

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté des Sciences

Département de Chimie

Mémoire Présenté par

EL HAOUARI Karima

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine Science de la matière
Filière Chimie
Option **Chimie des substances naturelles**

Titre

Contribution à l'étude chimique des extraits lipidiques de deux algues brunes méditerranéennes *Cystoseira elegans* et *Cystoseira tamariscifolia*

Soutenu le 06 juillet 2011, devant le jury composé de :

M. KHODJA	MCA	Président	Université de Blida
S. KASMI	MCA	Examineur	Université de Blida
N. BOUZIDI	MCB	Examineur	Université de Blida
M. EL HATTAB	MCA	Promoteur	Université de Blida

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire MAPIEM de l'Université de Toulon, je tiens à remercier Pr. Yves Blache et Dr. G. Culioli de m'avoir invité et m'avoir permis d'utiliser tous les équipements du laboratoire. Je remercie toute l'équipe du laboratoire pour leur grande sympathie.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude à mon promoteur, Dr. M. EL HATTAB, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui m'ont permis d'apprendre et de mener à bien mon mémoire.

Avant d'aborder ce mémoire, Je tiens à remercier vivement les membres du jury :

- Le Président de jury

Dr. KHODJA, Maître de conférences, Université Saâd DAHLAB de Blida d'avoir accepté de présider le jury.

Les examinateurs

- Dr. KASMI, Maître de Conférences, Université Saâd DAHLAB de Blida,

- Dr. BOUZIDI, Maître de Conférences, Université Saâd DAHLAB de Blida.

Qui me font l'honneur de juger ce travail.

A tous ceux qui m'ont aidé de proche ou de loin dans la réalisation de ce travail,

Dédicace

Je dédie ce mémoire de fin d'études

A

Mon très cher père et ma très chère mère

En témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les
sacrifices et tous les
efforts qu'ils ont fait pour mon éducation ainsi que ma formation

A

Mes chers Frères

Djamel et Amine
Pour leur affection, compréhension et patience

A

Tous ceux qui ont une relation de proche ou de loin
avec la réalisation du présent rapport.

SOMMAIRE

Introduction	10
CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique sur les espèces du genre <i>Cystoseira</i>	12
1.1 Taxonomie et Systématique du genre <i>Cystoseira</i>	13
1.2 Distribution phytogéographique mondiale.....	13
1.3 Position systématique de <i>cystoseira elegans</i>	14
1.4 Position systématique de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	15
1.5 Composition chimique des algues brunes du genre <i>Cystoseira</i>	16
1.5.1 Généralité sur les terpènes	17
1.5.1.1 Définition	17
1.5.1.2 Biosynthèse des diterpènes	17
1.6 Les méroditerpènes	19
1.6.1 Définition	19
1.7 Métabolites secondaires isolés de <i>Cystoseira elegans</i>	21
1.8 Métabolites secondaires du <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	23
1.9 Notions générales de chimiotaxonomie	25
1.10 Chimiotaxonomie des espèces du genre <i>Cystoseira</i>	26
1.11 Conclusion.....	28
CHAPITRE 2 : Etude chimique préliminaire de <i>Cystoseira elegans</i>.....	29
2.1 Récolte, traitement et conservation	30
2.2 Extraction	30
2.3 Fractionnement sur colonne de silice ouverte	30
2.4 Analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince	33
2.5 Analyse par chromatographie liquide CLHP.....	34
2.6 Analyse de la fraction 8 par CLHP	34
2.7 Analyse par RMN du proton du produit 8.1	35

2.8 Analyse de la fraction 9 par CLHP	41
2.9 Analyse par RMN du proton des produits 9.1 et 9.2	42
2.10 Conclusion	45

**CHAPITRE 3 : ÉTUDE CHIMIQUE D'UNE FRACTION DE
CYTOSEIRA TAMARISCIFOLIA 46**

3.1 Récolte et extraction	47
3.2 Analyse par chromatographie d'une fraction de colonne	47
3.3 Analyse par RMN du produit 9.2	48
3.4 Analyse du produit 9-2 par spectrométrie infrarouge.....	55
3.5 Conclusion	56

Conclusion générale 57

bibliographie 59

Annexes 64

Tableaux

Tableau 1	Groupes structuraux de <i>Cystoseira</i> Méditerranéennes proposés par Piatelli à partir des molécules isolées	26
Tableau 2	Groupe structural de <i>Cystoseires</i> Méditerranéennes proposé par Amico 1995 à partir des molécules isolées	27
Tableau 3	Données du fractionnement sur colonne ouverte	31
Tableau 4	Déplacements chimiques du proton et du carbone 13 de composé 9.2	50

Figures

Figure 1	<i>Cystoseira elegans</i>	14
Figure 2	<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	16
Figure 3	Biosynthèse des diterpènes	18
Figure 4	Biosynthèse des méroditerpènes	19
Figure 5	Présentation des différents groupes de méroditerpènes	20
Figure 6	Diterpènes linéaires isolés de <i>Cystoseira elegans</i>	21
Figure 7	Méroditerpènes monocyclisés isolés de <i>Cystoseira elegans</i>	21
Figure 8	Méroditerpènes linéaires isolés de <i>Cystoseira elegans</i>	22
Figure 9	Méroditerpènes linéaires isolés de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	23
Figure 10	Méroditerpènes monocyclisés isolés de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	23
Figure 11	Méroditerpènes bicyclisés isolés de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	24
Figure 12	Méroditerpènes réarrangés isolés de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	24
Figure 13	Fractionnement sur colonne ouverte de silice.	30
Figure 14	Chromatographie sur couche mince de l'extrait brut de <i>Cystoseira elegans</i>	33
Figure 15	Chaîne CLHP utilisée dans l'analyse	34
Figure 16	Profil chromatographique de la fraction 8	35
Figure 17	Spectre RMN ¹ H du composé 8.1	36
Figure 18	Méroditerpène isolé de <i>Cystoseira tamariscifolia</i>	36
Figure 19	Spectre RMN ¹ H du méroditerpène	37
Figure 20	Signaux des Protons aromatiques du méroditerpène	37
Figure 21	Signal du méthoxy du méroditerpène	38
Figure 22	Signaux des Protons méthyles du méroditerpène	38
Figure 23	Dédoublé des signaux des protons aromatiques du composé 8.1	39
Figure 24	Dédoublé des signaux du méthoxy du composé 8.1	40
Figure 25	Dédoublé des signaux des Protons méthyles du composé 8.1	40
Figure 26	Profil chromatographique de la fraction 9	41
Figure 27	Spectre RMN ¹ H du composé 9.1	42
Figure 28	Dédoublé des signaux du méthoxy du composé 9.1	43

Figure 29	Dédoubléement des signaux des Protons aromatiques du composé 9.1	43
Figure 30	Dédoubléement des signaux des Protons méthyles du composé 9.1	44
Figure 31	Profil chromatographique de la fraction 9	47
Figure 32	Spectre RMN 1H du produit 9.2	48
Figure 33	Spectre RMN 13C du produit 9.2	49
Figure 34	Structure de méroditerpène 4'-Methoxy-(2 <i>E</i>)-bifurcarenone	51
Figure 35	Spectre HMBC du produit 9.2	53
Figure 36	Spectre COSY ¹ H- ¹ H du produit 9.2	54
Figure 37	Spectre infrarouge du produit 9.2	55

المخلص :

في هذه المذكرة قمنا بدراسة كيميائية لمقتطفات ليبيدية لنوعين من الطحالب بنية اللون (سيستوزيرالبيغرا) و (سيستوزيراتماريسيفوليا).

الدراسة الكيميائية الأولية على النوع الأول سمحت لنا بتحضير مقتطف خام و تقسيمه على محور من السليكا ثاني أكسيد الكربون (Silice).

التحليل عن طريقة CCM أدى إلى غربلة المقتطف و الحصول على الشكل العام لمختلف الأقسام الكيميائية لهذا المقتطف.

أما التحليل عن طريقة النصف الإعدادي سمح لنا بالنصف الإعدادي، سمح لنا بعزل اثنين من المنتجات بواسطة RMN^1H أظهرت لنا أنه مزيج من مضاعف سنوية (épimères) مما يجبرنا بتحسين شروط التحضير.

فيما يخص النوع الثاني من الطحالب، سمحت الدراسة الكيميائية عن طريق CLHP بعزل منتوح خام، مما أدى إلى التعرف عن صيغته وذلك بالاستعمال الطرق الطيفية (على الخصوص ارتداد المغناطيسي النووي أحادي و ثنائي الأبعاد).

هذا الجزئي هو (4-methoxy-bifurcarénone)، شكل من أشكال méroditerpène أحادي الحلقة الذي تم عزله سابقا من نوعين من الطحالب وهما : (سيستوزيرالبيغرا) و (سيستوزيراتماريسيفوليا).

كلمات مفتاح :

سيستوزيرالبيغرا ، سيستوزيراتماريسيفوليا، Silice ، CCM ، RMN^1H ، épimères ، CLHP ، 4-methoxy- bifurcarénone ، méroditerpène ، سيستوزيرالبيغرا، سيستوزيراتماريسيفوليا.

Résumé

Le présent travail porte sur l'étude chimique des extraits lipidiques de deux algues brunes méditerranéennes *Cystoseira elegans* et *Cystoseira tamariscifolia*. L'étude chimique préliminaire sur *Cystoseira elegans* a porté sur la préparation d'un extrait brut suivi de son fractionnement sur colonne ouverte de silice. L'analyse par CCM a permis de faire un criblage de l'extrait et de se faire une idée générale sur les différentes classes chimiques de l'extrait brut. L'analyse par CLHP semi-préparative a permis d'isoler deux produits, l'analyse par RMN ¹H a permis de montrer qu'il s'agit d'un mélange d'épimères et donc l'amélioration des conditions de séparation devient nécessaire. L'étude chimique par CLHP d'une fraction de *Cystoseira tamariscifolia* a permis, en particulier, d'isoler un produit pur. L'analyse par des techniques spectroscopiques, notamment, par RMN mono- et bidimensionnelle a permis de caractériser la structure du produit. Il s'agit du 4-methoxy-bifurcarénone, un méroditerpène monocyclique déjà isolé à partir de l'espèce *Cystoseira amantacea* récoltée sur les côtes françaises et de *Cystoseira tamariscifolia* récoltée sur les côtes marocaines.

Mots clés : étude chimique, *Cystoseira tamariscifolia*, *Cystoseira elegans*, métabolites secondaires, meroditerpènes, chimiotaxonomie

INTRODUCTION

L'intérêt de la recherche dans le domaine de la chimie des substances naturelles trouve son explication dans les trois objectifs suivants [1] :

- L'investigation de composés à haute valeur ajoutée,
- La découverte de nouveaux modèles chimiques,
- La recherche de composés biologiquement actifs.

Bien que l'étude des substances naturelles d'origine terrestre a commencé depuis 1771, ce n'est que deux cents ans plus tard que celle des organismes marins a pu prendre son essor grâce à la mise en place de programmes de recherche visant à étudier l'activité pharmacologique des produits naturels marins. On peut citer le programme S.N.O.M (Substances Naturelles d'Origine Marine), le projet Pharmocéan du Centre National pour l'exploitation des océans et le National Sea Grant Program [2].

En 1947, seulement une douzaine de composés, dont le fucostérol (principal stérol des algues brunes) étaient décrites dans la littérature. Mais dans les années 1980, après une période de désillusion ayant entraîné l'arrêt de quelques programmes de recherches, plusieurs molécules pharmacologiquement actives ont été découvertes telles que les Didemnines, Antitumoraux puissants isolés à partir des tuniciers (ascidies) [3, 4] ou les hydroquinones terpéniques. Et jusqu'aux années 1990 ce sont les algues qui ont intéressé plus les chercheurs.

Récemment plus de 4000 nouveaux métabolites ont été isolés à partir de divers organismes marins. Ainsi le développement de la chimie de produits naturels marins est devenu exponentiel.

Les produits étudiés dans le cadre de ce mémoire sont des métabolites secondaires (diterpènes, méroditèrpens), c'est-à-dire des molécules qui, contrairement aux métabolites primaires, ne paraissent pas indispensables à la survie de l'organisme.

Chapitre 1

On sait aujourd'hui que le principal intérêt de ces substances réside dans le fait qu'elles jouent un rôle de médiateur chimique dans le milieu marin. Un certain nombre d'observations biologiques dans le domaine des algues ont permis en effet, de montrer, que certaines d'entre elles exercent une action de défense chimique vis-à-vis des prédateurs naturels de l'espèce qui les métabolise (oursins, poissons,.....) et qu'elles contribuent au phénomène d'épuration bactérienne des eaux de mer dans les zones côtières [5].

Les métabolites secondaires jouent aussi un rôle important en chimiotaxonomie (classement des espèces selon leur composition chimique). En effet, les biologistes rencontrent des problèmes d'identification des espèces car des variations morphologique peuvent intervenir suivant le lieu et /ou la période de récolte. Les résultats des études chimiques ont apporté dans certains cas des compléments d'informations qui, ajoutés aux critères biologiques existants permettent de mieux distinguer entre elles les espèces d'un genre donné.

Notre mémoire est consacré à l'étude chimique des extraits lipidiques de deux algues brunes *Cystoseira elegans* et *Cystoseira tamariscifolia*.

L'objectif principal est l'isolement et la caractérisation structural de nouveaux métabolites secondaires.

Il comprend trois parties principales :

- Une synthèse bibliographique sur les espèces du genre *Cystoseira*,
- Etude chimique préliminaire de *Cystoseira elegans*,
- Etude chimique d'une fraction de l'extrait lipidique de *Cystoseira tamariscifolia*

1.1. Taxonomie et Systématique du genre *Cystoseira*

Les algues brunes de l'ordre des fucales se subdivisent en quatre familles dont celles des *Cystoseiracées*. Cette famille, qui a été établie en 1843 par Kutsing [6], comprenait alors sept genres, après divers révisions, elle en inclut dix-huit [7].

Créé originalement par le phycologiste suédois Carl Adolph Agardh en 1820 [8], le taxon original *Cystoseira* comprenait alors trente espèces.

Au début du siècle, la situation était si confuse que *C. Sauvageau* [9, 10] fut amené à réviser l'ensemble du genre. Il effectua une étude approfondie et constitua de nombreux groupes, incluant certaines espèces, que G. Hamel [11], plus tard réduisit à six. Il y a une trentaine d'années M. Roberts [12, 13], après un certain nombre de mise au point sur les espèces des côtes britanniques, a tenté de donner des diagnoses plus précises des espèces de ce genre en les regroupant selon des critères liés à la morphogénèse. A l'heure actuelle, cinquante-six espèces sont rattachées à ce genre [14].

1.2. Distribution phytogéographique mondiale

Le genre *Cystoseira* montre une aire de répartition très large : océan Atlantique, océan Pacifique, océan Indien, mer Méditerranée mais fait défaut dans la zone Antarctique. La plupart vivent dans l'hémisphère nord et quelques rares espèces se trouvent dans l'hémisphère sud. La majorité des espèces du genre *Cystoseira* se développent sur les côtes de la Méditerranée comme l'attestent de nombreux travaux taxonomiques. Ces algues souvent de grande taille constituent une fraction importante de la biomasse des algues littorales [15].

1.3. Position systématique de *Cystoseira elegans*

L'espèce *Cystoseira elegans* (figure 1) admet comme classification :

Régne : Eukariota

Embranchement : Ochrophyta

Classe : Phaeophyceae

Ordre : Fucales

Famille : Sargassaceae

Genre : *Cystoseira*

Espèce : *elegans*



Figure 1 : *Cystoseira elegans*

1.3.1. Description

Espèce dressée, brune, iridescente, jusqu'à 30 cm de hauteur, procurant une sensation légèrement épineuse; axe tronconiforme, courte, 1-3 cm (rarement jusqu'à 7-8 cm), généralement simple, à sommet épineux non saillant et fixé au substrat par un petit disque circulaire; rameaux primaires pourvus de tophules (= enflement basal persistant sur l'axe après la chute saisonnière des rameaux); très épineux, 6-10 mm X 3-5 mm, groupés le long de l'axe; rameaux primaires minces, longs, jusqu'à 20 cm, cylindriques; nus à la base; extrémités et rameaux d'ordres supérieurs cylindriques et couverts de ramules épineux (feuilles), largement insérés, palmés-dentés à étroits-bifides, 1-3 mm de long; cryptes pilifères éparses sur les rameaux et sur les feuilles; aérocystes absents; réceptacles terminaux longs, 1-3 cm, simples ou bifurqués, cylindriques, tuberculés, avec ou sans épines; conceptacles peu saillants, différenciés dans le rameau et dans la base des épines [16].

1.4. Position systématique de *Cystoseira tamariscifolia*

Cystoseira tamariscifolia (figure 2) a pour systématique :

Régne : Eukariota

Embranchement : Ochrophyta

Classe : Phaeophyceae

Ordre : Fucales

Famille : Sargassaceae

Genre : *Cystoseira*

Espèce : *tamariscifolia*



Figure 2 : *Cystoseira tamariscifolia*

1.4.1. Description

C'est une algue robuste de 10 à 50 cm, de couleur verte olive, iridescent dans l'eau, produisant une sensation rude au toucher. Le thalle est fixé par un disque très solide et comprend un axe principal dont les ramifications portent de nombreux rameaux secondaires plusieurs fois divisés et recouverts de petits ramules épineux appelés « feuilles ». Elle présente une période de repos l'hiver, elle est alors rude au toucher et réduite. Dès le printemps, elle croît et peut donner des ramules non feuillés et souple, elle est beaucoup moins rude au toucher. Par la suite elle devient très touffue [15].

1.5. Composition chimique des algues brunes du genre *Cystoseira*

Les principaux métabolites secondaires rencontrés dans les algues brunes du genre *Cystoseira* étant des diterpénoïdes et des méroditerpénoïdes [17]. Nous commençons par donner quelques notions théoriques sur les composés terpéniques.

1.5.1. Généralités sur les terpènes

1.5.1.1. Définition

On appelle terpène un ensemble d'hydrocarbures cycliques ou à chaîne ouverte composés de plusieurs unités isopréniques, de formule brute $(C_5H_8)_n$ où n peut prendre les valeurs :

- 1 : Hémiterpènes (rares)
- 2 : monoterpènes
- 3 : sesquiterpènes
- 4 : diterpènes
- 6 : triterpènes
- 8 : tétraterpènes

Le nom terpène a été forgé à partir de la térébenthine, matière de base de leur obtention et de la racine « ène » pour rappeler qu'il s'agit de composés insaturés.

Les diterpènes sont communs dans le milieu marin : les algues, les éponges et les mollusques en renferment. Cependant, ces molécules semblent être synthétisées surtout par les algues puis distribuées dans le règne animal par le jeu des chaînes alimentaires [17].

1.5.1.2. Biosynthèse des diterpènes

Biogénétiquement, les terpènes ont pour précurseur l'acide mévalonique, obtenu par activation enzymatique d'une molécule d'acide acétique [19]. La phosphorylation et la décarboxylation qui suivent aboutissent à une unité de base : le pyrophosphate de 3-isoprényle (PPI-3). Cette unité est isomérisée en pyrophosphate de 2-isoprényle (PPI-2) qui joue le rôle d'agent alkylant envers d'autres groupes PPI-3. Selon le nombre d'unités isopréniques fixées, on obtient par le pyrophosphate de géranylgeranyl (PPGG), les diterpènes (20 atomes de carbone) (figure3). Les composés issus de cette sous-classe peuvent, par diverses réactions enzymatiques (cyclisation, oxydation, etc....) aboutir à un très grand nombre de produits naturels [15].

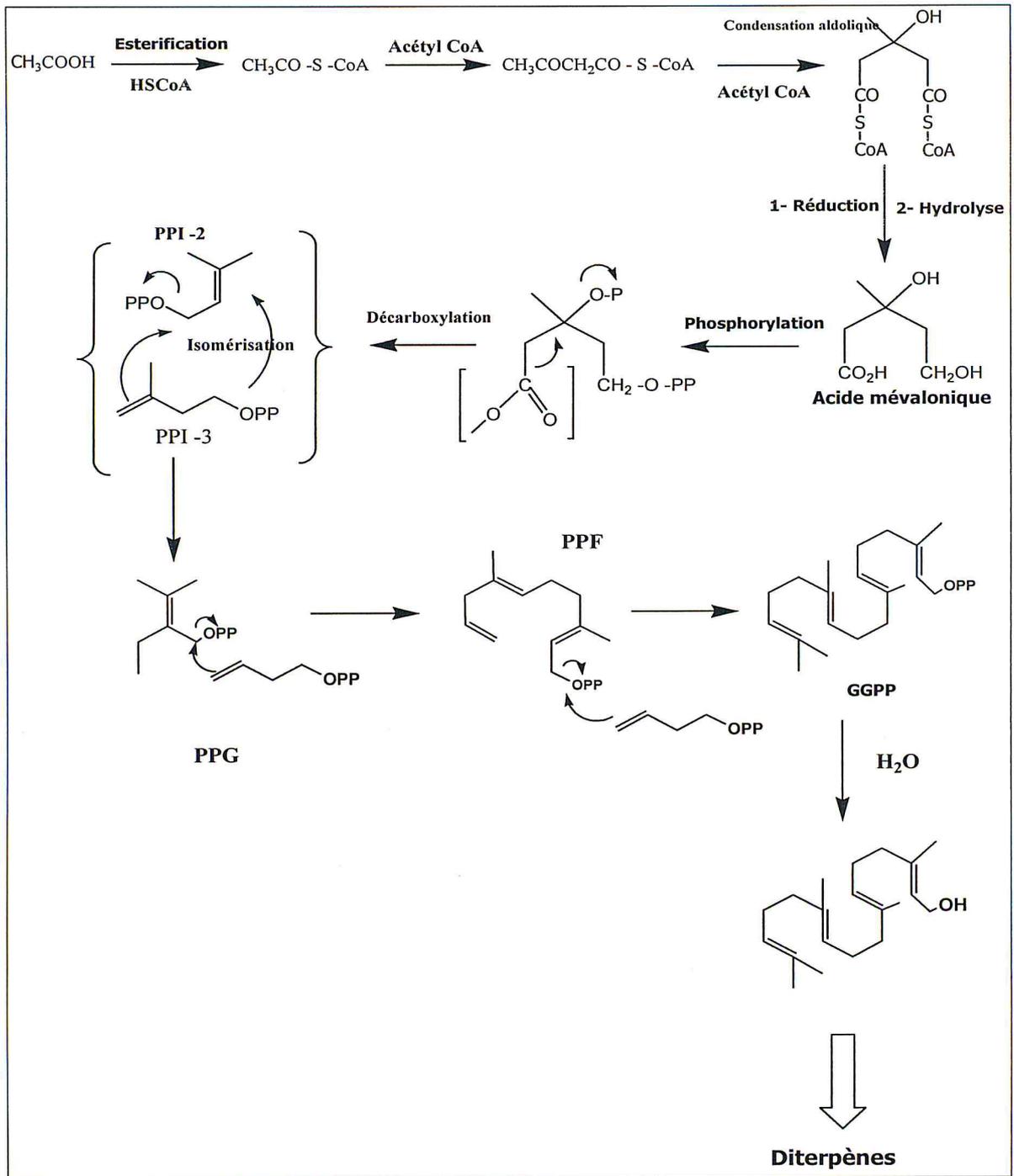


Figure 3: Biosynthèse des diterpènes.

1.6. Les méroditerpènes

1.6.1. Définition

Les diterpènes à biogenèse mixte, dits « méroditerpènes » comprennent un noyau hydroquinonique plus ou moins substitué fixé à un enchainement terpénique. La voie de biosynthèse de la partie hydroquinonique dérive du métabolisme de l'acide shikimique (figure 4)

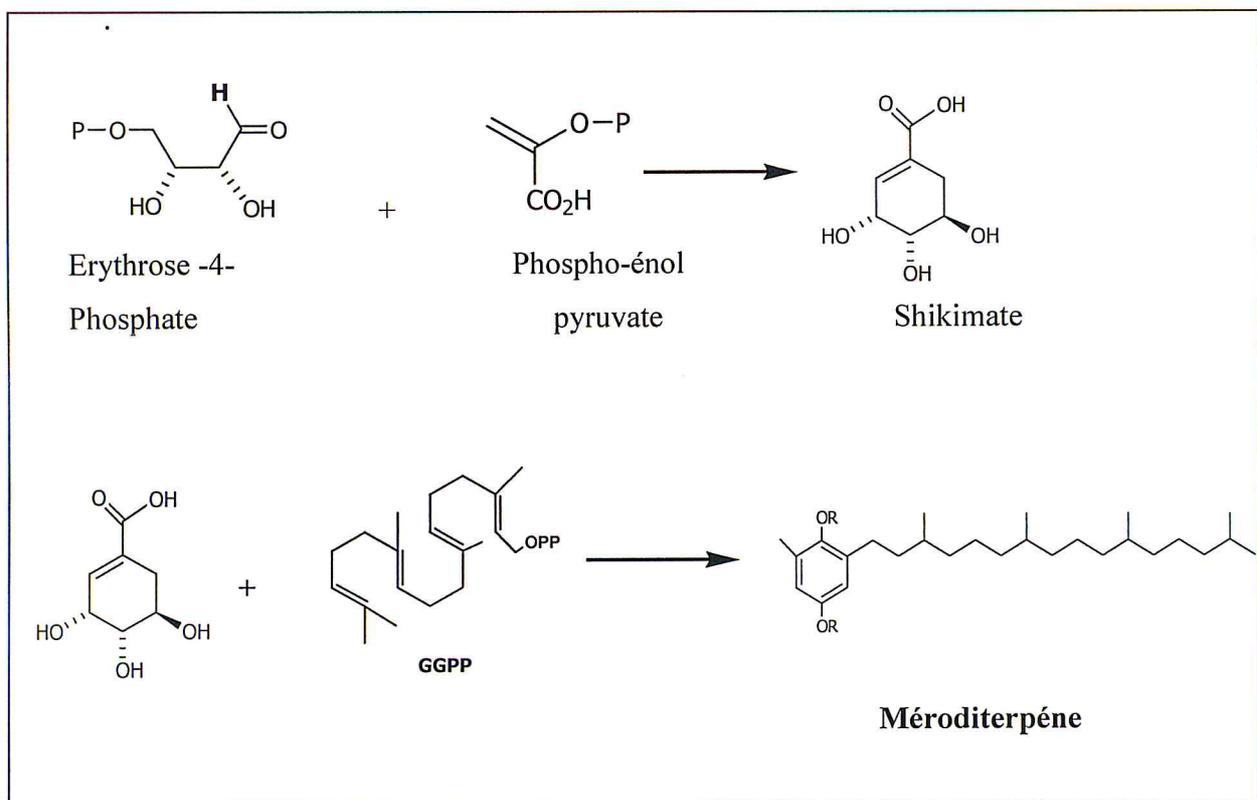


Figure 4 : Biosynthèse des méroditerpènes.

Il a été proposé pour les mérodiaterpènes, une division en quatre groupes :

- Les linéaires
- Les monocyclisés
- Les bicyclisés (en 7-11 et 6-12) ou (en 7-11 et 5-13)
- Les réarrangés

Cette division ne tient compte que des cyclisations touchant les atomes de carbone [15], les ponts oxygène ne sont pas considérés contrairement à l'option choisie par Piattelli [19], ceci permet de réduire le nombre des groupes. Les fonctions éthers sont prises en compte dans l'étude de la fonctionnalisation des molécules [18].

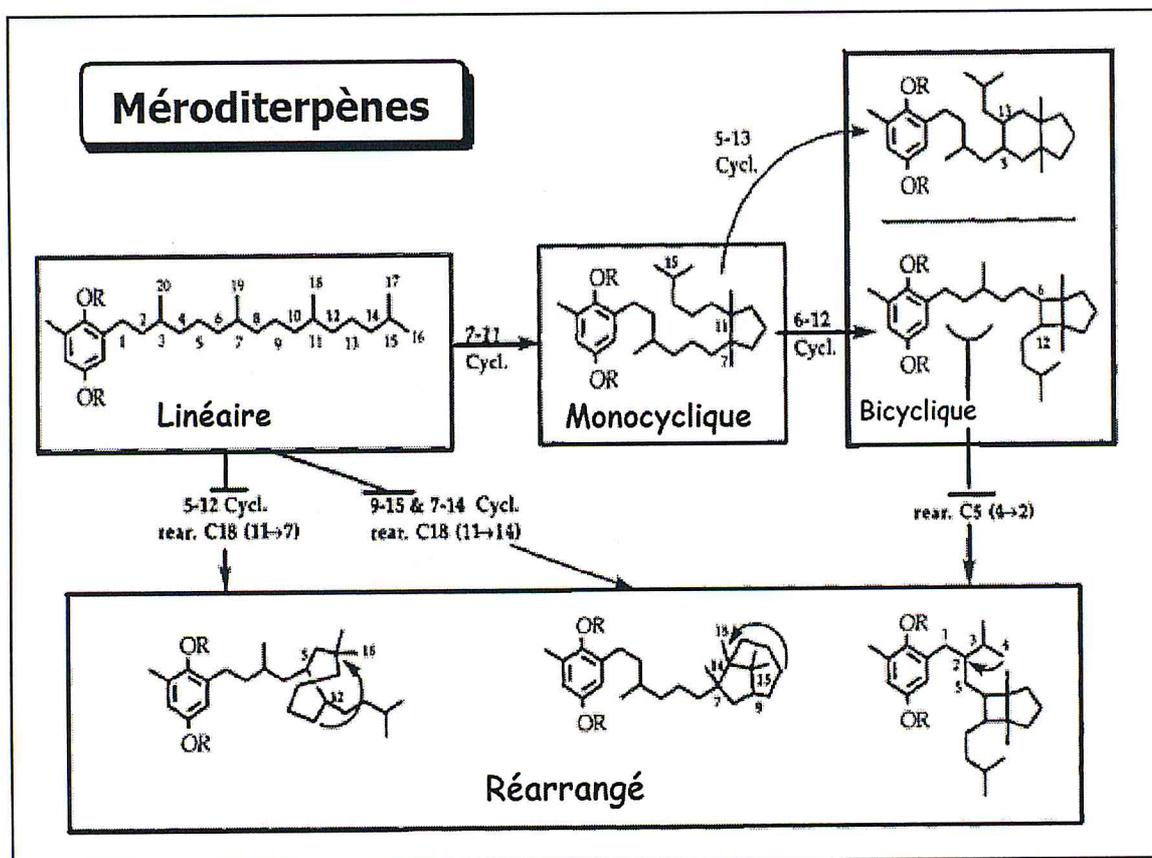


Figure 5 : Présentation des différents groupes de mérodiaterpènes

1.7. Métabolites secondaires isolés de *Cystoseira elegans*

Des travaux antérieurs effectués sur *Cystoseira elegans* ont permis d'isoler notamment des diterpène linéaires [20 ,21] (figure6), méroditerpènes linéaires [22,23, 24,25] (figure 8)et méroditerpène monocyclisés [26] (figure 7).

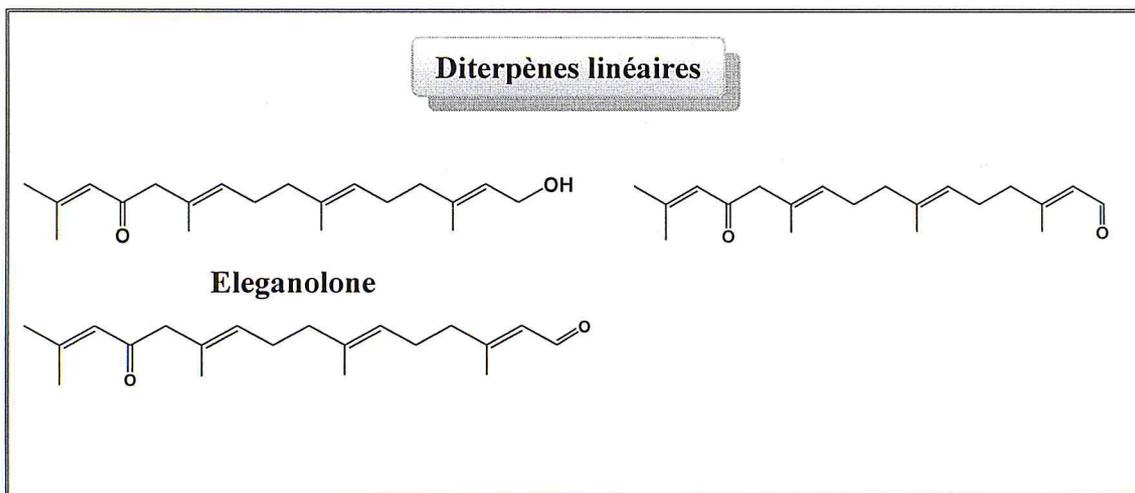


Figure 6 : Diterpènes linéaires isolés de *Cystoseira elegans*

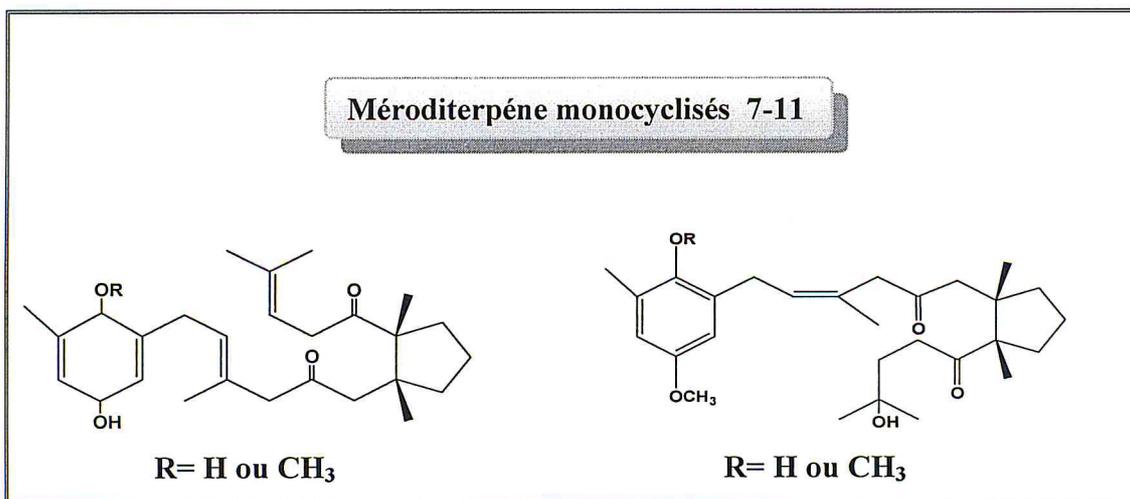


Figure 7 : Méroditerpènes monocyclisés isolés de *Cystoseira elegans*

Méroditerpènes linéaires

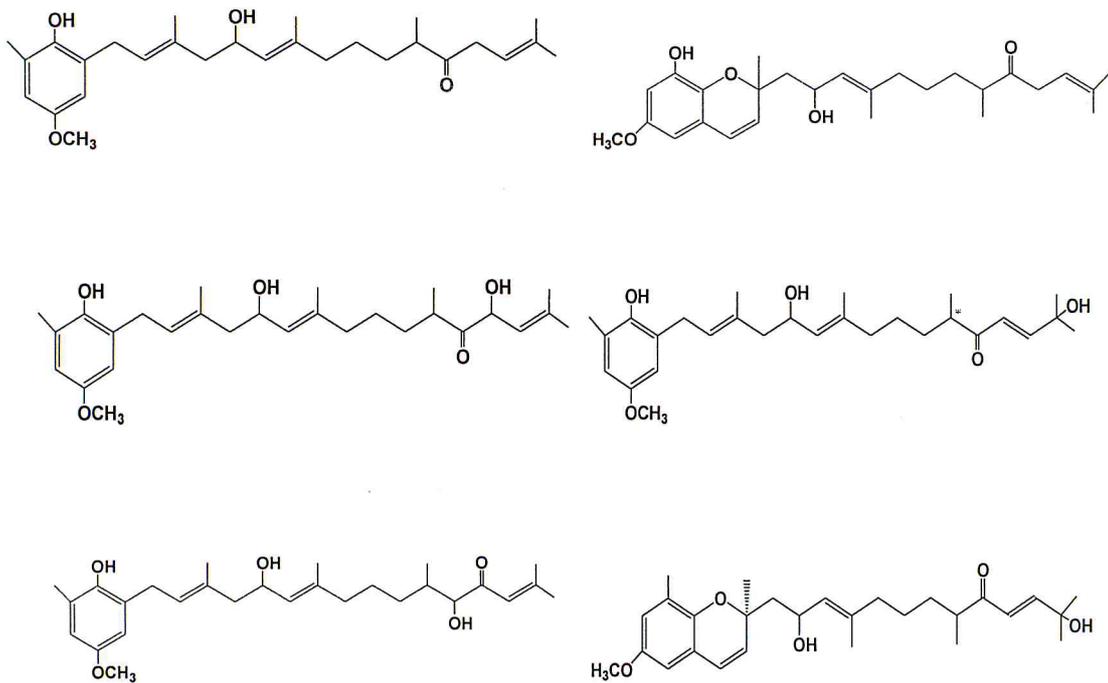
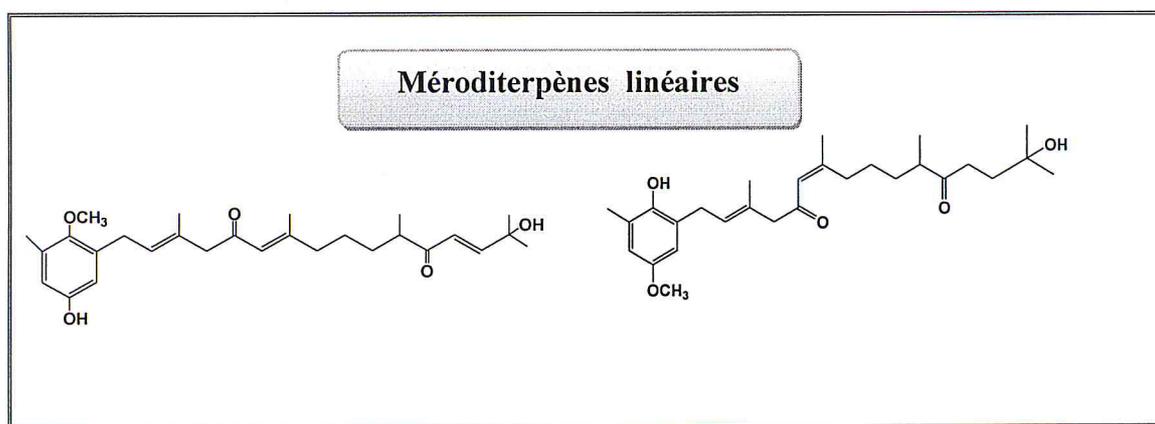


Figure 8 : Méroditerpènes linéaires isolés de *Cystoseira elegans*

1.8. Métabolites secondaires isolés de *Cystoseira tamariscifolia*

Les études chimiques effectuées sur *Cystoseira tamariscifolia* ont permis l'isolement des méroditerpènes linéaires [27] (figure 9), monocycliques [27,28] (figure 10), bicycliques [27] (figure 11) et des méroditerpènes réarrangés [27,29,30,31,,32] (figure 11).



Figures 9 : Méroditerpènes linéaires isolés de *Cystoseira tamariscifolia*

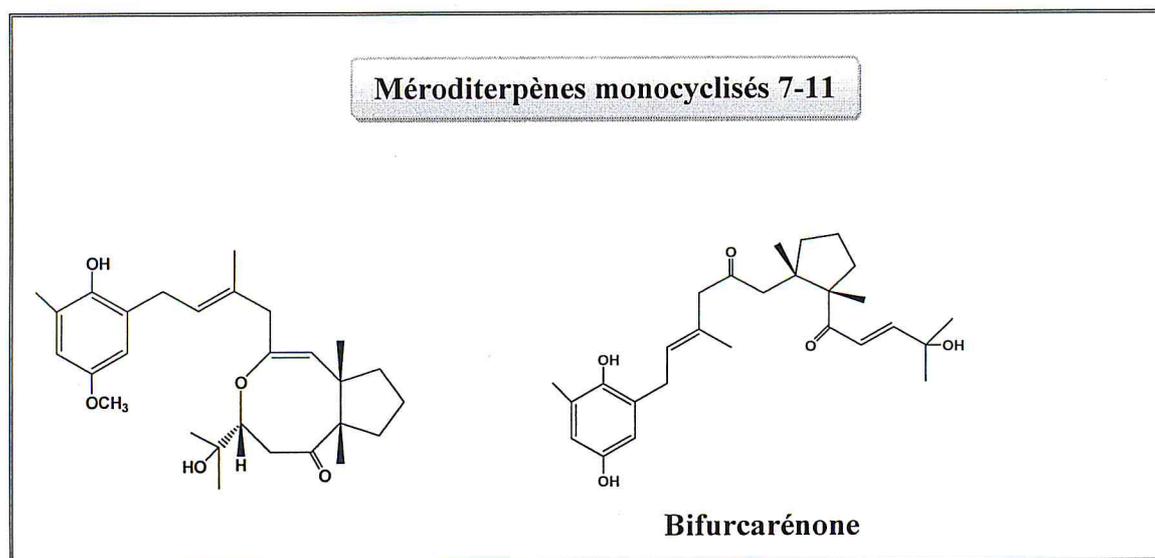


Figure 10 : Méroditerpènes monocyclisés isolés de *Cystoseira tamariscifolia*

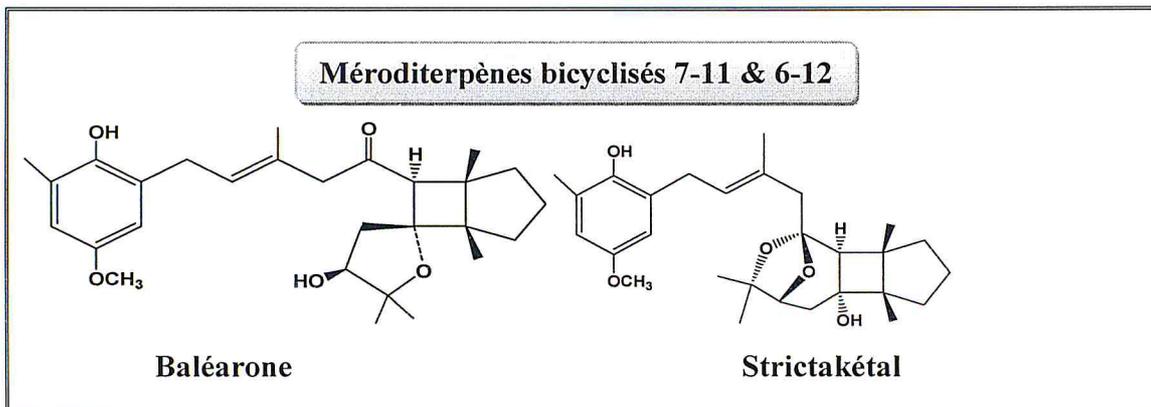


Figure 11 : Méroditerpènes bicyclisés isolés de *Cystoseira tamariscifolia*

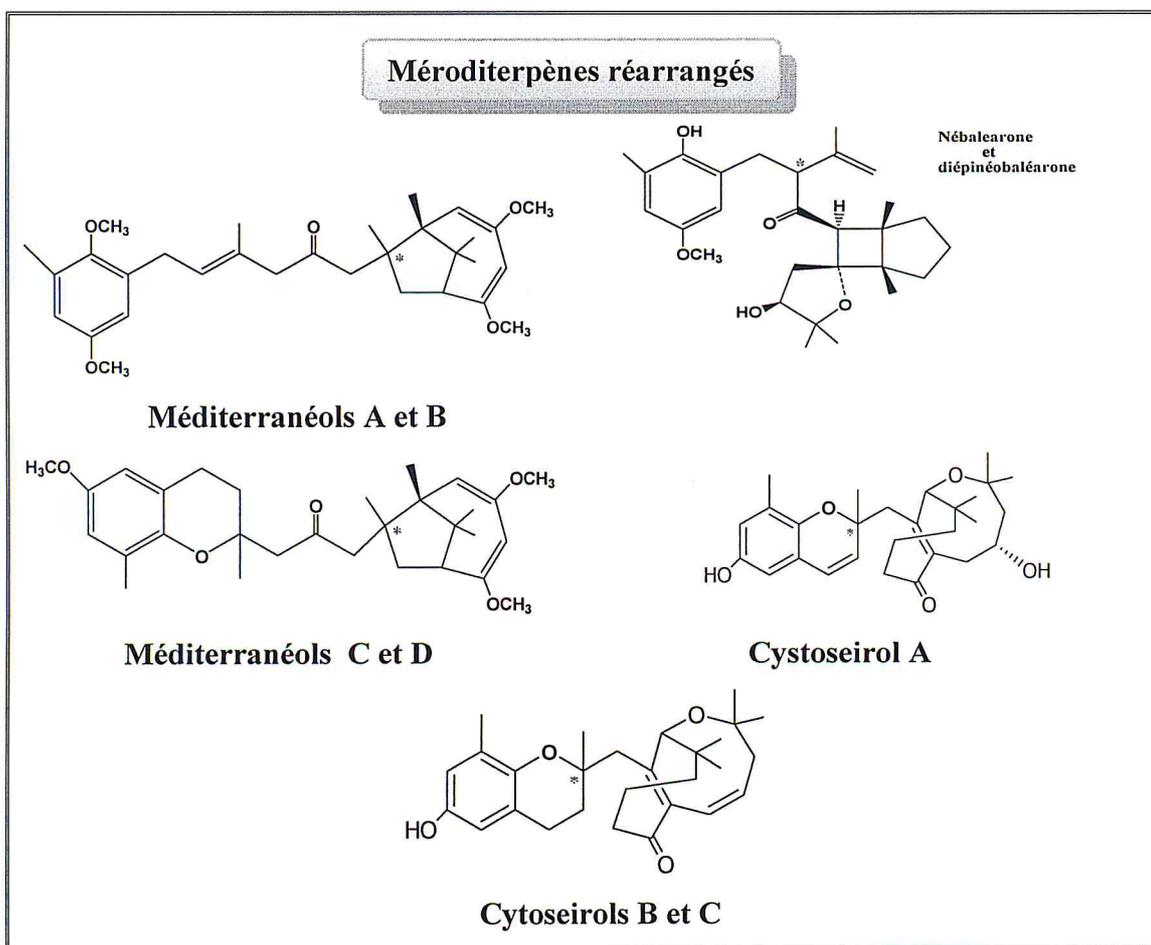


Figure 12 : Méroditerpènes réarrangés isolés de *Cystoseira tamariscifolia*

Les structures de diterpènes et de méroditerpènes isolés de certaines algues brunes ont eu un apport considérable dans la chimiotaxonomie. Nous allons tenter d'expliquer la problématique et les conséquences de cette science.

1.9. Notions générales de chimiotaxonomie

La chimiotaxonomie est une science de la classification qui consiste à classer les espèces d'une famille donnée en fonction de critères chimiques spécifiques. Chez les végétaux, il existe deux types extrêmes de constituants chimiques qui sont les composés peu spécifiques et les composés très spécifiques :

- Les composés peu spécifiques ont une structure chimique simple. Le plus souvent, ils sont le fruit de métabolismes fondamentaux et du point de vue chimio taxonomique ces substances sont peu intéressantes car elles sont présentes dans la plupart des espèces.

- Les composés peu spécifiques ont une structure chimique simple. Le plus souvent ils sont le fruit de métabolismes fondamentaux et du point de vue chimio taxonomique ces substances sont peu intéressantes car elles sont présentes dans la plupart des espèces.

- Les composés très spécifiques ont, au contraire, une structure chimique complexe. Ce sont essentiellement des métabolites secondaires que l'on rencontre que chez quelques familles, genres ou espèces botaniques. La chimiotaxonomie est basée essentiellement sur l'étude de ces composés.

L'étude chimique est une discipline relativement nouvelle car elle exige des techniques élaborées qui ont été développées récemment, il s'agit de techniques de séparation par chromatographie (CPG, HPLC) associées aux techniques de spectroscopie moléculaire, notamment, la RMN mono et bidimensionnelle [17].

1.10. Chimiotaxonomie des espèces du genre *Cystoseira*

Des travaux récents ont montré que les métabolites secondaires isolés d'algues brunes de la famille des *Cystoseiracées* peuvent être utilisés comme marqueurs taxonomiques [19, 18,33], certains diterpènes et méroditerpènes, en particulier, sont caractéristiques du genre *Cystoseira*. Une bibliographie complète sur la chimiotaxonomie des algues brunes de la famille des *Cystoseiracées* a été établie par R. Valls, L. Piovetti[18] et V. Amico[34], on peut également se reporter aux thèses de A. Praud[35] et R. Valls[15] pour des compléments d'information sur le genre *Cystoseira*.

La classification de Piatelli (tableau 1) définit des groupes à partir des structures des molécules extraites et propose une comparaison avec les groupes définis par Giaccone [36], (qui les a classé selon la morphologie). Cette classification ne tient compte que de la nature des composés extraits quelle que soit la quantité présente dans l'algue.

Tableau 1 : Groupes structuraux de *Cystoseira* Méditerranéennes proposés par Piatelli [19] à partir des molécules isolées

Groupe I	Métabolites secondaires non lipidiques
Groupe II	Diterpènes linéaires
Groupe III	Méroditerpènes linéaires
Groupe IV	Méroditerpènes avec Chaîne latérale avec furanes et tétrahydrofuranes
Groupe V	Méroditerpènes avec Chaîne latérale avec cycle cyclopentanique
Groupe VI	Méroditerpènes avec Chaîne latérale de type bicyclo[4.3.0]nonane
Groupe VII	Méroditerpènes avec Chaîne latérale de type bicyclo[3.2.0]heptane

Pour sa part Amico [34], il a modifié cette classification en regroupant les deux groupes V et VI en un seul qu'il a divisé en deux sous-groupes (tableau 2) :

V_a : Méroditerpènes cycliques avec des cyclopentanes

V_b : Méroditerpènes cyclique avec des bicyclo[4,3,0]nonanes

Le groupe VII est consacré aux méroditerpènes transposés

Tableau 2 : Groupe structural de *Cystoseires* Méditerranéennes proposé par Amico 1995 [34] à partir des molécules isolées

Groupe	Description	Espèces appartenant à ce groupe
Groupe I	Pas de métabolite secondaire lipophile	<i>C.compressa</i> , <i>C.humilis</i> , <i>C.barbata</i> , <i>C.susanensis</i>
Groupe II	Présences de diterpènes linéaire	<i>C.brachycarpa</i>
Groupe III	Présence de méroditerpènes linéaires	<i>C.dubia</i> <i>C.hyblaea</i> , <i>C.barbatul</i> , <i>C.crinita</i> , <i>C.sauvageauana</i> , <i>C.shiffineri</i>
Groupe IV	Méroditerpènes linéaires avec des furanes et /ou des tétrahydrofuranes et des pyranes	<i>C.squarrosa</i> , <i>C.zoteroides</i> , <i>C.usneoides</i>
Groupe V _a	Méroditerpènes cycliques avec des cyclopentanes	<i>C.jabukae</i> , <i>C.elegans</i>
Groupe V _b	Méroditerpènes cyclique avec des bicyclo[4,3,0]nonanes	<i>C.algeriensis</i> , <i>C.spinosa</i> , <i>C.baccata</i>
Groupe VI	Méroditerpènes cycliques avec des bicyclo[3,2,0]heptanes	<i>C.amentacea</i>
Groupe VII	Présences de méroditrpènes transposés	<i>C.tamariscifolia</i> <i>C.mediterranea</i>

Rappelons que la répartition d'Amico ne concerne que les *Cystoseira* de Méditerranée [37].

Conclusion

L'intérêt de la classification d'Amico est de classer les espèces du genre *Cystoseira* en fonction de leurs structures chimiques. Cette classification chimiotaxonomique contribue à l'établissement d'une relation entre la nature chimique du diterpène et/ou meroditerpène et les espèces du genre *Cystoseira* Méditerranéenne.

Cependant, cette classification présente des limites vis-à-vis des espèces contenant des métabolites variés appartenant aux différents groupes. L'espèce *cystoseira tamariscifolia* contient spécifiquement des méroditerpènes transposés, mais également, des diterpènes linéaires [27] monocycliques [27] et bicycliques [27].

On conclut donc que les critères phytochimiques (basées uniquement sur la nature des métabolites isolés) des espèces sont difficiles pour établir une étude chimiotaxonomique fiable du genre *Cystoseira*. Elle devrait inclure, en plus de la détermination des structures chimiques caractéristiques, la quantification précise de leur composition dans l'algue, les variations saisonnières et géographiques de composition chimique, ainsi que les processus biosynthétiques qui conduisent à la formation de ces substances dans l'algue [18].

Chapitre 2

2.1. Récolte, traitement et conservation

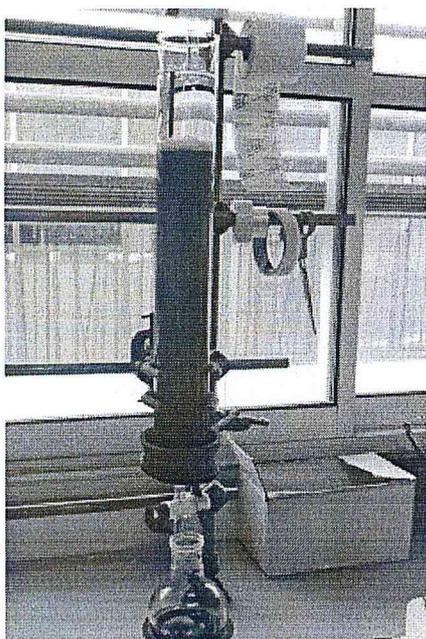
L'algue a été récoltée en juin 2006 au niveau du lieu dit " les caroubiers" à l'ouest de la ville de TIPAZA (36°37'12" N, 2°39'00" E) en Algérie. L'algue est ensuite triée manuellement pour éliminer toutes sortes d'épiphytes (organismes minuscules de nature animale ou végétale), elle est ensuite séchée à l'ombre et dans un endroit sec et aéré.

2.2. Extraction

L'extraction est effectuée par le mélange de solvant (MeOH/CHCl₃ 1/1 : v/v) dans un système statique (batch extraction). Une masse de 612.27 g d'algue a permis d'obtenir 3.04 g d'extrait brut soit un rendement de 0.5 %. Des extractions successives permettent d'épuiser la matière végétale et d'augmenter le rendement de l'extraction.

2.3. Fractionnement et purification

2.3.1 Fractionnement sur colonne ouverte de silice



Une colonne en verre (hauteur = 60 cm, diamètre = 5cm) remplie avec de la silice Si60 (40-63 μ m), de type Merck a été utilisée pour le fractionnement de l'extrait brut. Une masse de 6 g (obtenu suite a plusieurs extraction) est soumise à un fractionnement en utilisant un gradient de solvants de polarité croissante (TMP/AcOEt (90/10 ; v/v) à 100% AcOEt suivi du MeOH pur (100%)

Figure13 : Fractionnement sur colonne ouverte de silice.

Les résultats obtenus sont regroupés sous forme de la masse des fractions collectés en fonction de la nature de l'éluant sont donnés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Données du fractionnement sur colonne ouverte.

N° fractions.	Masse finale – masse initiale	Masse (mg)	Eluant TMP / AcOEt
1	6441.3 – 6425	16.3	90/10
2	6401.68 – 6394.8	6.88	80/20
3	6265.20 – 6231.6	33.6	70/30
4	6330.07 – 6271.3	58.77	70/30
5	6459.18 – 6334.0	125.18	70/30
6	6470.80 – 6412.20	58.8	70/30
7	6496.98 – 6393.9	103.08	60/40
8	8504.7 – 6391.6	113.1	60/40
9	6453.45 – 6263.6	189.85	60/40
10	6539.49 – 6335.04	204.45	60/40, 50/50
11	6556.63 – 6272.41	284.22	50/50
12	6444.94 – 6327.43	117.51	50/50
13	6403.08 – 6201.75	201.33	40/60
14	6305.30 – 6232.67	72.63	40/60
15	6423.36 – 6352.96	70.4	40/60
16	6309.35 – 6278.36	30.99	40/60
17	6556.90 – 6444.8	112.1	40/60
18	6353.24 – 6245.90	107.34	40/60
19	6381.43 – 6301.56	79.87	40/60, 30/70
20	6310.20 – 6206.73	103.47	30/70
21	6376.90 – 6335.48	41.42	30/70
22	6512.52 – 6477.39	35.13	30/70
23	6413.53 – 6331.6	81.93	20/80
24	6338.15 – 6278.69	59.46	20/80

25	6325.5 – 6285.50	40	20/80
26	6318.64 – 6270.71	47.93	10/90
27	6337.89 – 6286.37	51.52	10/90
28	6459.86 – 6417.18	42.67	10/90
29	6422.15 – 6363.23	58.92	100% AcOET
30	6353.14 – 6326.63	26.51	100% AcOET
			Eluant
			AcOET/MeOH
31	6482.36 – 6462.81	19.54	95/5
32	6422.1 – 6400.14	21.96	95/5
33	6394.10 – 6366.38	27.72	95/5
34	6470.4 – 6458.7	11.7	95/5
35	6349.88 – 6345.05	4.829	95/5, 90/10
36	6278.15 – 6266.99	11.16	90/10
37	6264.55 – 6247.54	17.01	90/10
38	6438.4 – 6411.5	26.9	80/20
39	6332.7 – 6318.36	14.34	80/20
40	6522.90 – 6423.0	99.9	50/50
41	6882.05 – 6367.40	514.65	50/50
42	6522.62 – 6312.77	209.85	100% MeOH
43	6748.47 – 6377.02	371.45	100% MeOH
44	7263.19 – 6277.14	968.05	100% MeOH
45	6539.6 – 6447.55	92.05	100% MeOH
46	6474.5 – 6431.7	42.8	100% MeOH
47	6294.39 – 6225.88	68.51	100% MeOH
48	6336.30 – 6308.07	28.23	100% MeOH

2.4. Analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince

L'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) a été effectuée par élution ascendante avec le système binaire acétate d'éthyle [AcOEt] / 2, 2,4 – triméthylpentane [TMP], dans le rapport 50 /50 [v /v], en utilisant le cholestérol comme témoin

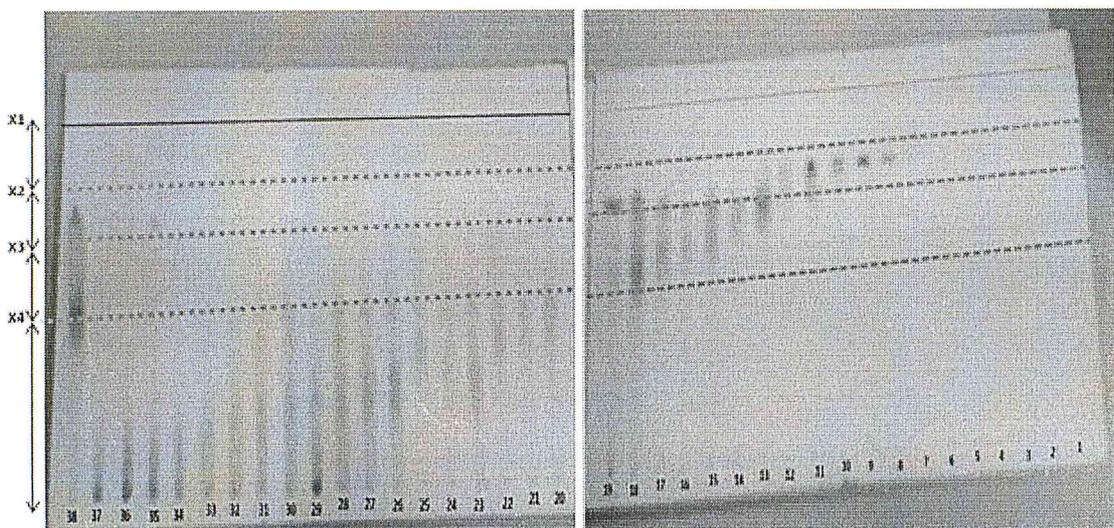


Figure 14 : Chromatographie sur couche mince de l'extrait brut de *Cystoseira elegans*

L'examen de la figure 14, permet de faire les constatations et analyses suivantes :

La 1^{ère} fraction de produits est éluée dans une zone de facteur de rétention variant entre x_1 et x_2 ($0.97 \leq R_f \leq 0.83$), elle correspond aux pigments (carotènes et ses dérivés) et autres produits (quelques fois de natures terpéniques),

La seconde partie de facteur de rétention compris entre $x_2 = 0.83$ et $x_3 = 0.69$, correspond aux stérols et acides gras (R_f du cholestérol = 0.72)

La troisième partie ayant un facteur de rétention compris entre $x_3 = 0.69$ et $x_4 = 0.46$, représente généralement la partie la plus intéressante correspondant souvent aux produits d'origine terpénique (diterpènes, méroditerpènes....).

La quatrième partie correspond à des valeurs de $R_f < x_4 = 0.46$ regroupe des produits polaires souvent difficiles à séparer.

2.5. Analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

L'analyse a été effectuée sur une chaîne CLHP de type Varian, composé d'un dégazeur, d'une monopompe (modèle Prostar 210) et d'un détecteur réfractométrique (modèle 350 RI Detector).

Une colonne semi-préparative (Merck Purospher STAR RP18e; $5\ \mu\text{m}$; Φ : 10mm, $l = 250$ mm) à un débit de $3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a été utilisée pour la majorité des purifications.

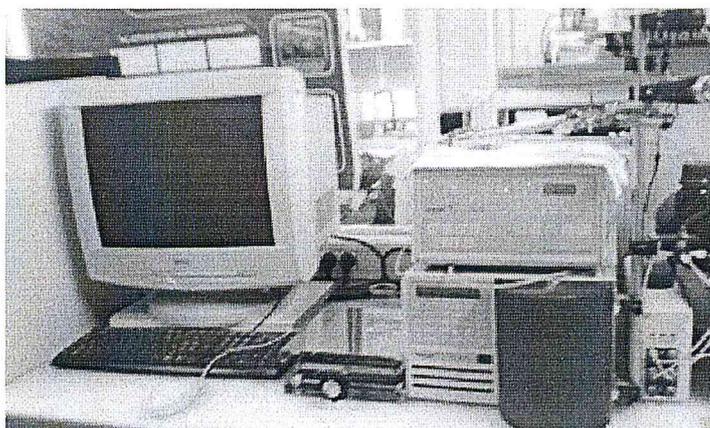


Figure 15 : Chaîne CLHP utilisée dans l'analyse

Nous avons choisi les fractions 8 et 9 pour l'analyse par CLHP en se basant sur l'analyse préliminaire par CCM. Ce choix est motivé par la valeur des facteurs de rétention des deux fractions qui habituellement correspond à l'élution des méroditerpènes.

2.6. Analyse de la fraction 8 par CLHP

La fraction 8, éluee avec un mélange d'éluant TMP/AcOEt (60/40 : v/v), a été analysée par CLHP à polarité de phase inversée l'aide du mélange d'éluant MeCN/H₂O (95/5 ; v/v). Le profil chromatographique obtenu est donné par la (figure 16)

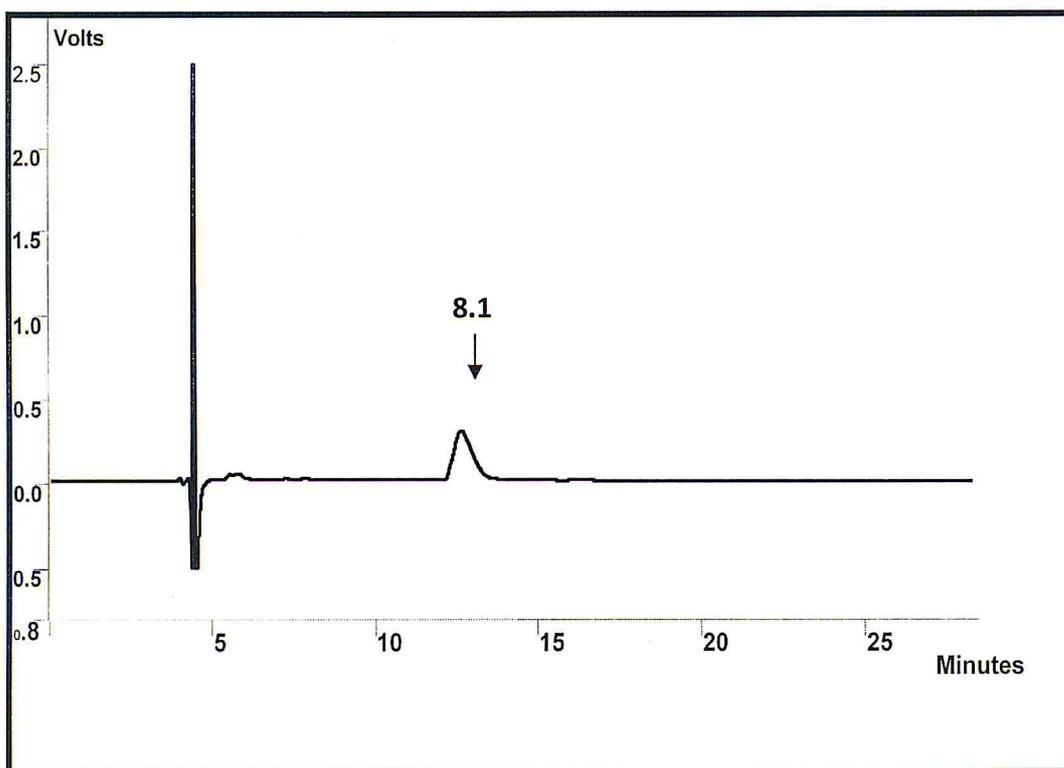


Figure 16 : Profil chromatographique de la fraction 8

L'examen de la figure 16 fait apparaître un seul pic (8.1) ce qui suggère qu'il s'agit d'un produit pur, afin de confirmer la pureté de notre composé, nous avons procédé à l'analyse par RMN du proton.

2.7. Analyse par RMN ^1H du produit 8.1

L'ensemble des expériences par RMN ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 400 MHz en utilisant le CDCl_3 comme solvant. Les spectres RMN ont été calibrés en utilisant les pics résiduels du solvant, soit δH 7,26 ppm en RMN ^1H et δC 77,0 ppm en RMN ^{13}C .

L'examen du spectre RMN du proton du produit 8.1 (figure 17) nous a permis de déduire qu'il s'agit d'un mélange d'au moins deux épimères.

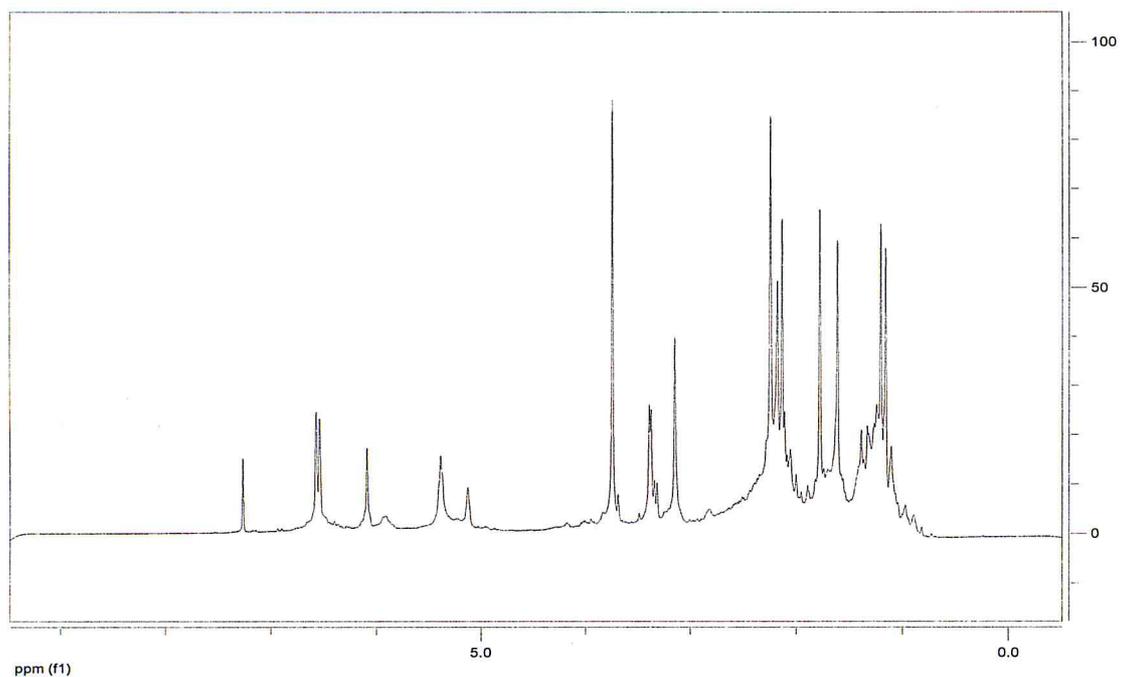


Figure 19: Spectre RMN ^1H du méroditerpène [38]

Dans le spectre RMN du proton du méroditerpène (figure 19), nous constatons que les protons aromatiques $\text{H}_{3'}$ et $\text{H}_{5'}$ apparaissent sous forme de singulets larges (figure 20) à $\delta = 6,53$ et $6,56$ ppm. Le méthoxy porté par le carbone aromatique C_4' apparait également sous forme d'un singulet ($\delta = 3,73$ ppm) car il ne présente aucun couplage (figure 21).

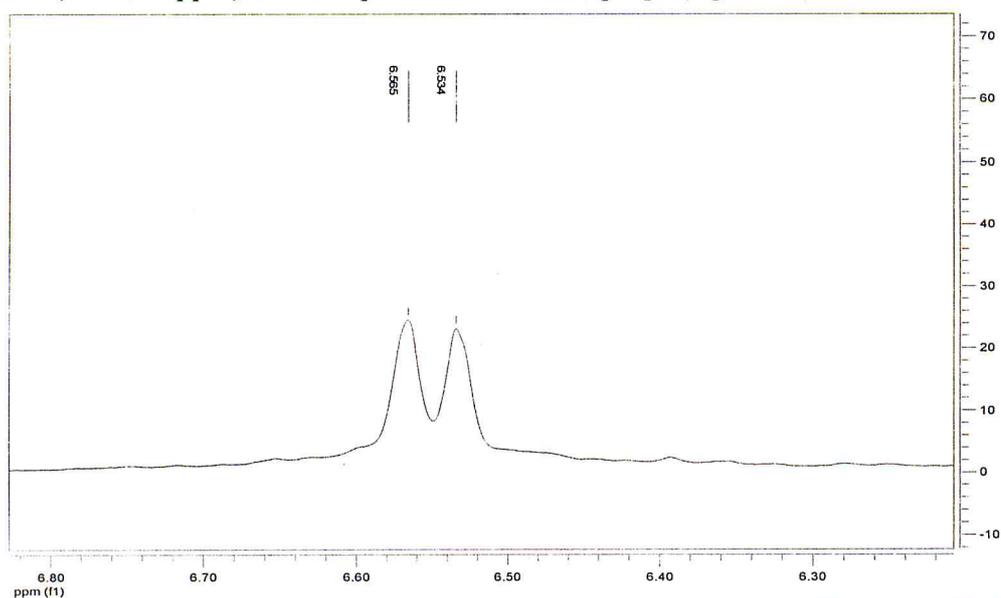


Figure 20 : Signaux des Protons aromatiques du méroditerpène [38]

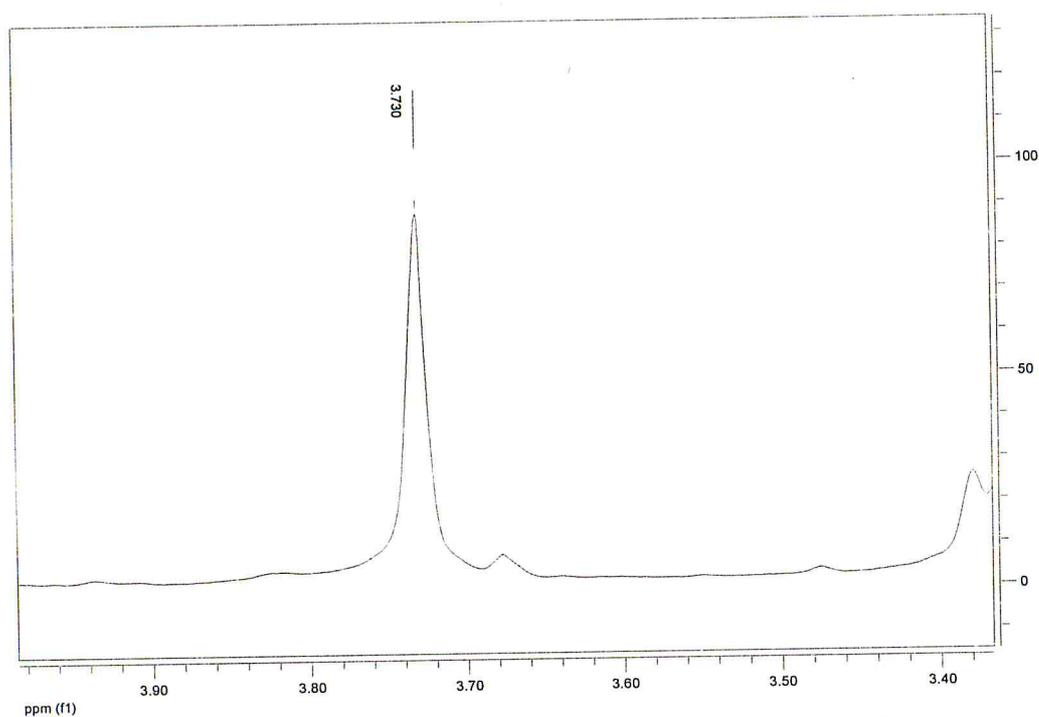


Figure 21 : Signal du méthoxy du méroditerpène [38]

Enfin, les protons des méthyles C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} et C_{20} apparaissent sous forme de singulets (figure 22) à des déplacements chimiques caractéristiques des protons portés par les méthyles, avec des valeurs de déplacements chimiques égales à : H_{16} à 1,19 ppm, H_{17} à 1,14 ppm, H_{18} à 1,60 ppm, H_{19} à 2,21 ppm et H_{20} à 1,76 ppm.

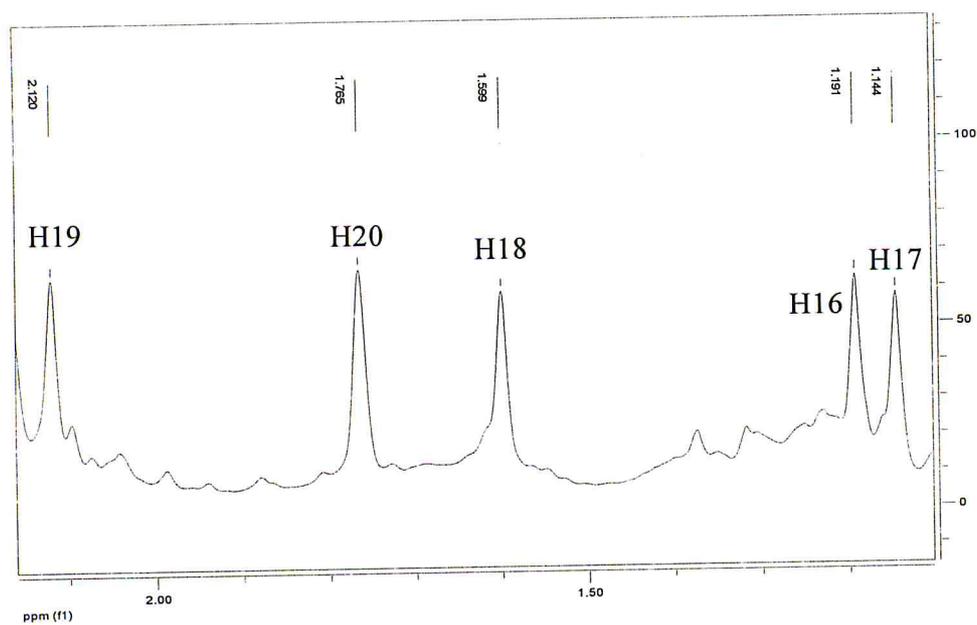


Figure 22 : Signaux des Protons méthyles du méroditerpène [38]

Nous avons comparé ces données par rapports à celles obtenues pour le produit 8.1 et nous avons relevé les remarques suivantes :

Les protons aromatiques H₃' et H₅' apparaissent (figure 23) à des déplacements chimiques similaires (H₃' à 6,5- ppm et H₅' à 6,58 ppm) à ceux du méroditerpène (figure 18) ci-dessus décrit. Néanmoins, leur allure présente un dédoublement de signaux ce qui est certainement en faveur de la présence d'au moins deux épimères.

Egalement, nous avons constaté l'apparition de deux signaux correspondant aux déplacements chimiques des méthoxy à $\delta = 3,6$ et à $3,8$ ppm, ce qui suggère qu'il y a au moins deux produits (figure 24). Nous remarquons également que les signaux des deux méthoxy sont dédoublés, ceci laisse prévoir la présence de plus de deux produits (?).

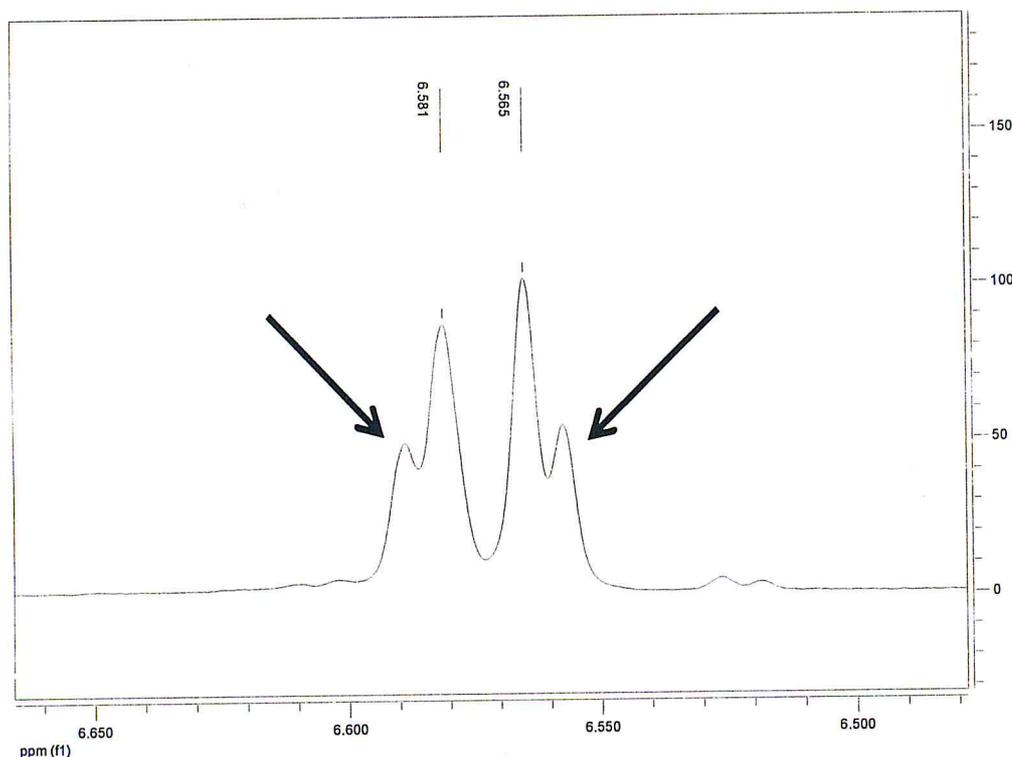


Figure 23: Dédoublé des signaux des protons aromatiques du composé 8.1

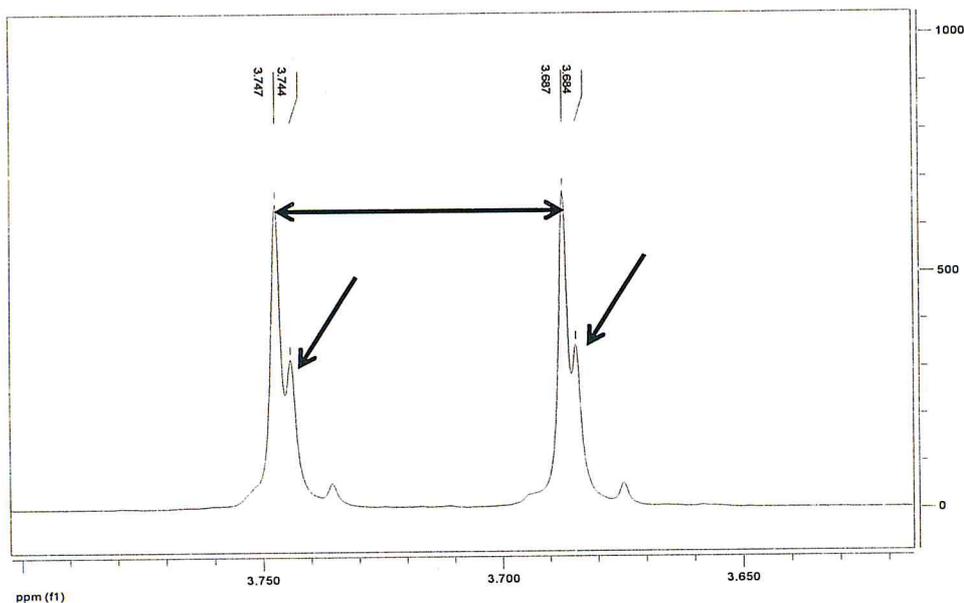


Figure 24 : Dédoublment des signaux du méthoxy du composé 8.1

Enfin, l'agrandissement de la zone du spectre RMN ^1H relative aux protons portés par les méthyles (figure 25) montre la présence de cinq signaux correspondants aux cinq méthyles, toute fois, chaque signal est dédoublé ce qui conforte l'hypothèse de la présence d'un mélange d'épimères.

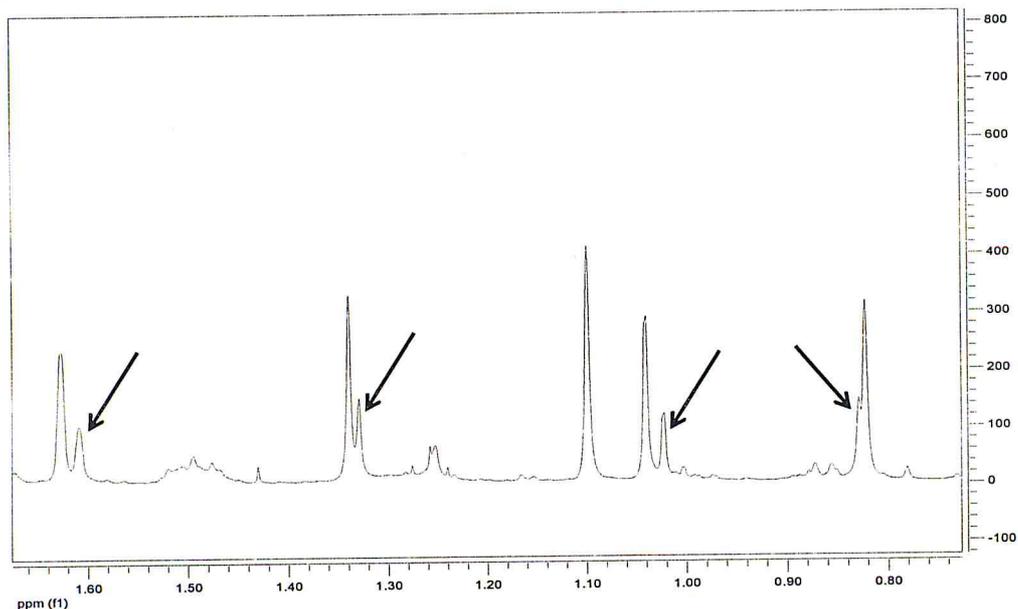


Figure 25 : Dédoublment des signaux des Protons méthyles du composé 8.1

L'ensemble de ces constatations nous ont permis de conclure de manière quasi sûre qu'on est en présence d'au moins deux épimères. L'amélioration des conditions de séparation est obligatoire.

2.8. Analyse de la fraction 9 par CLHP

La fraction 9 a été éluée avec un mélange TMP/AcOEt (60/40 : v/v) et analysée par CLHP à l'aide du mélange MeCN/H₂O (95/5 : v/v). L'analyse par CLHP de la fraction 9 montre le profil chromatographique donné par la figure 26.

Nous constatons l'élution de deux produits 9.1 et 9.2, ce dernier apparaît au même temps de rétention que le produit 8.1.

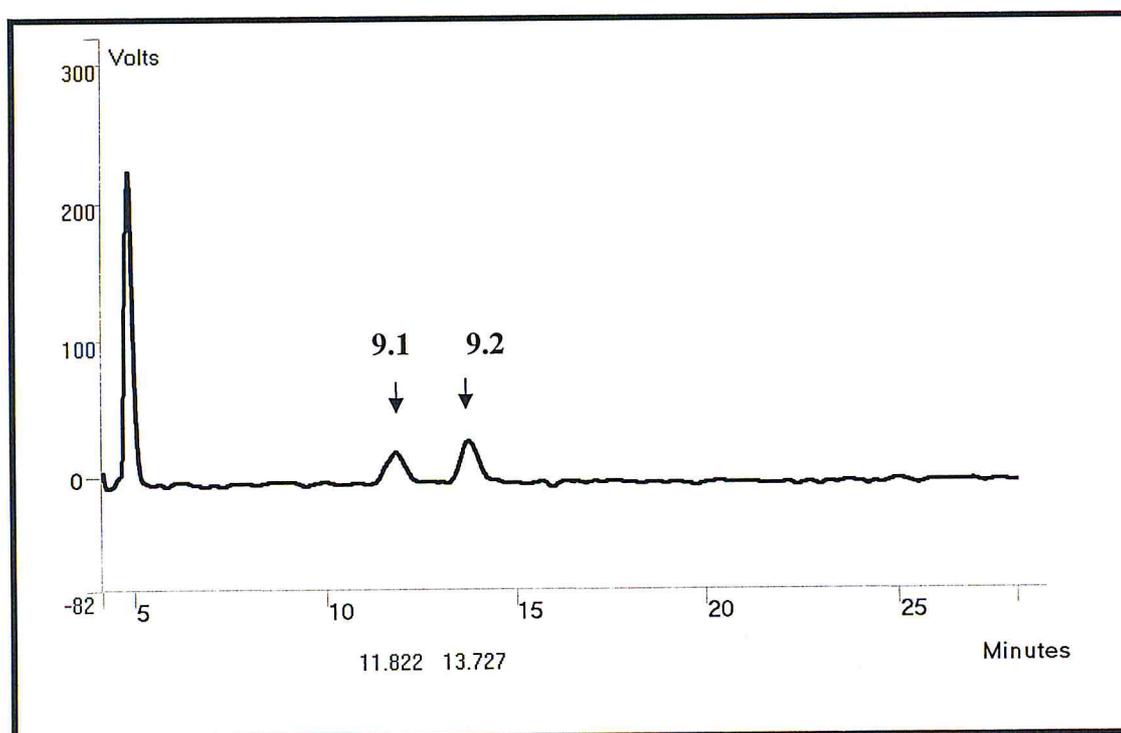


Figure 26 : Profil chromatographique de la fraction 9

2.9. Analyse par RMN du proton des produits 9.1 et 9.2

Le spectre du proton du produit 9.2 est identique à celui du produit 8.1, ce qui confirme que les deux produits sont identiques (élués au même temps de rétention).

Concernant le produit 9.1, il s'agit d'un produit différent. Le spectre du proton est donné par la figure 27. L'examen de cette dernière révèle les mêmes résultats que ceux obtenus pour le produit 8.1, c'est-à-dire qu'il ne s'agit pas d'un produit pur mais également d'un mélange d'épimères. Cette conclusion est faite en se basant sur le phénomène de dédoublement des signaux correspondant aux protons aromatiques, au méthoxy et aux protons des méthyles (figures 28, 29, 30).

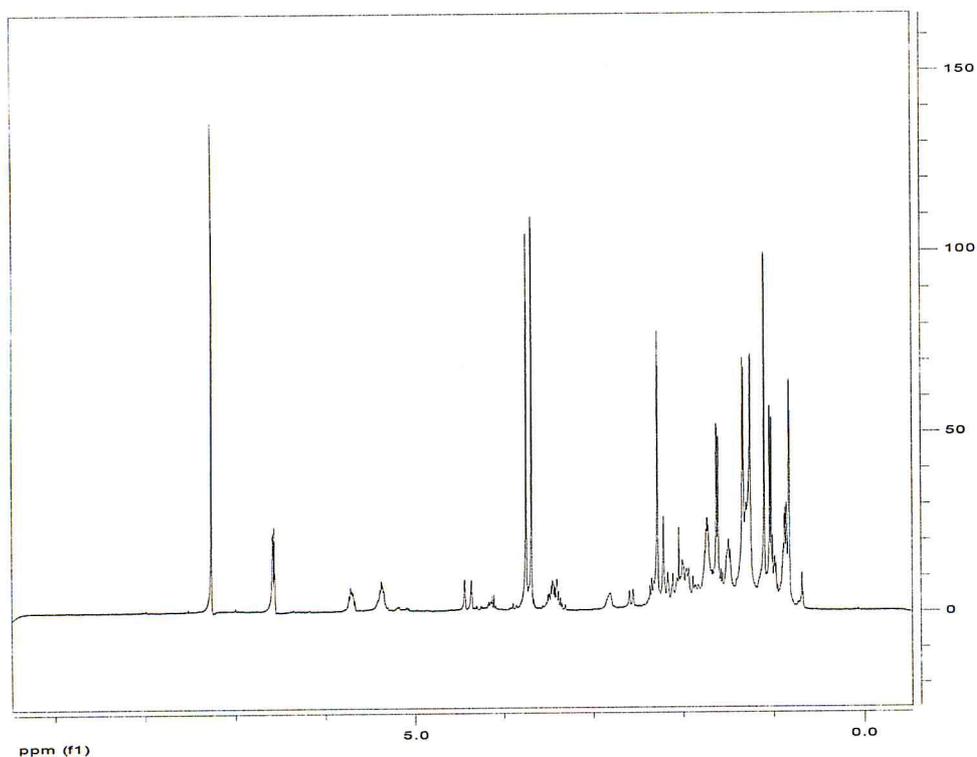


Figure 27 : Spectre RMN ^1H du composé 9.1

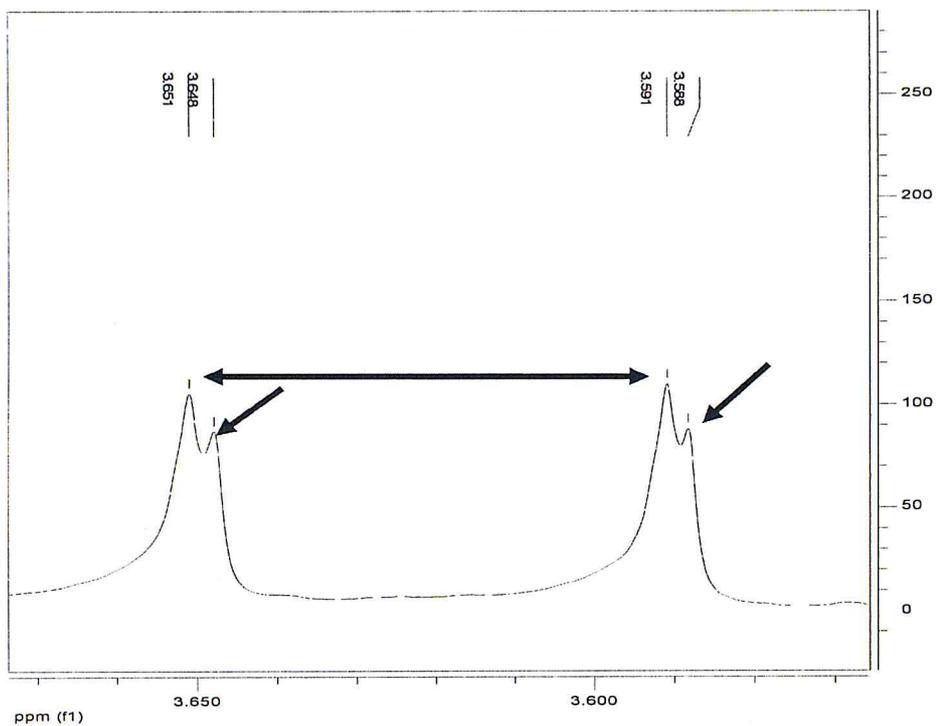


Figure 28 : Dédoublment des signaux du méthoxy du composé 9.1

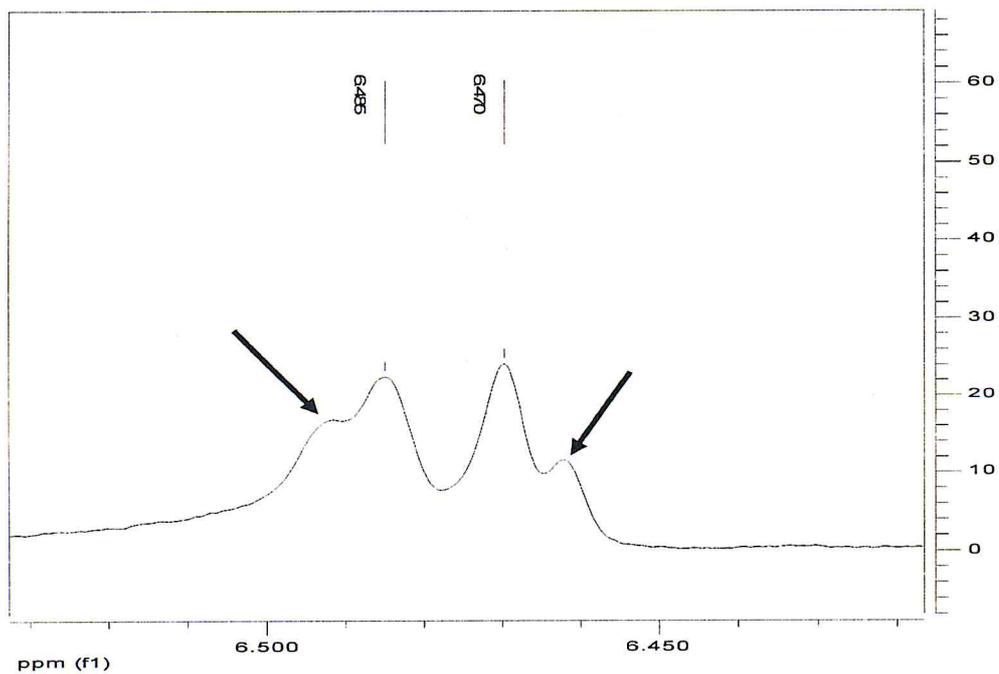


Figure 29 : Dédoublment des signaux des Protons aromatiques du composé 9.1

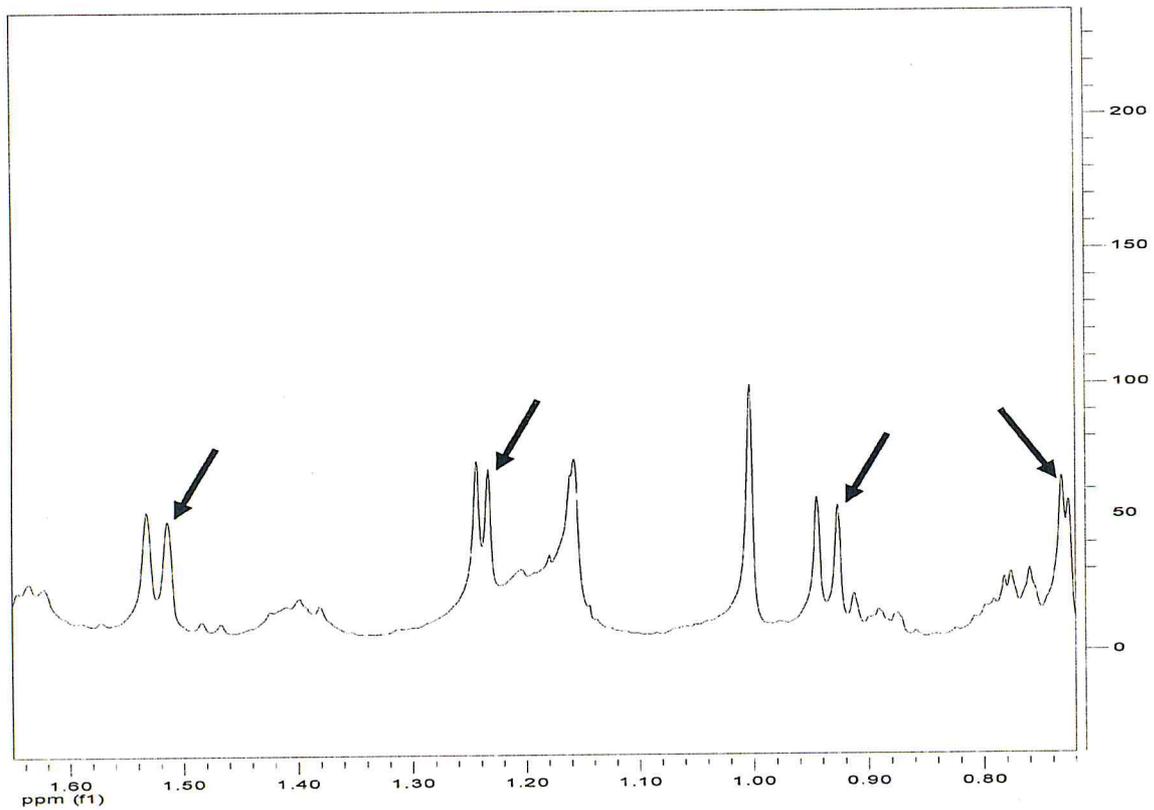


Figure 30 : Dédoublément des signaux des Protons méthyles du composé 9.1

2.10. Conclusion

Cette étude chimique nous a permis de préparer un extrait brut, de le fractionner sur colonne ouverte de silice et de procéder à des analyses préliminaires (CCM, ...). L'analyse par CCM nous a permis d'une part de mettre en évidence les différentes fractions qui composent l'extrait brut, et d'autre part, de choisir les fractions à étudier en priorité, dans ce cadre, nous avons analysé les fractions 8 et 9 par CLHP.

L'analyse par CLHP de la fraction 8 a montré un seul produit dont l'analyse par RMN du proton ^1H a révélé qu'il s'agit d'un mélange d'au moins deux épimères, cette conclusion a été faite en se basant sur le spectre RMN du proton d'un méroditerpène isolé dans *Cystoseira tamariscifolia* [38]. L'analyse par CLHP de la fraction 9 a permis d'isoler deux produits (9.1, 9.2) dont l'un des deux (9.2) est identique au produit 8.1. L'analyse par RMN ^1H du produit 9.1 a révélé qu'il s'agit d'un mélange d'épimères.

Au terme de ces résultats obtenus, nous avons conclu que nous n'avons pas travaillé dans les conditions optimales de séparation. L'amélioration des conditions d'analyses par CLHP (nature de la colonne et de la phase mobile) s'avère nécessaire. Nous comptons poursuivre nos travaux de recherche afin de mener l'étude chimique dans de meilleures conditions.

Chapitre 3

3.1. Récolte et extraction

L'algue a été récoltée en juin 2006 au niveau du lieu dit " les caroubiers" à l'ouest de la ville de TIPAZA. L'algue a ensuite été séchée à l'ombre et dans un endroit sec et aéré puis a été extraite avec un mélange MeOH/CHCl₃ (1/1 ; v/v). Après deux extractions successives on obtient un rendement de $\eta = 5,35\%$.

3.2. Analyse par chromatographie liquide d'une fraction de colonne

L'étude chimique par CLHP a été effectuée sur la fraction 9 issue du fractionnement d'un extrait brut de *cystoseira tamariscifolia* effectué précédemment [38].

Cette fraction 9 a été éluée avec le mélange AcoET / TMP 50 /50, la masse collectée est de 591 mg, elle représente 5.62% la masse de l'extrait brut. Elle a été analysée en CLHP par le mélange éluant acétonitrile/ H₂O 70/30 sur une colonne semi-préparative de type Purospher Merck. Le profil chromatographique obtenu est donné par la figure 31

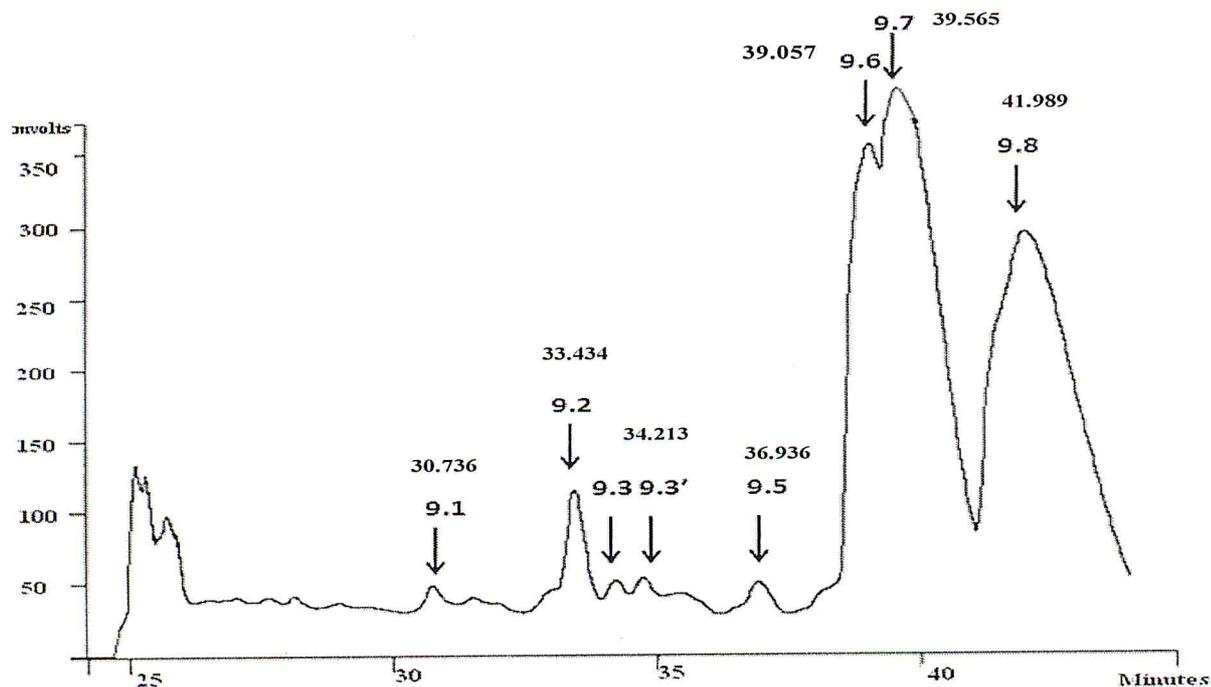


Figure 31 : Profil chromatographique de la fraction 9

Nous avons procédé à l'isolement de 8 produits (9.1 à 9.7). L'analyse du produit 9.1 par RMN du proton a montré qu'il s'agit d'un produit impur.

L'analyse du produit 9.2 par RMN du proton a montré qu'il s'agit d'un produit pur. Ayant obtenu ce résultat, nous nous sommes focalisés sur l'analyse complète du produit 9.2, les 7 autres produits ont été conservés pour une étude ultérieure.

L'élucidation structurale a fait appel aux techniques spectroscopiques classiques telle que la spectrométrie infrarouge (FTIR) et notamment la RMN monodimensionnelle (RMN du proton (^1H), du ^{13}C , et les DEPT (annexe 1) et bidimensionnelle telle que la Cosy H-H, la HMQC (C-H) et la HMBC (C-H longue distance) (voir annexe 1).

3.3 Analyse par RMN du produit 9.2

L'analyse par RMN du proton (^1H) (figure 32), du carbone (^{13}C) (figure 33), des expériences DEPT (DEPT 90, 135) et la séquence bidimensionnelle HMQC nous a permis d'élaborer le tableau 4

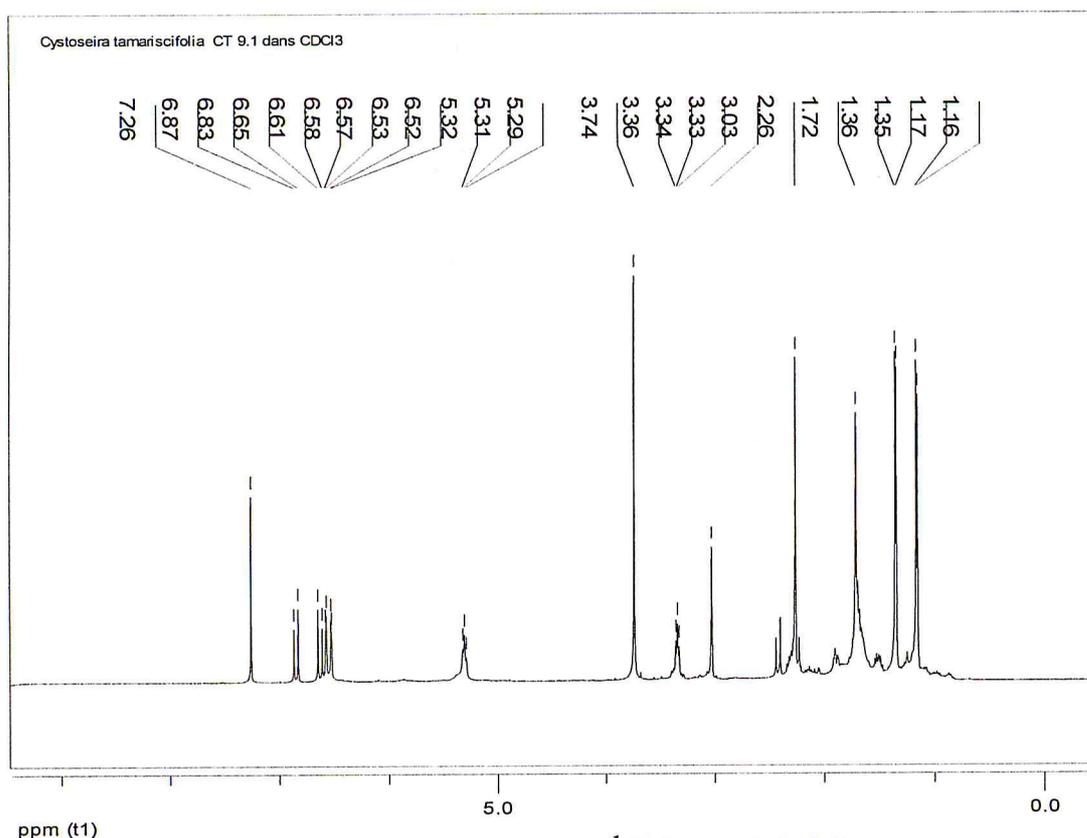


Figure 32 : Spectre RMN ^1H du produit 9.2

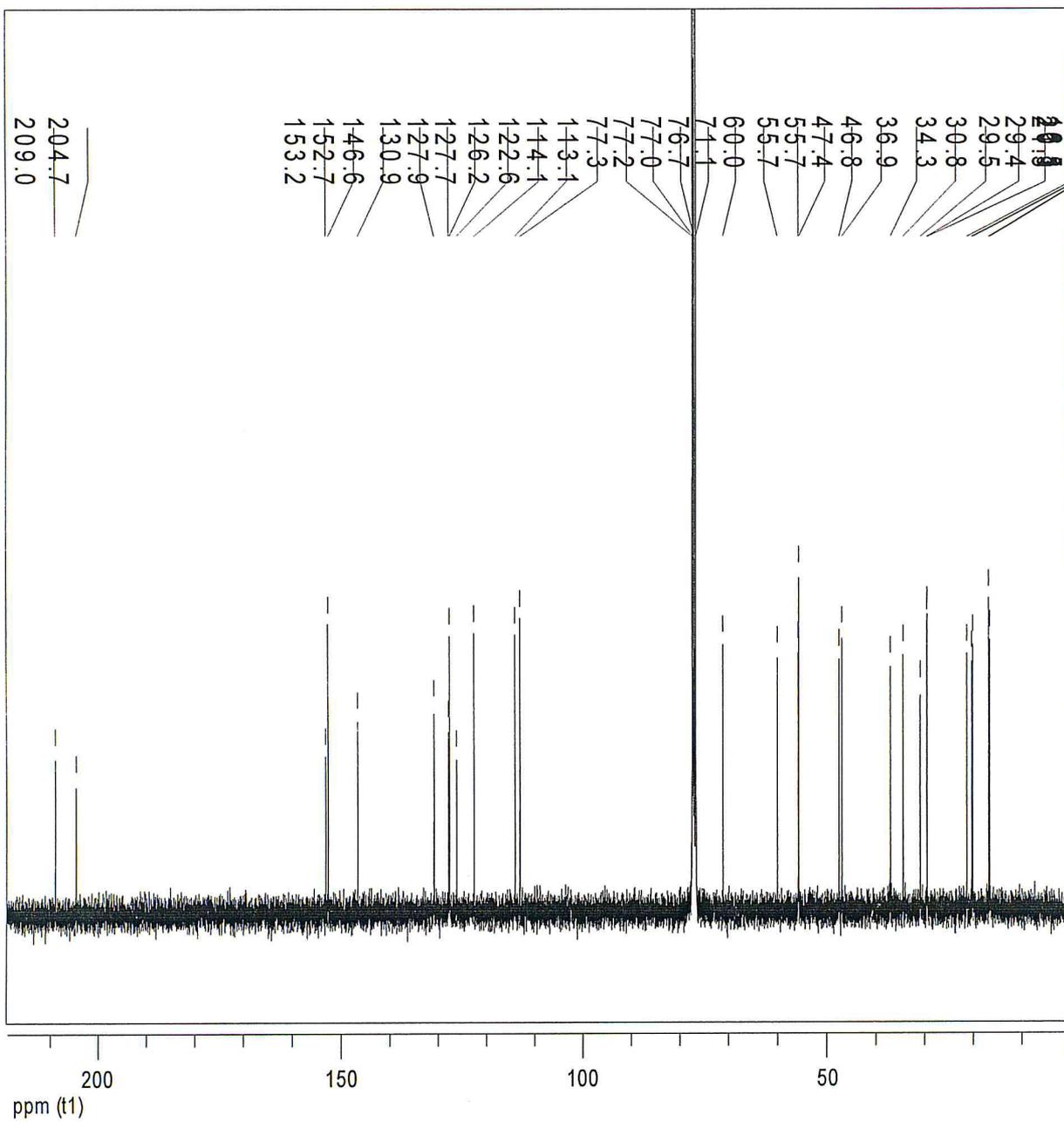


Figure 33 : Spectre du carbone 13 du produit 9.2

Tableau 4 : Déplacements chimiques du proton et du carbone 13 de composé 9.2

N°	¹³ C(CDCl ₃ , 100 MHz)	DEPT	¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz)	¹³ C RMN [39]	¹ H RMN [39]
1	30,8	CH ₂	3,34 <i>t</i> (6,5)	30.6	3,36 <i>d</i> (7)
2	127,7	CH	5,31 <i>d</i> (6,5)	127.8	5,34 <i>t</i> (6.4)
3	130,9	C	-	128.1	-
4	55,7	CH ₂	3,03 <i>s</i>	55.7	3.04 <i>s</i> (<i>br</i>)
5	209,0	C	-	209.2	-
6	47,4	CH ₂	a : 2,42 <i>d</i> (15,5) b : 2,25 <i>d</i> (15,5)	47.3	a : 2.26 <i>AB</i> (15.6) b : 2.44
7	46,8	C	-	46.8	-
8	36,9	CH ₂	a : 1,91 <i>m</i> b : 1,71 <i>m</i>	34.3	1.7- 1.9 <i>m</i>
9	20,1	CH ₂	1,73 <i>m</i>	20.0	1.7 <i>m</i>
10	34,3	CH ₂	a : 2,32 <i>m</i> b : 1,53 <i>m</i>	36.8	1.5-2.2 <i>m</i>
11	60,0	C	-	60.0	-
12	204,7	C	-	204.7	-
13	122,6	CH	6,63 <i>d</i> (15,0 Hz)	122.6	6.65 <i>d</i> (15.2 Hz)
14	152,7	CH	6,85 <i>d</i> (15,0 Hz)	152.9	6.88 <i>d</i> (15.2 Hz)
15	71,1	C	-	71.0	-
16	29,4	CH ₃	1,36 <i>s</i> *	29.4	1.37 <i>s</i>
17	29,5	CH ₃	1,35 <i>s</i> *	29.4	1.36 <i>s</i>
18	20,3	CH ₃	1,17 <i>s</i>	21.2	1.17 <i>s</i>
19	21,3	CH ₃	1,16 <i>s</i>	20.2	1.16 <i>s</i>
20	16,8	CH ₃	1,72 <i>s</i>	16.7	1.72 <i>s</i>
1'	146,6	C	-	146.5	-
2'	127,9	C	-	130.6	-
3'	113,1	CH	6,53 <i>d</i> (3,0 Hz)	113.0	6.54 <i>d</i> (3 Hz)
4'	153,2	C	-	153.1	-
5'	114,1	CH	6,58 <i>d</i> (3,0 Hz)	114.1	6,60 <i>d</i> (3 Hz)
6'	126,2	C	-	126.2	-
6'-Me	16.5	CH ₃	2,26 <i>s</i>	16.5	2.27 <i>s</i>
OMe	55,6	CH ₃	3,74 <i>s</i>	55.61	3,74 <i>s</i>
OH	-	-	-	-	5.60 <i>s</i>

L'examen de ce dernier nous a permis de comprendre rapidement qu'il s'agit d'un produit connu isolé de *Cystoseira tamariscifolia* et de *Cystoseira amantaceae* récoltées respectivement sur les

cotes marocaines [40] et françaises [39]. Il s'agit de la 4'-methoxy-(2*E*)-Bifurcarenone (figure 34).

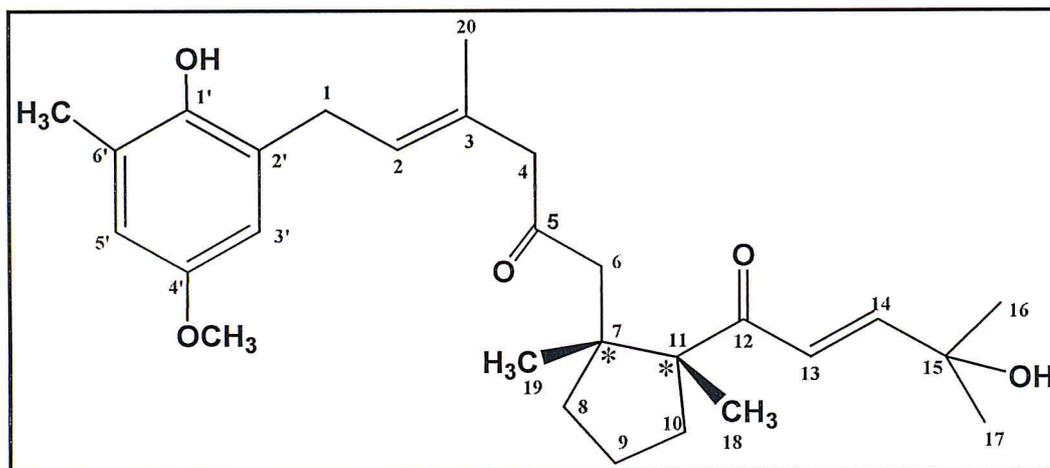


Figure 34: Structure de méroditerpène 4'-Methoxy-(2*E*)-bifurcarenone

Nous avons regroupé ; à titre comparatif, les données RMN du proton (^1H) et du carbone (^{13}C) de la methoxy-4-bifurcarenone reportées [39] avec ceux que nous avons obtenu sur le même tableau 4.

Cette étude nous a permis de faire quelques corrections de déplacements chimiques dans RMN ^{13}C , il s'agit des atomes des carbones C_3 , C_8 , C_{10} , C_{18} , C_{19} , $\text{C}_{2'}$ dont les déplacements chimiques sont respectivement : 130,9, 36,9 , 34,3, 20,3, 21,3, 127,9 ppm.

L'expérience RMN bidimensionnelle HMBC (figure 35) nous a permis de confirmer la structure à travers les corrélations longues distances carbone-proton. La jonction entre le noyau hydroquinonique et la partie diterpénique à travers le carbone C_1 est confirmée par les corrélations longues distances en ^3J : $\text{C}_1\text{-H}_3'$, $\text{C}_3'\text{-H}_1$, $\text{C}_3\text{-H}_1$, $\text{C}_1'\text{-H}_1$, en ^2J : $\text{C}_1\text{-H}_2$, $\text{C}_2'\text{-H}_1$, $\text{C}_2\text{-H}_1$.

Les fonctions cétone portées par les carbones C_5 et C_{12} caractérisées par des valeurs de déplacements chimiques, respectivement, de 209,2 et 204,7 ppm sont bien localisées par grâce aux corrélations longues distances. C'est ainsi que, la fonction cétone au niveau du carbone C_5 montre des corrélations en ^2J : $\text{C}_5\text{-H}_4$, $\text{C}_5\text{-H}_6$, concernant la cétone en C_{12} , elle est bien située grâce aux corrélations longues distance en ^2J : $\text{C}_{12}\text{-H}_{13}$ et en ^3J : $\text{C}_{12}\text{-H}_{14}$ et $\text{C}_{12}\text{-H}_{18}$.

La géométrie E de la double liaison en C₂ est indiquée par la résonance à champ fort du méthylénique vinylique à C₃ (C20 δ = 16,8ppm dans CDCl₃ signal inférieur à 20 ppm) dans le spectre RMN du carbone 13 [41], [42].

La valeur de la constante de couplage existant entre les protons éthyléniques en C₁₃ et C₁₄ (J = 15 Hz) montre également que la double liaison en C₁₃ est de configuration E, les deux protons forment un système AB à 6,63 (1H, d, J = 15Hz) et 6,85 (1H, d, J = 15 Hz).

La séquence COSY HH (figure 36) nous a permis également de confirmer la structure. L'enchaînement diterpénique est mis en évidence grâce aux corrélations H₁/H₂, H₂/H₄, H₂/H₂₀, H₁/H₄, H₁/H₂₀, H₄/H_{6a}, H₄/H_{6b}, H₆/H₁₉. Le cycle cyclopentanique est bien localisé à travers les taches de corrélations H_{8a}/H₁₉, H_{8b}/H₉, H_{8a}/H₉ et H₉/H_{10a} et H₉/H_{10b}. La suite de la chaîne diterpénique est confirmée par les taches H₁₈/H₁₃, H₁₃/H₁₄ et H₁₄/H₁₆ et H₁₄/H₁₇.

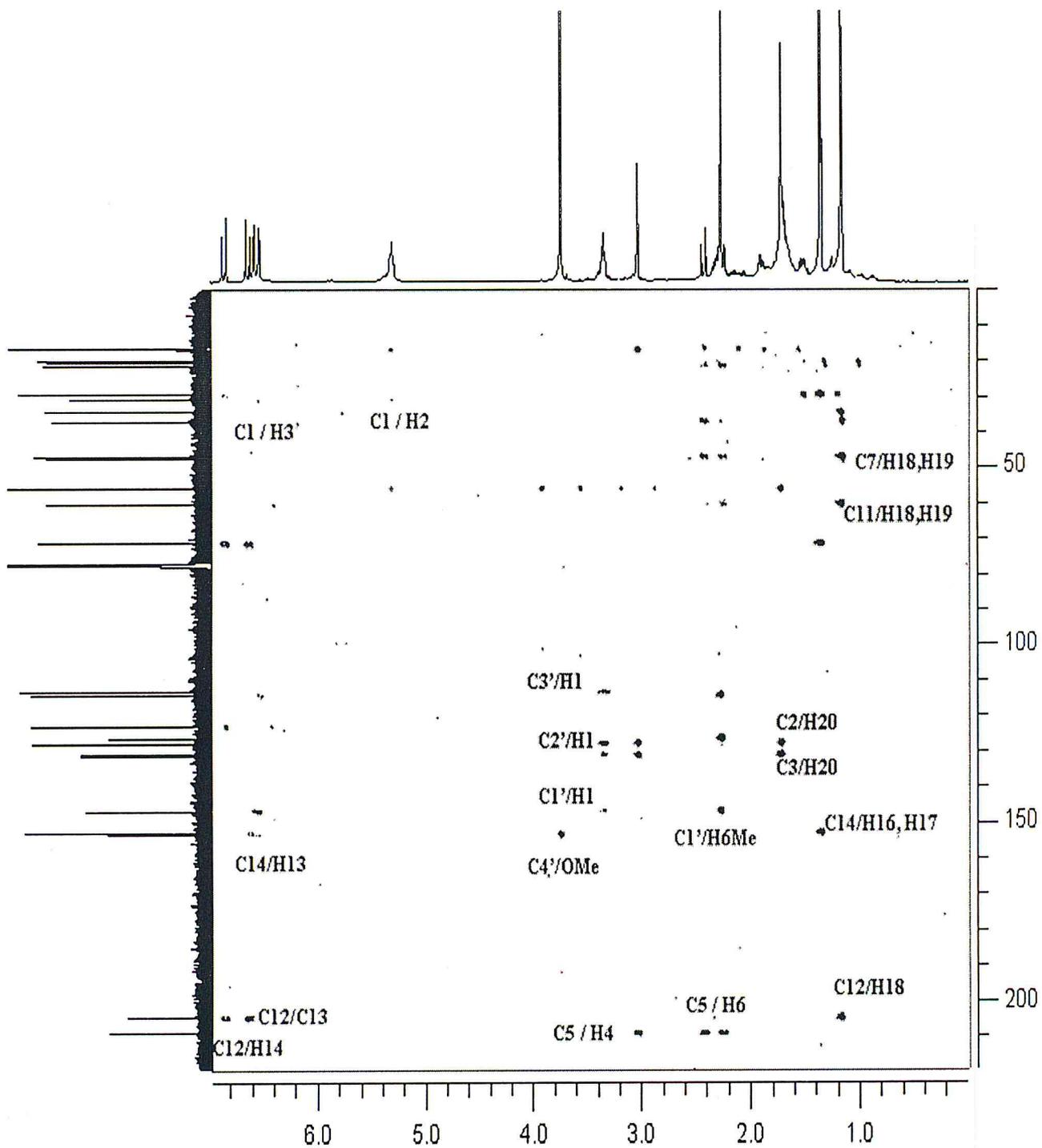


Figure 35 : Spectre HMBC du produit 9.2

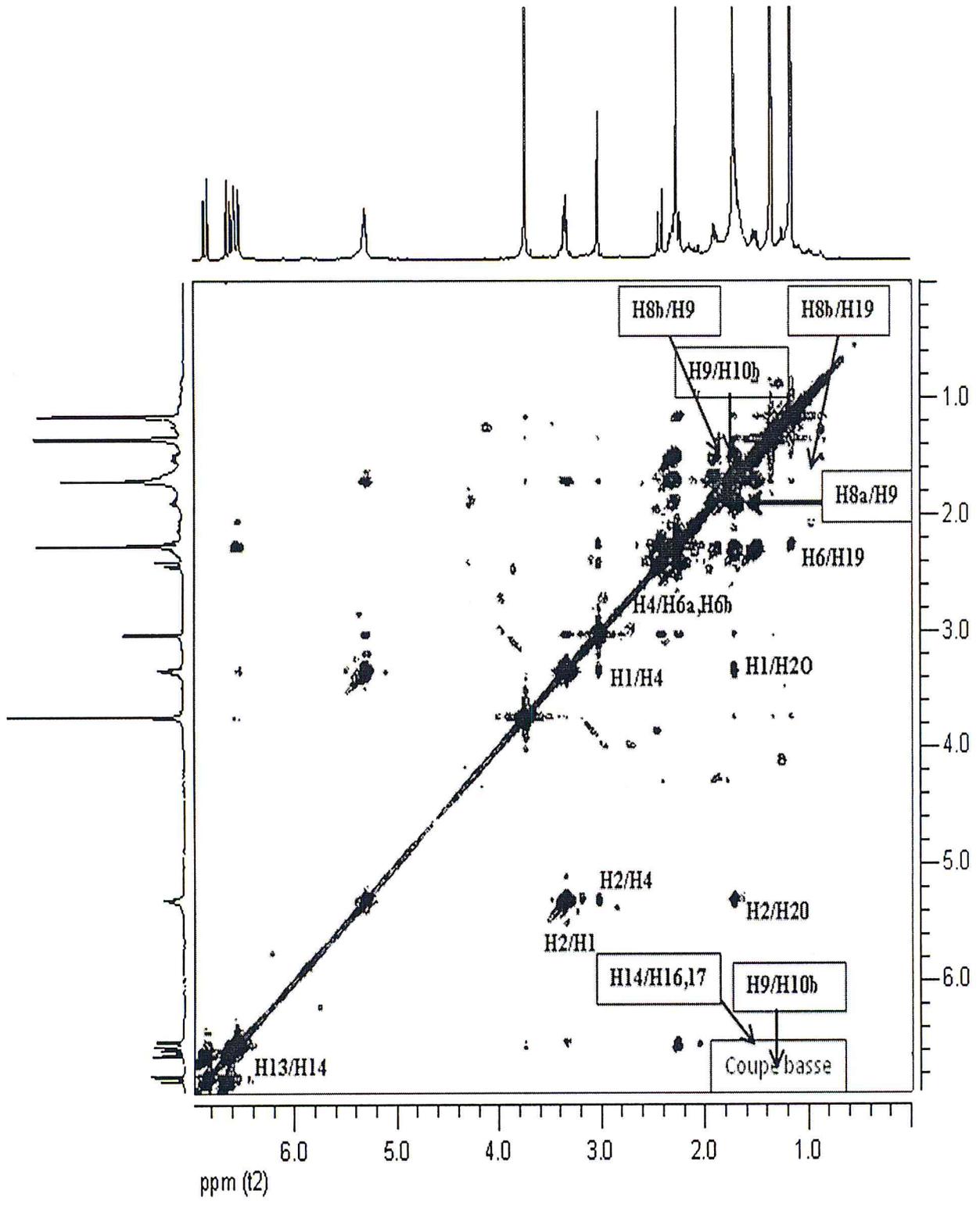


Figure 36 : Spectre COSY ^1H - ^1H du produit 9.2

3.4. Analyse du produit 9-2 par spectrométrie infrarouge

Le spectre infrarouge (figure 37) révèle des absorbances caractéristiques de certaines fonctions.

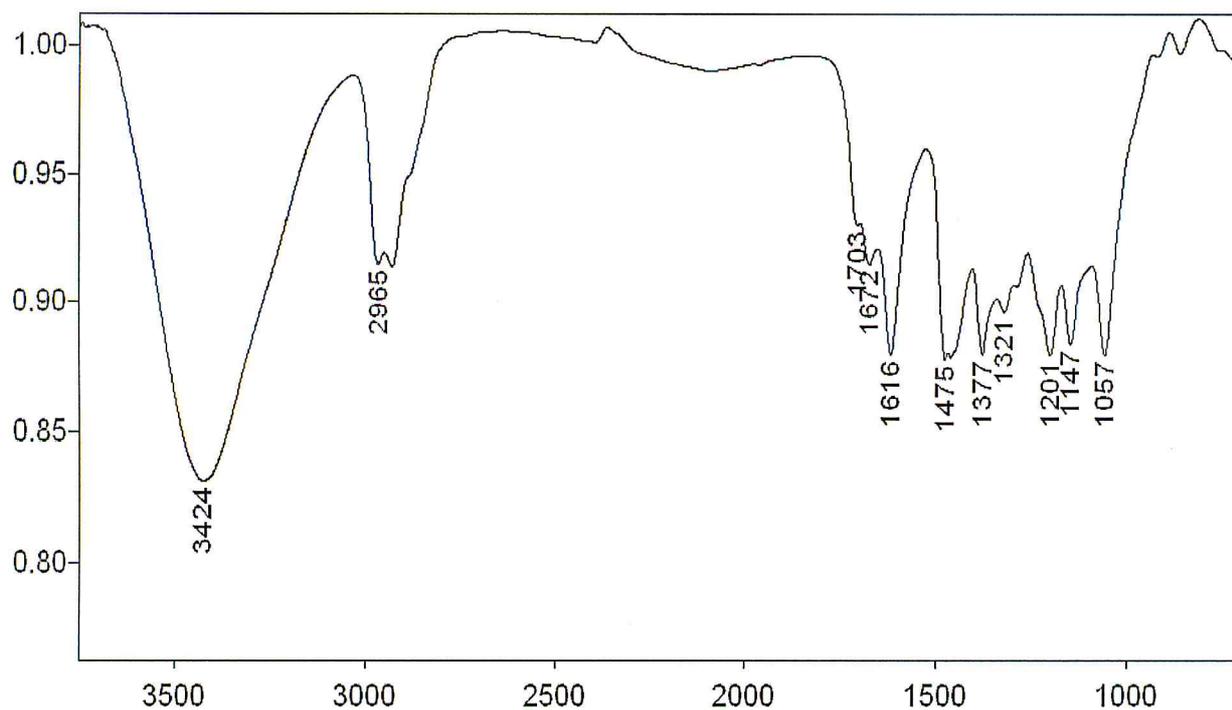


Figure 37 : Spectre infrarouge du produit 9.2

On enregistre des les bandes suivantes :

- Une large bande $\nu_{(O-H)}$ à 3424 cm^{-1} et des bandes $\nu_{(C-O)}$ vers 1201 cm^{-1} faisant référence à la présence de fonctions alcool,
- Une bande à $\nu_{(C-H)}$ 2928 cm^{-1} et $\delta_{(CH_2)}$ à 1475 cm^{-1} qui indiquent des carbones méthyléniques (sp^3),
- Deux bandes $\nu_{(C=O)}$ 1672 cm^{-1} et 1703 cm^{-1} correspondant aux deux fonctions cétones,
- Une bande $\nu_{(C=C)}$ à 1616 cm^{-1} indiquant la présence des doubles liaisons (carbones éthyléniques sp^2).

3.5. Conclusion

L'étude chimique par CLHP semi préparative de la fraction 9 collectée après fractionnement de l'extrait brut de *Cystoseira tamariscifolia* sur colonne ouverte de silice, nous a permis particulièrement d'isoler un produit pur (9.2). L'élucidation structurale, notamment par RMN mono- et bidimensionnelle nous permis de caractériser la structure. Nous nous sommes rendu compte qu'il s'agit d'un produit connu isolé dans *Cystoseira amantaceae* [39] et dans *Cystoseira tamariscifolia* [40]. Cette étude nous a permis de confirmer la structure de la 4'-méthoxy-2(*E*)bifurcarénone. Elle nous a permis de corriger les déplacements chimiques de certains atomes de carbone.

Conclusion générale

Cette étude nous a permis de discuter un aspect chimique et chimiotaxonomique des algues brunes du genre *Cystoseira*. Nous avons présenté les différentes classes de métabolites secondaires isolés de deux algues brunes d'une grande importance en l'occurrence *Cystoseira tamariscifolia* et *Cystoseira elegans*. Les métabolites isolés jouent un rôle très important dans la chimiotaxonomie (classification basée sur des critères chimiques). Dans ce cadre, nous avons évoqué la classification établie par Piatelli et Amico. Cette nous permis de conclure que les critères phytochimiques (basées uniquement sur la nature des métabolites isolés) des espèces sont difficiles pour établir une étude chimiotaxonomique fiable du genre *Cystoseira*, elle devrait inclure, en plus de la détermination des structures chimiques caractéristiques, la quantification précise de leur composition dans l'algue, les variations saisonnières et géographiques de composition chimique, ainsi que les processus biosynthétiques qui conduisent à la formation de ces substances dans l'algue [18].

L'étude chimique préliminaire de *Cystoseira elegans*, nous a permis de préparer un extrait brut qu'on a fractionné sur une colonne ouverte de silice en utilisant un gradient de polarité croissante TMP/AcOEt. Les expériences préliminaires par CCM nous ont permis de décrypter les différentes classes chimiques de l'extrait, ce qui nous a orienté sur le choix des fractions prioritaires dans l'étude chimique par CLHP. Sur cette base, nous avons commencé l'analyse par CLHP des fractions 8 et 9. Le profil chromatographique obtenu pour les deux fractions est fort intéressant a mené à purifier deux produits, malheureusement, l'analyse par RMN du proton des deux produits, et en se basant sur les données RMN de la littérature pour des mérodiaterpènes, nous a permis de conclure qu'il s'agit d'un mélange de deux épimères ou plus, ce qui est de bon augure pour des études ultérieures. L'amélioration des conditions de séparation s'avère nécessaire.

La dernière partie consacrée à l'étude chimique par CLHP semi préparative de la fraction 9 obtenu du fractionnement de l'extrait brut de *Cystoseira tamariscifolia*, nous a permis particulièrement d'isoler un produit pur (9.2). L'élucidation structurale, notamment par RMN mono- et bidimensionnelle nous permis de caractériser la structure. Nous avons vérifié qu'il s'agit d'un produit déjà isolé dans *Cystoseira amantaceae* [39] et dans *Cystoseira tamariscifolia*

[40]. Nous avons effectué la caractérisation structurale complète, elle nous a permis de confirmer la structure de la 4'-méthoxy-2(E)-bifurcarénone. Cette étude nous a également mené à corriger les déplacements chimiques de certains atomes de carbone.

Bibliographie

- [1] **S. Moussoukhoye**, « Détermination structurale de biomolécules polaires isolées d'organismes marins de la côte sénégalaise », Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR, 2003.
- [2] **B. HOWARD, K. CLARKSON and R.L. BERNSTEIN**, «Simple prenylated hydroquinone derivatives from the marine urocordate *aplidium californicum* - Natural anticancer and antimutagenic agents », Tetrahedron letters, 46, 4449-4452. 1979
- [3] **J.C. BRACKMAN et D.DALOZE**, « Les médicaments de la mer». La recherche, 14(143), 464-472. 1983
- [4] **M. PIATTELLI**. «Chemistry of marine algae: overview and current status», Oebali 17, 357-379. 1991
- [5] **M. AUBERT, M. GAUTHIER, J. AUBERT et P. BERNARD**, «Les systèmes d'information des micro-organismes marins. Leur rôle dans l'équilibre biologique océanique » Revue internationale d'océanographie médicale, tome LXI. 1981
- [6] **F.KUTZING**, Phycologia Generalis : I-XXXII, 458 pp. Ed. Leipzig (1843)
- [7] **K.LUNING**, Seaweeds. Their environment, biogeography and ecophysiology, 527 pp. Ed J. Wiley & Sons, New York (1990).
- [8] **C.AGARDH**, Species algarum, vol. 1, 168 pp. Ed. Lund. (1820).
- [9] **C.SAUVAGEAU**, «A propos des *Cystoseira* de Banyuls et de Guethary », Bulletin de la Station biologique d'Arcachon, 14, 133-556.1920

- [10] C.SAUVAGEAU, «A propos des *Cystoseira* de Banyuls et de Guethary», (supplément). Bulletin de la Station biologique d'Arcachon, 17, 3-52. 1920
- [11] G.HAMEL, Péophycées de France, Fascicule V, 337-432.Paris (1939).
- [12] M.ROBERTS, «Studies on marine algae of the British Isles-The genus *Cystoseira*», British Phycological Bulletin, 3 (2), 345-366, 1967
- [13] M.ROBERTS, «Modern approaches to the taxonomy of red and brown algae» The systematics association special, vol.10, num. 17: Active speciation in the taxonomy of the genus *Cystoseira* C. Ag., 399-422.Ed. D.E.G. Irvine and J.H. Price, London (1978).
- [14] M.RIBERA, A.GARRETA, T.GALLARDO, M.C ORMACI, G.FURNARI and G.GIACCONE, «Check list of Mediterranean seaweeds I Fucophyceae » Botanica Marina, 35, 109-130. 1992.
- [15] R. Valls « Séparation, identification, étude spectroscopiques de métabolites secondaires d'algues brunes (*Cystoseiracées*). Dosage. Variation. Chimiotaxonomie » Thèse d'état, 1993, Université d'Aix-Marseille III
- [16] <http://www.algaebase.org>
- [17] P. DEFFO « Contribution à l'étude chimique de l'algue brune *Cystoseira Amentacea* variété *Stricta* : isolement, caractérisation structurale et analyse de nouveaux méroditerpènes » Thèse de doctorat de l'Université de Toulon et du Var, 1995
- [18] R. VALLS et L.PIOVETTI, « The chemistry of marine natural product from brown algae of the family *Cystoseiraceae*. Chemotaxonomic relationships» Biochem. System. Ecol., 1995.
- [19] M.PIATELLI « *Chemistry and taxonomy of Sicilian Cystoseira species* » 1990

- [20] C. FRANCISCO, G. COMBAUT, J. TESTE et M. PROST, « ELEGANOLONE NOUVEAU CETOL DITERPENIQUE LINEAIRE DE LA PHEOPHYCEE *CYSTOSEIRA ELEGANS*» Phytochemistry, 1978.
- [21] V. AMICO, M. P. NERI, M.PIATTELLI, G.RUBERTO , «Linear diterpenoids from *Cystoseira balearica* » . Phytochemistry, 26(9), 2637-2639, (1987).
- [22] B.BANAIGS, C.FRANCISCO, E.GONZALEZ, L. CODOMIER, W.FENICAL, «Hydroxylated diterpenoid-hydroquinones from *Cystoseira elegans*: significant products or artifacts ? ».Tetrahedron Letters, 23(32), 3271-3272, (1982).
- [23] B.BANAIGS, C.FRANCISCO, G.GONZALEZ, W.FENICAL, «Diterpenoid Metabolites from the Marine Alga *Cystoseira elegans*». Tetrahedron, 39, 629-638, (1983)
- [24] B.BANAIGS, C. FRANCISCO, E.GONZALEZ, W.FENICAL, « A hydroxylated diterpenoid substituted quinol from the brown alga *Cystoseira elegans*», Phytochemistry, 22(12), 2865-2867, (1983).
- [25] B.BANAIGS, «Défense chimique des algues brunes(*Cystoseiraceae*) –Etude de nouveaux phénols diterpéniques chez *Cystoseira elegans*». These de Spécialité, Perpignan (1983).
- [26] V. AMICO, G.GIACCONE, M.PIATTELLI, G.RUBERTO, «inheritance of chemical constituents in algae: tetraprenyltoluquinols of *Cystoseira elegans* x *C.algeriensis*»
- [27] V.AMICO, M. PIATELLI, «Metabolites of mixed biogenesis from *Cystoseira tamariscifolia*» Gazzetta Chimica Italiana, 119,467-470, (1989).
- [28] C.FRANCISCO, B.BANAIGS, J.T ESTE, A.CAVE, « Mediterraneanols: a Novel Biologically Active Class of Rearranged Diterpenoid Metabolites from *Cystoseira mediterranea* (Pheophyta) ».

- [29] C.FRANCISCO, «Défense chimique des algues brunes de la famille des Cystoseiraceae : étude de nouveaux méroditerpènes chez *Cystoseira mediterranea*» .Journal of Organic Chemistry, 51, 1115-1120, (1986).
- [30] R. VALLS, L. PIOVETTI, B. BANAIGS, A. PRAUD, «Secondary metabolites from Morocco brown algae of the genus *Cystoseira* », Phytochemistry, 32(4), 961-966, (1993).
- [31] V. AMICO, M. PIATTELLI, F. CUNSOLO, G. RUBERTO, G. BRUNO, «Structure of the Algal Metabolite iso-Strictaketol» Acta Crystallographica, 44, 686-689, (1988).
- [32] C. FRANCISCO, B. BANAIGS, M. RAKBA, J. TESTE, A. CAVE, « Cystoseirols : Novel Rearranged Diterpenoids of Mixed Biogenesis from Cystoseiraceae (brown marine algae) ». Journal of Organic Chemistry, 51, 2707-2711, (1986).
- [33] R. VALLS, L. PIOVETTI, et A. PRAUD, « The use of diterpenoids as chemotaxonomic markers in the genus *Cystoseira* », Hydrobiologia :, 260/261, 549-556. 1993
- [34] V. AMICO, « Marine brown algae of family *Cystoseiraceae* : Chemistry and chemotaxonomy », Phytochemistry , 39, 1257-1279, 1995
- [35] A. PRAUD, « Isolement, caractérisation structurale et analyse de nouveaux métabolites d'algues méditerranéennes appartenant aux genres *Cystoseira* et *Lyngbia* » Thèse de doctorat de l'université d'Aix-Marseille I, 1994
- [36] V. Amico, G. Giaccone, P. Colombo, P. Colonna, A.M. Mannino, R. Randazzo, «Un nuovo approccio allo studio della sistematica del genere *Cystoseira* C. Agardh (Phaeophyta, Fucales) » Boletino delle sedute della Accademia Gioenia di Scienze Naturali in Catania, 18, 887-986, 1985
- [37] J.M. Kornprobst, « Substances naturelles d'origine marine », Edition TEC & DOC, 2005.
- [38] M. EL HATTAB, al « étude chimique de *cystoseira tamariscifolia* », travaux en cours
- [39] V. Mesguiche, R. Valls, L. Piovetti and B. Banaigs, “Merditerpenes from *Cystoseira amentacea* var. *stricta* collected off the Mediterranean coasts», Phytochemistry, vol. 45, No.7.pp. 1489-1494, 1997

[40] **A. Bennamara, A. Abourriche, M. Berrada, M. Charrouf, N. Chaib, M. Boudouma, F.X. Garneau**, «Methoxybifurcarenone: an antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*» *Phytochemistry* 52, 37-40, 1999

[41] **P.A.COUPERUS, A.D.H. CLAGUE and J.P.C.M.VAN DONGEN**, «¹³C chemical shifts of some model olefins» *Org. Magn. Reson.* 8, 426-431. 1976

[42] **R.M.COATES, D.A. LEY and P.L. CAVENDER**, «Synthesis and carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectra of all-trans Geranylgeraniol and its analogues» *J.Org. Chem.* 43 (26), 4915-4922. 1978

Annexe 1

1/ **DEPT** : Distortionless Enhancement Polarisation Transfer. C'est une séquence d'impulsion de transfert de polarisation qui permet de distinguer les signaux des groupes CH, CH₂ et CH₃ (signaux positifs pour CH et CH₃, signaux négatifs pour CH₂)

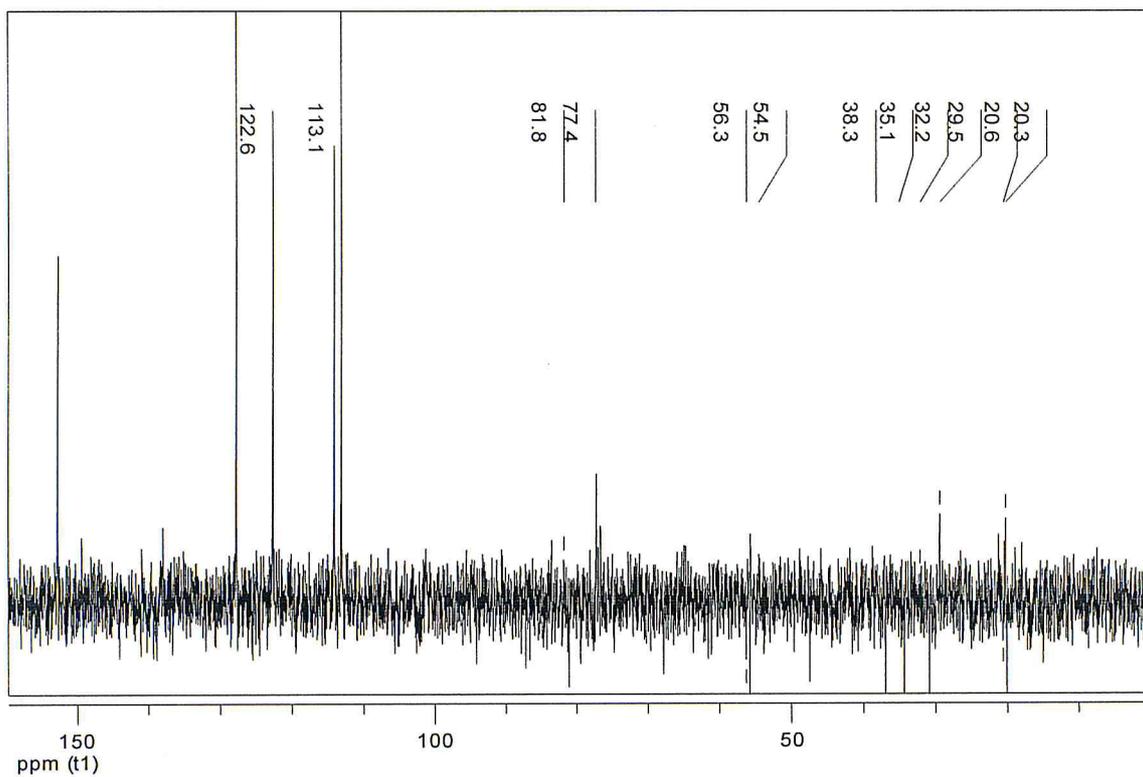
2/ **COSY** ¹H-¹H: Correlated Spectroscopy ¹H-¹H. C'est une séquence de RMN bidimensionnelle correspondant à un transfert de cohérence homonucléaire. Elle permet de déterminer les couplages scalaires existant entre protons voisins

3/ **HMBC**: Heteronuclear Multiple Bond Connectivity. C'est une séquence de RMN bidimensionnelle qui permet l'étude des corrélations longues distances ¹H-¹³C



Annexe 2

DEPT 90



DEPT 135

