



**UNIVERSITE D'ANTANANARIVO  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE**



**MEMOIRE DE RECHERCHE**  
Pour l'obtention du  
**Diplôme d'Etudes Approfondies**  
D.E.A.  
Chimie Organique Option « Produits Naturels »



Présenté par

Marie Pascaline RAHELIVAO

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES POLYSACCHARIDES DE  
*Plocamium corallorhiza*, (PLOCAMIACEAE)  
UNE ALGUE ROUGE DE MADAGASCAR  
ISOLEMENT D'UN COMPOSE MONOTERPENIQUE POLYHALOGENE

Soutenu publiquement le 26 Mars 2008 devant la Commission d'Examen

Président : Yvonne RANARIVELO  
Professeur titulaire

Rapporteur : Hanta ANDRIAMANANTOANINA  
Maître de Recherche

Examineur : Elie RAFIDINARIVO  
Professeur Titulaire

Antananarivo

- 2008 -



*Je remercie mon Seigneur JESUS de m'avoir donné la force d'accomplir ce travail.*

*Je dédie ce travail à :*

*Ma Mère,  
Tous mes frères et sœurs spirituels,*

*Ma sincère gratitude va à ma famille et proches pour leur patience et leurs encouragements tout au long de mes études. Merci de vous soucier de moi. Vous m'avez témoigné beaucoup d'amour et vous avez consenti à tous les sacrifices pour me voir réussir. Vos efforts, votre chaleur, votre attention sont tellement sincères !*

*Vous êtes toujours là pour écouter, aider et me redonner le moral. Je prie pour ne jamais considérer ce que vous faites comme un dû.*

*Pascaline*

## *Remerciements*

*A Madame Yvonne RANARIVELO,*

*Professeur Titulaire à l'Université d'Antananarivo,*

*Responsable de la Formation Doctorale Chimie à la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo*

*Directeur du Laboratoire de Chimie Organiques Substances Marines (LCO-SM).*

*En témoignage de votre gratitude pour l'enseignement que nous avons reçu.*

*Malgré vos multiples occupations, vous nous avez encore consacré un temps précieux pour nous apporter une aide inestimable et des conseils dans l'élaboration de ce travail.*

*Vous avez bien voulu nous faire l'honneur de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous sommes très heureux de pouvoir vous exprimer notre profonde reconnaissance et notre respectueuse déférence.*

*A Madame Hanta ANDRIAMANANTOANINA,*

*Docteur En Chimie Organique « Produits Naturels »,*

*Enseignant Vacataire En A.E.A De Chimie Organique « Produits Naturels »,*

*Maître de Recherche au Centre National des Recherches sur L'environnement.*

*Malgré vos multiples responsabilités, vous nous avez fait l'honneur d'être rapporteur de ce mémoire.*

*Nous vous remercions pour la confiance que vous nous avez témoignée en nous ayant confié le sujet de ce mémoire. L'enseignement précieux et les instructions efficaces que nous avons reçus, nous ont apportés une aide inestimable pour la réalisation de ce travail.*

*Nous ne pouvons pas laisser l'occasion de vous exprimer nos remerciements les plus sincères et notre haute considération.*

*A Monsieur Elie RAFIDINARIVO*

*Professeur Titulaire à l'Institut Supérieur de Technologie de l'Université l'Antananarivo.*

*Vous nous avez fait l'honneur de siéger parmi les membres de jury en tant qu'examinateur.*

*Il nous est particulièrement agréable de vous remercier pour vos enseignements.*

*Nous avons toujours trouvé auprès de vous conseils et soutiens. Vos remarques seront reçues et considérées comme constrictives et amélioratives pour élargir nos acquis.*

*Nous tenons à remercier vivement*

- *Monsieur le Président de l'Université d'Antananarivo ;*
- *Monsieur le Doyen de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo ;*
- *Madame le Chef du Département de Chimie Organique de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo ;*
- *Madame le Responsable de la Formation Doctorale Option Produits Naturels-Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo ;*
- *Tous les enseignants qui ont assuré notre formation.*

*-Monsieur le Directeur du Centre National de Recherche sur l'Environnement qui nous a accueilli dans leur Laboratoire pour la réalisation de nos travaux,*

*-L'équipe du Laboratoire de Microbiologie de L'Environnement du CNRE, pour la collecte des échantillons, réalisés dans le cadre du projet « Valorisation des algues marines malgache ».*

*-A toute l'équipe de l'Institut Halieutique et Sciences Marines (IHSM), pour l'identification et la confection de l'alguier.*

*Madame Bodosoa RAKOTONJATOVO et Monsieur Rahanira RALAMBONDRAHETY, pour leur encouragement, leur conseil, et leur amitié. Vous nous avez guidés avec discernement à chaque étape de ce travail. Vous n'avez pas hésité à nous faire part de votre expérience pour mener à bien ce travail. Vos conseils avisés nous ont permis d'acquérir une initiation pragmatique à la recherche. Nous tenons à vous témoigner notre reconnaissance pour tout ce que vous nous avez apporté.*

*L'équipe du Laboratoire de Chimie Organique « Substances Marines », dirigée par le Professeur Yvonne RANARIVELO, le Docteur Richard RASAMOELISENDRA, pour ses aides précieuses et efficaces.*

*Monsieur Nirina Rabe ANDRIAMAHARAVO, Maître de conférence à la Faculté des Sciences, pour l'enregistrement des spectres CPG/SM, CPG/FTIR, RMN et ses précieux conseils.*

*L'équipe de l'Unité Microbiologie du LME/CNRE, pour la réalisation des tests d'activités antimicrobiennes.*

*L'équipe du CNARP, plus particulièrement Monsieur le Docteur Michel RATSIMBASON, chercheur au département de Pharmacodynamie, pour la réalisation des tests anti-malaria.*

*La Famille RAKOTOMALALA pour ses soutiens matériels durant l'élaboration de ce mémoire. je vous suis reconnaissante de m'avoir assisté lors de la saisie d'une partie de ce mémoire.*

*Je suis redevable envers ma famille qui m'a beaucoup encouragé et soutenu depuis toujours.*

*Nos camarades étudiants des promotions DEA 2007 et AEA 2007  
Pour la fraternité et l'aide inestimable.*

*Je ne saurais oublier tous mes camarades de laboratoire, pour les témoignages de sympathie.  
Finalement, je remercie tous mes amis et collègues étudiants pour leur cordialité et leur soutien.*

*Pascaline*

# Glossaire

°C	degré Celsius
3,6-Agal	3,6-anhydrogalactose
AcONa	Acétate de sodium
BaCl <sub>2</sub>	Chlorure de baryum
Ca <sup>+2</sup>	ion calcium
CCE	Chromatographie sur Couches Epaises
CCM	Chromatographie sur Couches Minces
CE	Cold Extract
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	dichlorométhane
Cl <sup>-</sup>	ion chlorure
CNRE	Centre National de Recherche sur l'Environnement
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CTAB	cétyltriméthylammonium bromide (cetavlon)
DO	densité optique
E.D	eau distillée
EtOH	éthanol
Fru	fructose
Gal	galactose
Glc	glucose
h	heure
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	acide sulfurique
HCl	acide chlorhydrique
HE	Hot Extract
IR	infrarouge
K <sup>+</sup>	ion potassium
KBr	bromure de potassium
KCl	chlorure de potassium
LCOSM	Laboratoire de Chimie Organique Substances Marines
LME	Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement
m	masse
M	molarité
MA	modification Alcaline
Man	mannose
MeOH	méthanol
mg	milligramme
mm	millimètre
mn	minute
N	normalité
Na <sup>+</sup>	ion sodium
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfate de sodium

NaBH <sub>4</sub>	borohydrure de sodium
NaHCO <sub>3</sub>	hydrocarbonate de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
pH	potentiel hydrogène
PM	poids moléculaire
Pyr	pyridine
Rf	référence frontale
Rib	ribose
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Si	silice
SM	Spectrométrie de Masse
SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ion sulfonate
SO <sub>4</sub> <sup>--</sup>	ion sulfate
T <sub>R</sub>	temps de rétention
UV	ultraviolet
uv/visible	ultraviolet/visible
v	volume
Xyl	xylose
α	alpha
β	bêta
γ	gamma
δ	delta
ε	êta
η	nu
θ	téta
ι	iota
κ	kappa
λ	lambda
λ <sub>max</sub>	longueur d'onde maximale
μ	mu
μg	microgramme
μl	microlitre
μM	micromole
π	pi
ω	oméga



# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	8
A- POLYSACCHARIDES .....	10
A-1. Définition .....	10
A-2. Classification.....	11
A-2-1. Polysaccharides de Phaeophyceae -algues brunes.....	11
A-2-2. Polysaccharides de Rhodophyceae –algues rouges.....	11
A-2-3. Polysaccharides de Chlorophyceae –algues vertes .....	11
A-2-4. Polysaccharides des autres classes d'algues .....	12
A-3. Polysaccharides des algues rouges.....	12
A-3-1. Les carraghénanes.....	12
A-3-1.1. Différents types de carraghénanes .....	12
A-3-1.2. Utilisations des carraghénanes.....	15
B- TRAVAUX ANTERIEURS sur le genre Plocamium.....	15
MATERIELS ET METHODES .....	19
A. MATERIEL VEGETAL .....	20
A. 1. Collecte .....	20
A.2. Description botanique .....	21
B. MATERIELS ET APPAREILS UTILISES.....	22
B.1. Pesée .....	22
B.2. Séchage.....	22
B.3. Broyage.....	22
B.4. Centrifugation.....	22
B.5. Agitation .....	22
B.6. Evaporation.....	22
B.7. Filtration .....	22
B.8. Dialyse .....	23
B.9. Dosage colorimétrique .....	23

B.10. Chromatographie sur couche mince .....	23
B.11. Chromatographie Liquide à Basse Pression .....	23
B.12. Infrarouge.....	23
C. METHODES .....	24
C.1. Traitement préalable des échantillons d'algues .....	24
C.1.1. Lavage.....	24
C.1.2. Broyage .....	24
C.2. Méthodes d'analyse des polysaccharides.....	25
C.2.1. Extraction du carraghénane.....	25
C.2.2. Dialyse.....	27
C.2.3. Récupération des carraghénanes.....	28
C.2.4. Dosages colorimétriques .....	31
C.2.4-1. Dosage des sucres totaux .....	31
C.2.4-2. Dosage des 3', 6'- Anhydrogalactoses .....	33
C.2.4-3. Dosage des sulfates.....	35
C.2.5. Méthode physique d'analyse .....	36
C.2.6. Méthode chimique .....	37
C.2.6.1. Modification alcaline.....	37
C.3. Méthodes d'analyse des autres constituants de <i>P. corallorhiza</i> .....	40
C.3.1. Extraction.....	40
C.3.2. Méthodes chromatographiques .....	41
C.3.2-1. Chromatographie sur Couche Mince (C.C.M.).....	41
C.3.2-2. Chromatographie Liquide à Basse Pression (C.L.B.P).....	43
C.3.2-3. Chromatographie sur Couche Epaisse (C.C.E) .....	44
C.3.3. Méthodes d'analyses spectrales.....	44
C.3.3-1. Couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (CPG/SM).....	44
C.3.3-2. Couplage CPG/IRFT.....	47
C.3.3-3. La Résonance Magnétique Nucléaire.....	48
a- Le spectre R.M.N <sup>1</sup> H.....	49
b- Le spectre 1-D du <sup>13</sup> C .....	49

c- Spectre RMN 2-D .....	49
C.3.4. Etude de l'activité biologique .....	51
RESULTATS ET DISCUSSIONS .....	52
A. POLYSACCHARIDES .....	53
A.1. Aspects des précipités .....	53
A.2. Rendements.....	54
A.3. Dosages colorimétriques.....	55
A.3-1. Dosages des sucres totaux. ....	55
A.3.2. Dosage des 3',6'-anhydrogalactoses. ....	56
A.3.3. Dosage des sulfates .....	56
A.4. Spectroscopie infra rouge .....	57
A.5. Modification alcaline.....	59
A.6. Précipitation à l'aide d'ion K+ .....	61
B- AUTRES CONSTITUANTS CHIMIQUES.....	63
B.1. Résultats des extractions .....	63
B.2. Isolement du composé XXII <sub>b</sub> .....	63
B.3. Analyse de XXII <sub>b</sub> .....	66
B.3.1. Comportement chromatographique de XXII <sub>b</sub> .....	66
B.3.2. Détermination de structure.....	67
B.3.2.1. Spectrométrie de masse .....	67
B.3.2.2. IR .....	70
B.3.2.3.RMN.....	71
B.4. Résultats des tests antibactériens.....	73
B.5. Résultats des tests antimalaria .....	74
CONCLUSION.....	75
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	78
ANNEXES .....	86

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I Les différentes familles de carraghénane.
- Tableau II. Importance industrielle des carraghénanes.
- Tableau III. Activités de quelques espèces de *Plocamium*.
- Tableau IV. Composés isolés de *Plocamium corallorhiza*.
- Tableau V. Données systématiques
- Tableau VI. Conditions opératoires.
- Tableau VII Conditions opératoires.
- Tableau VIII. Aspect des précipités.
- Tableau IX. Rendement des extractions.
- Tableau X. Teneur en sucres totaux des extraits CE et HE.
- Tableau XI. Teneur en 3',6'-Agal des extraits CE et HE.
- Tableau XII. Teneur en sulfates des extraits CE et HE.
- Tableau XIII. Récapitulatif des dosages colorimétriques.
- Tableau XIV. Rendement des CE et HE après MA.
- Tableau XV. Teneur en 3, 6'-Agal des extraits CE et HE avant et après M.A.
- Tableau XVI. Teneur en sulfates des extraits CE et HE après M.A.
- Tableau XVII. Rendements des extractions.
- Tableau XVIII. Données en SM
- Tableau XIX. Données en spectroscopie IR de XXII<sub>b</sub>.
- Tableau XX. Identification des spectres RMN.
- Tableau XXI. Exploitation du spectre <sup>1</sup>H
- Tableau XXII Exploitation du spectre <sup>13</sup>C
- Tableau XXIII. Interprétation des corrélations en COSY.
- Tableau XXIV. Résultats préliminaires de tests microbiologiques sur les différents extraits.
- Tableau XXV. Résultats préliminaires des tests microbiologiques sur les extraits hexaniques fractionnés.

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Différents types des carraghénanes

Figure 2. *Plocamium Corallorhiza*

Figure 3. Localisation de la collecte

Figure 4. Prétraitement des échantillons d'algues

Figure 5. Extraction à Froid " Cold Extract"

Figure 6. Extraction à Chaud "Hot Extract"

Figure 7. Modification Alcaline

Figure 8. Protocole d'extraction

Figure 9. Précipité de carraghénane

Figure.10 Dosage des Sucres Totaux

Figure 11 Dosage des 3,6-Agal Avant et Après MA

Figure 12 Dosage des Sulfates avant et après MA

Figure 12'. Chromatogramme en CCM de l'extrait hexanique

Figure 12''. Chromatogramme en CCM des fractions 51 À 69 ( XXII<sub>b</sub>=65-69)

Figure 14. Chromatogramme en CCM De XXII<sub>b</sub>

Schéma : Fragmentation de l'ion moléculaire

Figure 15. Halo d'inhibition de F<sub>65</sub> vis-à-vis de *S. Aureus* et *S. Pneumoniae*

# **INTRODUCTION**

Bien que le milieu marin entoure Madagascar sur plus de 5.000Km, l'algue ne bénéficie malheureusement pas des mêmes attentions que les espèces végétales supérieures aussi bien de la part des scientifiques malgaches que des secteurs publics et privés. Mis à part les grandes sociétés crevettières et thonières, rien de bien concret ne se fait en ce qui concerne les algues marines malgaches qui constituent une source importante de matières premières et de produits à haute valeur ajoutée. Son développement est ressenti comme une source de richesses et d'emplois. Cependant, l'utilité et l'importance des algues ainsi que leurs dérivés (agar-agar, carraghénanes et alginates) sont encore méconnus par la majorité de la population malgache. L'insuffisance de données scientifiques et techniques sur les potentialités thérapeutiques des algues à Madagascar constitue un handicap pour le développement de cette filière.

D'autre part, les propriétés épaississantes, gélifiantes ou stabilisantes des algues sont exploitées dans les industries agro-alimentaires et textiles.

Notre sujet porte sur: « Etude chimique de *Plocamium corallorhiza* (PLOCAMIACEAE) algue rouge de Madagascar ».

Le présent travail consiste à étudier les substances naturelles de cette algue rouge. Il comporte une partie chimique et une partie biologique. Il a été réalisé en collaboration entre le Laboratoire de Chimie Organique et de Substances Marines (L.C.O-S.M) de l'Université d'Antananarivo et le Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (L.M.E) du Centre National de Recherches sur l'Environnement (C.N.R.E).

Le mémoire se subdivise en deux grandes parties :

La première est consacrée à la caractérisation des polysaccharides de *Plocamium corallorhiza*.

La seconde est réservée à l'isolement et à l'identification des constituants chimiques autres que polysaccharides, ainsi que l'étude de ses activités antibactérienne et antimalaria.

Il est présenté selon le plan IMRED, les références bibliographiques et annexes terminent l'ouvrage.

# GÉNÉRALITES

## A- POLYSACCHARIDES

### A-1. Définition

Les polysaccharides peuvent être définis comme de longues molécules formées de l'enchaînement de motifs similaires en l'occurrence des glucides appelés couramment sucres. Ce sont des polymères naturels de haut poids moléculaire, résultant de la condensation d'un grand nombre de molécules de chaînes linéaires ou ramifiées d'oses, reliés entre eux par des liaisons glycosidiques (Whyte *et al.*, 1986 ; Vollhardt et Schore, 1995).

Ils présentent une structure tridimensionnelle, variée et complexe.

Il existe plusieurs types de polysaccharides :

- les polysaccharides formés exclusivement par des oses ;
- les polysaccharides liés à des protéines ou protéoglycanes ;
- les polysaccharides présentant des ponts peptidiques ou peptiglycanes ;
- les polysaccharides ramifiés par des séquences répétitives d'unités oligosaccharides liées entre elles par les liaisons phosphorodiesters, les acides téichiques ;
- les acides nucléiques, ADN et ARN.

Les polysaccharides peuvent également être divisés en deux types :

- Les polysaccharides dites « homogènes » comportant un seul type d'unités monosaccharides.
- Les polysaccharides « hétérogènes » résultant de la condensation de différents types de monosaccharides.

Les polysaccharides peuvent se présenter sous forme linéaire ou ramifiés.



## **A-2. Classification**

Les phycocolloïdes, polysaccharides extraits des algues rouges et brunes sont répartis en fonction de la classe de l'algue qui les contiennent (Wuitner, 1865-1946 ; Percival *et al.*, 1967).

### **A-2-1. Polysaccharides de Phaeophyceae -algues brunes**

Les algues brunes sont les principales sources d'alginate et d'acide alginique (Bodard *et al.*, 1983).

Dans cette classe, on trouve :

- . Les polyuronides composés de deux unités d'acides uroniques : les acides D-mannuroniques liés en  $\beta$ -1,4- et les acides L-guluroniques liés en  $\alpha$ -1,4-.
- . Les fucoïdanes polymères du  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-L-fucose-4-sulfate
- . Les laminaranes ou  $\beta$ -1,3-glucane.

Leur chaîne présente un poids moléculaire de l'ordre de 800.000.

### **A-2-2. Polysaccharides de Rhodophyceae –algues rouges**

Les algues rouges contiennent un taux considérable en galactanes sulfatés, ayant un poids moléculaire supérieur à 1.000.000 et caractérisés par une répétition régulière de résidus galactopyranoses. Ces unités monomères sont liées alternativement par des liaisons  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) et  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) (Kloareg *et al.*, 1988).

Ces galactanes sont subdivisés eux-mêmes en deux groupes suivant la configuration des unités :

- les molécules du type carraghénane
- les molécules du type agar (Bruneton, 1993).

### **A-2-3. Polysaccharides de Chlorophyceae –algues vertes**

Les polysaccharides d'algues vertes présentent une structure voisine de celle des polysaccharides des végétaux supérieurs, amylose ou amilopectine. Il s'agit d'hétérosides très sulfatés (22%), de poids moléculaire situé entre 100.000 et 1.000.000. (Kloareg *et al.*, 1988).

#### **A-2-4. Polysaccharides des autres classes d'algues**

Ces polysaccharides sont contenus dans les familles *Cyanophyceae* (bleu-vert), *Bacillariophyceae* (diatomique) et *Lanthophyceae*. Ils sont constitués par des unités très variables comme le mannitol, le glucose, le laminitol, l'inositol (Percival *et al.*, 1967).

#### **A-3. Polysaccharides des algues rouges**

Les algues rouges sont capables de produire soit des carraghénanes, soit des agars (Whyte *et al.*, 1984).

##### **A-3-1. Les carraghénanes**

Les carraghénanes sont des polysaccharides qui constituent les parois cellulaires de divers algues rouges (Rhodophycées) appartenant aux familles des *Gigartinaceae*, *Hypneaceae*, *Furcellariaceae* et *Polyideaceae* (Rees, 1969 ; Santos, 1980 ; Greer *et al.*, 1984 ).

Ils comportent des longues chaînes galactanes, polyélectrolytes anioniques. Leur masse moléculaire peut être supérieure à  $10^6$  (Kloareg *et al.*, 1988).

Ces polymères linéaires, formés par des motifs disaccharides [AB], sont composés par deux unités D-galactopyranoses liées alternativement par des liaisons  $\alpha$ -(1→3) et  $\beta$ -(1→4) (Yaphe, 1959 ; Bellion *et al.*, 1983).

Ce sont des polysaccharides très sulfatés (20-50%) et les résidus  $\alpha$ -D-galactopyranosyles peuvent être sous forme 3',6'-anhydro (Asare, 1980 ; Greer *et al.*, 1985).

##### *A-3-1.1. Différents types de carraghénanes*

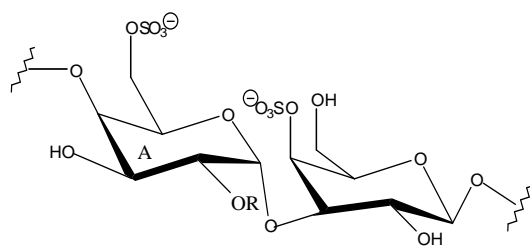
Initialement, on a subdivisé les carraghénanes en deux familles suivant leur solubilité dans le KCl. Les fractions solubles dans le KCl ont été désignées par le préfixe « Kappa », tandis que le préfixe « Lambda » a été réservé à celles des fractions insolubles.

Plus tard, les classifications ont été basées sur le nombre, la position de groupements sulfates ainsi que la présence de pont 3',6'-anhydro sur les résidus  $\beta$ -D-galactopyranosyles. Ceci a abouti aux quatre grandes familles :  $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\beta$ ,  $\omega$  (Yaphe, 1972 ; Anderson *et al.*, 1969 ; Rees *et al.*, 1969 ; Greer *et al.*, 1984).

Les différentes familles (figure 1) de carraghénane sont présentées dans le tableau I suivant :

**Tableau I.** Les différentes familles de carraghénane.

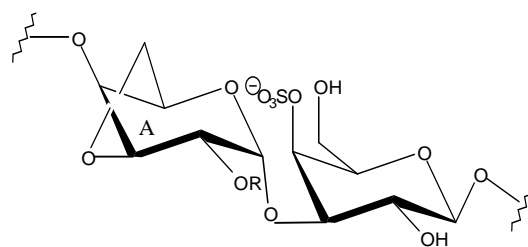
Familles	Position de sulfate	Carraghénanes présents
Kappa ( $\kappa$ )	C4.	$\kappa$ , $\iota$ , $\mu$ , $\nu$ -carraghénanes
Lambda ( $\lambda$ )	C2.	$\lambda$ , $\epsilon$ , $\theta$ , $\pi$ -carraghénanes
Bêta ( $\beta$ )	ne sont pas sulfatés	$\beta$ , $\gamma$ , $\alpha$ , $\delta$ -carraghénanes
Omega ( $\omega$ )	C6.	$\omega$ -carraghénane



R = H,  $\mu$ -carraghénanes

R =  $\text{SO}_3^-$ ,  $\nu$ -carraghénanes

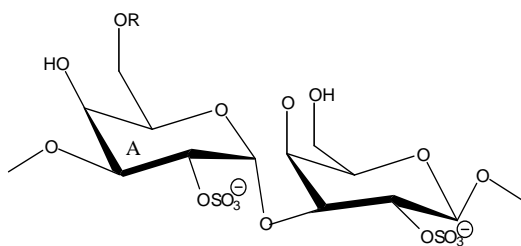
$\mu, \nu$ -carraghénanes



R = H,  $\kappa$ -carraghénanes

R =  $\text{SO}_3^-$ ,  $\iota$ -carraghénanes

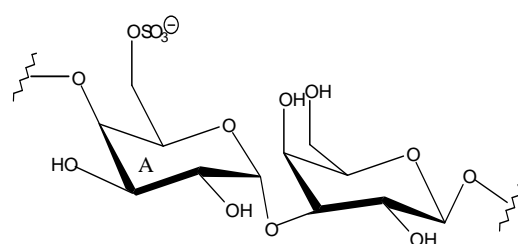
$\kappa, \iota$ -carraghénanes



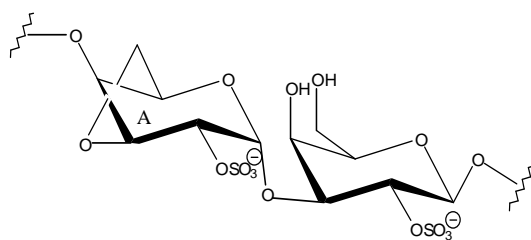
R = H,  $\epsilon$ -carraghénanes

R =  $\text{SO}_3^-$ ,  $\lambda$ -carraghénanes

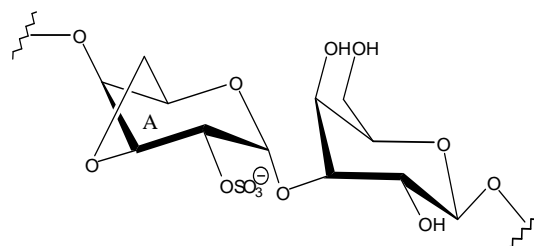
$\epsilon$ - $\lambda$ -carraghénanes



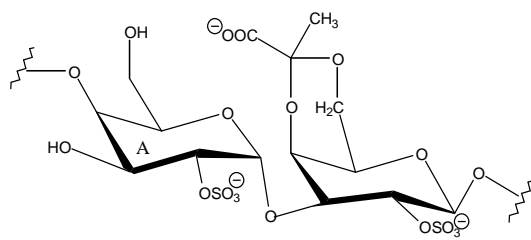
$\gamma$ -carraghénane



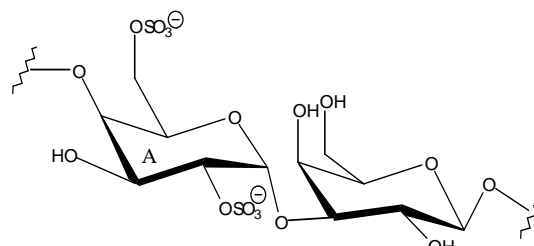
$\theta$ -carraghénane



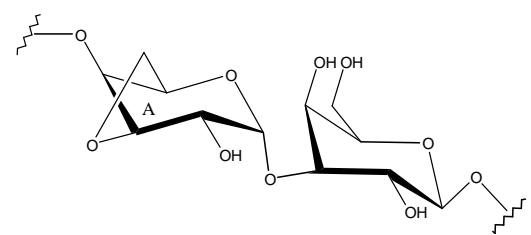
$\alpha$ -carraghénane



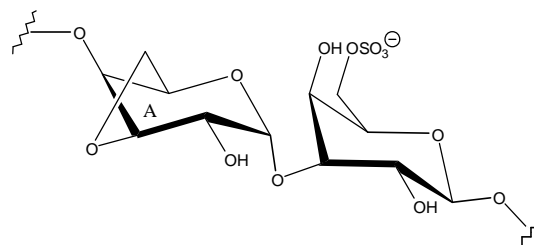
$\pi$ -carraghénane



$\delta$ -carraghénane



$\beta$ -carraghénane



$\omega$ -carraghénane

**Figure 1.** Différents types des carraghénanes.

### A-3-1.2. Utilisations des carraghénanes

Le tableau II ci-après présente quelques exemples de leurs utilisations courantes.

**Tableau II.** Importance industrielle des carraghénanes.

<b>Branche d'activité humaine</b>	<b>Propriétés</b>
Industrie alimentaire	Emulsionnant dans les pâtisseries, confiseries
Elevage et agriculture	Adjuvant favorable à la croissance dans l'alimentation du bétail et des volailles, engrais
Industrie cosmétique	Emulsionnant
Industrie pharmaceutique	Efficacité dans les ulcères gastriques et duodénaux, laxatifs
Agro-alimentaire	Gélifiant, stabilisant, épaississant
Papeterie	Peintures et vernis
Photographie	Fabrication de films

### **B- TRAVAUX ANTERIEURS sur le genre *Plocamium***

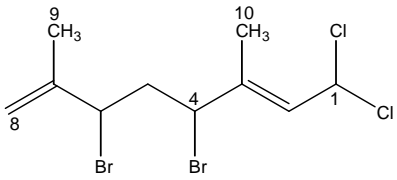
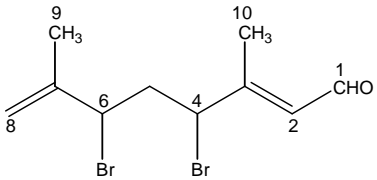
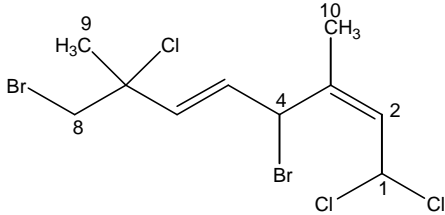
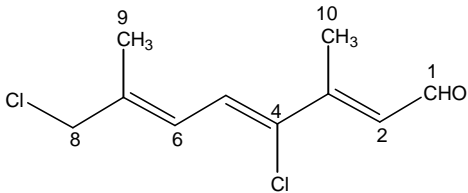
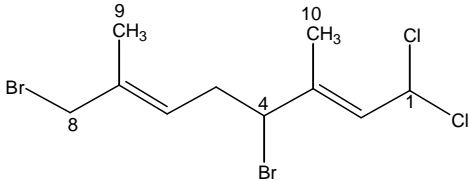
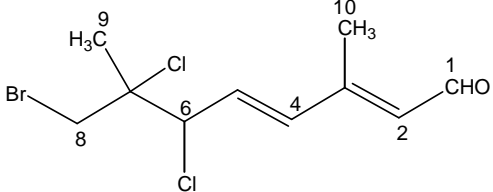
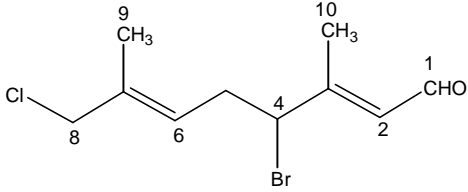
Comme d'autres produits de la mer, les algues ont jouées un rôle thérapeutique vis à vis de certaines affections (Whyte *et al.*, 1984). Elles montrent une gamme d'activité biologique : anticoagulante, antibactérienne, antitumorale, antivirale, hypocholéstérolémiant (Dominique, 1998), antimicrobienne (Kônig *et al.*, 1999), insecticide (San-Martin *et al.*, 1991 ; Argandona *et al.*, 2002), antituberculeuse (Kônig *et al.*, 2000), et anticancéreuse (Fuller *et al.*, 1992-1994). Le tableau III suivant montre quelques exemples de leurs activités.

**Tableau III.** Activités de quelques espèces de *Plocamium*.

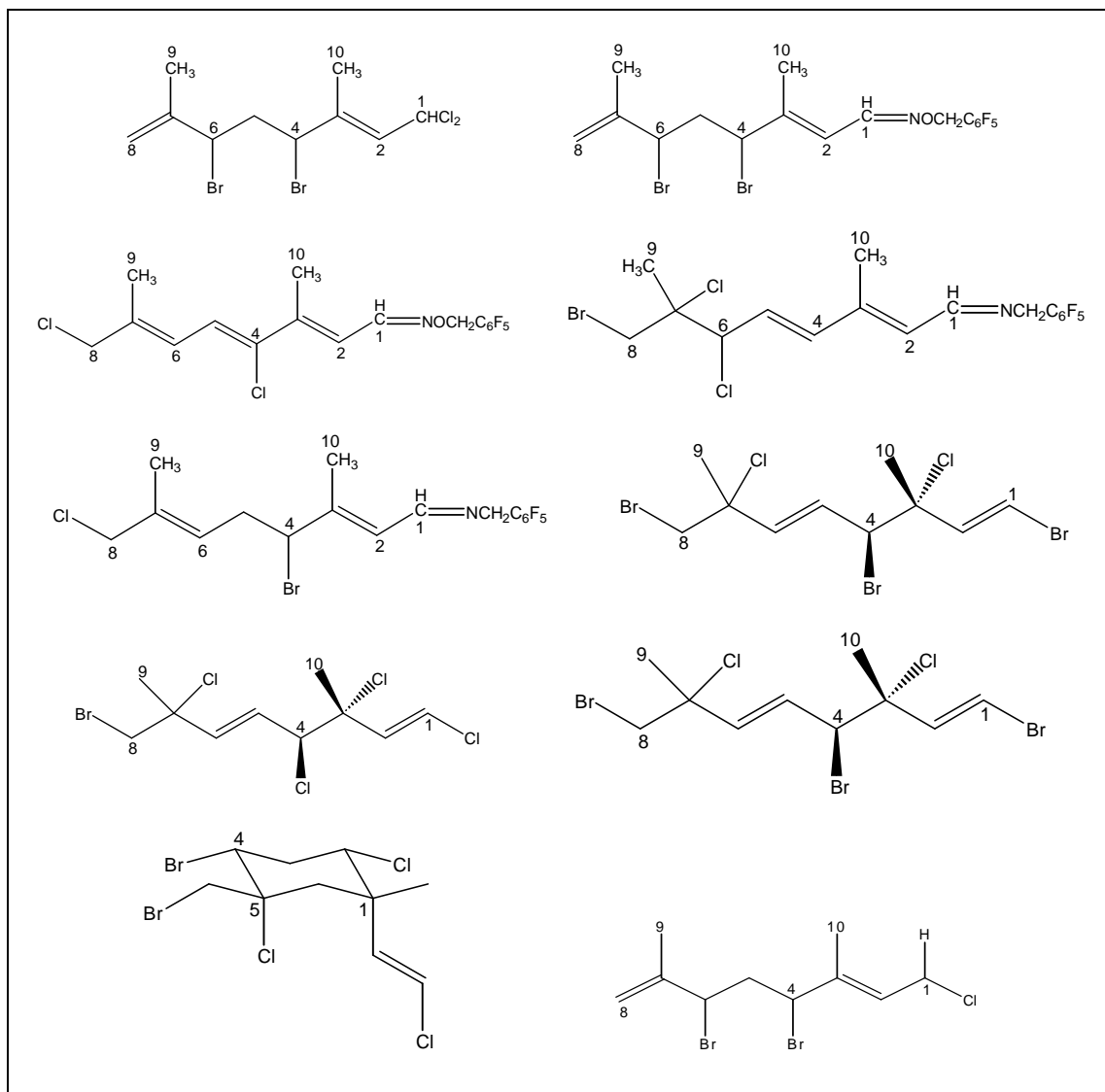
<b>Algues</b>	<b>Activités</b>
<i>Plocamium angustum</i>	Antibacterial, antifungal
<i>Plocamium cartilagineum</i>	Antiretroviral
<i>Plocamium custatum</i>	Sedative, antibacterial
<i>Plocamium hamatum</i>	antitumoral
<i>Plocamium lemtophyllum</i>	Antiherpetic, anti- HIV
<i>Plocamium mertensii</i>	Sedative, anticonvulsant
<i>Plocamium telfairia</i>	Antiherpetic, anti-HIV
<i>Plocamium violaceum</i>	Antiretroviral

Plus récemment, Knott *et al.* (en 2005) et Mann *et al.* (en 2007), ont entrepris des études préliminaires sur les constituants chimiques de *Plocamium corallorhiza*, récoltés en Afrique du Sud, en Mars 2002, et en Janvier 2006. Les composés obtenus sont présentés dans le tableau IV suivant.

**Tableau IV.** Composés isolés de *Plocamium corallorhiza*.

Knott <i>et al.</i> , 2005	Mann <i>et al.</i> , 2007
 <p>4,6-Dibromo-1,1-dichloro-3,7-diméthylocta-2,7-diène</p>	 <p>4,6-Dibromo-3,7-diméthylocta-2,7-dièneal</p>
 <p>4,8-Dibromo-1,1,7-trichloro-3,7diméthylocta-2,5-diène</p>	 <p>4,8-Dichloro-3,7-diméthylocta-2,4,6-trièneal</p>
 <p>4,8-Dibromo-1,1-dichloro-3,7diméthylocta-2,6-diène</p>	 <p>8-Bromo-6,7-dicloro-3,7-diméthylocta-2,4-dièneal</p>
	 <p>4-Bromo-8-chloro-3,7-diméthylocta-2,6-dièneal</p>

Stierle *et al.*, 1979 ; Ireland *et al.*, 1976 ; Higgs *et al.*, 1977 ont également identifié d'autres constituants chimiques de *Plocamium corallorhiza* :





# **MATERIELS ET METHODES**

## A. MATERIEL VEGETAL

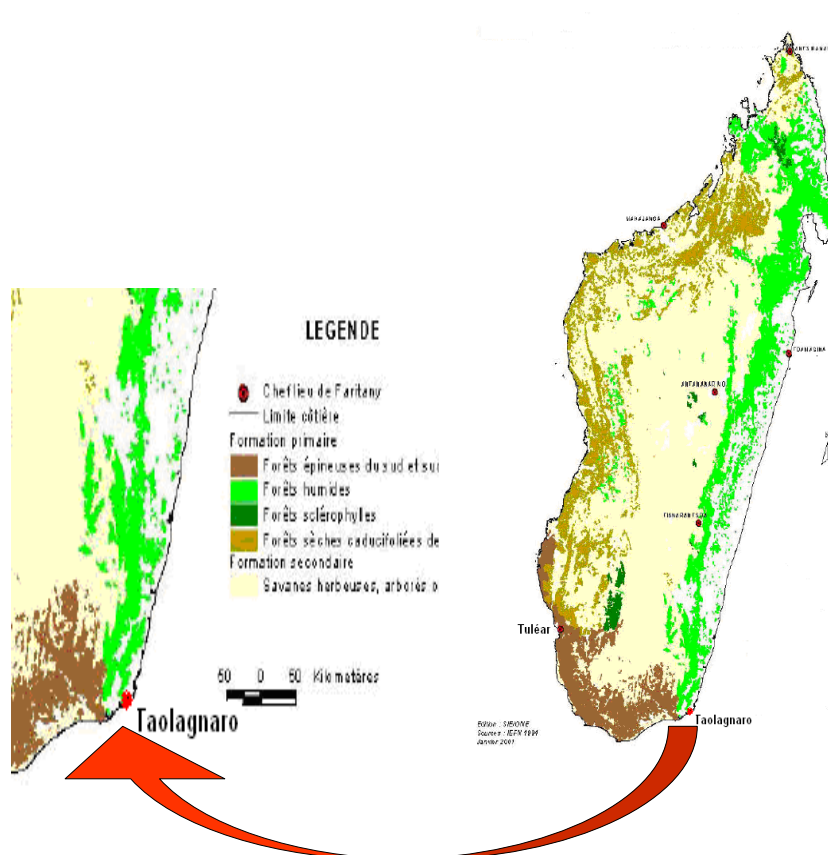
### A. 1. Collecte

Les collectes ont été réalisées durant la marée basse, période à laquelle les algues émergent à la surface de l'eau de mer, et peuvent être facilement arrachées des rochers, leur support. Une partie représentative de chaque échantillon d'algues fraîches a été immédiatement fixée pour la constitution d'un herbier.

Notre échantillon d'algue rouge *Plocamium corallorhiza* a été collecté par les équipes du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME) du Centre National de Recherche sur l'Environnement (CNRE) en 2004. L'échantillon d'algue (figure 2) a été collecté au Sud-Est de Madagascar, dans un petit village au Nord de Fort-Dauphin (figure 3), à Evatraha. Un alguier est disponible au Laboratoire du CNRE.



**Figure 2.** *Plocamium corallorhiza*.



**Figure 3.** Localisation de la collecte.

## A.2. Description botanique

Les données systématiques de l'échantillon d'algues rouges étudiées sont résumées dans le tableau V suivant :

**Tableau V.** Données systématiques.

<b>Classe</b>	Rhodophyceae
<b>Division</b>	Rhodophyta
<b>Ordre</b>	Gigartinales
<b>Famille</b>	Plocamiaceae
<b>Genre</b>	<i>Plocamium</i>
<b>Espèce</b>	<i>Corallorhiza</i>

## **B. MATERIELS ET APPAREILS UTILISES**

### **B.1. Pesée**

Les différentes pesées ont été effectuées à l'aide des deux types de balances :  
High Presion balance excell 9VDC/1300 mA BH-1500, Cap : 1500 g/ Div. 0,05 g.  
Precisa XT 220A de portée maximale 220 g, à  $10^{-4}$  près.

### **B.2. Séchage**

Tout séchage a été réalisé à l'aide d'une étuve universelle BINDER.

### **B.3. Broyage**

L'échantillon d'algue a été broyé à l'aide d'un broyeur électrique.

### **B.4. Centrifugation**

Les centrifugations ont été réalisées à l'aide d'une centrifugeuse SIGMA, réglée à la vitesse de 1000 rpm.

### **B.5. Agitation**

Les agitations ont été effectuées soit à l'aide d'un agitateur magnétique Fisherbrand HOTPLATE STIRRER Model L-81, Heidoph MR 3000.

### **B.6. Evaporation**

Un évaporateur rotatif BUCHI type R200 a été utilisé pour concentrer ou sécher les extraits.

### **B.7. Filtration**

Les différents filtrations ont été effectuées par à l'aide d'une filtre Buchner et papier filtre Whatman<sup>R</sup> Cat no 1001 110, 110mm de diamètre.

### **B.8. Dialyse**

Pour la dialyse, des morceaux de boudin de dialyse d'une longueur approximative de 25cm ont été utilisés.

### **B.9. Dosage colorimétrique**

Les mesures de densité optique lors des différents dosages colorimétriques ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre UV.BIOMATE.

### **B.10. Chromatographie sur couche mince**

Plaque C.C.M utilisé : 25 DC – Alufolié Kieselgel 60 F<sub>254</sub> MERCK, art 5568 d'épaisseur 0,2mm.

- **Observation sous UV**

Les dépôts et les taches ont été observés sous UV à l'aide d'une lampe de WOOD VL – 4 LC aux longueurs d'onde  $\lambda=254$  nm et 365 nm.

- **Révélation**

Les taches ont été révélées par pulvérisation de réactif à la vanilline sulfurique suivi de chauffage.

### **B.11. Chromatographie Liquide à Basse Pression**

Colonne utilisée :

Diamètre intérieur de 2,3cm

Diamètre extérieur de 2,5cm

Hauteur de 50cm

Hauteur effective de 17cm

Adsorbant (ou phase stationnaire): ACROS ORGANICS 27,5080g de silicagel, for column chromatography 0,035-0,070mm, pore diameter Ca 6nm.

### **B.12. Infrarouge**

Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés sur un spectrophotomètre FTIR-8400S SHIMADZU.

## C. METHODES

### C.1. Traitement préalable des échantillons d'algues

#### C.1.1. Lavage

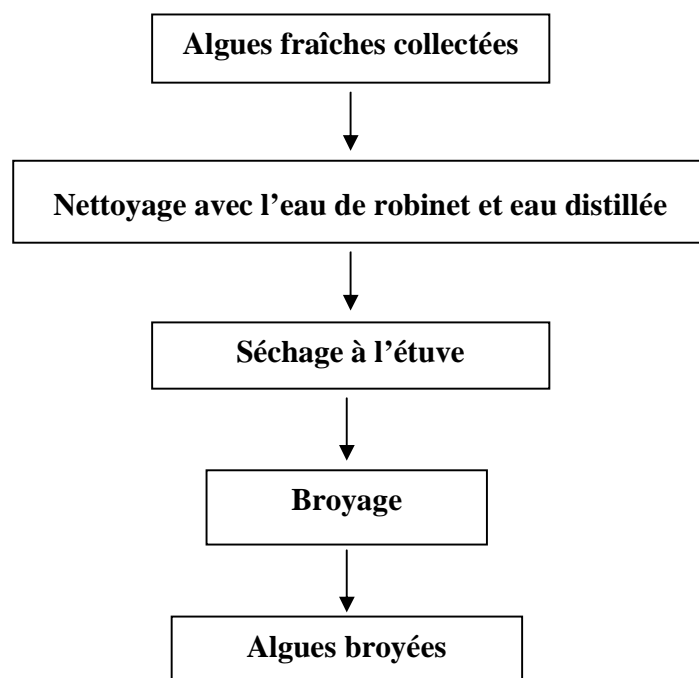
Avant toute opération, il est nécessaire d'éliminer toutes les impuretés possibles, telles que les sels, sable, coquilles, les algues parasites, etc. qui souillent les échantillons d'algues. A cet effet, on procède à leur lavage à l'eau, lequel est suivi d'un séchage à l'étuve (Greer *et al.*, 1984 ; Andriamanantoanina *et al.*, 1996).

Les échantillons d'algues ont été lavés abondamment à l'eau, rincés à l'eau distillée puis séchés à l'étuve 50°C avant d'être finement broyés. (Alexeev, 1980 ; Greer *et al.*, 1984 ; Mollion, 1988).

#### C.1.2. Broyage

Les échantillons ont été broyés afin d'optimiser le contact entre les prises d'essai et les solvants lors des diverses opérations ultérieures. Un fin broyage est requis pour améliorer le rendement de ces derniers (Alexeev, 1980).

Le prétraitement effectué aux échantillons d'algues est présenté dans la figure 4 suivante.



**Figure 4.** Prétraitement des échantillons d'algues.

## **C.2. Méthodes d'analyse des polysaccharides**

### **C.2.1. Extraction du carraghénane**

On effectue trois extractions différentes : chaque extraction s'effectue en deux étapes :

#### **➤ Première voie d'extraction**

Elle porte sur la poudre de *Plocamium corallorhiza*.

##### **Première étape : Extraction à froid ou « Cold Extract » :CE**

10,083g de poudre de *Plocamium corallorhiza* sont macérées dans 150 à 400ml d'eau distillée, sous agitation pendant une nuit. On filtre à l'aide d'une voile propre pour séparer la solution ou cold-extract de la plus grosse partie des débris. Le filtrat est ensuite passé sous pression sur papier filtre WHATMAN 589/1 de 110mm de diamètre.

On le concentre sur évaporateur rotatif, puis précipité par 4 volumes d'éthanol 90° pendant 24h à 4°C. On centrifuge et le précipité est laissé à sécher à l'étuve à 60°C.

##### **Deuxième étape : Extraction à chaud ou « Hot Extract » :HE**

Le résidu récupéré après filtration du cold-extract est dépigmenté trois fois avec 60 à 200ml d'acétone et une fois avec de l'éthanol bouillante. Après chaque traitement, on centrifuge à l'aide d'une centrifugeuse SIGMA pendant 15 à 20minutes.

Le dépôt, rincé à l'eau distillée est placé dans 150 à 500ml d'eau distillée à 100°C pendant trois heures avec reflux. La décoction encore chaude subit les mêmes traitements (filtrations) que précédemment. Cette extraction à 100°C est réalisée trois fois pour le même résidu. Les filtrats très bien mélangés sont ensuite congelés une nuit à -20°C puis décongelés pour éliminer la majeure partie des impuretés solubles.

Ils sont précipités par quatre volumes d'éthanol 90° pendant 24 heures et séchés à l'étuve à 60°C.

#### **➤ Deuxième voie d'extraction**

Elle porte sur le résidu de *Plocamium corallorhiza* obtenu après extractions successives à l'hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol de la poudre.

### **Première étape : Extraction à froid ou « Cold Extract » : CE**

10,083g de résidu de *Plocamium corallorhiza* sont macérés dans 150 à 500ml d'eau distillée, sous agitation pendant 24 heures. On procède au même protocole que lors de la 1<sup>ère</sup> étape de la 1<sup>ère</sup> voie d'extraction.

### **Deuxième étape : Extraction à chaud ou « Hot Extract » : HE**

Après dépigmentation et extraction à chaud, les filtrats bien mélangés sont divisés en deux lots :

L'un est précipité par 4V d'EtOH pendant 24h à 4°C. On centrifuge et le précipité est laissé à sécher à l'étuve à 60°C.

L'autre lot est précipité à l'aide d'une solution aqueuse de Bromure de cetyltriméthylammonium, communément appelé CTAB ou cétaïlon, à une concentration de 2%, puis laissé au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures. Le précipité est séparé du liquide surnageant après centrifugation (2.000 tours par minute, pendant 30 minutes).

Le précipité est par la suite lavé deux fois avec de l'eau distillée. Le CTAB est déplacé à l'aide d'une quantité suffisante d'éthanol 90°C saturé de l'acétate de sodium NaHCO<sub>3</sub> (3 fois). L'acétate de sodium est éliminé en rinçant le précipité avec de l'éthanol bouillant (2 fois), suivis de centrifugation. L'extrait est séché à l'étuve BINDER 50°C.

#### **➤ Troisième voie d'extraction**

10,083g de résidu d'algues rouges de *Plocamium corallorhiza*, récupérées après extraction fractionnée à l'hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol, ont été traitées successivement par (3 x 20 ml) d'acétone, (1 x 20ml) d'éthanol bouillant et (1 x 20ml) d'acétate d'éthyle.

### **Première étape : Extraction à froid ou « Cold Extract » : C.E.**

Les poudres d'algues dépigmentées ont été soumises à une première extraction par simple macération à l'eau distillée de 100 à 500 ml, sous agitation magnétique pendant 24 h et à température ambiante. Le résidu insoluble a été récupéré par filtration sur voile de tergal. Une deuxième filtration sur papier filtre WHATMAN a été nécessaire pour une meilleure extraction (Santos, 1980 ; Greer *et al.*, 1984; Greer 1984).



Les carraghénanes ont été obtenus par précipitation du filtrat ci-dessus avec quatre volumes d'éthanol 90°, pendant 24h, à 4°C. Le précipité a été récupéré après une centrifugation, puis un séchage à l'étuve 40°C. Les polysaccharides de faible poids moléculaire ont été ainsi extraits. Le rapport entre la masse de l'extrait et celle de la prise d'essai donne le rendement en CE (Mollion, 1988).

#### **Deuxième étape : Extraction à chaud ou « Hot Extract »: H.E.**

Les résidus d'algues de l'opération C.E. précédente (7,7833 g) sont traités par 300 ml de solution aqueuse de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,5 N, au bain-marie 90°C, pendant 2 heures, en agitant de temps en temps. Les constituants non solubles sont éliminés en filtrant la solution obtenue, à chaud et sous vide, deux fois sur de la célite 545 PROLABO. Le filtrat est laissé refroidir (Santos, 1980 ; Greer *et al.*, 1984; Greer 1984).

Les carraghénanes sont précipités à l'aide de 50 ml de CTAB 2%, puis laissés au réfrigérateur à 4°C, pendant 24 heures.

Le précipité est séparé du liquide surnageant après centrifugation (2. 000 tours par minute), pendant 30 minutes.

Il est ensuite lavé deux fois avec 30 ml d'eau distillée. Le CTAB est déplacé à l'aide l'une quantité suffisante d'éthanol 90°C saturé de l'acétate de sodium  $\text{NaHCO}_3$  (3 fois). L'acétate de sodium est éliminé en rinçant le précipité avec de l'éthanol bouillant (2 fois), suivis de centrifugation.

L'extrait est par la suite dissous à chaud dans de l'eau distillée chaude, dialysé puis séché à l'étuve 50°C, pendant 24 heures. Après refroidissement dans un dessicateur, le résidu est pesé pour le calcul du rendement (Mollion, 1988).

#### **C.2.2. Dialyse**

La dialyse est une technique qui permet de séparer les substances d'une solution en utilisant leur capacité respective à franchir les pores calibrés d'une membrane artificielle appelée membrane de dialyse. Grâce à sa perméabilité sélective, ce boudin de dialyse permet de séparer les petites molécules des grosses en permettant le phénomène de la diffusion. Ainsi, la membrane sépare deux solutions de différentes concentrations. Les solutés diffusent de la solution la plus concentrée vers la solution la plus diluée. La diffusion s'arrête lorsque les

concentrations dans ces deux compartiments sont égales. Les facteurs qui peuvent influencer la vitesse de la dialyse sont : la température, le diamètre des pores de la membrane, le pH, le temps de contact, et la différence de concentration entre les deux compartiments (Ibrahim, 2005).

La membrane de dialyse ou boudin contient de la glycérine, des composés sulfureux et des métaux lourds. Ces constituants présents à la surface membranaire doivent être éliminés. La technique usuelle consiste à bouillir la membrane dans l'eau distillée pendant 15 minutes.

Un volume déterminé de polysaccharide (HE de la 1<sup>ère</sup> extraction) à dialyser est versé dans une portion de boudin à dialyse dont une extrémité est fermée par un nœud. Un deuxième nœud est ensuite confectionné à l'autre extrémité en prenant soin de laisser suffisamment de place entre ce nœud et la surface supérieure de l'extrait. Cette précaution est prise pour éviter l'éclatement du boudin par augmentation de volume interne de la solution de polysaccharide. La membrane est ensuite immergée dans l'eau distillée (liquide de contre dialyse), en agitant de temps en temps afin d'éviter la formation d'un gradient de concentration des substances diffusibles au voisinage du boudin. Ce liquide est renouvelé fréquemment pour accélérer la diffusion et maintenir la différence de concentration entre l'intérieur et l'extérieur du boudin (Ibrahim, 2005).

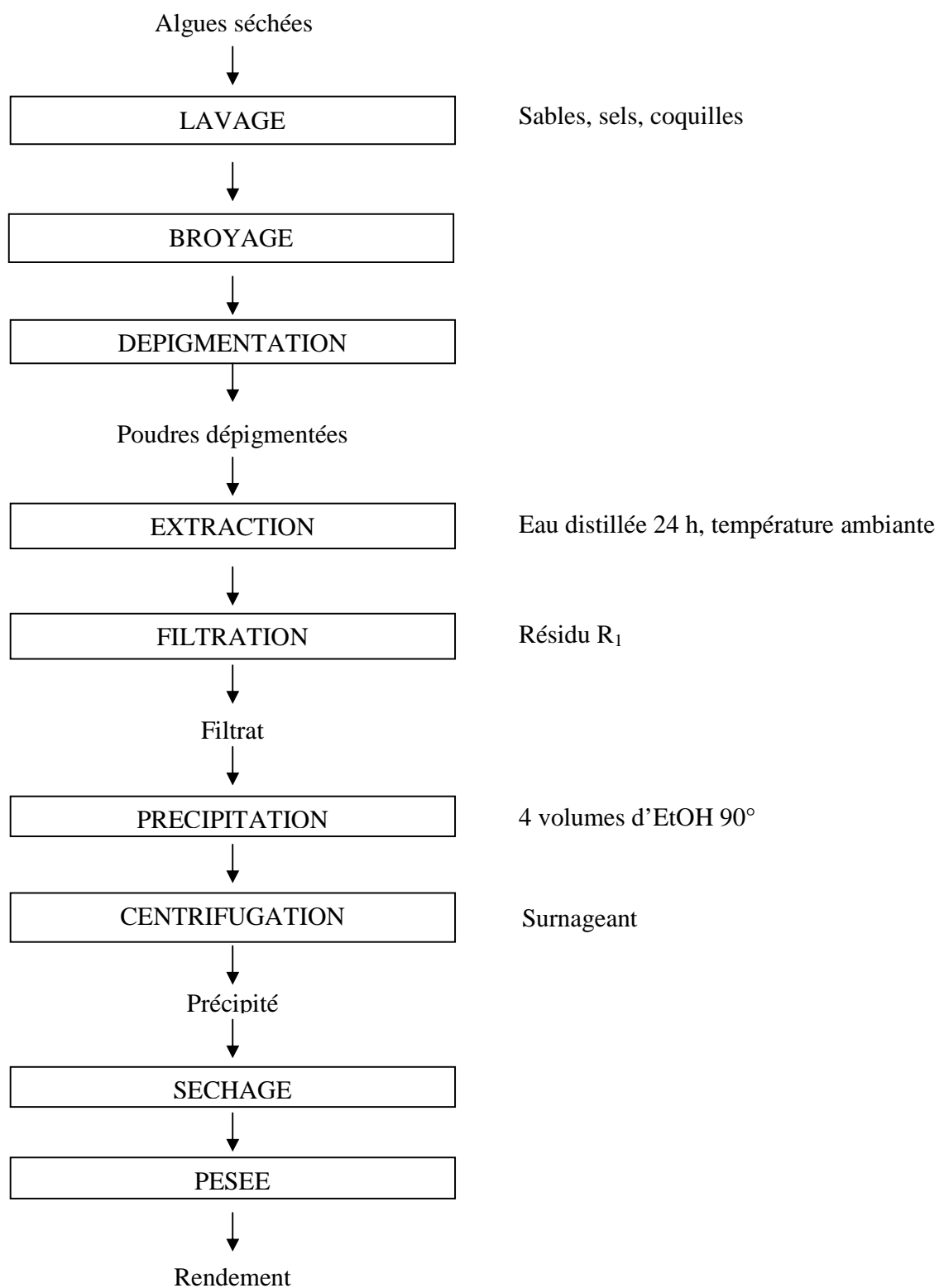
### **C.2.3. Récupération des carraghénanes**

Les polysaccharides ont la propriété de former un précipité, soit en présence d'un excès d'alcool (3 à 10 volumes) soit par action d'un sel d'ammonium quaternaire. La précipitation du carraghénane, soit par l'éthanol, soit par le propanol-2 (Mollion, 1988), soit par le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB ou cétavlon), permet de le récupérer d'une solution aqueuse contenant divers extraits hydrosolubles.

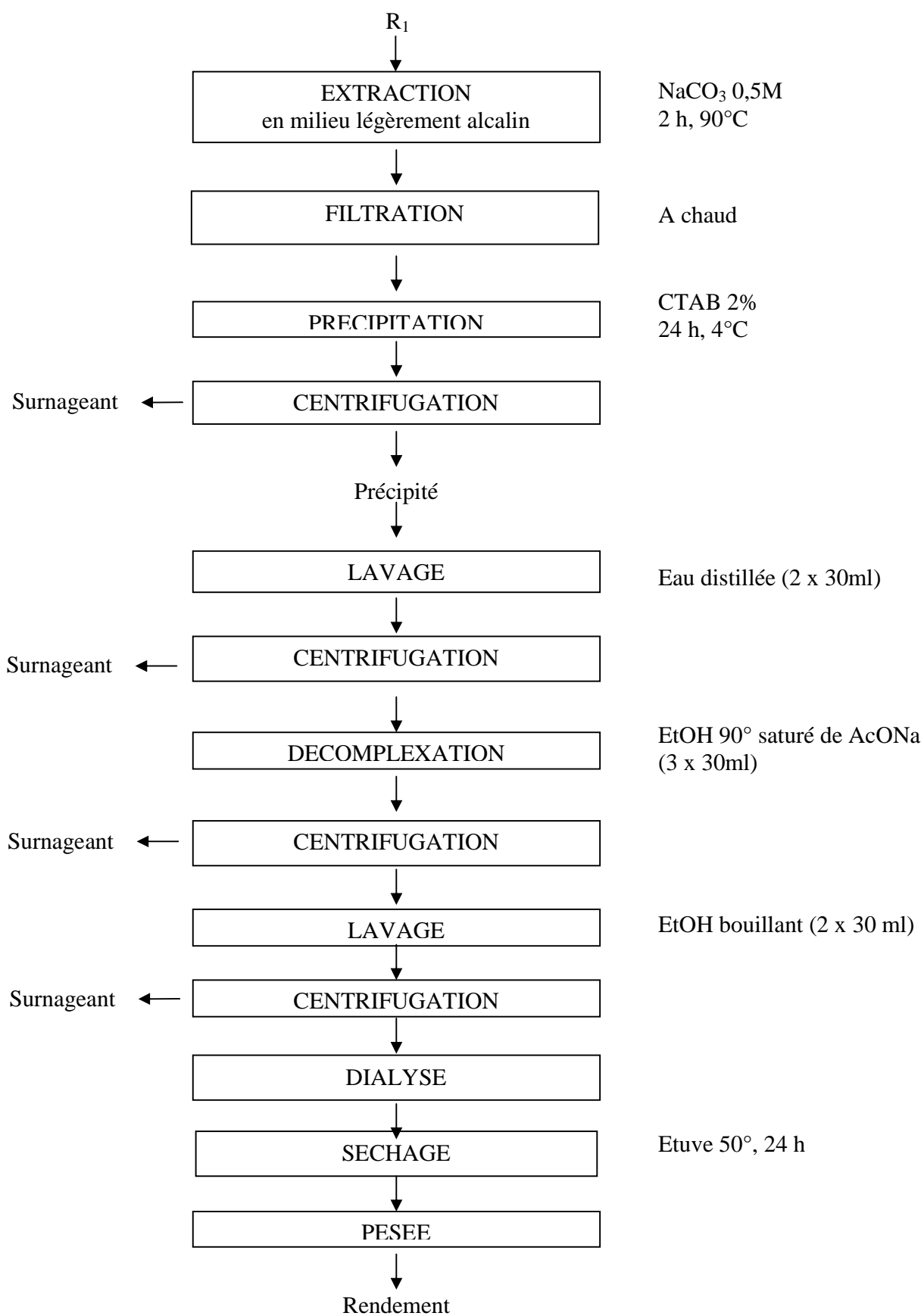
Lorsque la quantité d'éthanol augmente, on arrive à précipiter même les polysaccharides de faible masse moléculaire.

Un sel d'ammonium quaternaire précipite sélectivement les polysaccharides chargés. La précipitation par le CTAB est généralement plus sélective que celle par l'éthanol (Bellion *et al.*, 1983).

Les protocoles d'extraction relatifs à C.E. et H.E. sont résumés dans les figures 5 et 6 suivantes :



**Figure 5.** Extraction à froid « Cold Extract ».



**Figure 6.** Extraction à chaud « Hot Extract ».

## C.2.4. Dosages colorimétriques

### C.2.4-1. Dosage des sucres totaux

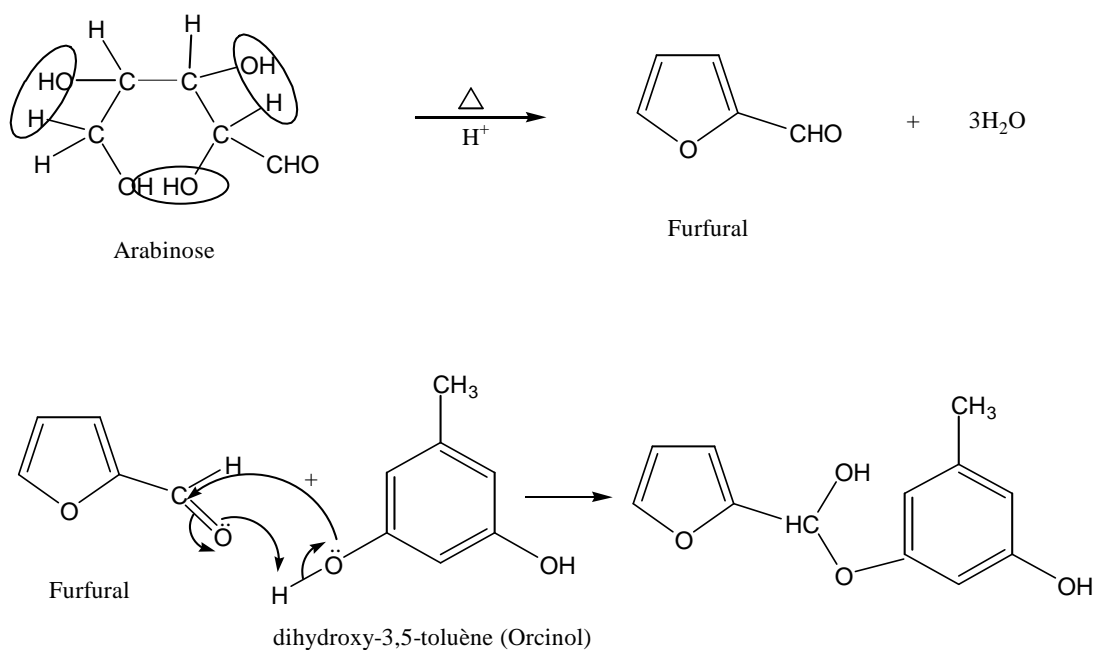
En milieu sulfurique et à chaud, les oses neutres donnent des dérivés furfurals qui se condensent avec l'orcinol pour donner un complexe de couleur brun jaune.

Les termes « sucres totaux » ou « oses neutres » sont utilisés pour désigner les monosaccharides neutres entrant dans la composition des polysaccharides. Trois méthodes sont couramment utilisées pour ce dosage (Tillmans *et al.*, 1929 ; Dubois *et al.*, 1956 ; Montreuil, 1963 ; Yaphe, 1972).

-A l'orcinol TILLMANS et PHILLIPI

-A l'enthron DREYWOOD

-Au phénol DUBOIS *et al.*



Nous avons utilisé la méthode au Phénol sulfurique (Mollion, 1988).

#### a) Préparation des solutions

##### ➤ Réactifs

Solution aqueuse de Phénol 50% (m/v)

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré.

➤ **Gamme étalon**

Solution de galactose 200, 100, 50µg/ml.

➤ **Solution de référence.**

Eau distillée (ED)

➤ **Solution à doser.**

Solution de carraghénane CE et HE : 200µg/ml.

*b) Mode opératoire*

Dans des tubes à essai, on a mis successivement :

- 200µl d'ED de la solution étalon ou de solution à doser (à l'aide d'une micropipette),
- 200µl de la solution phénolique (5%),
- addition brutale de 1ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré à l'aide d'une burette ;
- agitation rapide (à l'aide d'un vortex) ;
- 5mn au bain-marie 100°C ;
- refroidissement 30mn à l'obscurité ;
- Mesure de DO : La lecture des DO a été réalisée à la longueur d'onde  $\lambda=492$  nm à l'aide d'un spectromètre UV BIOMATE.

*b) Calcul*

La teneur en sucres totaux est donnée par la formule suivante :

$$\text{Teneur en sucres totaux (\%)} = \frac{[\text{galactose}]}{[\text{échantillon}]} \times 100$$

Avec : [Galactose] : concentration en galactose obtenue par projection de la densité optique (DO) sur la courbe d'étalonnage en µg/ml.

[Échantillon] : concentration en polysaccharides de la solution à doser en µg/ml.

Remarque :

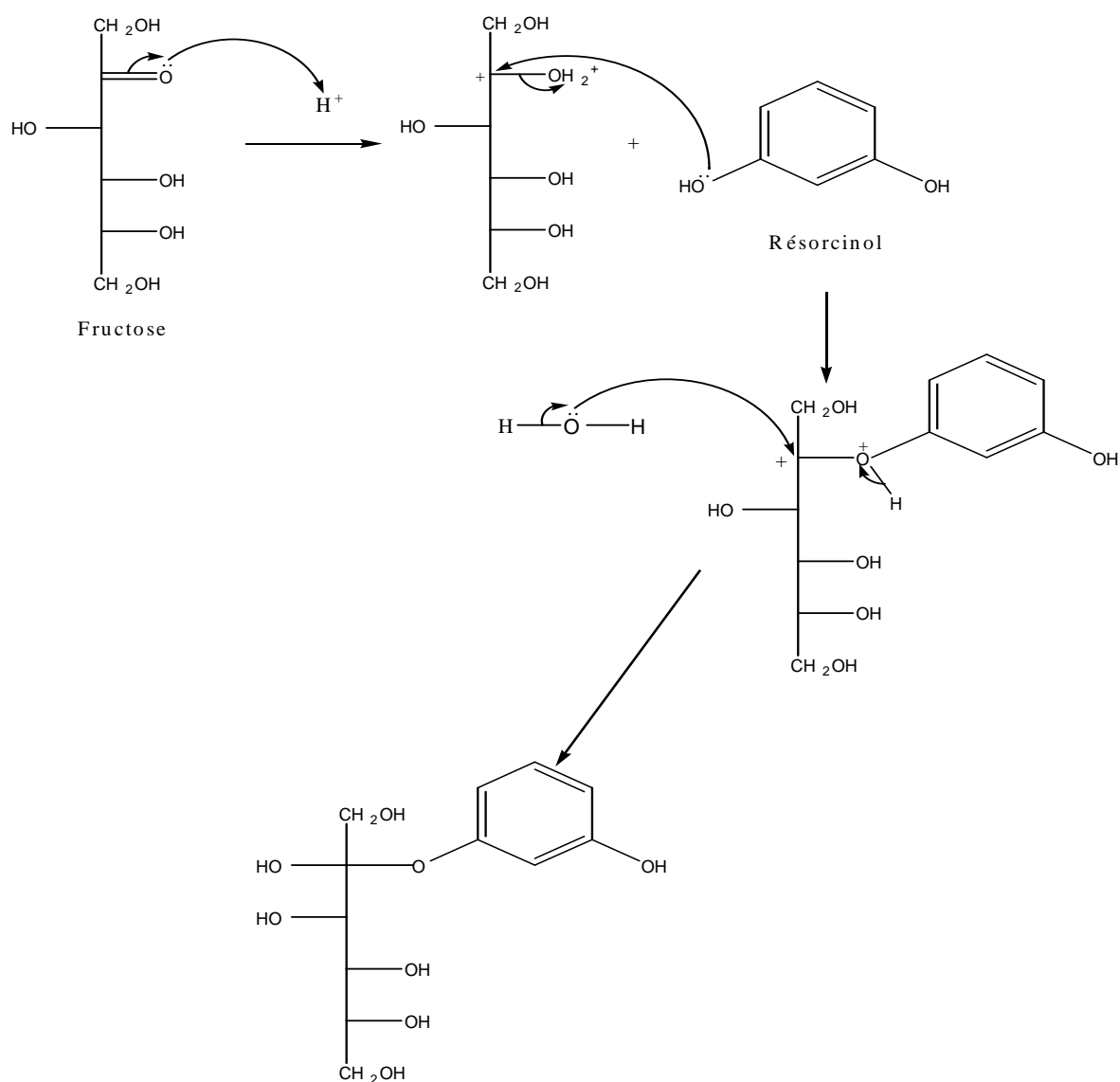
Les courbes d'étalonnage ont été tracées en utilisant la méthode de barycentres

DO = f (concentration).

### C.2.4-2. Dosage des 3', 6'- Anhydrogalactoses

Les 3', 6'- Anhydrogalactoses, sous l'action du résorcinol en milieu acide, donnent une coloration intense.

Une absorbance maximale à 555 nm est obtenue par ajout de l'acétaldéhyde. Le fructose est pris comme échantillon de référence. La réponse colorimétrique du 3', 6'- Anhydrogalactose est de 92% par rapport à celle du fructose (Yaphe, 1960 ; Yaphe *et al.*, 1965 ; Arsenault *et al.*, 1965 ; Arsenault *et al.*, 1966).



*a) Préparation des solutions*

➤ **Réactifs**

Acétaldéhyde 0,822g/100ml d'H<sub>2</sub>O (A)

Résorcinol 150mg/100ml d'H<sub>2</sub>O (B).

➤ **Gamme étalon :**

Solution aqueuse de Fructose de : 0,15 ; 0,10 ; 0,05μM/ml.

➤ **Solution de référence :**

Eau distillée (ED).

➤ **Solution à doser :**

Solution de carraghénane CE et HE : 1mg/ml.

*b) Mode opératoire*

- Dilution 25 fois de (A)=2,78μM/ml (A')
- Solution (C) : 9ml de (B) + 1ml de (A') dans 100ml d'HCl concentré.

Dans les tubes refroidis dans un bain de glace, on a versé successivement :

- 200μl de la solution à doser ou eau distillée ou étalon ;
- 1ml de (C), le mélange limpide est agité au vortex, puis
- laissé refroidir dans la glace ;

Le tout est porté au bain-marie 80°C 10mn

La coloration du mélange est devenue rouge violacée. L'intensité de la coloration augmente avec la teneur en fructose.

- les tubes sont ensuite remis dans de la glace pendant 15 minutes.
- Mesure de DO : La lecture des DO a été réalisée à la longueur d'onde  $\lambda=555\text{nm}$ .

*c) Calculs de la teneur en 3',6'-anhydrogalactose*

➤ **Résultats par rapport au Fructose**

Correction à 92 % car le 3',6'-anhydrogalactose répond à 92 % par rapport à la réponse du Fructose :

$$[3',6'\text{-Agal}] = \text{teneur en Fructose } (\mu\text{M/ml}) \times 180 \times 0,92.$$



D'où

$$\text{Teneur en 3',6'-Agal (\%)} = \frac{[3',6'\text{-Agal}]}{[\text{Echantillon}]} \times 100$$

Avec [3',6'-Agal] : concentration en 3',6'-anhydrogalactose (µg/ml).

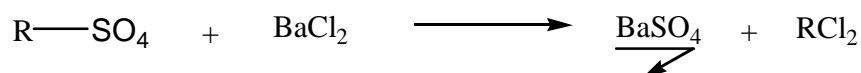
[Echantillon] : concentration en polysaccharide de la solution à doser (µg/ml).

#### C.2.4-3. Dosage des sulfates

Les carraghénanes subissent une hydrolyse totale par l'acide chlorhydrique. Ensuite, les ions sulfates vont être précipités par le BaCl<sub>2</sub>. Les quantités précipitées sont évaluées par turbidimétrie à l'aide d'un spectromètre UV. C'est la méthode à la gélatine/BaCl<sub>2</sub> de TABATABAI (Tabatabai, 1974 ; Mollion, 1988).

Les ions sulfates libérés peuvent être doser par une autre méthode : celle au rhodizionate. Ceci procède par précipitation du sulfate à l'aide de la benzidine, diazotation et dosage colorimétrique du précipité de benzidine (Tuulikki *et al.*, 1971).

Nous avons utilisé la méthode à la gélatine/BaCl<sub>2</sub> (Tabatabai, 1974 ; Andriamanantoanina, 1992).



##### a) Préparation des solutions

L'eau distillée utilisée a été désionisée. En effet, il faut éliminer toute trace d'ions notamment SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> qui risque de fausser les résultats des dosages. Tous les matériels utilisés sont également lavés préalablement avec de l'eau distillée désionisée.

##### ➤ Réactifs

- Solution d'HCl 0,5 N

- Réactif à la gélatine/BaCl<sub>2</sub>:

0,3g de gélatine en poudre sont dissous dans 100ml d'eau distillée, laissés une nuit à 4°C. Après avoir ramené et laissé la solution à température ambiante pendant 2h, on lui a ajouté 2g de BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O. Puis, elle a été stockée à 4°C, et on la fait sortir 2h avant l'utilisation. La

solution ainsi obtenue reste stable pendant environ une semaine, à condition de la conserver à la température déjà mentionnée.

- **Gamme étalon** :  $K_2SO_4$ , 300-150-75-37,  $5\mu\text{g/ml}$  de  $SO_4^{2-}$ .
- **Solution de référence** : Eau distillée désionisée.
- **Solution à doser** : Solution de carraghénane CE et HE :  $200\mu\text{g/ml}$ .

#### *b) Mode opératoire*

Dans des tubes à essai, on a mis successivement :

- $200\mu\text{l}$  d'eau désionisée ou solution étalon ou de gamme à doser;
- $1,8\text{ml}$  d'eau désionisée ;
- $200\mu\text{l}$  d'HCl  $0,5\text{ N}$ , agitation au vortex
- $100\mu\text{l}$  du réactif Gélatine/ $BaCl_2$ , agitation ;
- 30mn à température ambiante
- Mesure de DO : la lecture des DO a été faite à  $\lambda=550\text{ nm}$

#### *c) Calcul*

La teneur en sulfates est donnée par la formule suivante :

$$\text{Teneur en sulfates (\%)} = \frac{[\text{Sulfate}]}{[\text{Echantillon}]} \times 100$$

Avec  $[\text{sulfate}]$  : concentration en sulfate obtenue par projection de DO sur la courbe d'étalonnage en  $\mu\text{g/ml}$ .

$[\text{Echantillon}]$  : concentration en polysaccharides de la solution à doser en  $\mu\text{g/ml}$ .

### **C.2.5. Méthode physique d'analyse**

#### *Spectroscopie Infrarouge*

La spectroscopie infrarouge fournit des informations quant à la position des groupements sulfates des polysaccharides des algues (Christiaen *et al.*, 1983). Elle permet aussi de prévoir leur concentration ainsi que celle du 3',6'- Agal (Greer *et al.*, 1984 ; Mollion, 1966, Andriamanantoaniana *et al.* 1998).

Le spectre infrarouge est une représentation graphique du pourcentage d'énergie absorbée en fonction de la longueur d'onde ou de la fréquence (Barrett, 1981).

Les positions des bandes d'absorption d'un spectre infrarouge sont repérées soit en longueur d'onde (exprimé en  $\mu$ ), soit en fréquence (exprimée en nombre d'ondes par centimètre) (Rochas *et al.*, 1981).

Les intensités des bandes sont indiquées soit par leur transmission T, soit par leur densité optique A la transmission est le rapport de l'énergie du faisceau infrarouge après traversée de l'échantillon à l'énergie du même faisceau avant l'échantillon (Bellion *et al.*, 1983).

$$A = \log 10 \frac{1}{T}$$

Préparation des films pour la méthode spectrale (ir) :

Les films sont préparés à partir d'une solution de carraghénanes (CE et HE de la 1<sup>ère</sup> extraction) de concentration 1 à 2%(m/v). Cette dernière est placée dans une capsule en polyéthylène et séchée à 55°C (Christiaen *et al.*, 1983 ; Andriamanantoanina *et al.*, 1996).

**Tableau VI.** Conditions opératoires.

Echantillon	Polystyrene Film included in FTIR
Scan mode	Transmittance (%)
Apodisation	Happ-Genzel
Résolution	4 cm <sup>-1</sup>

## C.2.6. Méthode chimique

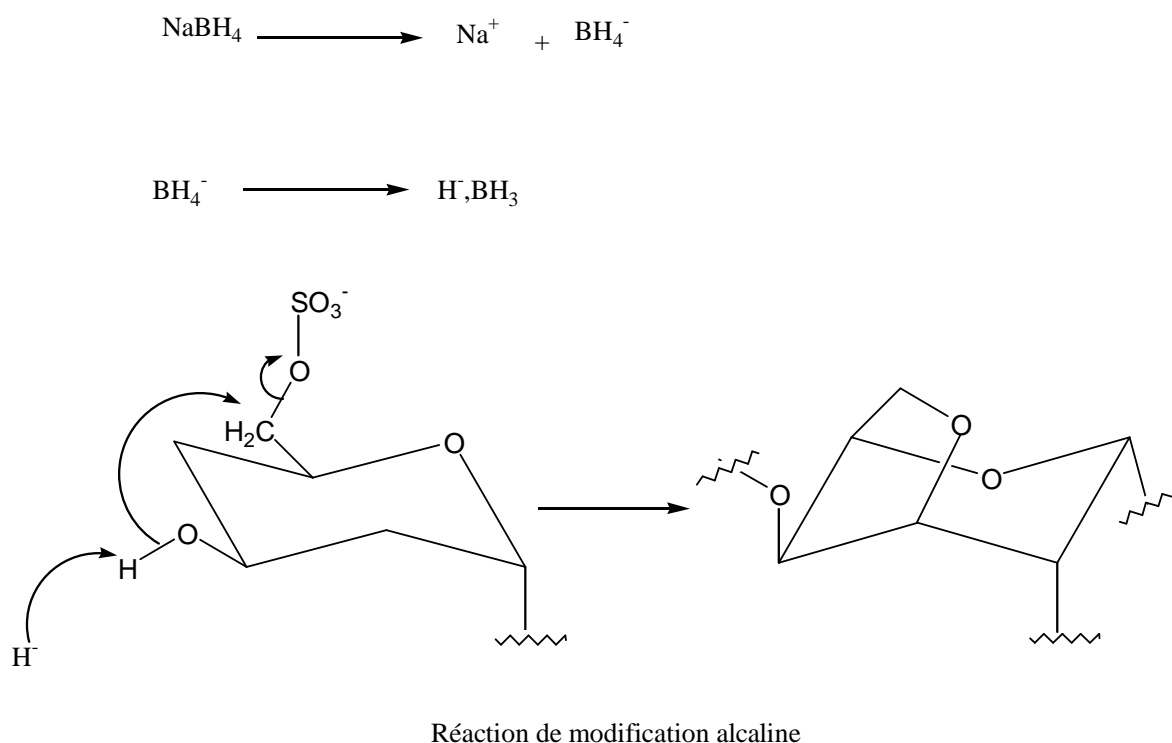
### C.2.6.1. Modification alcaline

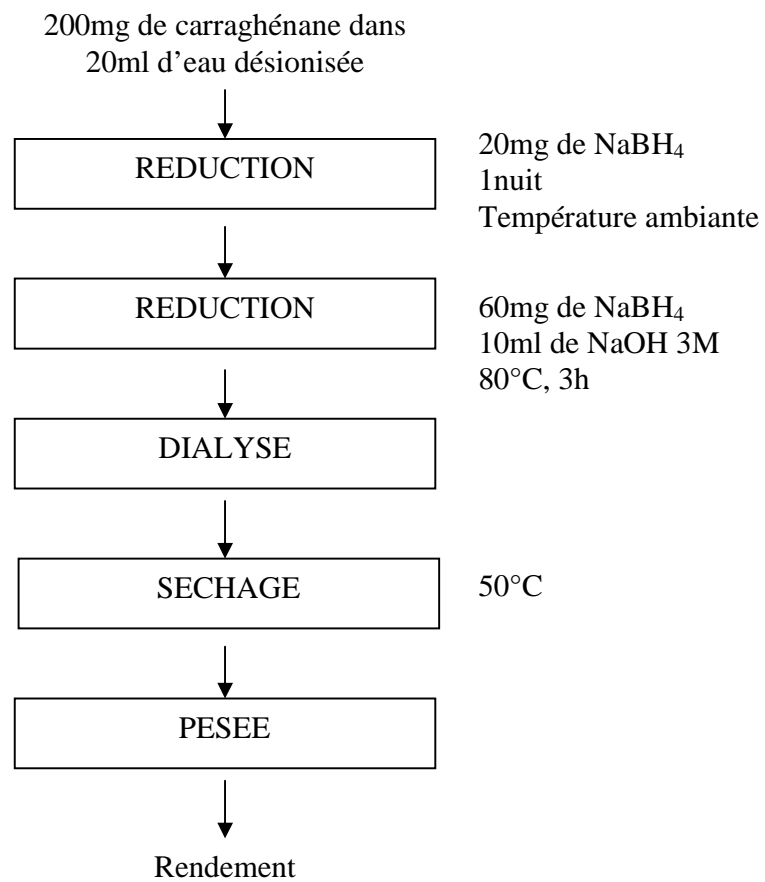
C'est une réaction d'élimination baso-catalysée des groupements sulfates conduisant à la formation d'un pont 3,6-anhydro (Mollion, 1988). Elle est accompagnée de la conversion de l'atome de carbone qui porte le groupement sulfate (Tipson, 1953 ; Ciancea *et al.*, 1993).

Cette méthode est mise a profit pour estimer la position de sulfate en C6 pour les carraghénanes contenant un groupement hydroxyle libre en C3 (Percival, 1980 ; Santos, 1980 ; Kovensky *et al.*, 1990).

200mg de carraghénane (CE et HE de la 1<sup>ère</sup> extraction) sont dissous à chaud (60°C) dans 20ml d'eau désionisée, dans un erlen. 20mg de NaBH<sub>4</sub> est ajouté dans le mélange. Le tout est laissé une nuit, à la température ambiante, sous agitation magnétique. On ajoute, par la suite, 60mg de NaBH<sub>4</sub> et 10ml d'une solution de NaOH 3M. Le mélange est porté à 80°C. La solution est ensuite refroidie, puis dialysée pour éliminer l'excès de NaOH, NaBH<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La solution est ensuite séchée à l'étuve 50°C, pour récupérer les carraghénanes modifiés. (Mollion, 1988, Ciancia *et al.*, 1993).

La teneur en sulfates, en 3',6'-anhydrogalactodes et la spectrométrie IR des extraits après modification alcaline ont été effectués avec les mêmes méthodes décrites précédemment. La figure 7 suivante résume le protocole de la modification alcaline.





**Figure 7.** Modification alcaline.

### C.3. Méthodes d'analyse des autres constituants de *P. corallorhiza*

#### C.3.1. Extraction

L'hexane a été choisi pour éliminer les lipides ainsi que les pigments de *P. corallorhiza*.

L'algue séchée et broyée a été traitée en utilisant un extracteur de type Soxhlet. Le mélange réactionnel a été ensuite filtré. L'évaporation à sec sous pression réduite du filtrat (40°C) a permis d'obtenir l'extrait hexanique.

Le résidu a été par la suite soumis à une macération par gradient de polarité croissante des solvants à savoir le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Les extractions successives ont été réalisées sous agitation magnétique pendant 24 heures et à température ambiante.

Les rendements des extractions ont été calculés à partir de la formule suivante :

$$r = \frac{ms}{mp} \times 100$$

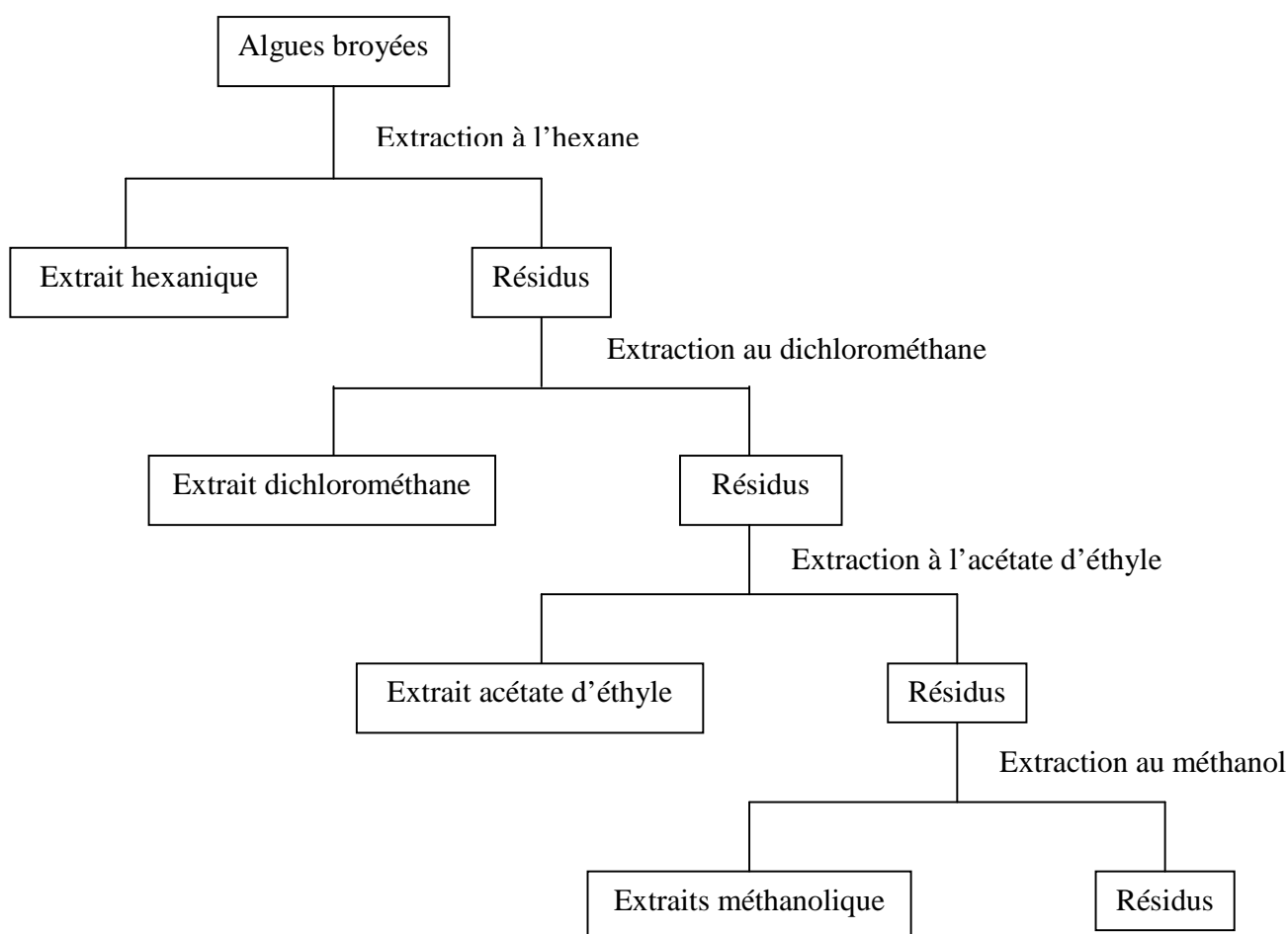
Avec :

r : rendement (%)

ms : masse de l'extrait sec (g)

mp : masse de m'algue broyée (g) (prise d'essai).

La méthode d'extraction est présentée dans la figure 8 suivante :



**Figure 8.** Protocole d'extraction.

### **C.3.2. Méthodes chromatographiques**

#### *C.3.2-1. Chromatographie sur Couche Mince (C.C.M.)*

La C.C.M. est fréquemment utilisée pour des analyses exploratoires et pour la caractérisation des produits. C'est une technique très simple et rapide, mais présente l'avantage d'être sensible à un degré souvent élevé. La C.C.M. est classé parmi une phase stationnaire solide ou adsorbant et une phase mobile liquide La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvant qui progresse par capillarité le long d'une phase stationnaire déposée en un film fluorescent à la lumière Ultra-Violette (UV). La substance à analyser est déposée sur la phase stationnaire et le développement se fait à l'aide d'un solvant approprié. Les différents composés migrent à leur propre vitesse derrière le front du solvant et leur emplacement est repéré l'observation de la plaque sous U.V ( $\lambda=254$  mn et 365 mn). Ils sont ensuite révélés à

l'aide d'un réactif approprié. Pour un chromatogramme, chaque constituant est caractérisé par un référence frontale notée  $R_f$ . (Papin *et al.*, 1977 ; Chavanne *et al.*, 1986).

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le produit}}{\text{distance parcourue par le solvant}} (R_f < 1)$$

➤ Saturation de la cuve

Le système d'éluant a été versé dans la cuve 15 minutes avant l'opération. Ceci a pour effet de saturer l'atmosphère de la cuve. Chaque plaque C.C.M. a subi un traitement préalable afin d'éviter les effets de bord. La ligne de dépôt a été tracée à 1cm du bord inférieur. Sur chaque plaque, le système d'éluant utilisé est mentionné.

➤ Dépôt des échantillons

Les échantillons en solution ont été déposés sur la ligne de dépôt à l'aide d'un capillaire. Les dépôts sont distants de 1cm au minimum. Avant toute élution, une vérification sous UV est faite pour chaque dépôt pour s'assurer que la quantité déposée est bien suffisante.

➤ Développement de la plaque

La plaque a été placée en position verticale dans la cuve en évitant d'immerger les taches de dépôt. La migration a été arrêtée lorsque le front du solvant arrive à 1cm du bord supérieur de la plaque. Ainsi la plaque est retirée de la cuve et laissée sécher à l'aire libre.

➤ Observation de la plaque à a lumière UV

La plaque a été observée à l'UV aux longueurs d'onde  $\lambda=254$  nm et 365 nm.

➤ Révélation

Les produits ont été révélés à la vanilline sulfurique.

Préparation de réactif à la Vanilline sulfurique : On mélange un volume égal d'une solution A (6g de vanilline dans 100ml d'éthanol) et d'une solution B (6ml de  $H_2SO_4$  dans d'éthanol).



### *C.3.2-2. Chromatographie Liquide à Basse Pression (C.L.B.P)*

La C.L.B.P est une méthode courante de séparation et aussi de purification des constituants d'un mélange.

C'est une technique basée sur un système de phases composé d'une phase stationnaire et d'une phase mobile (Nagel *et al.*, 1969). Le remplissage de la colonne par la phase fixe est une opération délicate, car de son homogénéité dépend de la qualité de la séparation. Eviter les bulles d'air est une condition importante pour la réussite de la manipulation.

Il existe deux modes de remplissage :

- ✓ Par voie sèche : l'adsorbant est mis directement dans la colonne utilisée
- ✓ Par voie humide : l'adsorbant est d'abord mélangé avec un volume d'éluant.

Après agitation, le tout bien homogénéisé est versé dans la colonne L'échantillon à analyser est déposé au sommet de la colonne en bande étroite sous forme :

- ✓ Soit d'un dépôt liquide : l'échantillon est dissout dans un minimum de volume de solvant (cas d'un échantillon peu ou moyennement polaire).
- ✓ Soit d'un dépôt solide : l'échantillon est dissout dans un minimum de volume de solvant polaire puis mélangé avec une petite quantité d'adsorbant (cas d'un échantillon polaire). La poudre est débarrassée avec précaution du solvant par évaporation et déposée en haut de la colonne (Chavanne *et al.*, 1986).

L'élution peut se faire à l'aide d'un seul solvant ou d'un mélange dont on varie progressivement la composition.

La phase stationnaire (gel de silice) est mise en suspension dans un très petit volume de la phase mobile (éluant) et on agite jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. La bouillie obtenue est versée dans la colonne et l'excès de solvant est éliminé à l'extrémité de la colonne. La substance à séparer est mise en solution dans la plus faible quantité de solvant pour obtenir un dépôt liquide qui par la suite est déposée en une seule fois au sommet de la colonne. L'élution a été effectuée suivant le mode d'analyse par gradient d'élution. Les systèmes de solvants employés pour séparer les différents constituants des extraits sont :

- ✓ hexane/gradient dichlorométhane
- ✓ dichlorométhane/gradient méthanol

L'élution a été recueillie par fraction de 6ml.

### *C.3.2-3. Chromatographie sur Couche Epaisse (C.C.E)*

La C.C.E est employée pour la purification, l'isolement des composés. Elle consiste à séparer de manière très satisfaisante des quantités de substance inférieure à 100mg. L'échantillon à séparer est déposé en un trait continu que l'on recharge plusieurs fois.

Le développement de la plaque fractionne l'échantillon en bande parallèle. Ces bandes sont révélées soit par la lumière U.V, soit par pulvérisation d'un réactif sur une partie de la plaque.

L'adsorbant correspondant à la zone contenant le produit recherché est gratté, dissous et agité à température ambiante dans un solvant. Le mélange est alors filtré.

L'évaporation du solvant permet de recueillir quelque mg du produit purifié. Une C.C.M ultérieure permettra de contrôler la pureté.

## **C.3.3. Méthodes d'analyses spectrales**

### *C.3.3-1. Couplage CPG/SM*

• Chromatographie en phase gazeuse

La CPG permet d'analyser, de séparer les composés gazeux, susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La séparation est fondée sur la différence de distribution des composés à séparer entre un gaz et liquide ou un gaz et un solide. (Chavanne *et al.*, 1986 ).

La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon, hydrogène ou mélange benzène/méthane).

Elle comprend 6 éléments principaux :

- Source à gaz : Le gaz, sous forte pression de 1 à 4 bars arrive dans le système chromatographique.

- Chambre d'injection : La chambre d'injection possède une double fonction, d'une part, elle provoque la volatilisation instantanée de l'échantillon introduit et d'autre part elle assure l'homogénéisation du mélange vapeur de l'échantillon/gaz vecteur, elle a un volume et une géométrie soigneusement étudiés, et doit être maintenue à une température relativement élevée, supérieure à celle de la colonne, sans toutefois entraîner la décomposition thermique des substances à chromatographiques.
- Four : Il est destiné à recevoir les colonnes et possède un dispositif de programmation de température en fonction du temps.
- Colonne : Elle est constituée d'un tube étroit destiné à contenir la phase stationnaire. Les avantages des colonnes capillaires les plus utilisées actuellement sont leur efficacité et leur rapidité. La phase stationnaire est étalée sur la paroi interne du tube ou sur une fine couche poreuse de support déposé sur cette paroi, interne du tube ou sur une fine couche poreuse de support déposé sur cette paroi, à l'intérieure de la colonne.
- Détecteur : Le détecteur est placé à la sortie de la colonne. Il décèle la présence des substances entraînées par le gaz vecteur au fur et à mesure de leur élution. Chacune de ces substances modifie une propriété physique ou parfois chimique de ce gaz et la variation résultante est transformée par le détecteur en signal électrique.
- Enregistreur : Les signaux électriques sont amplifiés et transcrits sous forme graphique par l'enregistreur.

#### • Spectrométrie de Masse

La S.M est une méthode d'analyse en phase gageuse qui occupe une place privilégiée grâce à ses caractéristiques : sensibilité et limite de détection inégalées. Elle permet à la fois d'accéder à la mesure de la masse moléculaire d'un composé ainsi que d'obtenir des données structurales. Le composé isolé se trouve dans un état excité qui provoque sa fragmentation. L'analyse de ces fragments informe sur la structure de la molécule. Chacun des ions formé est caractérisé par son rapport masse /charge ( $m/z$ ) et l'appareil est capable de séparer ces ions et de les détecter, les caractériser qualitativement et quantitativement (Jaussaud, 1996).

Fondamentalement, un spectromètre de masse travaille sous vide et comprend cinq parties principales :

- ✓ Le système d'introduction qui fait pénétrer l'échantillon dans le spectromètre de masse.
- ✓ La source et chambre d'ionisation qui a pour but de produire des ions à partir de l'échantillon à analyser, dans laquelle les molécules sont ionisées après bombardement.
- ✓ L'analyseur qui sépare les ions en fonction de  $m/z$ .
- ✓ Un détecteur qui collecte les ions fragments et amplifie le signal associé aux ions.
- ✓ Un ensemble informatique de traitement des données qui permet de transformer les informations reçues par le détecteur en spectre de masse.

Il existe diverses méthodes d'ionisations :

- ✓ l'Impact Electronique (E.I), c'est le mode d'ionisation le plus courant. Avec l'expérience par E.I, le nombre de fragments obtenus est élevé.
- ✓ L'Ionisation Chimique : cette ionisation plus douce que la prétendante consiste à produire des ions par collision de la molécule à ioniser avec des ions du plasma du gaz réactif. Les ions primaires du gaz réactif ont été obtenus par Impact Electronique.
- ✓ Autres méthodes d'ionisation douces : la Désorption de champ (F.D), le Bombardement par des atomes ou des ions rapides(F.A.B), la Désorption Laser(L.D) ; la Désorption par Plasma(P.D), le « thermospray » (T.S.P), l'Ionisation à Pression Atmosphérique(A.P.I) dont l' electospray(E.S) ou Ionisation par électronebulisation (E.S.I), le plasma couplé inductivement (I.C.P), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (A.P.C.I) et la désorption et ionisation laser assistée par matrice (MALDI).

➤ Couplage CPG/SM

La CPG et la SM sont deux méthodes compatibles car on opère, dans les deux cas, en phase gazeuse. Les structures des composés séparés en CPG pourront être déterminées après analyse du spectre de masse. Le couplage CPG/SM nous permet d'avoir en même temps le profil chromatographique et le spectre de masse de chaque constituant.

**Tableau VII** Conditions opératoires.

		Conditions opératoires
Chromatographie en phase gazeuse	Appareillage	Focus GC Thermo Electron Corporation
	Gaz vecteur	He Débit : 1ml/mn
	Colonne	HP5 25m x 0,32mm x 052µm thickness Hewlett Packard (HP5: Crosslinked 5% PhMe Silicone)
	Echantillon	Dilué 20 fois dans CHCl <sub>3</sub>
	Quantité injectée	1µl split injection automatique
	Température de l'injecteur	250°C
	Four	1mn à 100°C 5°C/mn jusqu'à 280°C 10mn à 280°C
	Température du « transfert line »	280°C
SM	Appareillage	Polaris Q Thermo Electron Corporation
	Mode	Ions positifs IE (Impact Électronique)

*C.3.3-2. Couplage CPG/IRFT*

➤ Spectroscopie Infra Rouge

Les spectroscopies optiques utilisent des échanges d'énergie, qui s'établissent entre les molécules d'une part et un rayonnement électromagnétique, le plus couramment UV, visible ou IR, d'autre part. On peut alors définir quelles sont les longueurs d'ondes absorbées et avec quelle intensité le phénomène se produit, ces données s'exprimant graphiquement par un spectre spécifique du composé analysé. Le choix d'une méthode spectroscopie dépend du

type d'information que l'on désire obtenir. Ainsi, l'utilisation de photons infra rouge, très peu énergétiques, met en évidence les divers groupements chimiques présents au sein d'une molécule : alcool, aldéhyde, cétone, acide. Ainsi que la nature des liaisons entre les carbones d'une chaîne (chaîne saturée, insaturée, aromatique). Ces types de spectroscopie exploitent des variations des états de vibration et de rotation des composés organiques, soumis à l'impact des radiations. Les pertes d'énergie correspondant aux mouvements que l'on suscite au sein des édifices moléculaires se traduisent alors par des bandes d'absorption, facilement réparables sans le spectre (Chavanne *et al.*, 1986 ; Jaussaud, 1996).

#### ➤ Couplage CPG/IRTF

Le couplage CPG/IRTF permet d'avoir le spectre sans qu'il soit nécessaire d'isoler le produit suivant un processus analogue au couplage CPG/SM.

L'analyse en CPG/IRTF devient une nécessité lorsque l'échantillon à disposition est en très faible quantité. Le couplage CPG/IRTF fournit en premier lieu le chromatogramme Total Response Chromatogram (TRC) ou Chromatogramme Totale et dans un deuxième temps, le spectre IR correspondant à chaque pic. Le spectre IRTF obtenu représente empreinte digitale de la molécule, ce qui permet de lever l'ambiguïté quand à la stéréochimie du composé.

#### C.3.3-3. La Résonance Magnétique Nucléaire

Lors qu'une molécule est soumise à l'action conjointe de deux champs magnétiques convenablement orientés, l'un intense et fixe, et l'autre oscillant dans le domaine des radiofréquences, certains des noyaux atomiques de la molécule entrent en résonance. Cela signifie qu'ils absorbent des fréquences définies du rayonnement électromagnétique, en émettant des signaux caractéristiques. UN tel phénomène physique, appelé Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N), peut être exploité pour l'analyse structurale. En effet, l'étude de la forme, de la position et de l'intensité des signaux nucléaires recueillis sous forme de spectre, permet de localiser les atomes de la molécule étudiée et de préciser sa formule développée plane, voire sa stéréochimie (Usov, 1984 ; Chavanne *et al.*, 1986 ; Jaussaud, 1996).

En chimie organique, les propriétés du  $^1\text{H}$  et celles du  $^{13}\text{C}$  sont les plus exploitées. On distingue alors plusieurs catégories de spectres dont les plus usuels sont ceux de types mono et bidimensionnels.

#### **a- Le spectre R.M.N $^1\text{H}$**

Tous les signaux des  $^1\text{H}$  apparaissent aux valeurs des  $\delta\text{ppm}$  comprises entre 0 et 15.

Le spectre est caractérisé par la présence d'une courbe d'intégration ou courbe intégrale qui se présente sous forme d'escaliers ou courbe en paliers. Elle représente l'intégration des surfaces sous les pics des signaux, et renseigne sur le nombre de  $^1\text{H}$  possible pour chaque signal.

Le nombre de  $^1\text{H}$  sur les sites voisins donne l'allure d'un signal, et les signaux peuvent contenir un ou plusieurs pics. Dans ce dernier cas, la distance entre 2 pics dans un multiplet est appelée constante de couplage J (exprimé en Hz).

Les informations à tirer d'un spectre R.M.N  $^1\text{H}$  sont les types de sites protoniques dans la molécule et la structure de l'enchaînement des sites protoniques (Bellion *et al.*, 1983).

#### **b- Le spectre 1-D du $^{13}\text{C}$**

Dans le spectre off résonance decoupling, les couplages entre  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  sont distingués en appliquant à l'acquisition du spectre, une fréquence légèrement à droite de celle de T.M.S. On supprime ainsi le petit couplage et on n'observe que le grand couplage. L'allure des signaux permet d'obtenir le nombre de  $^1\text{H}$  porté par le  $^{13}\text{C}$  remarquable (Usov; 1984).

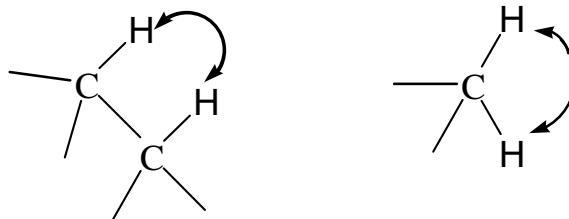
#### **c- Spectre RMN 2-D**

En ce qui concerne les spectres bidimensionnels, ils montrent des corrélations entre deux noyaux :

- ✓ de même espèce (homonucléaires), l'abscisse et l'ordonnée du spectre représentent les spectres de ces derniers.
- ✓ ou l'espèce différentes (hétéronucléaires), leurs spectres respectifs sont portés sur l'abscisse et l'ordonnée des spectres 2-D (Greer *et al.*, 1984).

Le COrrélation SpectroscopY ou COSY est un spectre de corrélation homonucléaire  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . La présence des taches de corrélations symétrique par rapport à la diagonale (spectre

de forme carrée) permet de déterminer les corrélations entre les  $^1\text{H}$  impliqués dans les enchaînements de types :



➤ Les conditions opératoires

Tous les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre utilisant Varian 300 NMR Gemini. Les spectres sont enregistrés dans  $\text{CHCl}_3$ .

$\delta^1\text{H}=7,23\text{ppm}$

$\delta^{13}\text{C}=77,23\text{ppm}$



### C.3.4. Etude de l'activité biologique

#### ➤ La méthode utilisée

Un antibiogramme est un examen permettant de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (C.M.I) d'une souche bactérienne vis-à-vis des divers antibiotiques. Par définition, la C.M.I est la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée (Whyte *et al.*, 1984, König *et al.*, 1999).

Dans le cadre du présent travail, la méthode de diffusion ou antibiogramme standard a été mise à profit pour un criblage des activités microbiologiques (antimicrobiennes), et biologiques (antipaludéennes).

Des disques de papiers buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélose, préalablementensemencé avec une culture pure de souche (*Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Shigella boydii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterides*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon mucoides*, *Candida albicans* pour le test antimicrobienne et *Plasmodium falciparum* pour le test antipaludéenne) à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent des zones d'inhibitions circulaires correspondant à une absence de culture. Lors que la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe (San-Martin *et al.*, 1991, Argadona *et al.*, 2002).

Pour chaque souche, 1mg d'extrait est déposé sur un disque de 6mm de diamètre. La zone d'inhibition circulaire est mesurée par le diamètre en mm : plus elle est grande, plus la sensibilité de la souche bactérienne testée vis-à-vis de l'antibiotique étudié est importante.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

## A. POLYSACCHARIDES

### A.1. Aspects des précipités

Les précipités obtenus lors de la récupération des carraghénanes (Figure 9), par les deux méthodes d'extraction, diffèrent par leur aspect (tableau VIII).



Cold Extract



Hot Extract

**Figure 9.** Précipité de carraghénane.

**Tableau VIII.** Aspect des précipités.

Méthode d'extraction	Aspect du précipité
« Cold Extract »	Blanc dispersé
« Hot Extract »	Blanc non dispersé

Les aspects du précipité obtenu par précipitation à l'EtOH du CE et de celui obtenu par précipitation au CTAB du HE sont relativement différents. Dans le premier cas, les chaînes polysaccharidiques s'associent progressivement de manière réversible en double hélice (REES *et al.*, 1969). Pour le second, l'aspect « blanc non dispersé » est dû à la présence de CTAB.

## A.2. Rendements

Les teneurs en carraghénanes obtenues par les trois extractions effectuées sont rassemblées dans le tableau suivant :

**Tableau IX.** Rendement des extractions.

<b>Rendement</b> <b>Extraction</b>	<b>Par « Cold Extract »</b> <b>(%)</b>	<b>Par « Hot Extract »</b> <b>(%)</b>
Extraction 1	6,12*	14,21* (H <sub>2</sub> O)
Extraction 2	6,97*	12,63* (H <sub>2</sub> O) 14,83** (H <sub>2</sub> O)
Extraction 3	8,88*	12,833** (milieu légèrement alcalin/NaHCO <sub>3</sub> )

\* : précipité par l'EtOH

\*\* : précipité par CTAB

Dans l'extraction 3, la poudre d'algue a subi un traitement préliminaire de dépigmentation avant l'extraction à froid. Pour les deux autres extractions (1 et 2), la dépigmentation a eu lieu après l'extraction à froid, c'est-à-dire, avant l'extraction à chaud. Les rendements en carraghénanes obtenus pour les deux cas, diffèrent en moyenne, de 1%. Ainsi, on peut avancer que l'opération de dépigmentation influence peu le rendement des extractions. Elle améliore légèrement le rendement en polysaccharides à froid.

Pour une même extraction (2), une précipitation au CTAB améliore le rendement en carraghénane de *P. corallorhiza*, 14,83% contre 12,63%. En effet, il est généralement admis que la CTAB est l'agent de précipitation usuel des carraghénanes.

Le rendement de l'extraction à chaud, à pH neutre (eau distillée), est meilleur par rapport à celui de l'extraction en milieu alcalin, les polysaccharides étant récupérés à l'aide du CTAB (14,83% contre 12,83%).

### A.3. Dosages colorimétriques

Les valeurs ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage.

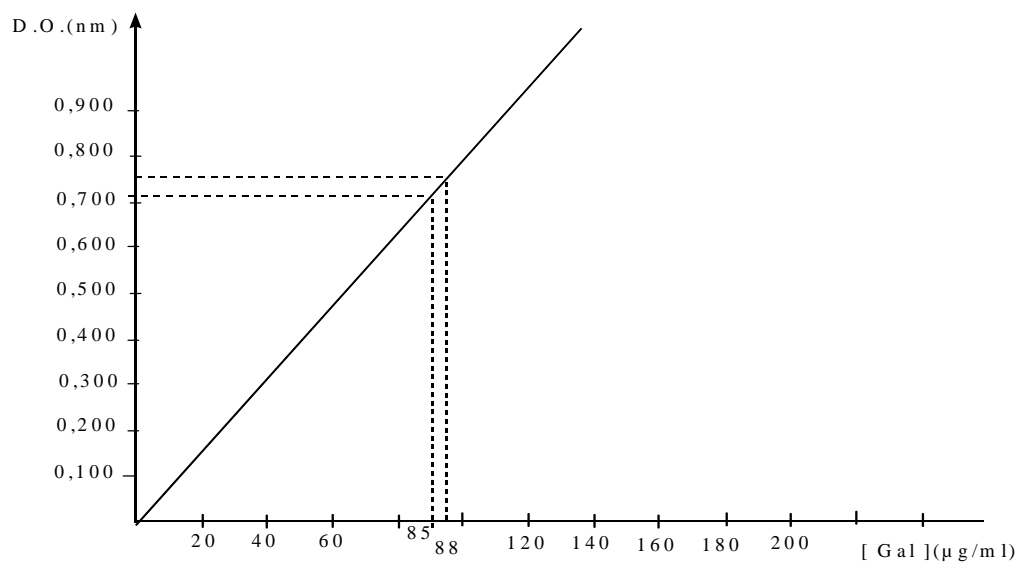
#### A.3-1. Dosages des sucres totaux.

Les teneurs en sucres totaux des extraits CE et HE sont regroupées dans le tableau X. La courbe d'étalonnage est présentée dans la figure 10.

**Tableau X.** Teneur en sucres totaux des extraits CE et HE.

Extraits	[échantillon] ( $\mu\text{g/ml}$ )	[Galactose]* ( $\mu\text{g/ml}$ )	Teneur en sucres totaux (%)
CE	200	87	43,5
HE	200	90	45

\*etalon



**Figure.10.** Courbe d'étalonnage du dosage des sucres totaux.

### A.3.2. Dosage des 3',6'-anhydrogalactoses.

Les teneurs en 3',6'-anhydrogalactose des extraits CE et HE sont rapportées dans le tableau XI suivant :

**Tableau XI.** Teneur en 3',6'-Agal des extraits CE et HE.

Extraits	[échantillon] (µg/ml)	[Fructose] (µM/ml)	[3',6'-Agal] (µg/ml)	Teneur en 3',6'-Agal (%)
CE	1000	0,075	12,42	1,24
HE	1000	0,045	7,45	0,75

### A.3.3. Dosage des sulfates

Les teneurs en sulfates des extraits CE et HE sont rassemblées dans le tableau XII suivant :

**Tableau XII.** Teneur en sulfates des extraits CE et HE.

Extraits	[échantillon] (µg/ml)	[sulfate] (µM/ml)	Teneur en sulfates (%)
CE	200	22	29
HE	200	70	36

**Tableau XIII.** Récapitulatif des dosages colorimétriques.

Teneur en sucres totaux (%)		Teneur en 3',6'-anhydrogalactose (%)		Teneur en sulfates (%)	
C.E	H.E	C.E	H.E	C.E	H.E
43,5	45	1,24	0,76	29	36

*CE = Cold Extract*

*HE = Hot Extract*

La teneur en sucres totaux exprime le taux de pureté d'un polysaccharide. Les teneurs trouvées pour le cas des extraits CE et HE de *P. corallorhiza* sont faibles et pratiquement équivalentes. Ceci pourrait révéler la présence de substances autres que du sucre. La présence de résidu du

CTAB non déplacé, lors de la récupération des carraghénanes pendant les extractions, n'est pas à exclure.

Les résultats des dosages biochimiques, rapportés dans le tableau XI précédent, montrent que les teneurs en 3',6'-anhydrogalactose de nos échantillons sont faibles. Ceci s'explique par le fait que les polysaccharides de *P. corallorhiza* pourraient ne pas contenir ou contiennent très peu de famille  $\kappa$ -carraghénane (Yaphe, 1959 ; Mollion, 1973 ; Bodard *et al.*, 1980).

En ce qui concerne les teneurs en sulfates, les valeurs trouvées sont conformes à celles des carraghénanes qui varient de 20 à 50 % (Bruneton, 1993).

#### **nA.4. Spectroscopie infra rouge**

Les interprétations des principales absorptions en spectroscopie IR des CE et HE sont rassemblées dans le tableau XVII. Celles-ci livrent les informations relatives à la position des groupements sulfates et à la présence de pont-3',6'-Agal, dans l'unité de répétition du carraghénane :

- Présence de sulfate équatorial secondaire d'un galactose-2-sulfate ( $830\text{ cm}^{-1}$ )
- Faible teneur en 3',6'-Agal, justifiée par la faible intensité du pic à  $930\text{ cm}^{-1}$
- Présence de sulfate en C<sub>2</sub> de l'unité 3',6'-Agal ( $805\text{ cm}^{-1}$ , épaulement)
- Absence de sulfate en C4 axial secondaire d'une unité D-Gal (absence d'absorption en  $845\text{ cm}^{-1}$ ).

**Tableau XVII.** Résultats de l'analyse en IR des CE et HE.

CE		HE		Attributions (littérature)	
Fréquence (cm <sup>-1</sup> )	Intensité	Fréquence (cm <sup>-1</sup> )	Intensité		
3450	TF	3478	TF	vers 3000	vibration de valence de O-H libre et lié
2954	f	2917 2852	F M	2920 2800-2900	vibration de valence de –C-H vibration de valence de –C-H
1640	F	1640	TF	1640	H <sub>2</sub> O
1370	M	1362	M	1370	allongement antisymétrique de C-O-S et S-O-S (sulfate)
1250	TF	1250	TF	1240-1250	allongement antisymétrique de C-O-S et S-O-S (sulfate)
1240	TF	1240	TF	1240	S=O de sulfate
1070	f	1100	F	1100-1050 1070	déformation de liaison d'O-H lié vibration d'allongement de la liaison C6-O
1050	TF	1050	TF	1030-1050	allongement de la liaison C-O de C-O-S
930	f	930	f	930 920-930	déformation du pont 3,6-anhydro de 3,6- Agal galactose 4-sulfate dans le carraghénane
890	E	890	E	890	épaulement dû au 3,6-Agal
-	-		-	845	C-O-S de SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> de C4 axial secondaire (+ 705 caractéristique de κ)
830	M	830	M	830	sulfate équatorial secondaire d'un galactose-2-sulfate
820	?	820	?	820	C-O-S de SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> équatorial
810	?	810	?	810-820	sulfate en C6
	E		E	805	sulfate en C2 de 3,6-Agal (caractéristique de ι)
776	f	777	F	770-810	O-S de C-O-S

*F : très forte*

*F : forte M : moyenne*

*f : faible*

*E : épaulement*



### A.5. Modification alcaline (M.A.)

Le tableau suivant montre les rendements en CE et HE après MA.

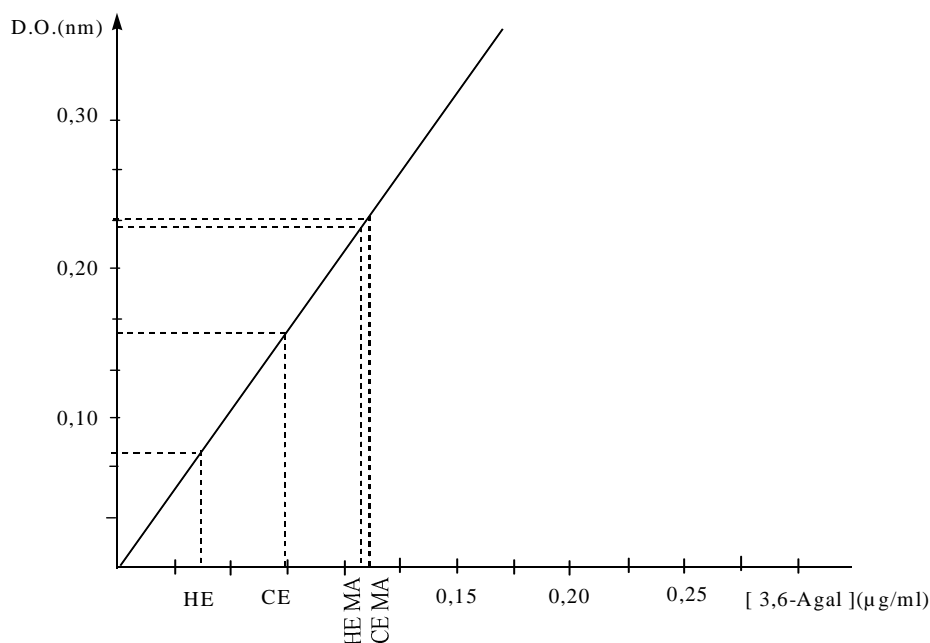
**Tableau XIV.** Rendement des CE et HE après MA.

	Masse obtenue après modification (mg)	Rendement (%)
<b>CE</b>	173,80	86,90
<b>HE</b>	174,10	87,05

Les rendements des CE et HE après MA sont pratiquement égaux. Les tableaux XV, XVI, et XVII montrent respectivement les teneurs en sulfates, en 3',6'-Agal, et les variations observées en spectrométrie IR des extraits, avant et après modification alcaline.

**Tableau XV.** Teneur en 3',6'-Agal des extraits CE et HE, avant et après M.A.

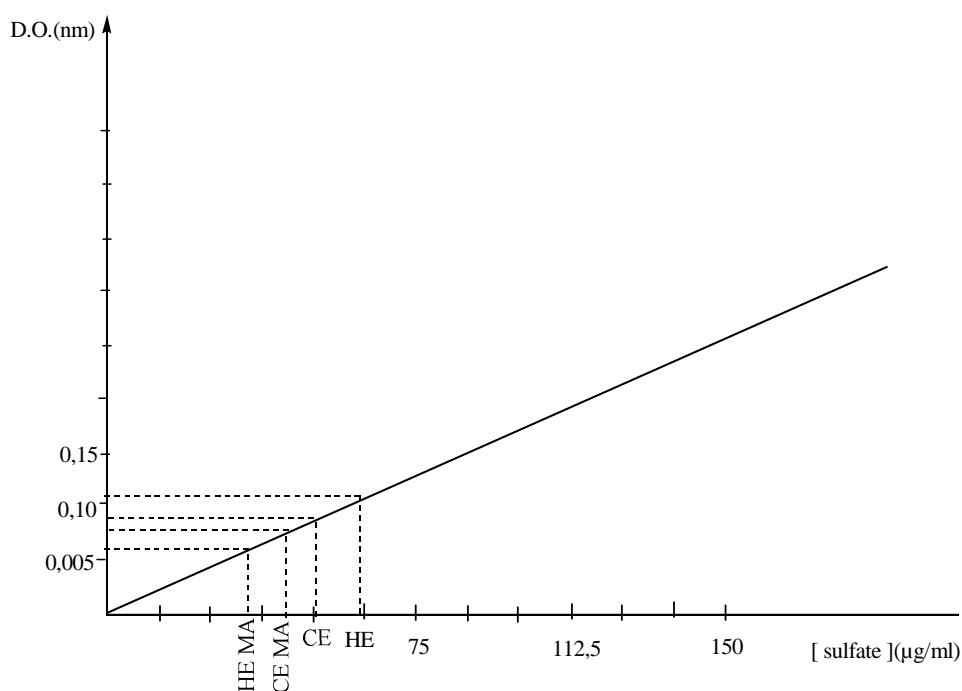
Extraits	[échantillon] ( $\mu\text{g/ml}$ )	[Fructose] ( $\mu\text{M/ml}$ )	[3', 6'- Agal] ( $\mu\text{g/ml}$ )	Teneur en 3',6'-Agal (%)	
				avant MA	après MA
<b>CE</b>	1000	0,115	19,044	1,24	1,904
<b>HE</b>	1000	0,110	18,216	0,75	1,821



**Figure 11.** Courbe d'étalonnage lors du dosage des 3,6-Agal avant et après MA.

**Tableau XVI.** Teneur en sulfates des extraits CE et HE après M.A.

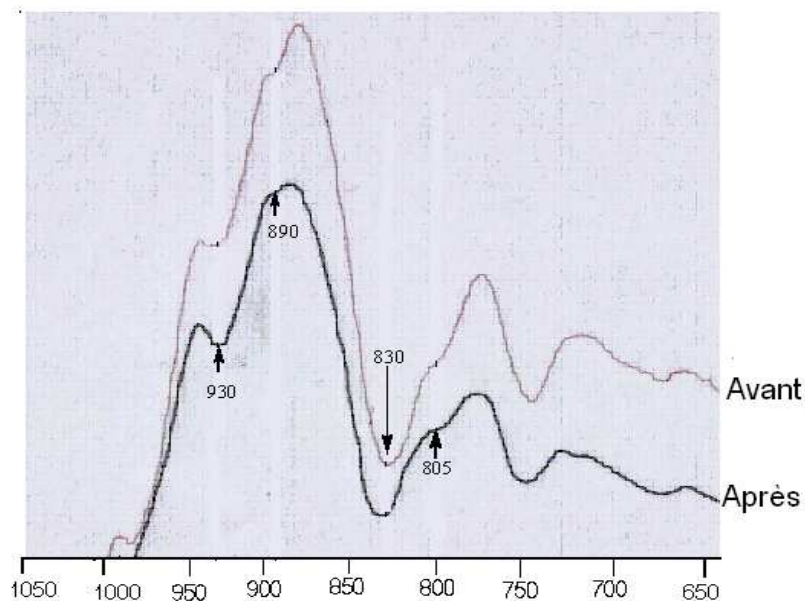
Extraits	[échantillon] ( $\mu\text{g/ml}$ )	[sulfate] ( $\mu\text{M/ml}$ )	Teneur en sulfates (%)	
			avant MA	après MA
CE	200	37,5	29	18
HE	200	56,25	36	28



**Figure 12.** Courbe d'étalonnage du dosage des sulfates avant et après MA.

Les teneurs en 3,6-AGal trouvées avant et après MA, corroborent celles des sulfates. En effet, la formation du pont 3,6-AGal, justifiant la perte de groupement  $\text{SO}_4^-$ , en position C6 de l'unité A de répétition, nous permet d'avancer que la sulfatation en C6 est faible pour le cas des polysaccharides de *P. corallorhiza*.

La variation des intensités des absorptions en  $930\text{ cm}^{-1}$ , correspondant à cette formation du pont 3,6-AGal est observée lorsque l'on procède à la comparaison des spectres IR des CE, HE avant et après MA (figure 13).



**Figure 13 :** Comparaison des spectres IR des carraghénanes avant et après MA.

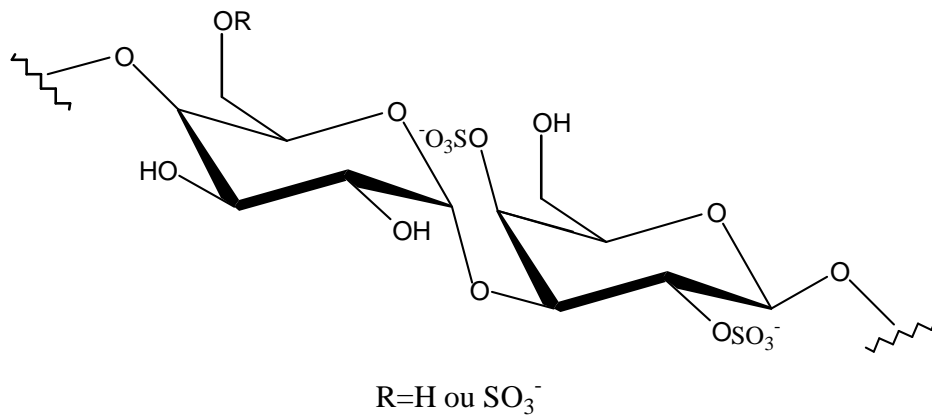
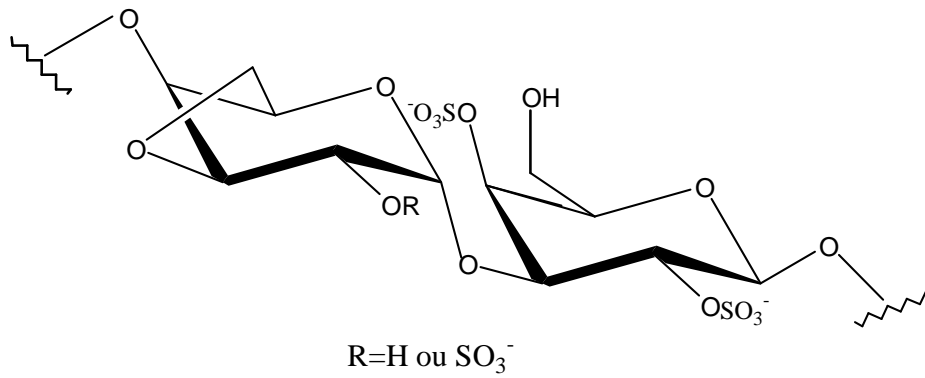
#### **A.6-Précipitation à l'aide d'ion $K^+$ : mis en évidence de $\kappa$ -carraghénane**

En solution aqueuse, certains ions, entre autres l'ion  $K^+$ , conduisent à la formation de gels stables qui, à des concentrations en polymère très faible, de l'ordre de 1g/l (Rochas *et al.*, 1984 ; Ciancea *et al.*, 1997), est nécessaire pour induire cette gélification (0,0075M pour les  $\kappa$ -carraghénanes, sous forme  $K^+$ ) (Rinaudo, 2002).

Cette manipulation a été entreprise, et nous a permis de justifier l'absence de la forme  $\kappa$ -carraghénane dans les polysaccharides de *P. corallorhiza*.

Conclusion partielle :

Compte tenu des résultats obtenus en spectroscopie IR et ceux des réactions de modification chimique, et par élimination, des propositions de structure des polysaccharides présents dans notre matériel d'étude sont données :



## B- AUTRES CONSTITUANTS CHIMIQUES

### B.1. Résultats des extractions

103,78 g de poudre de *P. corallorhiza* ont subi 4 extractions successives, par gradient de polarité de solvant (n-hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, MeOH). Les résultats sont rapportés dans le tableau suivant.

**Tableau XVII.** Rendements des extractions.

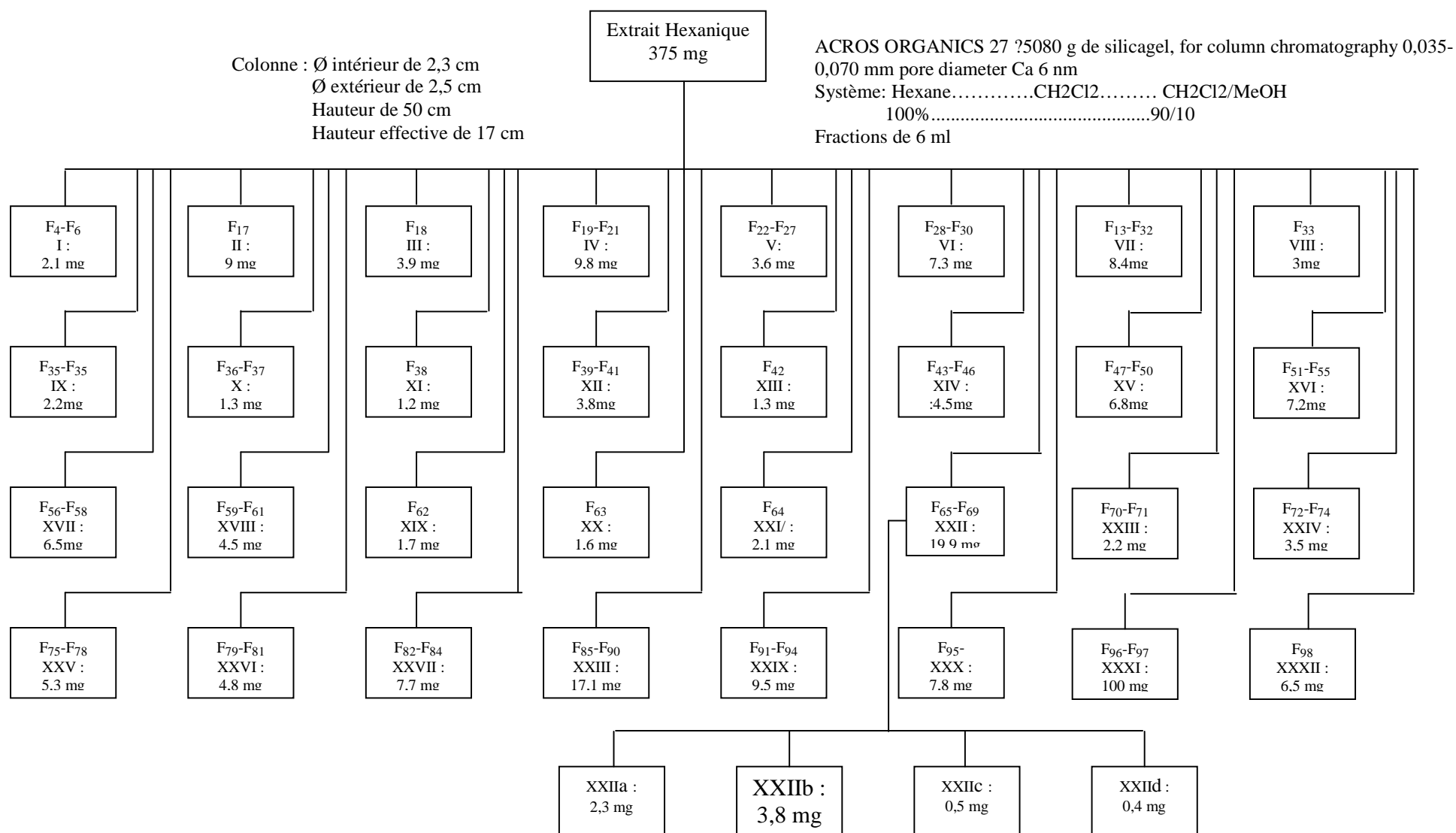
Extraits	Masse de l'extrait obtenu (g)	Rendement (%)
n-hexane	0,3748	0,36
Dichlorométhane	0,6513	0,63
Acétate d'éthyle	0,1645	0,15
Méthanol	1,4679	1,41
Total		2,56

Le rendement de l'extrait obtenu par AcOEt est faible par rapport aux autres extraits. On note également que le rendement total en d'autres composés est faible (2,56 %) par rapport à celui des polysaccharides (environ 20%).

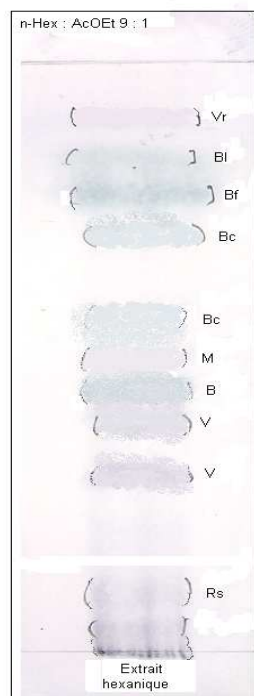
### B.2. Isolement du composé XXII<sub>b</sub>

Le composé noté XXII<sub>b</sub> a été isolé après CCE préparative d'une fraction active de l'extrait hexanique (Figure 14).

32 fractions ont été recueillies en fonction des résultats de suivi en CCM. Le profil chromatographique sur couche mince de la fraction hexanique est présenté dans la figure 15.



**Figure 14.** Protocole d'obtention de XXII<sub>b</sub>.



Adsorbant : silice 60 F<sub>254</sub>, sur feuille d'aluminium

Observation : UV 254nm et 365nm

Révélateur : Vanilline sulfurique

**Figure 15.** Chromatogramme en CCM de l'extrait hexanique.

Le profil CCM de la fraction XXII, active, obtenue après CLBP de l'extrait hexanique est présenté dans la figure 16 ci-après.



Adsorbant : silice 60 F<sub>254</sub>, sur feuille d'alu

Observation : UV 254nm et 365nm

Révélateur : Vanilline sulfurique

	R <sub>f</sub>
a	0,79
b	0,63
c	0,42
d	0,13

**Figure 16.** Chromatogramme en CCM de la fraction XXII.

La tache « b » du chromatogramme précédent, a été isolé après une CCE préparative de XXII, avec un système de solvant d'élution  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  100 % + 1goutte MeOH. Cette analyse a permis de récupérer 3,8 mg de poudre blanche, amorphe, noté XXII<sub>b</sub>.

### B.3. Analyse de XXII<sub>b</sub>

#### B.3.1. Comportement chromatographique de XXII<sub>b</sub>

Le résultat d'analyse en C.C.M de XXII<sub>b</sub> est rapporté dans la figure 17.



Adsorbant : silice 60 F<sub>254</sub> , sur feuille d'aluminium

Observation : UV 254nm et 365nm

Révélateur : Vanilline sulfurique

**Figure 17.** Chromatogramme en CCM de XXII<sub>b</sub>.

Le profil chromatographique de la figure 14 nous montre que le composé XXII<sub>b</sub> est obtenu sous forme de monotache de couleur grisâtre après observation sous UV, et de couleur gris après révélation à la vanilline sulfurique.



### B.3.2. Détermination de structure

Les algues rouges (Rhodophyta) des genres *Plocamium*, *Chondrococcus* et *Occhodes* sont riches en monoterpènes polyhalogénés linéaires et/ou cycliques biologiquement actifs. (Faulkner, 2002 ; Blunt *et al.*, 2003).

Plusieurs méthodes spectrales ont été utilisées pour déterminer la structure du composé XXII<sub>b</sub>.

#### B.3.2.1. Spectrométrie de Masse

**Tableau XVIII.** Données en SM.

m/z	Abondances relatives (%)	Observations
131	32	
149	18	Pic de Cl <sub>2</sub> Br (Annexe 1)
167	70	
185	16	pic de Cl <sub>3</sub> Br (Annexe 1)
203	80	
247	34	
283	52	
300	100	Pic de base
336	34	Pic parent

Par application de la règle de parité, en l'absence d'azote, l'ion m/z 336 est un radical cation, à nombre impair d'électrons, obtenu par impact électronique, ce qui conduit à une masse moléculaire M<sup>+</sup> de 336 u.m.a, et à la formule brute correspondante : C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>OCl<sub>3</sub>Br.

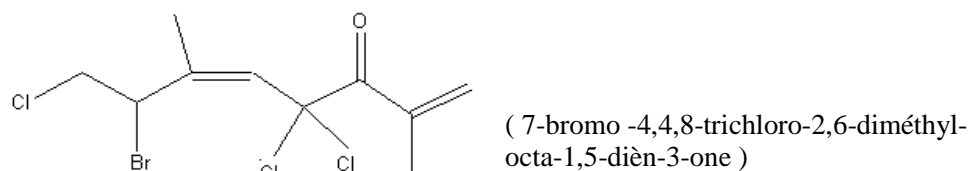
Le nombre d'insaturation(s) et/ou cycle(s) (N<sub>i/c</sub>) correspondant se détermine par la relation suivante :

$$N_{i/c} = X_{4v} - Y_{1v}/2 + Z_{3v}/2 + 1$$

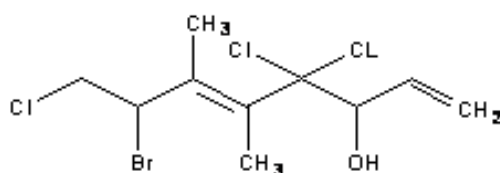
Où X<sub>4v</sub> : Nombre d'atome tétravalent  
Y<sub>1v</sub> : Nombre d'atome monovalent  
Z<sub>3v</sub> : Nombre d'atome trivalent

$$\Rightarrow N_{i/c} = 2$$

Une analogie avec la structure en C10 de la molécule isolée du genre *Plocamium* a été effectuée pour la détermination de structure. (Bonald *et al.*, 1984). Ces auteurs ont identifié un monoterpène polyhalogéné à partir de 2 espèces d'algues rouges du genre *Plocamium*, et dont la structure est la suivante :



Sur la base des données de la littérature, nous proposons la structure suivante pour le composé XXII<sub>b</sub>.



( 7-bromo -4,4,8-trichloro-5,6-diméthyl-octa-1,5-dièn-3-ol )

**Figure 18.** Proposition de structure de XXII<sub>b</sub>.

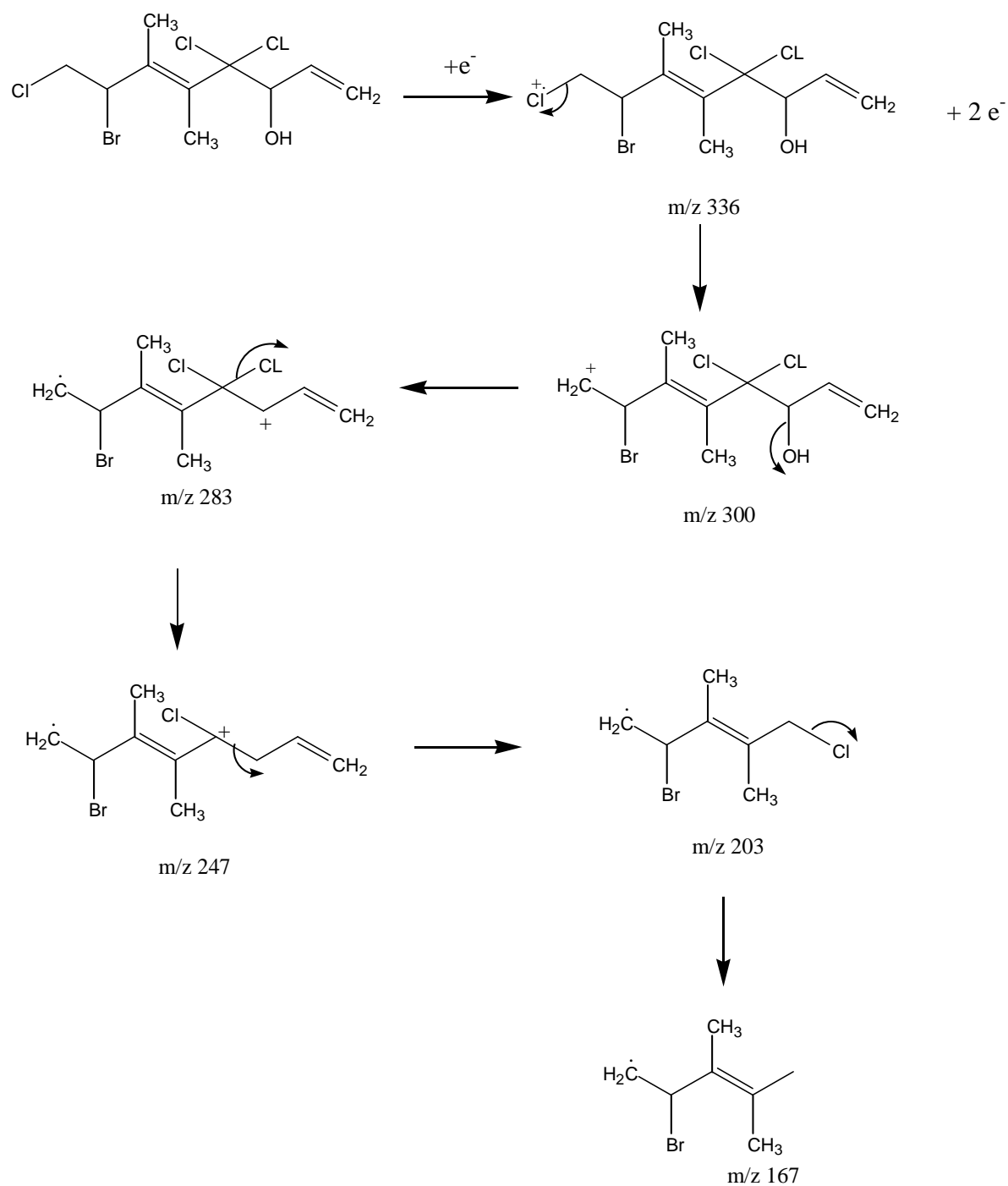
La fragmentation de l'ion moléculaire est donnée dans le schéma 1 de la page suivante.

L'ion le plus intense  $m/z$  300 correspondant à  $[M^+-Cl]$  montre qu'il y a départ d'un atome de Chlore.

Le fragment  $m/z$  283 correspond à  $[(M-Cl)^+-OH]$ .

Le fragment  $m/z$  247 correspond à  $[(M-Cl-OH)^+-C_3H_4]$ .

Le fragment  $m/z$  167 correspond à  $[(M-Cl-OH-C_3H_4)^+-Cl]$ .



**Schéma 1** : Fragmentation de l'ion moléculaire.

### B.3.2.2. Spectroscopie IR

Le tableau XIX résume les données principales issues de l'exploitation du spectre IR porté en annexe.

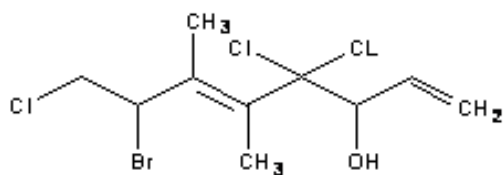
**Tableau XIX.** Données en spectroscopie IR de XXII<sub>b</sub>.

Nombres d'ondes (cm <sup>-1</sup> )	Observations	Groupes vibrants
3633,46	Faible	-OH
2985,52	Forte	-C-H
1615,26	Moyenne	-C=C
1453,42	Faible	-CH <sub>2</sub>
1383,03	Moyenne	-CH <sub>3</sub>
968,56	forte	-CH=CH <sub>2</sub>

Les informations apportées par le spectre ont permis de confirmer la présence des divers groupements fonctionnels dans la molécule. On note notamment la présence de :

- ❖ Un groupement -C=C-, laissant supposer un groupement éthylénique
- ❖ Un groupement -C=CH<sub>2</sub> terminale

On remarque également la présence d'une bande entre 3580-3670cm<sup>-1</sup>, caractéristique d'un groupement -OH. Ces données corroborent la structure proposée.



( 7-bromo -4,4,8-trichloro-5,6-diméthyl-octa-1,5-diène-3-ol )

### B.3.2.3.RMN

Le tableau XX résume les informations tirées des spectres RMN de XXII<sub>b</sub> permettant leur identification.

**Tableau XX : Identification des spectres RMN.**

Spectres	Identifications	Remarques
S <sub>1a</sub> : spectre H-1D normale S <sub>1b</sub> /S <sub>1c</sub> /S <sub>1d</sub> /S <sub>1e</sub> /S <sub>1f</sub> : agrandissement de certaines zones de S <sub>1a</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <math>\Delta\delta = SW/SF = 4500,5/300,075 = 14,997</math> 0&lt;<math>\delta</math>&lt;14,997ppm (spectre <sup>1</sup>H: 0&lt;<math>\delta</math>&lt;15ppm)</li> <li>➤ présence de courbe d'intégration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ on dénombre 14 <sup>1</sup>H.</li> <li>➤ on note la présence de deux méthyles (CH<sub>3</sub>) <math>\delta = 1,800</math>ppm et à <math>\delta = 1,459</math>ppm</li> </ul>
S <sub>2a</sub> : spectre d'off résonance decoupling S <sub>2b</sub> /S <sub>2c</sub> : agrandissement de certaines zones de S <sub>2a</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <math>\Delta\delta = SW/SF = 18761,7/75,428 = 248,73</math> 0&lt;<math>\delta</math>&lt;248,73ppm (spectre <sup>13</sup>C: 0&lt;<math>\delta</math>&lt;250ppm)</li> <li>➤ absence de courbe d'intégration</li> <li>➤ présence des multiplets : il y a un phénomène de couplage scalaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ on dénombre 10 atomes de Carbone</li> </ul>
S <sub>3a</sub> : spectre COSY S <sub>3b</sub> : agrandissement de certaines zones de S <sub>3a</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Abscisses et ordonnées : 0&lt;<math>\delta</math>&lt;9ppm 0&lt;<math>\delta</math>&lt;250ppm</li> <li>➤ Les taches de corrélations forment des carrés avec des taches des <sup>1</sup>H sur la diagonale</li> </ul>	

SW: largeur spectrale

SF: fréquence du spectromètre

**Tableau XXI. Exploitation du spectre <sup>1</sup>H.**

$\delta$ ppm moyen	Allure des signaux	Courbe d'intégration			Type de site <sup>1</sup> H possible
		Hauteur du pallier	Nombre de <sup>1</sup> H	Identité de <sup>1</sup> H	
6,300	m	0,6	1	a	CH
6,07		0,6	1		
6,03		0,9	1		
6,010	m	1,9	2	b/c	CH <sub>2</sub>
4,80		0,7	1		
4,08	m	0,6	1	d	CH
3,65		0,6	1		
1,800	m	1,7	3	e	CH <sub>3</sub>
1,459	m	1,9	3	f	CH <sub>3</sub>

m : multiplet

L'exploitation du spectre  $S_1$  ( $^1\text{H}$ ) a permis :

- de dénombrer 14  $^1\text{H}$ , à partir de la courbe d'intégration
- de relever la présence des deux méthyles ( $-\text{CH}_3$ ) (tableau XXII)

**Tableau XXII** : Exploitation du spectre  $^{13}\text{C}$ .

$\delta\text{ppm}$	Allure des signaux	Type de C
140,939	t	$=\text{C}$
138,091	d	$=\text{CH}$
125,032	s	
124,404	d	
119,908	d	$=\text{CH}_2$
65,961	s	$-\text{CH}_2-\text{O}, \text{CH}-\text{O}-$
41,796	d	$-\text{CH}_2-$ , $-\text{CH}$ , $\text{C}-$ , $-\text{CH}-\text{Br}$ , $-\text{CH}_2-\text{Br}$ , $\text{CH}_2-\text{Cl}$
28,587	d	$-\text{CH}_3$ , $-\text{CH}_2-$ ,
27,548	s	
25,576	d	

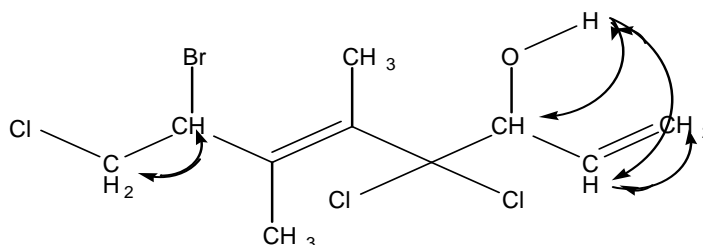
*t* : triplet

*d* : doublet

*s* : singulet

L'exploitation du spectre  $S_2$   $^{13}\text{C}$  a permis de dénombrer 10 C.

Les corrélations trouvées à partir des spectres COSY corroborent l'hypothèse de structure attribuée à XXII<sub>b</sub>.



Les résultats des interprétations respectives des spectres COSY sont portés dans le tableau XXIII.

**Tableau XXIII**. Interprétation des corrélations en COSY.

$^1\text{H}/^1\text{H}$	6,30	6,07	6,03	4,80	4,06	3,82	3,65	1,80	1,46
6,30		○							
6,07	○		o						
6,03		o		○					
4,80			○						
4,06							○		
3,82							o		
3,65					○	o			
1,80									
1,46									

○ : Corrélation forte

o : Corrélation faible

#### B.4. Résultats des tests antibactériens

**Tableau XXIV.** Résultats préliminaires de tests microbiologiques sur les différents extraits.

Extraits	Diamètre d'inhibition			
Souches	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AcOEt	MeOH
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 700323	-	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724	-	-	-	-
<i>Shigella boydii</i> ATCC 9207	++	+	+++	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Salmonella enterides</i>	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061	+	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632	-	-	++	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6301	+	+	+++	+
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 201382	-	-	-	-
<i>Trichosporon mucoides</i> ATCC 201382	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-

Diamètre d'inhibition :

Ø < 7mm	-
7 < Ø < 8mm	+
8 < Ø < 9mm	++
Ø > 9mm	+++

Interprétation :

insensible
peu sensible
moyennement sensible
fortement sensible

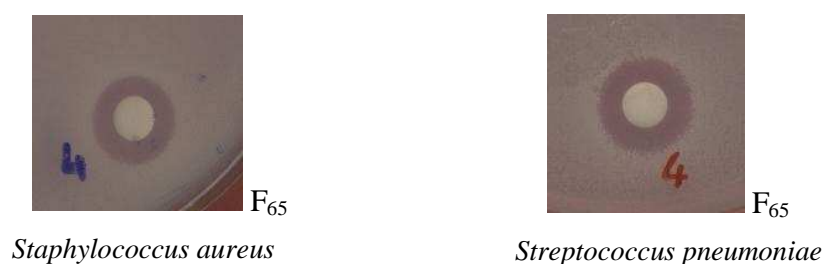
De la liste des microorganismes utilisés pour les tests, trois parmi les souches ont été sensibles aux quatre extraits. Il s'agit de *Shigella boydii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*. L'activité antibactérienne des extraits AcOEt vis-à-vis de *Shigella boydii* de *Streptococcus pneumoniae* a été plus importante comparée à celles des extraits hexanique, dichlorométhane, et méthanol. La majorité des antibiotiques a été probablement entraînée dans la phase AcOEt lors de l'extraction.

Les fractions N° 17, 19, 65, et 95 de la chromatographie liquide à basse pression ont été également testés sur les souches *Shigella boydii*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, les résultats sont mentionnés dans le tableau XXV suivant.

**Tableau XXV.** Résultats préliminaires des tests antimicrobiens de 4 fractions de extraits hexaniques.

Extraits Souches	Diamètre d'inhibition			
	F <sub>17</sub>	F <sub>19</sub>	F <sub>65</sub>	F <sub>97</sub>
<i>Shigella boydii</i> ATCC 9207	+		+	+
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061	+			+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632	+		+++	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6301	+	+	+++	+++

L'activité antibactérienne des fractionnements F<sub>65</sub> et F<sub>97</sub>, vis-à-vis de *Streptococcus pneumoniae* est plus importante comparée à celle des fractions F<sub>17</sub> et F<sub>19</sub>. La souche *Staphylococcus aureus* est fortement sensible vis-à-vis de la fraction F<sub>65</sub> (Figure 19), et moyennement sensible aux fractions F<sub>17</sub>, F<sub>19</sub>, et F<sub>97</sub>. Les autres agents pathogènes n'ont eu aucune sensibilité vis-à-vis des fractions testées.



**Figure 19.** Halo d'inhibition de F<sub>65</sub> vis-à-vis de *S. aureus* et *S. pneumoniae*.

### B.5. Résultats des tests antimalaria

Concernant le test antimalaria de l'extrait hexanique de *P. corallorhiza*, réalisé sur *Plasmodium falciparum* FCM29, le taux d'inhibition à une concentration de 50 µg/ml est de 33%. La quinine a été prise comme référence, (IC<sub>50</sub>=3,28 ± 0,53µg/ml).



# CONCLUSION

Les premières études approfondies sur *Plocamium corallorhiza* de Madagascar réalisées dans le présent travail, entrent dans le cadre de notre initiation à la recherche. Elles nous ont permis de comprendre la méthodologie de recherche dans le domaine des Produits Naturels, et de nous familiariser avec les techniques courantes de laboratoire. Nous rapportons dans ce document les premiers résultats de l'étude chimique et biologique entreprise sur *Plocamium corallorhiza* :

- Extraction et caractérisation des polysaccharides de cette algue rouge.
- Tests antibactériens de différents extraits (à l'hexane, au dichlorométhane, à l'acétate d'éthyle et au méthanol).
- Isolement et détermination de structure d'un constituant majoritaire d'un extrait hexanique.

Le protocole d'extraction, entrepris pour les polysaccharides de *Plocamium corallorhiza* est celui des carraghénanes : Cold- Extract et Hot-Extract (précipité par CTAB). Les dosages colorimétriques réalisés ont permis d'avancer que les polysaccharides de *P. corallorhiza* contiennent une faible teneur en 3,6-anhydrogalactose (0,75 à 1.24 %), et une teneur en sulfates qui varie de 29 à 36 %.

Les données spectrales en infra rouge du polysaccharide ont confirmé la présence de pont 3,6-Anhydrogalactose, et de groupement sulfate. Après modification alcaline, la teneur en 3,6-Anhydrogalactose augmente tandis que la teneur en sulfate diminue. C'est une indication pour la détermination ultérieure du type de carraghénane.

Le volet microbiologie nous a permis de nous initier aux méthodes de réalisation de tests antibactériens. Des antibiogrammes ont été réalisés sur dix souches bactériennes de référence. Ces extraits ont donné une touche positive à ces tests, notamment l'extrait à l'acétate l'éthyle. D'autre part, les tests antipaludéens ont également été réalisés sur l'extrait hexanique. Ce dernier présente également une touche positive à ce test. Ainsi une étude des constituants chimiques de l'extrait hexanique a été entreprise. Le fractionnement a nécessité l'emploi de différentes méthodes chromatographiques : CCM, CLBP, CCE, et a conduit à l'isolement d'un constituant majoritaire, qui se présente sous forme de poudre blanche amorphe, codée XXII<sub>b</sub>. Une structure chimique est proposée sur la base des différentes données spectrales. Il s'agit de 7-bromo -4,4,8-trichloro-5,6-diméthyl-octa-1,5-diène-3-ol ( $C_{10}H_{14}OC_{13}Br$ ). Ces données sont en accord avec celles de la littérature. Des monoterpènes aliphatiques polyhalogénés analogues ont été isolés sur *Plocamium corallorhiza*, collectée en New South Wales, Australie (Donald *et al.*, 1984).

Actuellement, l'utilisation des algues comme médicament s'effectue encore de façon empirique. Une meilleure connaissance des algues marines malgaches est encore nécessaire. Pour nos travaux ultérieurs sur *Plocamium corallorhiza*, nous envisagerons :

- de confirmer les types de polysaccharides,
- d'affiner la purification du produit XXII<sub>b</sub> afin de tester et de confirmer son activité antibactérienne, et
- de poursuivre l'étude chimique des autres extraits biologiquement actifs.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

ALEXEEV, 1980. Préparation de la substance à l'analyse, Analyse quantitative, 3<sup>ème</sup> éd., éd. MR. Moscou, pp. 48-50.

ANDERSON, N. S., CAMPBELL, J. W., HARDING, M. M., REES, D. A. and SAMUEL, J. W. 1969. X-ray Diffraction Studies of Polysaccharide Sulphates: Double Helix Models for  $\kappa$ - and  $\iota$ -Carrageenans, J. Mol. Biol, Vol. 45, pp. 85-99.

ANDRIAMANANTOANINA, H. C. 1992. Contribution à l'étude des propriétés physico-chimiques et à l'analyse structurale de l'agar de *Gracilaria corticata* de Madagascar, Thèse de Doctorat de 3<sup>ème</sup> Cycle, Chimie Organique, Option "Produits Naturels", Université d'Antananarivo.

ANDRIAMANANTOANINA, H., RANARIVELO, Y., ANDRIATSIFERANA, M. 1996. A Study of the Phycocolloids from Five Red Seaweeds Collected on the Southwest Coasts of Madagascar: *Eucheuma striatum*, *Eucheuma denticulatum*, *Hupnea misciformis*, *Desmia harveyi*, *Halymenia venusta*, 9<sup>th</sup> International Symposium on Marine Natural Products, Cape Town, South Africa.

ANDRIAMANANTOANINA, H., RANARIVELO, Y., ANDRIATSIFERANA, M. 1996. Comparison of Physico-Chemical Properties of the Agar from Two Species of *Gracilaria* Collected on the South Coasts of Madagascar, 9<sup>th</sup> International Symposium on Marine Natural Products, Cape Town, South Africa.

ARGANDONA, V. H., CAN-MARTIN, A., RIQUELME, A., DIAZ-MARRERO, A. R., CUETO, M., DARIAS, J., SANTANA, O., GUADANO, A., GONZALEZ-COLOMA, A. 2002. Antifeedant effects of marine halogenated monoterpenes, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 50, pp. 7029-7033.

ARSENAULT, G. P. and YAPHE, W. 1965. Effect of Acetaldehyde, Acetic Acid and Ethanol on the Resorcinol Test for Fructose, Analytical Biochemistry, Vol. 13, pp. 133-142.

ARSENAULT, G. P. and YAPHE, W. 1966. Fructose-Resorcinol-Hydrochloric Acid Test for Detection and Determination of Acetaldehyde, Analytical Chemistry, Vol. 38, n° 3, pp. 503-504.

ASARE, S. O. 1980. Seasonal Changes in Sulphate and 3,6-anhydrogalactose Content of Phycocolloids from Two Red Algae, Botanica Marina, Vol. XXIII, pp. 595-598.

BARRETT, T. W. 1981. Laser Raman spectra of mono-, oligo- and polysaccharides in solution, Spectrochimica Acta, Vol. 37A, n° 4, pp. 233-239.

- BELLION, C., BRIGAND, G., PROMÉ, J.C., WELTI, D. et BOCIEK, S. 1983. Identification et Caractérisation des précurseurs biologiques des carraghénanes par spectroscopie de RMN  $^{13}\text{C}$ , Carbohydrate Research, Vol. 119, pp. 31-48.
- BLUNT, J.W., COPP, B.R., MUNRO, M.H.G., NORTHCOTE, P.T., PRINSEP, M.R. 2003. Marine natural products, Natural Product Reports, Vol. 20, pp. 1-48.
- BOBIN-DUBIGEON, C., HOEBLER, C., LOGNONE, V., DAGORN-SCAVINER, C., MABEAU, S., BARRYJ, L., LAHAYE, M. 1997. Chemical composition, Physico-Chemical properties, enzymatic inhibition and fermentative characteristics of dietary fibres from edible seaweeds ISSN: 0240-8813, Vol. 17, n° 6, pp. 619-639.
- BODARD, M., MOLLION, J., CHRISTIAEN, D. et FOUCHER, T. 1980. Réflexions sur la culture industrielle des algues rouges, Vie Marine, Vol. 2, PP 9-24.
- BRUNETON, J. 1993. Polysaccharides des algues, Pharmacognodie, Phytochimie, Plantes médicinales, 2<sup>ème</sup> édition, pp. 41-54.
- CHAVANNE, M., JULLIEN, A., BEAUDOIN, G.J., FLAMAND, E. 1986. Chimie Organique expérimentale, Moduco BELIN.
- CHRISTIAEN, D. et BODARD, M. 1983. Spectroscopie infrarouge de films d'agar de *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenfuss, Botanica Marina, Vol. XXVI, pp. 425-427.
- CIANCIA, M.; MILAS, M.; RINAUDO, M. 1997. *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol., 20, pp. 35
- CIANCIA, M.; NOSEDA, M.D.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. 1993. Alkali-modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the Kappa/iota-, mu/nu- and lambda-series, Carbohydrate Polymers, Vol. 20, pp. 95-98.
- DONALD, B.S., JAMES, J.S. 1984. Plocamenone, a unique halogenated monoterpene from the red alga, Plocamium, Tetrahedron Letters, Vol. 25, n° 2, pp. 153-156.
- DUBOIS, M., GILLES, F. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, Anal. Chem., Vol. 28, pp. 350-356.
- FAULKNER, D.J. 2002. Marine Natural Products, Natural Product Reports, Vol. 19, pp. 1-48, and previous reports in this series.

FULLER, R. W., CARDELLINA II, J. H., JUREK, J., SCHEUER, P. J., ALVARADO-LINDNER, B., MCGUIRE, M., GRAY, G. N., STEINER, J. R., CLARDY, J., MENEZ, E., SHOEMAKER, R. H., NEWMAN, D. J., SNADER, K. M., BOYD, M. R. 1994. Isolation and structure/activity features of halomon-related antitumor monoterpenes from the red alga *Portieria hornemannii*, Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 37, pp. 4407-4411.

FULLER, R. W., CARDELLINA II, J. H., KATO, Y., BRINEN, L. S., CLARDY, J., SNADER, K. M., BOYD, M. R. 1992. A pentahalogenated monoterpene from the red alga *Portieria hornemannii* produces a novel cytotoxicity profile against a diverse panel of human tumor cell lines, Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 35, pp. 3007-3011.

GREER, C. W. and YAPHE, W. 1984. Characterisation of Hybrid (Beta-Kappa-Gamma) Carrageenan from *Eucheuma gelatinae* J. Agardh (Rhodophyta, Solieriaceae) Using Carrageenases, Infrared and <sup>13</sup>C-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Botanica Marina, Vol. XXVII, pp. 473-478.

GREER, C. W., SHOMER, I., GOLDSTEN, M. E. and YAPHE, W. 1984. Analysis of carrageenan from *Hypnea musciformis* by using  $\kappa$  and  $\iota$ -carrageenases and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, Carbohydrate Research, Vol. 129, pp. 189-196.

HIGGS, M.D.; VANDERAH, D.J.; FAULKNER, D.J. 1977. Polyhalogenated monoterpenes from *Plocamium cartilagineum* from the British coast, Tetrahedron, Vol. 33, pp. 2775-2780.

IBRAHIM, S. A. 2005. Etude Chimique, Biochimique et Biologique des feuilles de *Phyllarthron madagascariense* (BIGNONIACEAE), Mémoire de DEA, Biochimie Fondamentale et Appliquée, Option "Biochimie Appliquée aux Sciences Médicales", Université d'Antananarivo.

IRELAND, C.; STALLARD, M.O.; FAULKNER, D.J.; FINER, J.; CLARDY, J. 1976. Some chemical constituents of the digestive gland of the sea hare *Aplysia californica*, Journal of Organic Chemistry, Vol. 41, pp. 2461-2465.

JAUSSAUD, J. 1996. L'exploration des molécules, Nathan.

KLOAREG, B., QUATRANO, R. S. 1988. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides, Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev., Vol. 26, pp. 259-315.

- KNOTT, M.G., MWKANANZI, H., ARENDSE, C.E., HENDRICKS, D.T., BOLTON, J.J. , BEUKES, D.R. 2005. Plocoralides A-C, polyhalogenated monoterpenes from the marine alga *Plocamium corallorhiza*, *Phytochemistry*, Vol. 66, pp. 1108-1112.
- KÖNIG, G. M., WRIGHT, A. D., FRANZBLAU, S. G. 2000. Assessment of antimycobacterial activity of a series of mainly marine derived natural products, *Planta Medica*, Vol. 66, pp. 337-342.
- KÖNIG, G. M., WRIGHT, A. D., LINDEN, A. D. 1999. *Plocamium hamatum* and its monoterpenes: chemical and biological investigations of the tropical marine red alga, *Phytochemistry*, Vol. 52, pp. 1074-1053.
- KOVENSKY, J., COVIAN, J. A. and FERNANDEZ, A. C. 1990. A Suitable Method for a Rapid Estimation of Sulphated Positions in Polysaccharides of Pharmacological Interest, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 12, pp. 307-314.
- LONTREUIL, J. et SPIK, K. 1963. Méthodes colorimétriques des glucides totaux, *Microdosage des glucides ? Monographie*, n° 1, pp. 205-207.
- MANN, M.G.A., MKWANANZI, H.B., ANTUNES, E.M., WHIBLEY, C.E., HENDRICKS, D.T., BOLTON, J.J., and BEUKES, D.R. 2007. Halogenated Monoterpene Aldehydes from the South African Marine Alga *Plocamium corallorhiza*, *J. Nat. Prod.*, Vol. 70, pp. 596-599.
- MIRALLES, J., AKNIN, M., MICOUIN, L., GAYDOU, E. M. and KORNPROBST, J.M. 1990. Cyclopentyl and  $\omega$ -5 monounsaturated fatty acids from red algae of the solieriaceae, *Phytochemistry*, Vol. 29, n° 7, Pergamon Press plc, pp. 2161-2163.
- MOLLION, J. 1988. Etude des carraghénanes de *Rissoella venuculosa* sur les filiations entre les différents systèmes de carraghénanes, Thèse de 3<sup>ème</sup> Cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois.
- MOLLION, M. J. 1973. Etude préliminaire des Hypnées au Sénégal comme source de phycocolloïde, *Botanica Marina*, XVI, Fasc, Vol. 4, pp. 221-225.
- MUHAMMAD, S. A. and MUHAMMAD, K. P. 2003. Seco-Dolastanes from the marine brown alga *Dictyota dichotoma* (Huds.) Lamour, 58, N° 5, p. 438-442.
- NAGEL, C. W., and WILSON, T. M. 1969. The Isolation of Oligogalacturonate acids by column chromatography, *Journal of chromatography*, Vol. 41, pp. 410-416.



- PAPIN, J. P. et UDIMAN, M. 1977. Chromatographie sur Couche Mince des principaux cétones, *Journal of Chromatography*, Vol. 132, pp. 339-343.
- PERCIVAL, E. 1980. Desulfation of Polysaccharides, *Meth. Carbohydr. Chem*, Vol. 8, pp. 281-285.
- PERCIVAL, E. and Mc DOWELL, R. H.. 1967. Composition and Biosynthesis, *Algal Walls*, n° 12, pp.277-307.
- RACHAS, C., LAHAYE, M. and YAPHE, W. 1986. Sulfate content of Carrageenan and Agar determined by infrared spectroscopy, pp. 1-14.
- REES, D. A. 1963. A Note on the Characterization of Carbohydrate Sulphates by Aced Hydrolysis, *Biochem. J.*, Vol. 88, pp. 343.
- REES, D. A., STEELE, I. W., and WILLIAMSON, F. B. 1969. Conformational Analysis of Polysaccharides .III. The Relation between Stereochemistry and Properties of Some Natural Polysaccharide Sulfates, *J. Polymer Sci.: Part C*, n° 28, pp. 261-276.
- RINAUDO, M.2002. Les alginates et les carraghénanes, *actualité chimique*,pp.35-38.
- ROCHAS, C. and HEYRAUD, A. 1981. Acid and Ezymic Hydrolysis of Kappa Carrageenan, *Polymer Bulletin*, Vol. 5, pp. 81-86.
- ROCHAS, C.; RINAUDE, M. 1984. *Biopolymers*, Vol. 23, pp. 735.
- SAN-MARTIN, A., NEGRETE, R., ROVIROSA, J. 1991. Insectiside and acaricide activities of polyhalogenated monoterpenes from Chilean *Plocamium cartilagineum*, *Phytochemistry*, Vol. 30, pp. 2165-2169.
- SANTOS, A. 1980. Quality of carrageenan, and agar , in pacific seaweed aquaculture, *Proc. Symp. on Useful Algae*, pp.123-129.
- SMIDSRØD, O., LARSEN, B., PERNAS, A. J. and HAUG, A. 1967. The Effed of Alkale Treatment on the Chemical Heterogeneity and Pjysical Propriétés of Some Carrageenans, *Acta Chem. Scand*, Vol. 21, n° 10, pp. 2585-2598.
- STIERLE, D.B.; WING, R.M. ; SIMS, J.J. 1979. Marine natural products XVI, Polyhalogenated acyclic monoterpenes from the red alge *Plocamium* of Antarctica, *Tetrahedron*, Vol., 35, pp. 2855-2859.

TABATABAI, M. A. 1974. Determination of Sulphate in water Samples Sulphur, Inst. J., Vol. 10, pp. 11-13.

TILLMANS, J., PHILIPPI, K. 1929. The Carbohydrate Content of the Important Proteins of Foostuffs and a Colorimetric Procedure for the Determination of Nitrogen-Free Sugar in Protein. Biochem. Z., Vol. 215, pp. 36-60.

TIPSON, R. S. 1953. Advan. Carbohydrate Chem., Vol. 8, pp. 107.

TUULIKKI, T. T. and HARTIALA, K. 1971. Method for determination of the Sulfate Content of Glycosaminoglycans, Analytical Biochemistry, Vol. 41, pp. 471-476.

USOV, A. I. 1984. NMR Spectroscopy of Red Seaweed Polysaccharides : Agars, Carrageenans, and Xylans, Botanica Marina, Vol. XXVII, pp. 198-202.

VERDUS, M. C., CHRISTIAEN, D., STADLER, T. et MORVAN, H. 1986. Etude ultrastructurale et cytochimique de la paroi cellulaire chez *Gracilarea verrucosa* (Rhodophyceae), Can. J. Bot., Vol. 64, pp. 96-101.

VOLLHARDT, C.P.K., SCHORE, N. 1995. Traité de Chimie Organique 2<sup>ème</sup> éd., De Boeck-wesmael Bruxelles.

WHYTE, J. N. C. , ROREMAN, R. E. , DEWREEDE, R. E. 1984. Phycocolloid screening of British Columbia red algae, Hydrobiologia, Vol. 116, pp. 537-541.

WUITNER, E. 1865-1946. Les Algues Marines des Côtes de France.

YAPHE, W. 1957. The Use of agarase from *Pseudomonas Atlantica* in the identification of agar in marine algae (RHODOPHYCEAE), Can. J. Microbiol, Vol. 3, pp. 987-993.

YAPHE, W. 1959. The Determination of  $\kappa$ -carrageenin as a factor in the classification of the Rhodophyceae, Can. J. Botany, Vol. 37, pp. 751-757.

YAPHE, W. 1960. Colorimetric Determination of 3,6-Anhydrogalactose and Galactose in Marine Algal Polysaccharides, Analytical Chemistry, September, Vol. 32, n° 10, pp. 1327-1330.

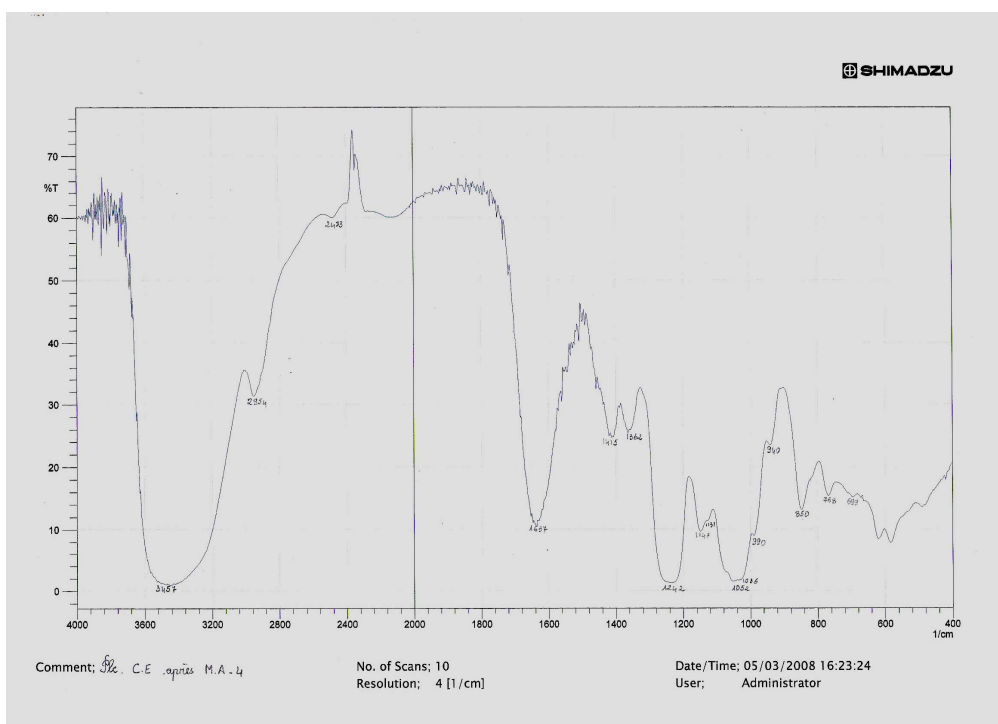
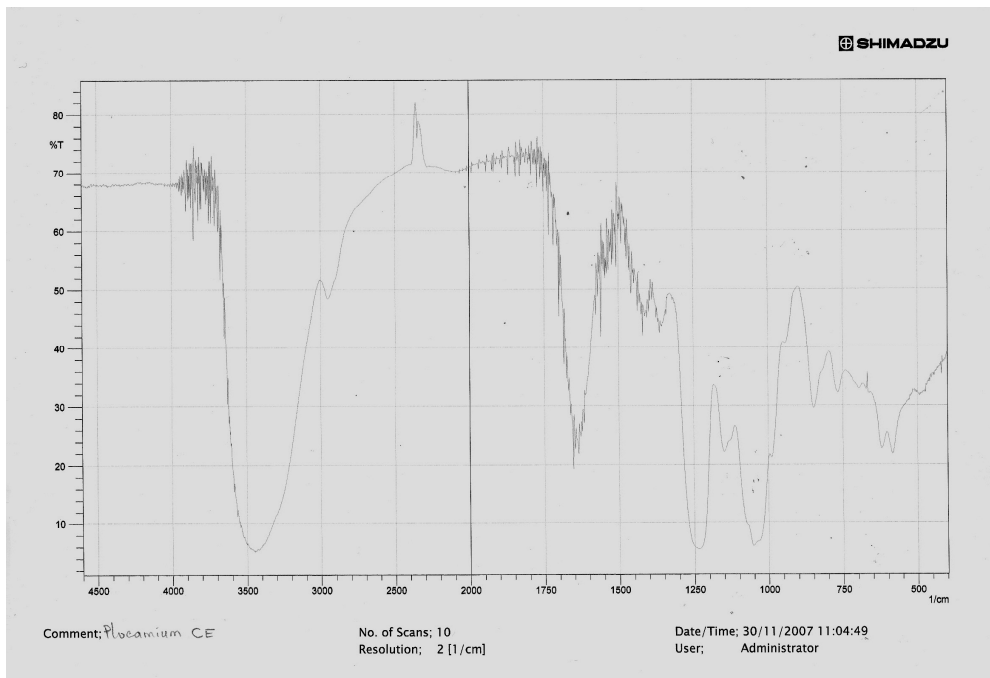
YAPHE, W. 1972. Chemistry of Carrageenan, Microbiology & Immunology.

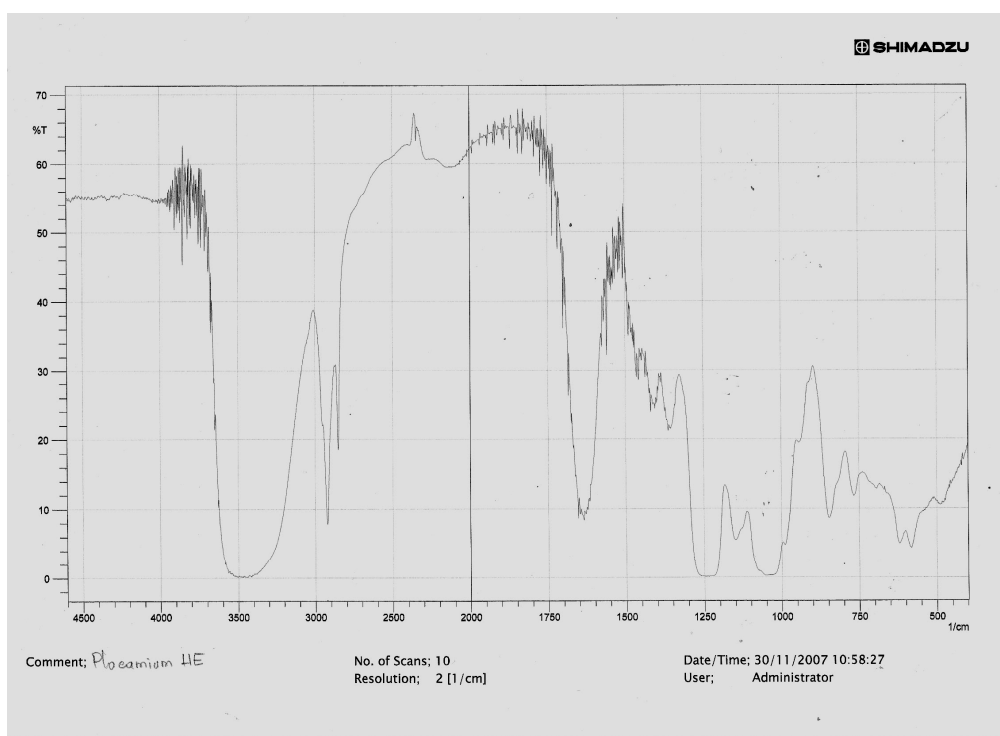
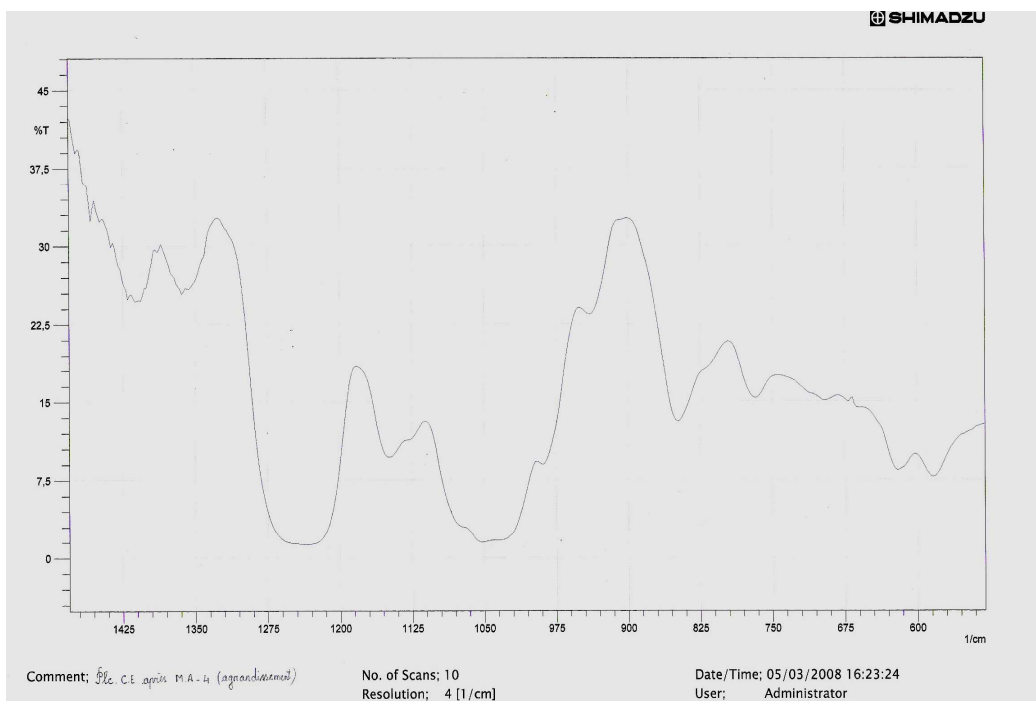
YAPHE, W. and ARDENAULT, G. P. 1965. Improved Resorcinol Reagent for the Determination of Fructose, and of 3,6-Anhydrogalactose in Polysaccharides, *Analytical Biochemistry*, Vol. 13, pp. 143-148.

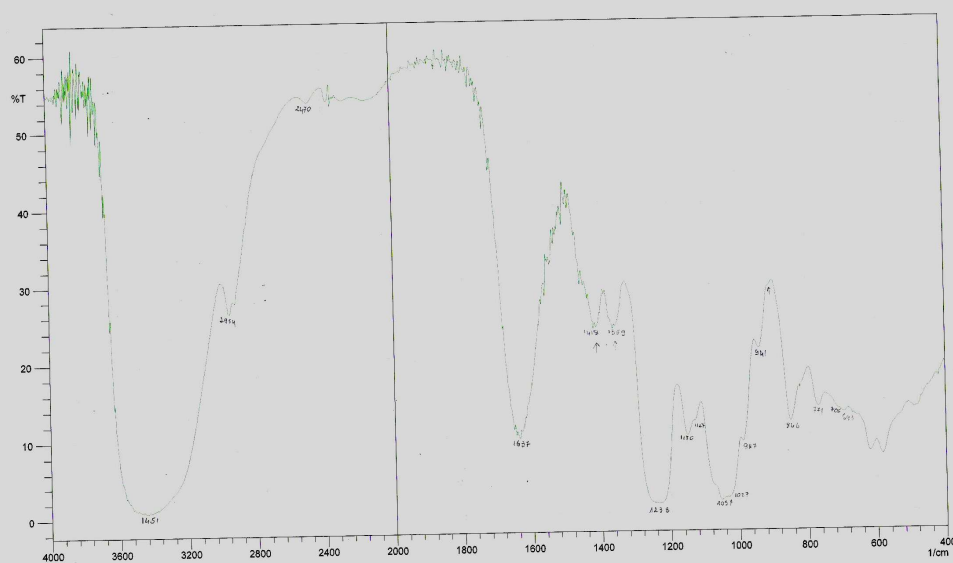
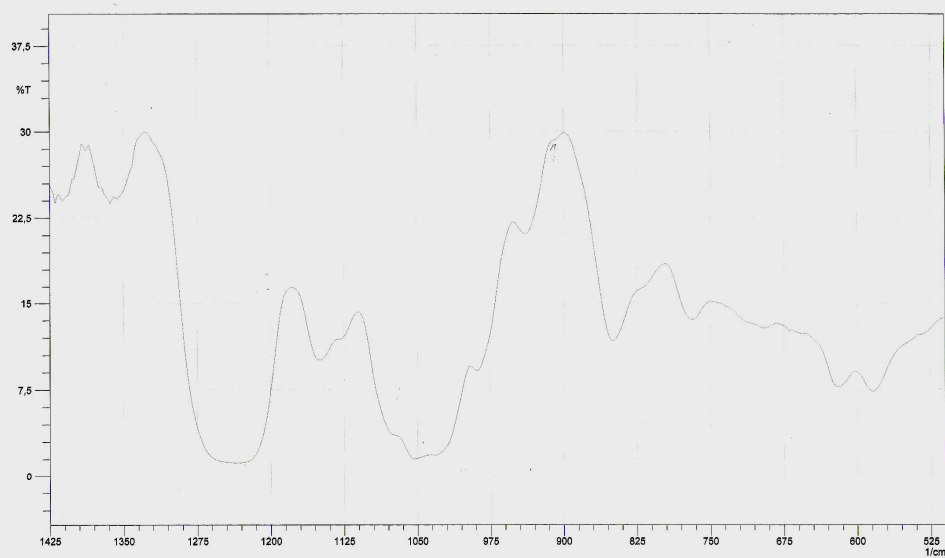
# ANNEXES

## I

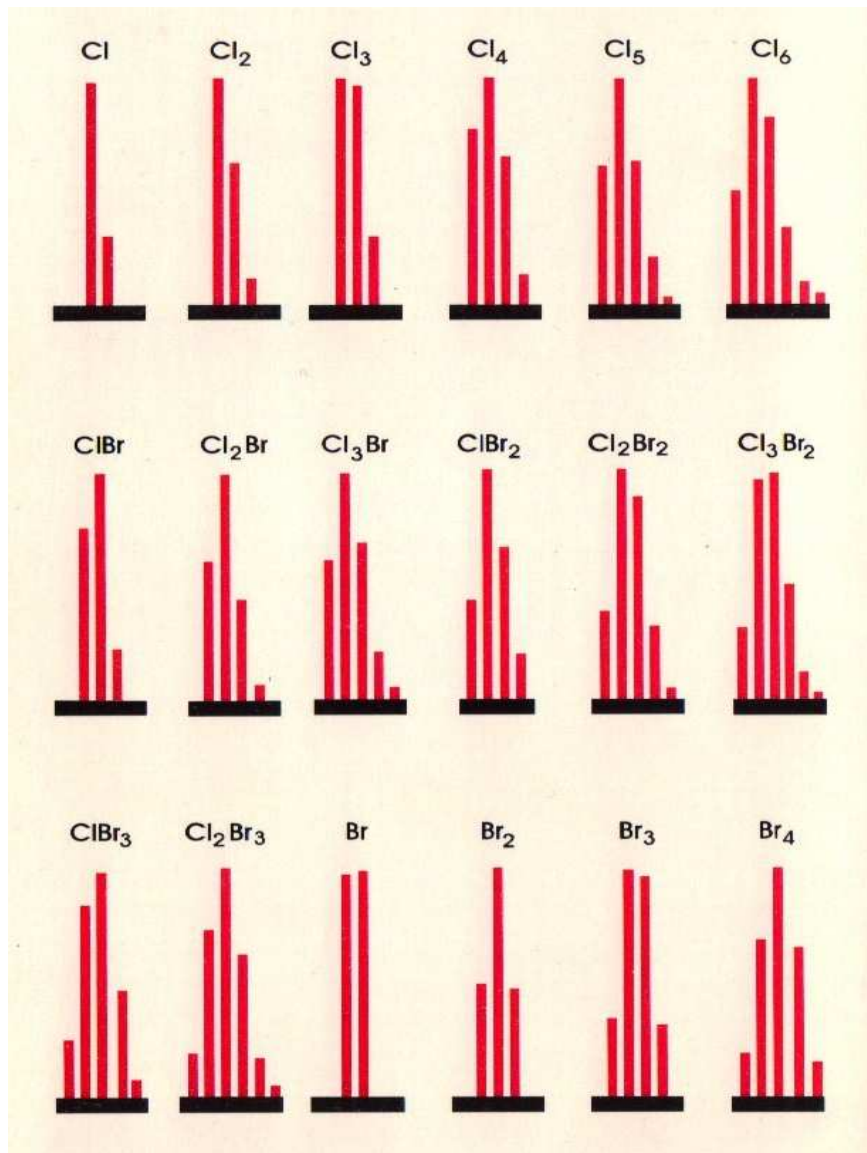
## Spectres InfraRouge des carraghénanes de *P. corallorhiza*





Comment; *HE apres M.A.4*No. of Scans; 10  
Resolution; 4 [1/cm]Date/Time; 05/03/2008 16:14:19  
User; AdministratorComment; *HE apres M.A.4 (agrandissement)*No. of Scans; 10  
Resolution; 4 [1/cm]Date/Time; 05/03/2008 16:14:19  
User; Administrator

Amas isotopiques résultant de la combinaison de 1 à 5 d'halogènes soit chlore, soit brome



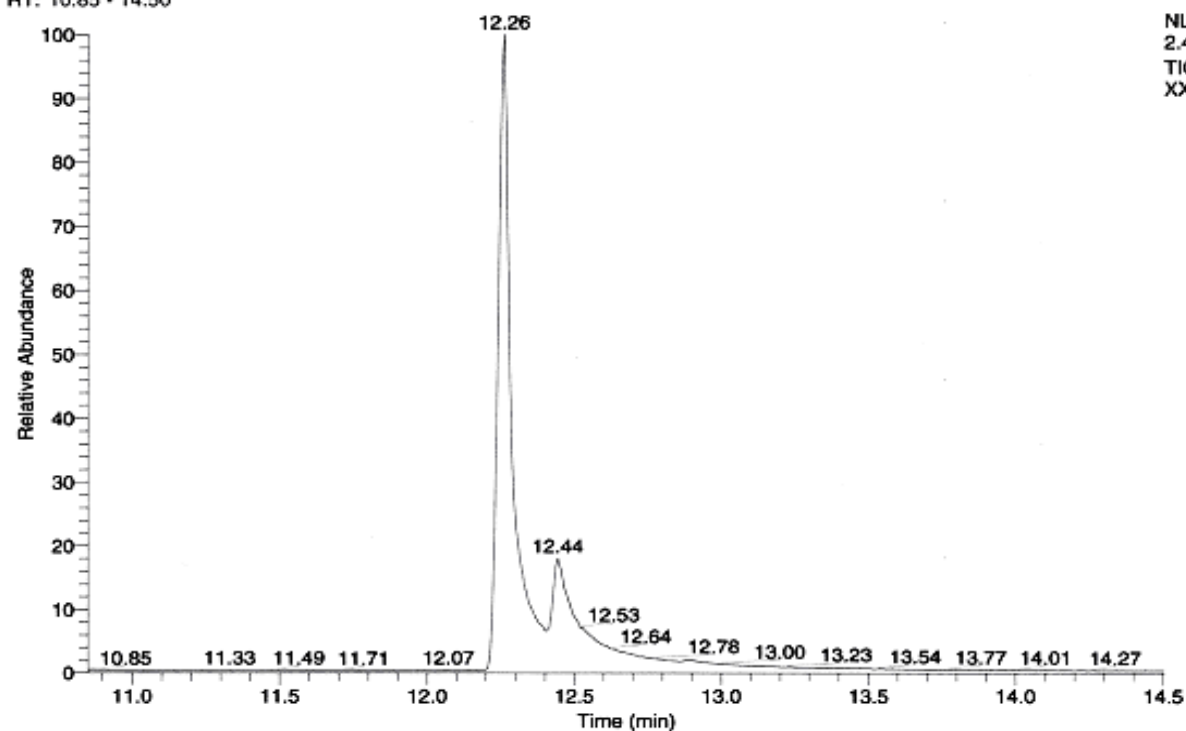


# Chromatogramme et spectre de masse de XXII<sub>b</sub>

C:\Users\...Other Analysis\XXHB\_ci  
he

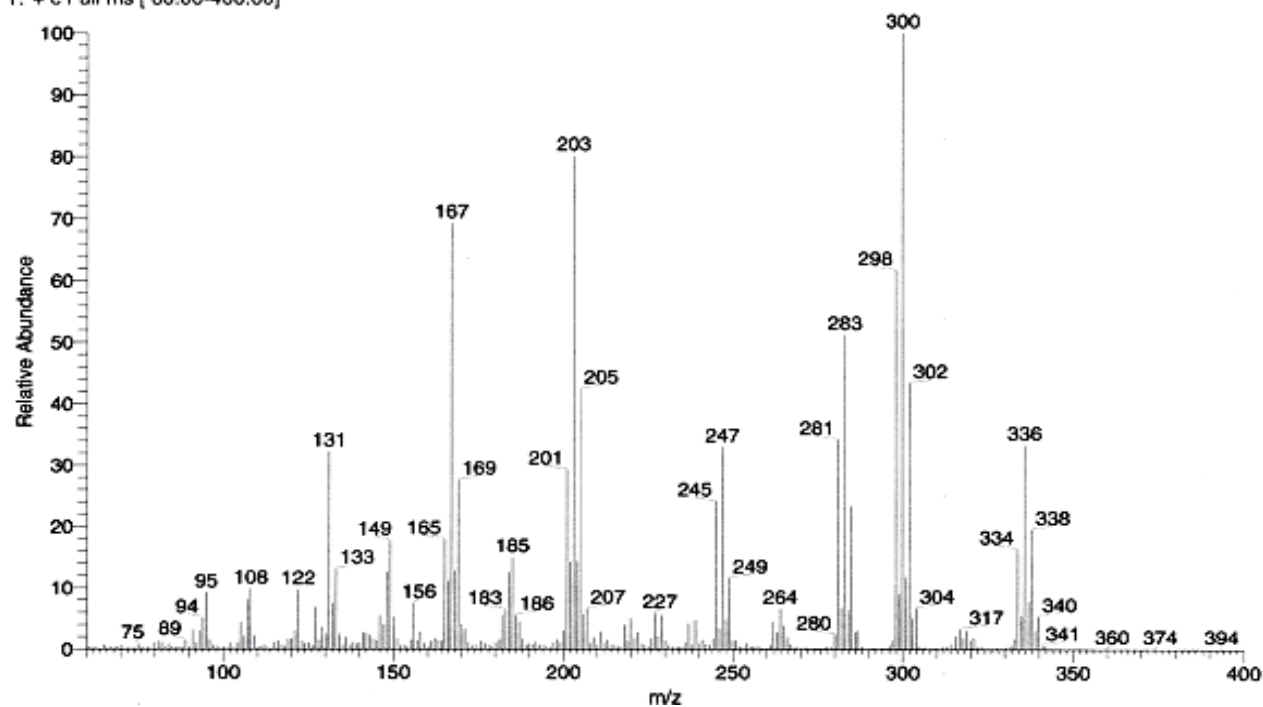
1/18/2008 9:48:16 AM

RT: 10.85 - 14.50



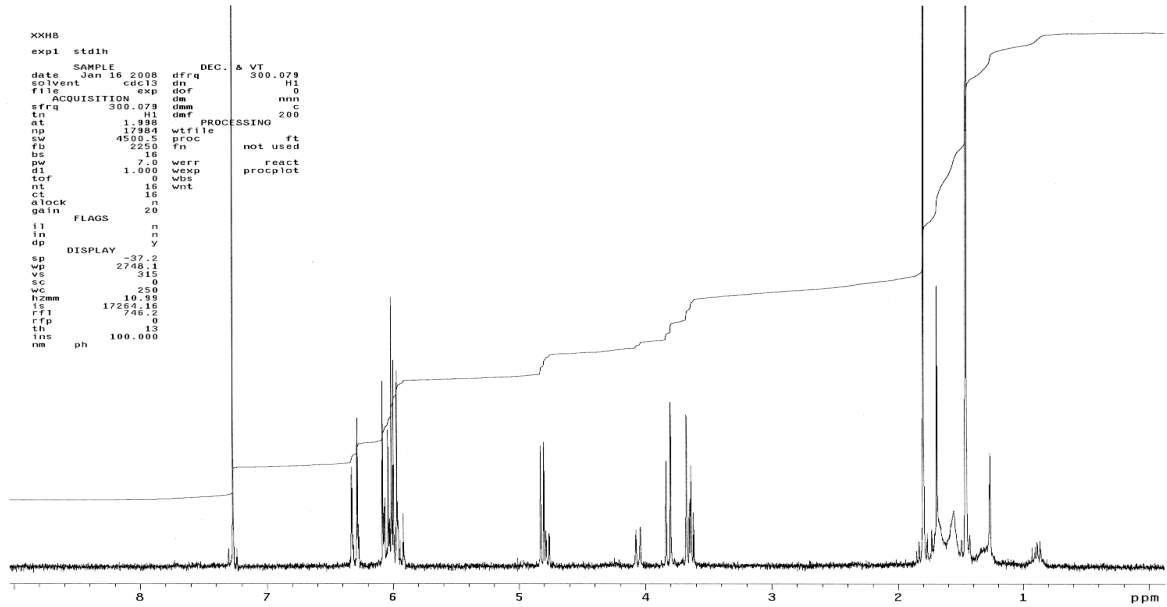
NL:  
2.43E6  
TIC F: MS  
XXHB\_ci

XXHB\_ci #1051-1059 RT: 12.23-12.28 AV: 9 SB: 37 12.35-12.60 NL: 1.02E5  
T: + c Full ms [ 60.00-400.00]

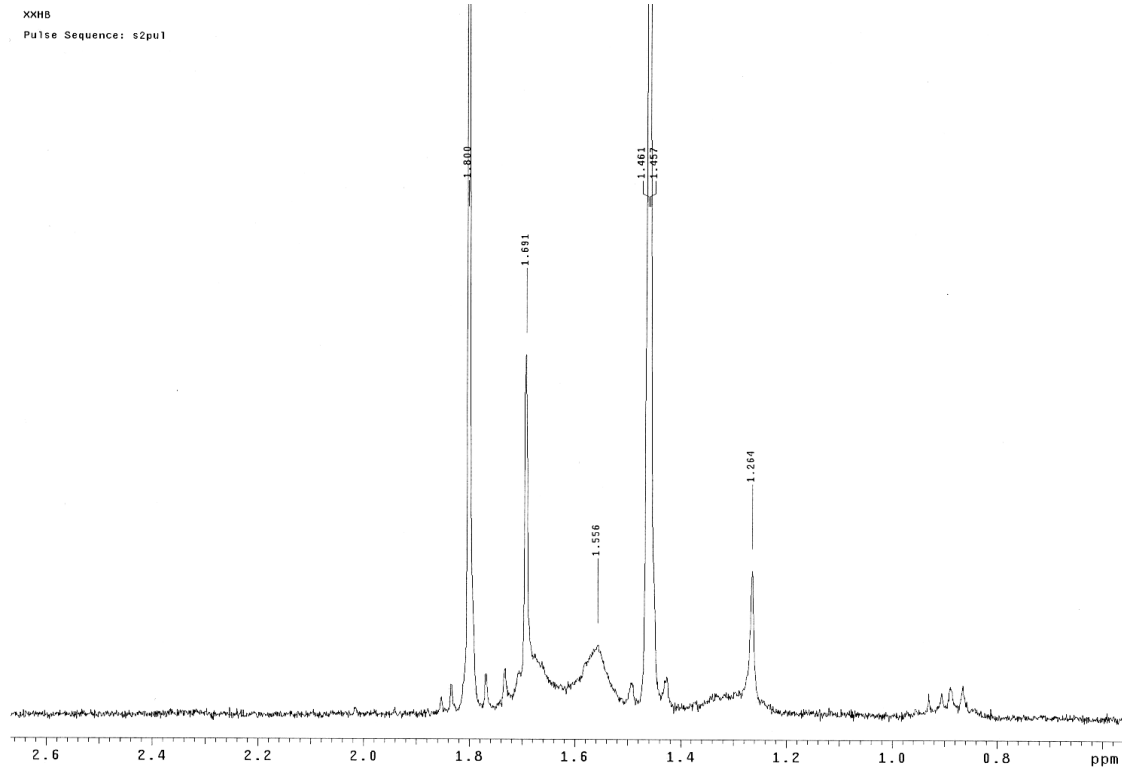


# Spectres de RMN de XXII<sub>b</sub>

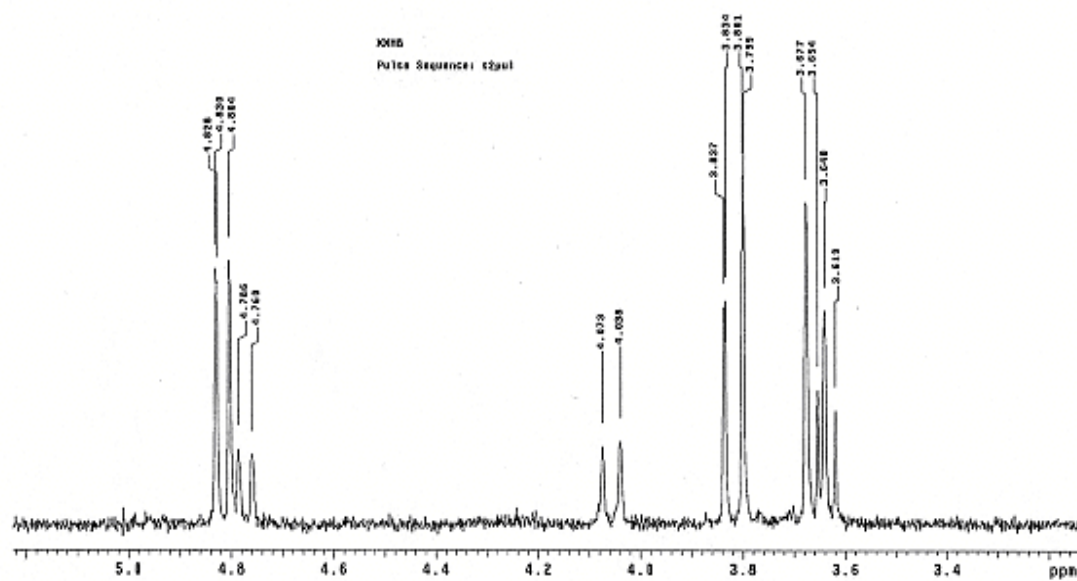
## S1a



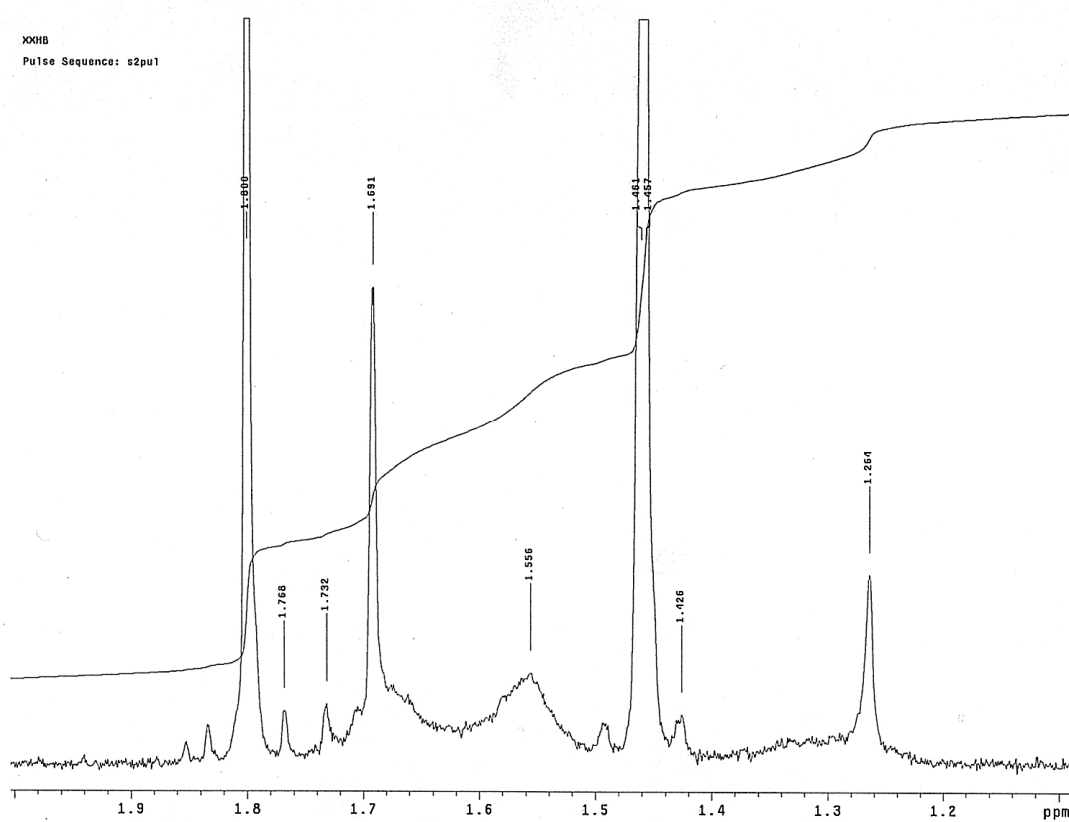
## S1b



S1c



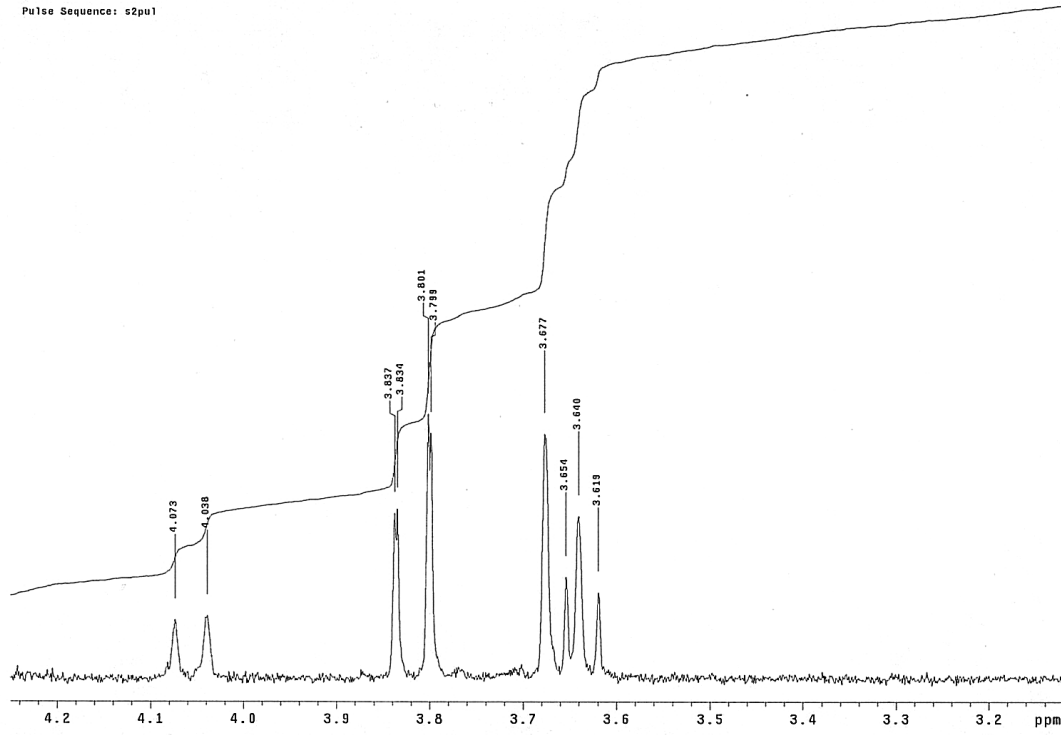
S1d



S1e

XXHB

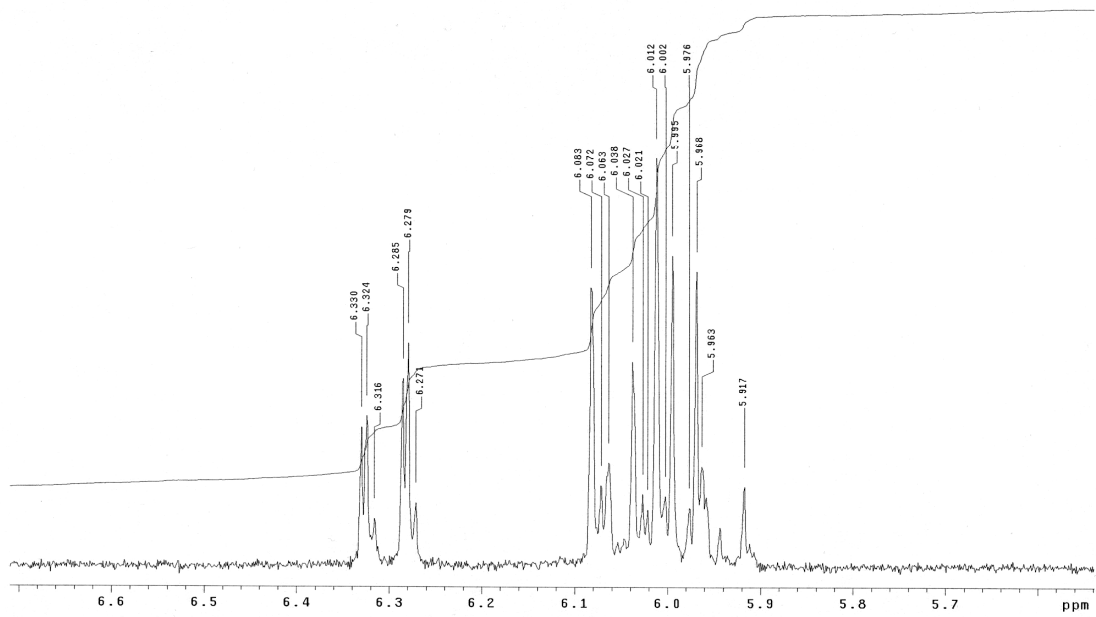
Pulse Sequence: s2pu1



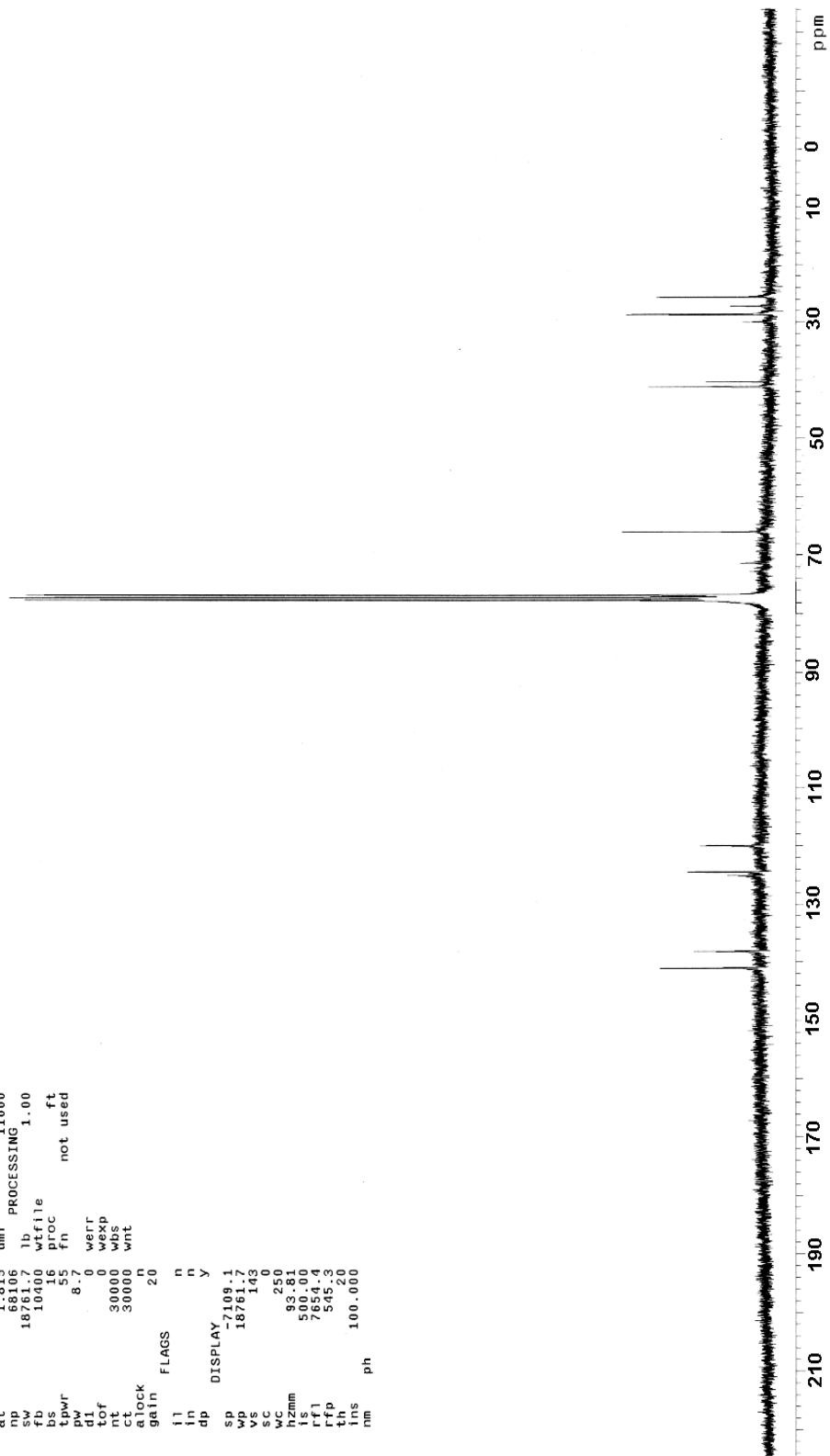
S1f

XXHB

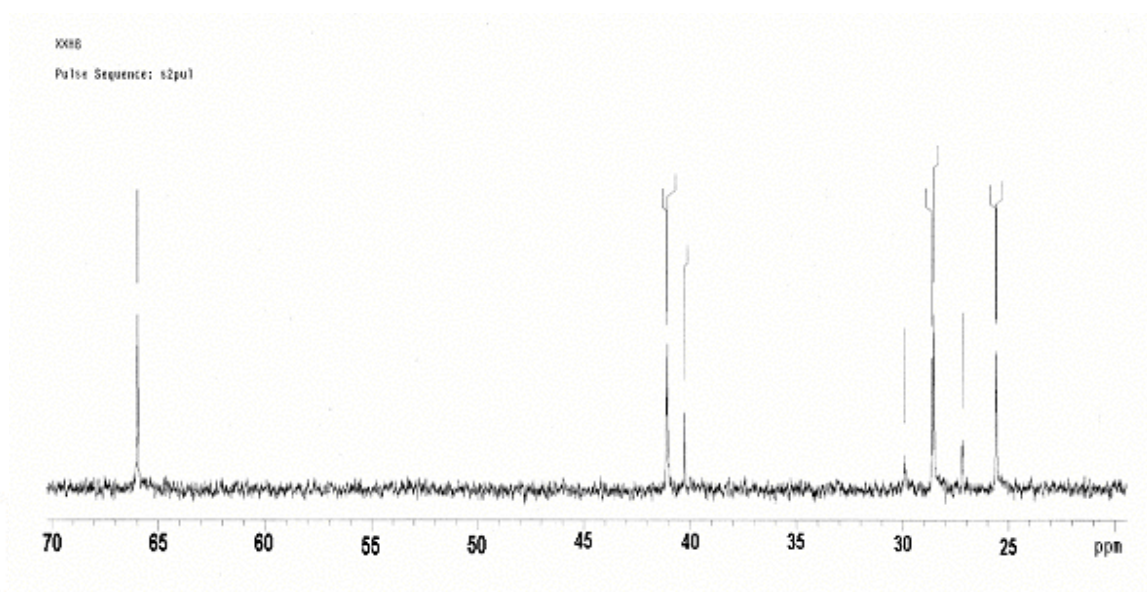
Pulse Sequence: s2pu1



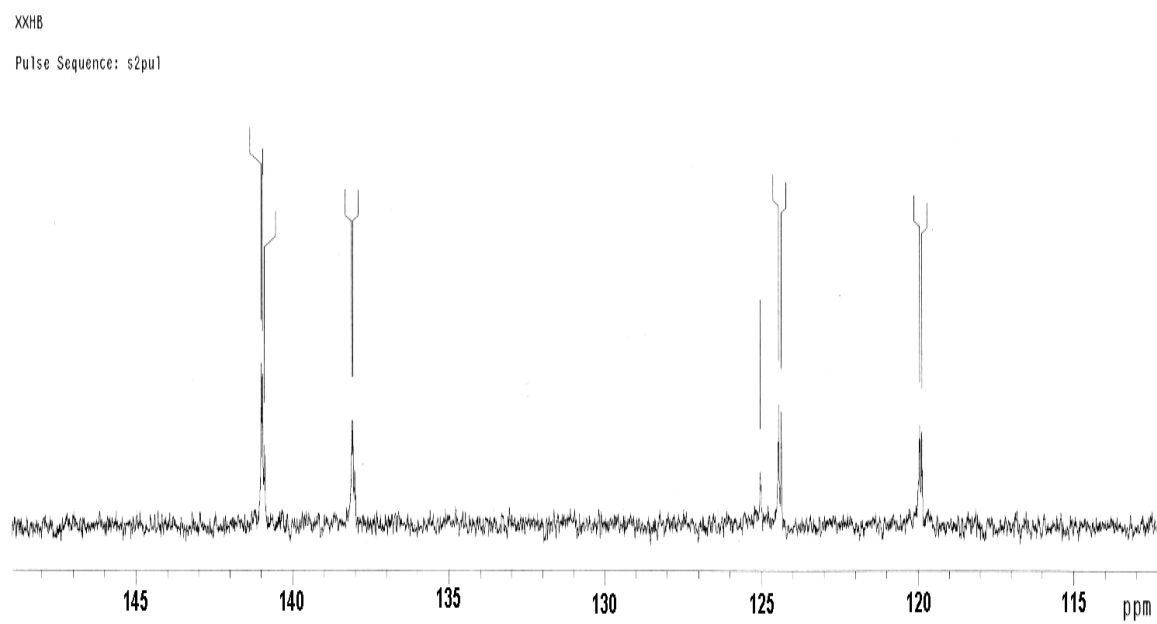
XXHB	exp2	std13c	SAMPLE	DEC. & VT
date	Jan 23	2008	dfrq	239.943
solvent	COC13		dn	31
fl	exp		dn	30
ACQUISITION	exp		dof	30
sfreq	75.428		dm	yyv
tn	C13		dmm	w
at	1.815		dmm	11000
np	68106		dmf	PROCESSING
sw	18781.7		lb	1.00
bs	1046		lb	file
bs	16		proc	ft
tpwr	55		fn	not used
pw	8.7		werr	
to	0		wexp	
tof	30000		wbs	
nt	30000		wnt	
clock				
gain	20			
FLAGS				
fl	n			
in	n			
dp	y			
DISPLAY				
sp	2100.1			
sw	18781.7			
ws	143			
sc	0			
wc	250			
hzm	93.81			
hzmm	500.00			
ls	7684.3			
rfi	345.20			
th				
ins	100.000			
ph				



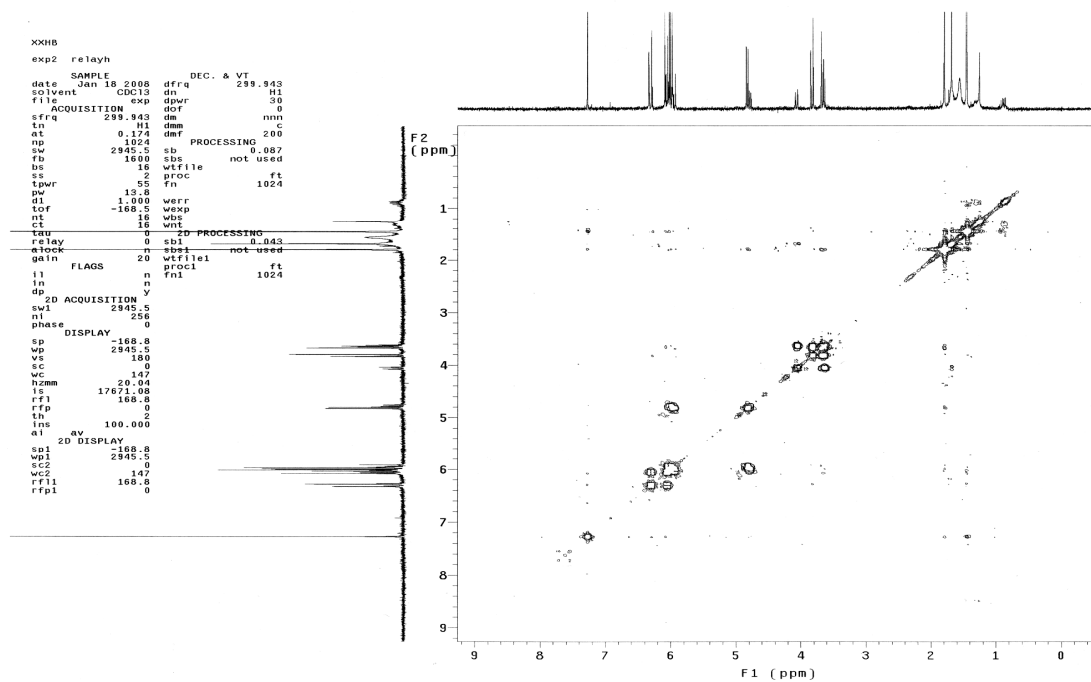
**S2b**



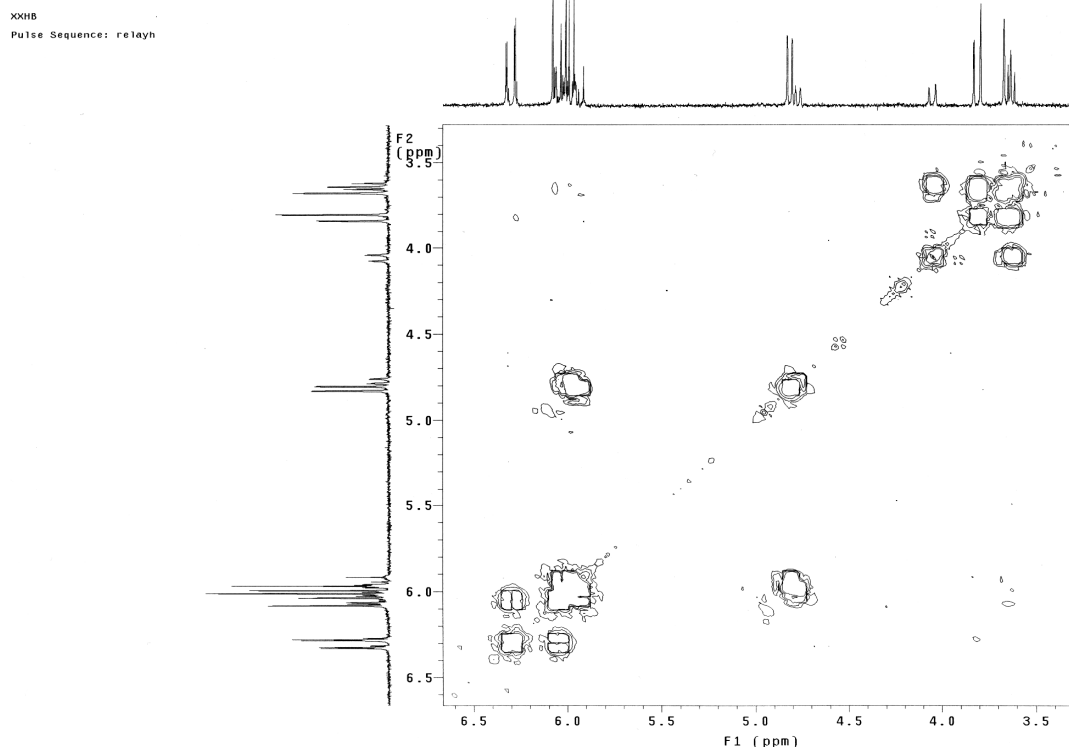
**S2c**



# S3a



# S3b



**Auteur** RAHELIVAO Marie Pascaline  
**Adresse** Laboratoire de Chimie Organique Substances Marines (LCOSM) Ampasampito  
Département de Chimie Organique, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo  
**E-mail** mariEPSA@yahoo.fr  
**Téléphone** 032 41 744 12

**Titre** Contribution à l'Etude des polysaccharides de *Plocamium corallorhiza* (PLOCAMIACEAE), une algue rouge de Madagascar. Isolement d'un composé monoterpénique polyhalogéné.

Nombre de pages 86  
Nombre de figures 16  
Nombre de schémas 01  
Nombre de tableaux 25

**Mots-clés** *Plocamium corallorhiza*, algue marine, algue rouge, carraghénane, dosage, IR, CPG/SM, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, activité antimicrobienne, monoterpène polyhalogéné.

**Keys words** *Plocamium corallorhiza*, marine algae, red algae, carrageenan, dosage, IR, GC/MS, <sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR, antimicrobial activity, polyhalogenated monoterpene.

### Résumé

*Plocamium corallorhiza*, une algue rouge, récoltée dans la région de Taolagnaro, fait l'objet d'étude chimique de ce mémoire. Les polysaccharides extraits de cette algue marine sont constitués de carraghénanes, formé d'unité de répétition D-galactose/D-galactose. Les méthodes de dosages colorimétriques, réalisées pour la détermination des teneurs en sucres totaux, en groupements sulfate et en unité 3,6-Anhydrogalactose, associées aux méthodes physico-chimiques d'analyses des polysaccharides (modification alcaline, spectroscopie Infra rouge) ont permis d'avancer que les polysaccharides de *P. corallorhiza* pourraient être constitués d'un mélange de  $\mu$ -,  $\gamma$ -, et de  $\omega$ -carraghénanes.

Un produit codé XXIIb, a été isolé de la fraction hexanique de *P. corallorhiza*. Une hypothèse de structure a été donnée sur la base des résultats d'analyses chromatographiques : CLBP, CCM, CPG/SM, CPG/IRTF, d'une part, des données spectrales (RMN<sup>1</sup>H et RMN<sup>13</sup>C), d'autre part. Il s'agit d'un monoterpène polyhalogéné : 7-bromo-4,4,8-trichloro-5,6-diméthyl-octa-1,5-diène-3-ol.

Des tests d'activité antimicrobienne des fractions, ainsi que des tests d'activité antimalariale, ont montré que *P. corallorhiza* pourrait constituer une algue thérapeutique.

### Abstract

*Plocamium corallorhiza*, a red alga, collected in the area of Taolagnaro, is the chemical subject of study of this memory. The polysaccharides extracted from this marine alga consist of carrageenans, formed of unit of repetition D-galactose/D-galactose. The colorimetric dosing method for total sugar contents, sulfates and 3,6-Anhydrogalactose units determination, associated with the physicochemical polysaccharides analysis methods (alkali- modification, IR spectroscopy) allowed to advance that polysaccharides of *P. corallorhiza* could be made up of a mixture of  $\mu$ -,  $\gamma$ -, et de  $\omega$ -carragheenans.

One compound coded XXIIb was isolated from the hexanic fraction of *P. corallorhiza*. Structure proposition was given on the basis of chromatographic analysis results and spectral data (LPLC, TLC, GC/MS, GC/IRTF, <sup>1</sup>HNMR and <sup>13</sup>CNMR): it may be a polyhalogenated monoterpene 7-bromo-4,4,8-trichloro-5,6-dimethyl-octa-1,5-dien-3-ol.

Antimicrobial and antimalarial activities of some fractions showed that *P. corallorhiza* could be a therapeutic alga.

### Directeur de mémoire

Yvonne RANARIVELO  
Professeur titulaire  
Laboratoire de Chimie Organique Substances Marines (LCOSM) Ampasampito  
Département de Chimie Organique, Faculté des Sciences, BP 906- Université d'Antananarivo  
Tél. : 034 04 461 36  
E-mail : yrana@refer.mg

### Co-encadreur

Hanta ANDRIAMANANTOANINA  
Maître de Recherche  
Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, Centre National de Recherche sur l'Environnement  
BP 1739, Fiadanana Antananarivo  
Tél : 261 33 12 397 12 / 261 34 08 073 92  
E-mail : andriamanantoanina@yahoo.fr