vert des chlorobiontes qui leur donne leur couleur verte. (Synonyme, chromatophore ou plaste).

Dichotome. Qualifie un axe qui se divise en deux rameaux symétriques.

Diploïde. Correspond à un lot double de chromosomes dans le noyau des cellules.

Dulçaquicole. Qualifie un organisme vivant en eau douce. En anglais freshwater (alga or organism)

Encroûtant. En forme de croûte.

Eucaryotes. Organisme vivant possédant un noyau isolé du cytoplasme par une membrane et qui contient de l'ADN. Les eucaryotes s'opposent aux procaryotes (bactéries, cyanophycées)

Flagelles. Sont des caractères fondamentaux de la systématique.

Flagellés. (du latin flagellum = fouet) Sont des organismes eucaryotes unicellulaires, qui sont dotés de flagelles dont ils se servent pour leur propulsion.

Foliacé. Allure de feuille ou de lame.

Gamétophyte. Thalle qui produit des gamètes

Haptonème. Appendice filiforme particulier des Haptophyta, très court ou plus de dix fois plus long que le corps cellulaire ou encore réduit à quelques microtubules dans la cellule. Son ultrastructure est différente de celle d'un flagelle

Hétérotrophique. Organisme qui se nourrit de substances organiques, ne pouvant effectuer lui-même la synthèse de ses éléments constitutants

Infralittoral. Etage (espace vertical du domaine benthique) compris entre l'étage médiolittoral et l'étage circalittoral.

Isomorphe. Se dit d'un cycle d'alternance de générations dont les générations successives sont morphologiquement semblables.

Lignée. Ensemble d'êtres vivants (ou de gènes) descendant d'un ancêtre commun.

Métabolites secondaires. Produits du métabolisme secondaire

Pélagique. Relatif au pelagos, s'oppose à benthique .

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.

Phylogénétique. Qui tient compte des liens de parenté entre les organismes, de leur généalogie (classification, méthode de reconstruction phylogénétique)

Phytoplancton. Ensemble des organismes du plancton appartenant au règne végétal, de taille très petite ou microscopique, qui vivent en suspension dans l'eau; communauté végétale des eaux marines et des eaux douces, qui flotte librement dans l'eau et qui comprend de nombreuses espèces d'algues et diatomées.

Plaste. organite cellulaire qui peut se charger de pigments (chloroplaste, chromoplaste) ou de diverses substances nutritives

Plancton. Ensemble des organismes pélagiques incapables de mouvements propres suffisants pour résister aux masses d'eau

Procaryote. Se dit d'un organisme qui ne possède pas un vrai noyau, s'oppose à eucaryote, synonyme bactérie.

Propagule. Structure multicellulaire spécialisée, destinée à être libérée pour assurer la multiplication végétative de l'organisme qui la produit

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 certaines algues brunes (Laminariales), expansion foliacée qui porte les sores.

Sore. Groupement d'organes reproducteurs (sporo- ou gamétocystes) à la surface d'un thalle.

Streptophyta. Incluent les algues d'eau douce ou aériennes mais aussi les Embryophyta (algues vertes adaptées à la vie terrestre).

Surnuméraires. Se dit des pigments, autres que les chlorophylles, composant l'antenne collectrice de la photosynthèse

Taxon. Groupe d'être vivant constituant une unité systématique d'un niveau hiérarchique donné (espèce, genre, famille, classe, embranchement, etc.).

Taxonomie. Science de la classification des êtres vivants selon leurs caractéristiques et qui a pour objet de les décrire et de les regrouper en entités appelées taxons ...

Thalle. Appareil végétatif des végétaux inférieurs, caractérisé par l'absence de tige, feuilles et racines.

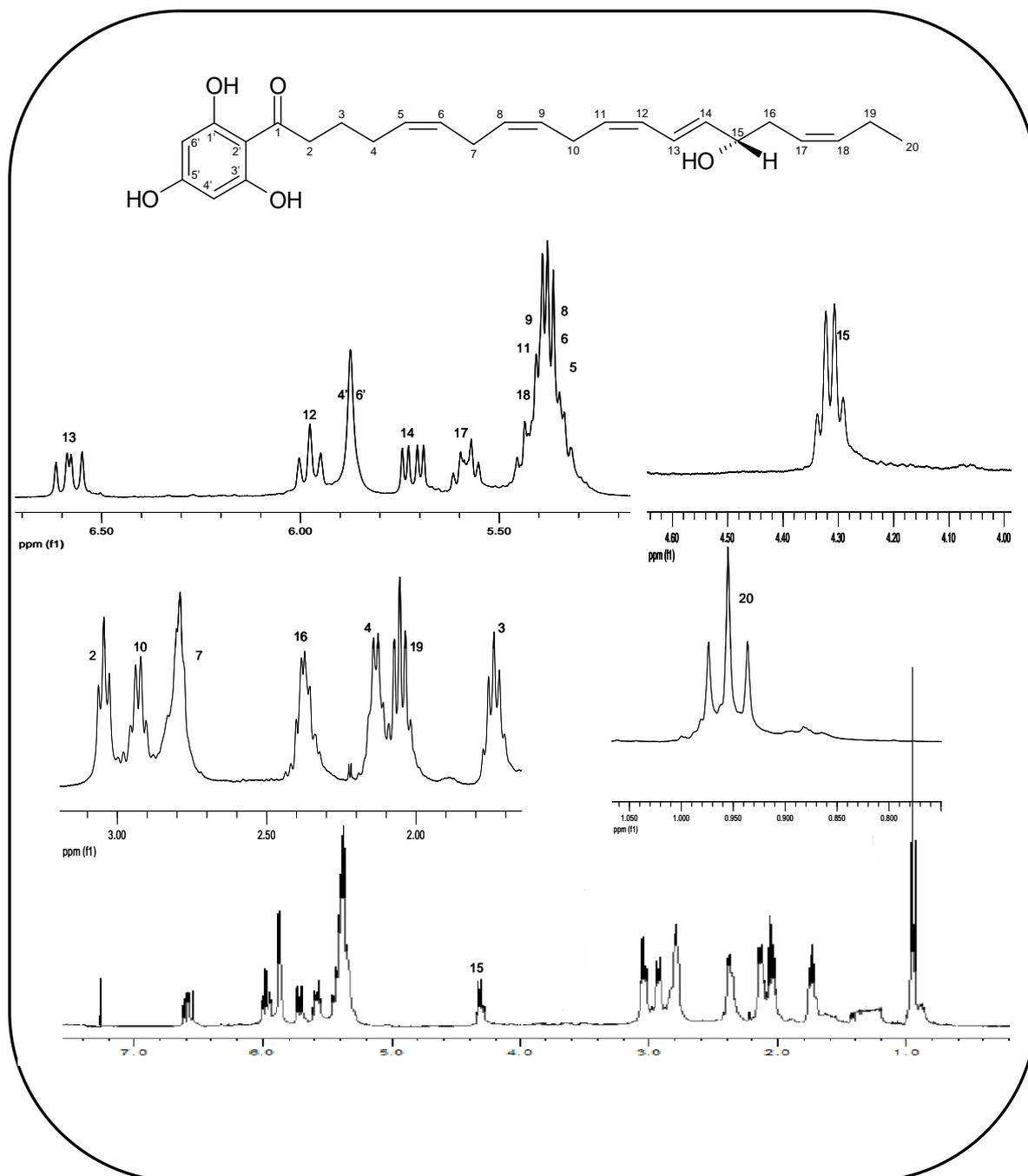
Unicellulaire: Se dit d'un organisme constitué d'une seule cellule

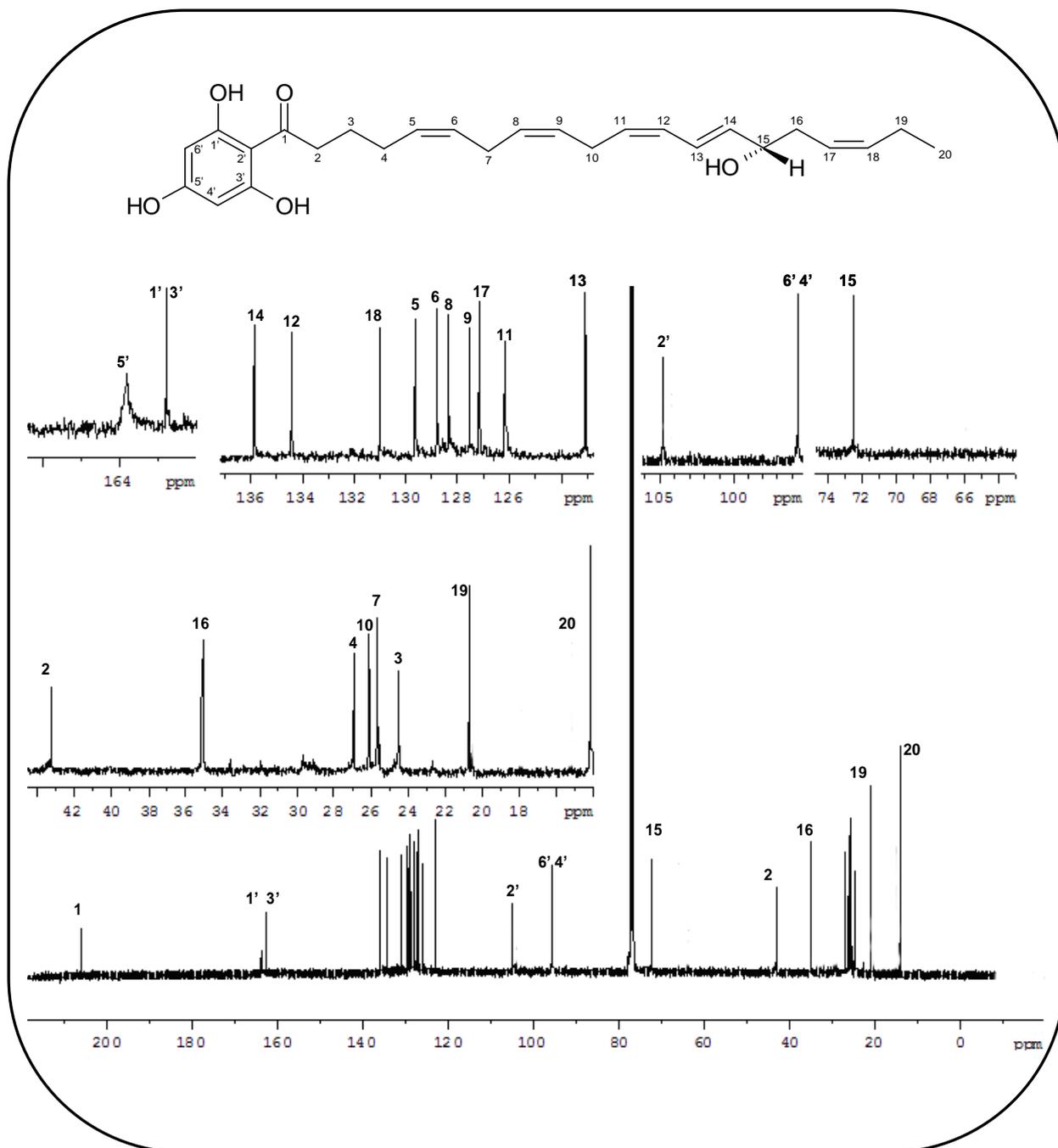
Verticillé. Ensemble de pièces (ramulles, poils, etc...) s'insérant sur un axe à un même niveau et en nombre supérieur à deux.

Xanthophylle. Pigment térénoïde, jaune, orangé ou rouge de structure voisine de celles des carotènes mais comportant des atomes d'oxygène en plus de la chaîne hydrocarbonée.

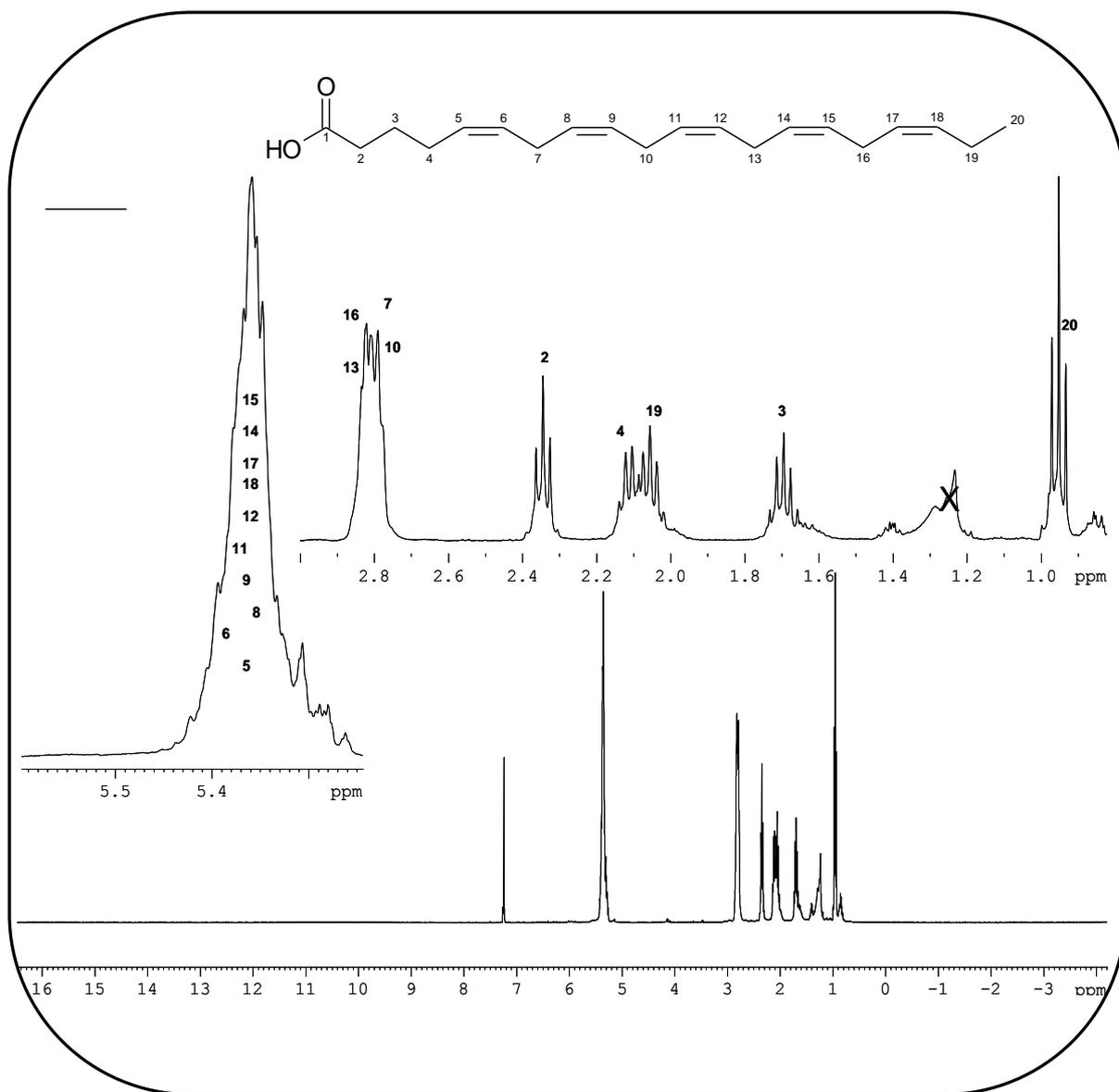
Zygote. Œuf, cellule issue de la fusion des gamètes.

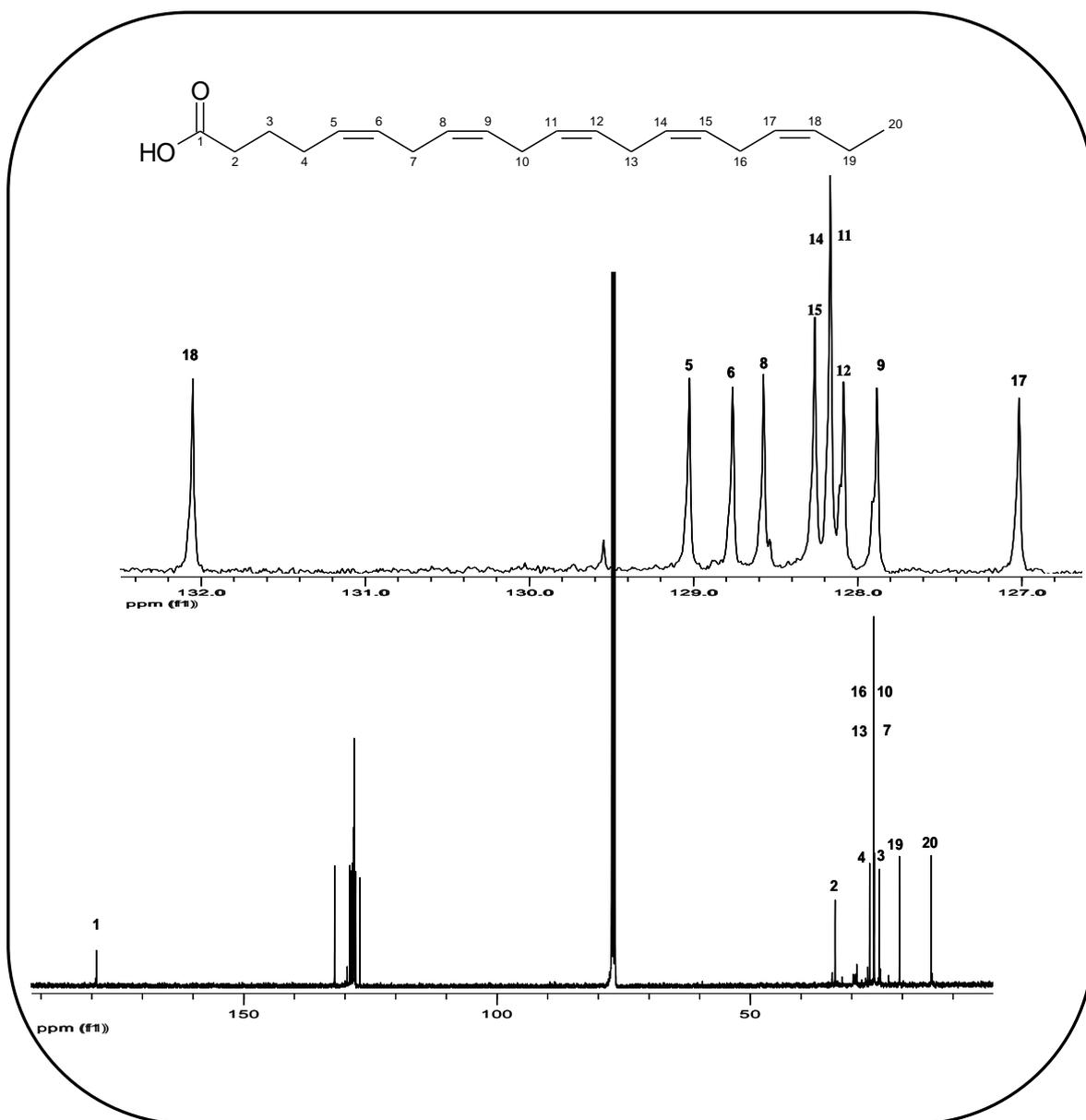
APPENDICE C

Spectre RMN ^1H à 400 MHz dans CDCl_3 du produit 2



Spectre RMN ^{13}C à 100 MHz dans CDCl_3 du produit 2

Spectre RMN ^1H à 400 MHz dans CDCl_3 du produit 5



Spectre RMN ^{13}C à 100 MHz dans CDCl_3 du produit 5

TRAVAUX REALISES

Publications scientifiques

N.El Hattab, Y. daghbouche, M. El Hattab, L.piovetti , Salvador Guarrigues, Miguel de la Guardia, « FTIR-Determination of sterols from the red alga *asparagopsis armata* : comparative studies with HPLC », *Talanta*, **68**, 1230-1235, 2006.

N. Bouzidi, Y. Daghbouche, M. El Hattab, Z. Aliche, G. Culioli et L. Piovetti, Salvador Garrigues et Miguel de la Guardia: « Determination of total sterols in brown algae by Fourier transform infrared spectroscopy”: *Analytica Chimica Acta 616 (2008) 185-189*

El Hattab M., Bouzidi N., Ortalo-magné A., Daghbouche Y., Richou M., CHitour S., Bruno de Reviere et Louis Piovetti, « Eicosapentaenoic acid: Possible precursor of the phloroglucinol derivatives isolated from the brown alga *Zonaria tournefortii* (J. V.Lamouroux) Montagne», *Biochem. System. And Ecol.* 37 (2009) 55-58

Communications scientifiques :

N.EL Hattab, Y.Daghbouche, M.EL Hattab, L.Piovetti et M.de la Guardia «Dosage des stérols totaux de l’algue rouge *asparagopsis armata* en utilisant l’extraction en phase solide et la spectrométrie infrarouge à transformée de fourier », 16^{ème} journée de la Société Française de chimie –Marseille Avril 2003, CA. 52.

N. El Hattab, Y. Daghbouche, M. El Hattab, L. Piovetti, S. Garrigues and M. de la Guardia, «Detemination of sterols from the red alga *asparagopsis armata* by high performance liquid chromatography», Société franco-algerienne, Gênes, Italie , avril 2004, P 104.

M. El Hattab, Naima El Hattab, H. S. Saif Al Easa, A. Tabariès, J.-M. Kornprobst, L. Piovetti, « Volatile compounds of the brown alga *hormophysa cuneiformis* obtained by supercritical carbon dioxide and by steam hydrodistillation », Société franco-Italienne, Gênes, Italie , avril 2004, P. 102.

M.EL Hattab, Naima El Hattab, L.Piovetti and al., , « Extraction au dioxyde de carbone supercritique de la fraction volatile de *Dictyopteris membranacea* : modélisation mathématique », 18^{ème} journée de la SFC - Toulon, France avril 2005 (*orale*).

N.EL Hattab, Y.Daghbouche, M.EL Hattab, L.Piovetti, M. Bezzina, S.Guarrigues et M.de la Guardia, « . Dosage des stérols totaux de l'algue rouge *asparagopsis armata* par spectrométrie infrarouge à transformée de fourier IRTF: Etude comparative par chromatographie liquide haute performance», 18^{ème} journée de la Société Française de chimie –La Garde Avril 2005, CA. 67.

M. El Hattab, N. Bouzidi, M. Bezzina, S.E. Chitour, L. Piovetti, «Comparison of the chemical composition of the volatile fraction of the brown alga *dictyopteris membranacea* obtained by three different techniques», 4th European Conference On Marine Natural products, Paris - France Sept. 12-16, 2005 (*Poster*).

N. Bouzidi, Z. Aliche, Y. Daghbouche, M. El Hattab, G. Culioli et L. Piovetti, «Dosage des stérols d'algues brunes par spectrométrie IR-TF», 20^{ème} Journée de la SFC-PACA ; Univrsité d'Avignon et des pays de Vaucluse 24 mai 2007, Ref. CA4

Z. Aliche, Y. Viano, M. El Hattab, N. Bouzidi, Y. Daghbouche, G. Culioli et L. Piovetti, «Etude de la composition chimique de *Cystoseira ercegovicii*», 20^{ème} Journée de la SFC-PACA ; Univrsité d'Avignon et des pays de Vaucluse 24 mai 2007, Ref. CA2

Y. Viano, Z. Aliche, N. Bouzidi, M. El Hattab, Y. Daghbouche, G. Culioli et L. Piovetti, «Les algues brunes méditerranéennes :une source prolifique de diterpènes originaux», 21^{ème} Journée de la SFC-PACA ; Aix-Marseille Université - Centre Saint Jérôme 16 avril 2009.

PERSPECTIVES

- Dosage des stérols libres dans les algues par IRTF
- Généraliser la méthode de dosage par spectrométrie IRTF en faisant appel aux méthodes de calibration multi-variables et multi-composés (les algues vertes)
- Dosage des métabolites secondaires en considérant les méthodes FIA
- Étude de la variation saisonnière et géographique
- Étendre l'étude des métabolites secondaires à d'autres espèces d'algues