

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I -) GENERALITES SUR LES ALGUES

I- 1) Définition et caractères généraux des algues

I- 2) Classification des algues

I- 3) Les algues rouges

a) Rhodophycées de la côte sénégalaise

b) Algues rouges : genre *Polysiphonia*

I- 4) Familles de composés isolés du genre *Polysiphonia*

a) Glucides et dérivés

b) Bromophénols

c) Acides gras

d) Lipides polaires

e) Amino-acides

f) Stérols

II -) MATERIEL ET METHODES

II-1) Présentation de l'espèce *Polysiphonia harveyi*

a) Lieu de récolte

b) Description de l'espèce *Polysiphonia harveyi*

II-2) Méthodes d'extraction et d'analyse

a) Rappels de chromatographie

b) Méthodes spectroscopiques

- Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

- Spectroscopie de masse

c) Extraction

d) Fractionnement et purification par chromatographie

III -) RESULTATS ET DISCUSSIONS

III-1) Détermination structurale de f_2 isolé de la fraction F_2

a) Analyse du spectre RMN ^{13}C

b) Analyse du spectre de masse

c) Analyse du spectre RMN ^1H

d) Analyse du spectre HMBC

III - 2) Détermination structurale de f_3 isolée de la fraction F_3

a) Analyse du spectre RMN ^1H

b) Analyse du spectre de masse

III - 3) Détermination structurale de la fraction B isolée de F_4

a) Analyse du spectre RMN ^1H

b) Analyse du spectre de masse

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Moins bien connues que la plupart des autres végétaux du fait de leur habitat essentiellement aquatique qui les place hors de l'environnement habituel de l'homme, les algues sont des thallophytes chlorophylliens.

La flore algale de la côte sénégalaise est assez riche avec près de 260 espèces d'algues, dont la proportion en algues rouges représente près de 50% (1).

Des études effectuées sur les algues ont permis de mettre en évidence, des produits organiques élaborés et s'accumulant dans les cellules où ils se manifestent comme métabolites propres, c'est le cas de l'amidon ou des lipides (2).

En effet on remarque l'importance des algues dans la biosphère, par leur photosynthèse ; elles produisent à partir du gaz carbonique une masse annuelle très importante de composés organiques.

Elles peuvent aussi jouer le rôle de défense chimique sur le plan écologique en synthétisant un métabolite secondaire (soit une molécule ou une substance toxique) pour survivre du fait de l'environnement où elles peuvent être attaquées par les prédateurs ou par les agents pathogènes.

Ce métabolite synthétisé pour sa survie, nocif à une bactérie si on l'isole peut servir de médicaments ou de médiateurs chimiques. On peut aussi noter que certaines rhodophycées ou algues rouges sont employées comme engrais.

L'utilisation la plus généralisée des algues rouges est la production industrielle de substances polysaccharidiques renfermant une certaine proportion de monomères sulfatés.

Ces substances, élaborées au niveau des parois, sont plus ou moins solubles dans l'eau bouillante et donnent des produits industriels : l'agar-agar ou gélose et le carraghénane (3).

L'énumération d'ailleurs incomplète, des usages de ces produits explique qu'à l'heure actuelle, l'industrie des dérivés des algues rouges soit florissante.

Ainsi l'étude sur les constituants chimiques des algues constitue un véritable enjeu pour le développement de la recherche de nouveaux métabolites.

Ce travail constitue une contribution à l'étude des métabolites secondaires de l'algue rouge *Polysiphonia harveyi*, isolés à partir de fractions polaires de l'algue et identifiés par des techniques modernes d'analyse.

Ce mémoire comprend trois parties :

- 1- Généralités sur les algues ;
- 2- Matériel et méthodes ;
- 3- Résultats et discussions.

GENERALITES

SUR

LES ALGUES

I- GENERALITES SUR LES ALGUES.

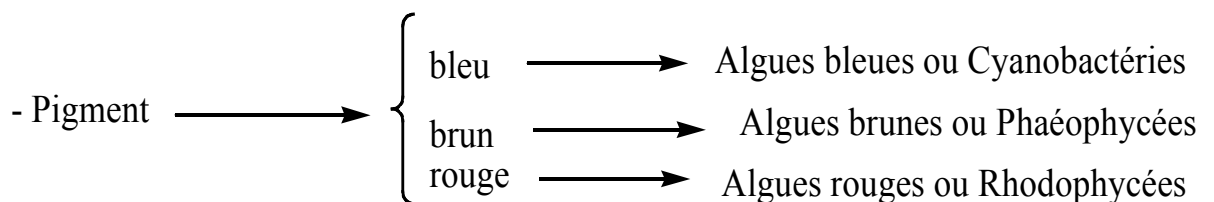
I-1) Définitions et caractères généraux des algues

Les algues sont des organismes chlorophylliens. Elles présentent une très grande diversité morphologique ayant des formes uni ou pluricellulaires. Leur appareil végétatif qui est dépourvu de racines, de tiges et de feuilles est nommé thalle (4). Ce thalle en aucun cas ne comporte des organes différenciés comme en ont les végétaux supérieurs, d'où l'absence de tissus vasculaires. Ils se reproduisent sans jamais donner des fruits, graines ou fleurs d'où le terme de cryptogrammes. Bien que renfermant de façon constante de la chlorophylle, la couleur du thalle n'est pas toujours verte, car un pigment spécifique lié à la classe de l'algue considérée peut s'ajouter au pigment photosynthétique fondamental.

I-2) Classification des algues

Ainsi à partir de la couleur de l'algue, une première classification peut être faite.

- Absence de pigments surnuméraires : Algues vertes ou chlorophycées
- Présence de pigments surnuméraires :



A partir de cette classification, les algues sont réparties en plusieurs sous-classes (4). Cependant nous ne nous intéresserons qu'aux trois grandes divisions d'algues marines macroscopiques :

- Les Chlorophycées
- Les Phaéophycées
- Les Rhodophycées

I-3) Les algues rouges

Les rhodophycées ou algues rouges viennent après les algues vertes. Elles constituent l'unique classe de l'embranchement des Rhodophytes et essentiellement marines. On compte 4000 espèces qui se répartissent en deux grandes classes (5).

Les Bangiophycées (Bangiales) qui sont des formes primitives microscopiques et unicellulaires. A l'exception du *Porphyra*, algue macroscopique.

Les Floridéophycées sont les formes macroscopiques pluricellulaires les plus évoluées. Toutes les algues rouges macroscopiques appartiennent à ce groupe.

a) Rhodophycées de la côte sénégalaise

C'est la classe d'algues la plus représentée de la côte sénégalaise soit près de 50% de l'ensemble avec quelques espèces très répandues comme le genre *Polysiphonia*, *Laurencia*, *Corallina*, *Meristotheca*, *Gracilaria* etc. (1).

b) Algue rouge : genre *Polysiphonia*

La majeure partie des espèces du genre *Polysiphonia* sont réparties sur toutes les côtes du monde. On dénombre 14 espèces de *Polysiphonia* dans 25 algues de l'ordre des Cérariales et 9 de la famille des Rhodomélacées apparentées. Donc, à présent le *Polysiphonia* a une circonscription générale incluant au moins 200 espèces. Les *Polysiphonia* comportent trois clades fortement étayés, groupe *Polysiphonia*, groupe *Neosiphonia* et groupe "multipéricentrique". Etant donné la confusion qui entoure la taxonomie traditionnelle dans le genre *Polysiphonia*, une matrice de 28 caractères anatomiques est produite représentant l'espèce des lignées principales du genre *Polysiphonia* (6).

C'est ainsi que différentes familles de composé ont été identifiées à partir du genre *Polysiphonia*.

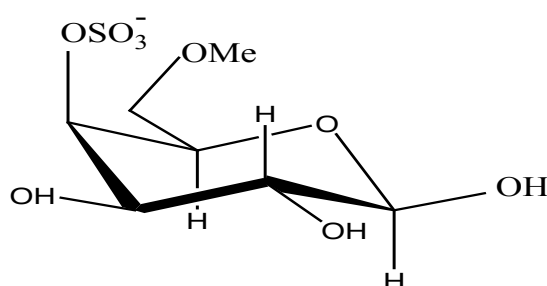
I-4) Familles de composés isolés du genre *Polysiphonia*

L'étude des métabolites secondaires du *Polysiphonia* permet de distinguer les familles de composés suivantes : (7)

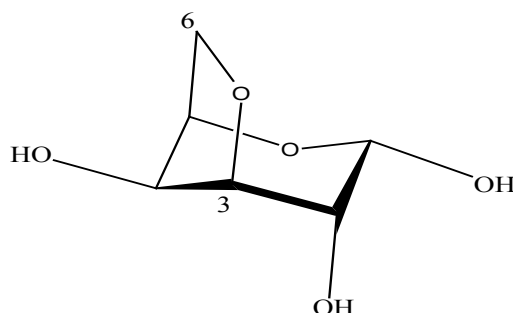
- Glucides et dérivés ;
- Bromophénols ;
- Acides gras ;
- Lipides polaires ;
- Amino-acides ;
- Stérols.

a) Glucides et dérivés ;

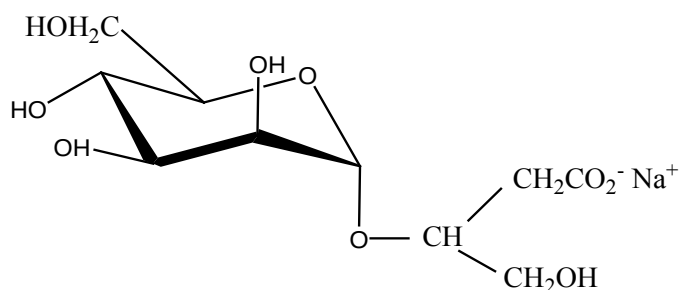
Batey et Turvey (8) ont isolé du *P. lanosa* le composé 6- O-méthyl-4-sulfate- β -galactose.



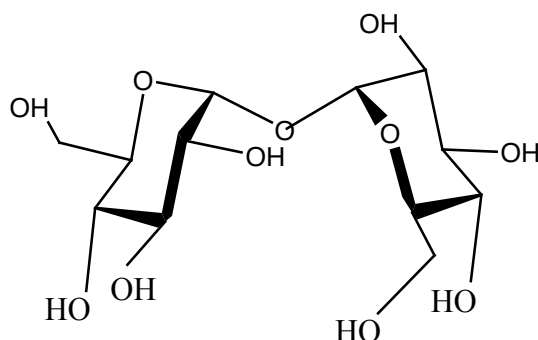
De cette même espèce a été identifiée le 3,6- α -anhydrogalactose (8).



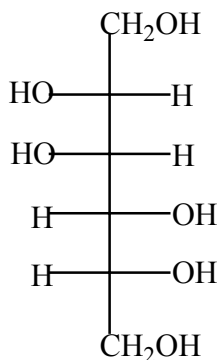
Le mannoglycérade de sodium a été isolé du *P. fastigiata* (9).



Un composé similaire au α,α -tréhalose est trouvé par Wickberg (10) à partir de la même espèce.



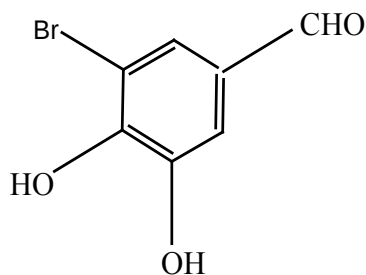
On a également le mannitol à partir du *P.fasgiata* (11)



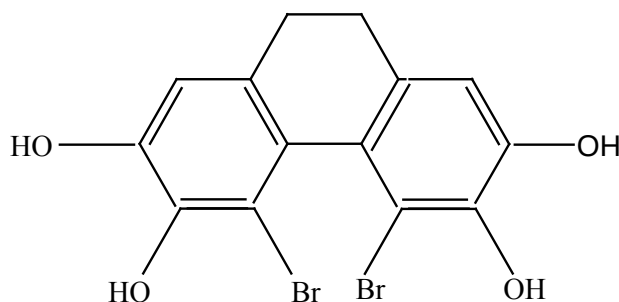
b) Bromophénols

Des bromophénols possédant des activités antibiotiques et antioxydantes ont été isolés à partir de plusieurs espèces du genre *Polysiphonia*.

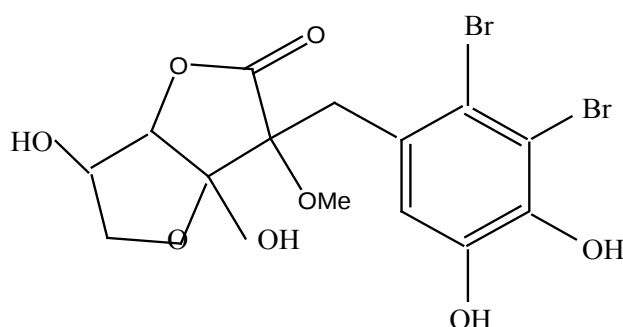
Le composé antioxydant, 5-bromo-3,4-dihydroxybenzaldehyde a été isolé du *Polysiphonia morowii* par Saito et Ando (12).



Le polysiphénol (dihydrophénanthrène dibromé) a été trouvé en 1992 au Sénégal à partir de l'espèce *Polysiphonia ferulacea* par Aknin et al (13).



Le méthylrhodomelol possédant deux hétérocycles accolés est extrait du *Polysiphonia lanosa* par Glombitza et al (14).

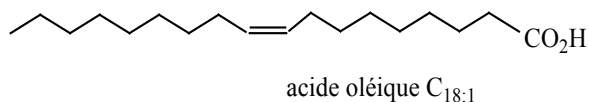
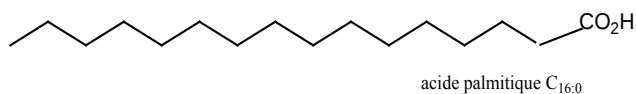


c) Acides gras

L'étude des acides gras révèle leur présence dans certaines espèces du genre *Polysiphonia*.

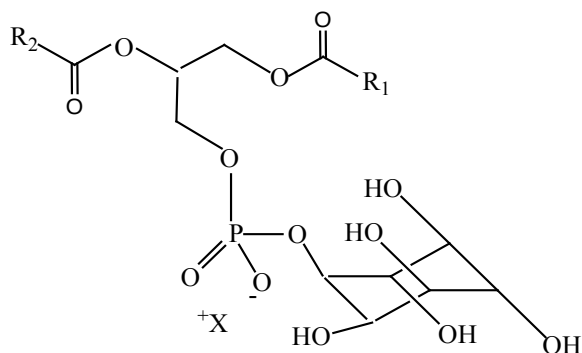
Laur (15) a identifié à partir de *Polysiphonia elongata*,

l'acide caprique $C_{10:0}$, l'acide laurique $C_{12:0}$, l'acide myristique $C_{14:0}$,
l'acide palmitique $C_{16:0}$, l'acide stéarique $C_{18:0}$, et l'acide oléique $C_{18:1}$

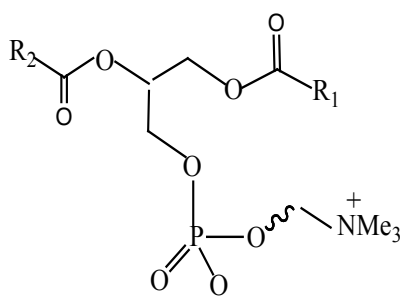


d) Lipides polaires

Yu et al (16) ont trouvé dans les lipides polaires du *Polysiphonia morowii* les composés tels que le Phosphatidylinositol (PI) ; le Phosphatidylcholine (PC) ; le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) et le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) uniquement présents dans les plantes marines.



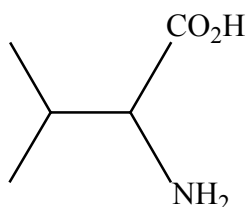
Phosphatidylinositol (PI)



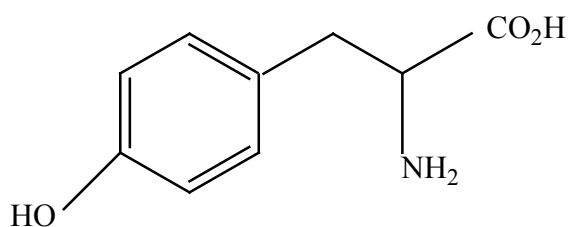
Phosphatidylcholine (PC)

e) Amino-acides

La valine, la tyrosine ont été isolées à partir des espèces *Polysiphonia brodiaei*, *Polysiphonia ferulacea* et *Polysiphonia crassicolis* (17).



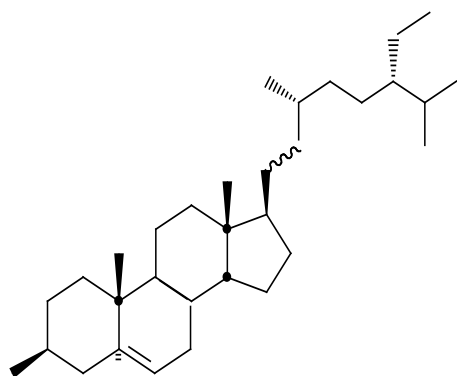
Valine



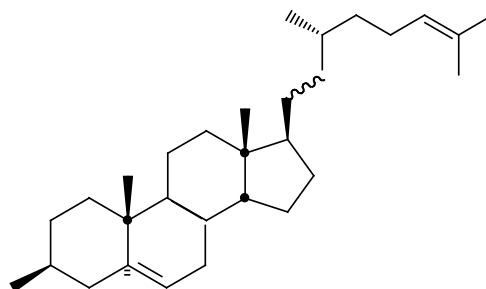
tyrosine

f) Stérols :

Le clionastérol (stérol) et le démostérol ont été identifiés par Al-Easa et al (18) respectivement à partir de *Polysiphonia brodiaei* et de *Polysiphonia ferulacea*, algues originaires des côtes du Qatar.



Clionastérol



Démostérol

MATERIEL

ET

METHODES

II - MATERIEL ET METHODES.

II-1) Présentation de l'espèce *Polysiphonia harveyi*

a) Lieu de récolte

L'algue rouge *Polysiphonia harveyi* a été récoltée au niveau de la petite côte précisément à Joal situé à 114km de Dakar au mois de juillet 2000.

b) Description de l'espèce *Polysiphonia harveyi*

L'algue rouge *Polysiphonia harveyi* appartient à l'embranchement des Rhodophytes, classe des Floridéophycées, ordre des Cérariales et famille des Rhodomélacées (3).

La cellule apicale est de forme cylindrique. Elle se divise de façon transversale. L'axe principal a un diamètre qui varie entre 1 et 3 μm . Les branches issues de l'axe sont dressées de façon indéterminée. Les initiales de branches latérales y compris celles du trichoblaste sont séparées par un ou plusieurs segments nus de l'entre-nœud. Elle a une symétrie radiale. Le nombre de cellules péricentrales est quatre. Les branches sont unisériées ; Les cellules corticales sont présentes (6).

II-2) Méthodes d'extraction et d'analyse

Généralement on utilise des solvants polaires (méthanol) ou un mélange MeOH / CHCl_3 pour l'extraction à froid. Après on procède au fractionnement par chromatographie.

a) Rappels de chromatographie

La chromatographie est une méthode d'analyse et de fractionnement fondée sur l'entraînement d'une phase mobile le long d'une phase fixe ou stationnaire. Il existe plusieurs techniques de chromatographie.

- Chromatographie sur Couche Mince (CCM) (4)

C'est une chromatographie d'adsorption basée sur des interactions entre un mélange de constituants à séparer. La phase stationnaire est déposée en mince couche sur une plaque de verre ou une feuille en matière plastique ou en aluminium.

L'adsorbant le plus utilisé est la silice 60 (diamètre des pores 60 Armstrong).

La phase stationnaire contient une substance fluorescente qui est un silicate de zinc éclairé et détecté par la lumière ultraviolet (UV). Le solvant est déposé au fond de la cuve quelque temps avant le début de la chromatographie pour saturer l'atmosphère.

Après dépôt de l'échantillon, la plaque est introduite dans la cuve où il monte par capillarité vers le sommet entraînant les substances qui migrent à une vitesse qui dépend de leur polarité et de celle du solvant.

Chromatographie sur colonne (4)

La chromatographie sur colonne permet de séparer un mélange en vue d'isoler de petites quantités des différents constituants de ce mélange.

C'est une chromatographie d'adsorption où l'adsorbant ou support généralement solide (Al_2O_3 , SiO_2 ...) est dans une colonne en verre munie d'un robinet. C'est une chromatographie par gravité qui se fait souvent à la pression atmosphérique. La séparation est liée à la différence d'adsorbabilité des divers composants du mélange. Les composés les plus adsorbés par la phase stationnaire seront élués moins rapidement au travers de la colonne.

- Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) (4)

C'est une chromatographie d'adsorption fondée sur la distribution des solutés entre deux phases non miscibles, l'une stationnaire (Silice, Aluminium ...) à travers une colonne, l'autre mobile (éluant).

Si la CCM et la colonne interviennent surtout dans le fractionnement, la HPLC permet d'isoler les métabolites pratiquement purs.

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une forme de chromatographie sur colonne, permettant la séparation, la détection et la quantification de substances pures.

- Chromatographie en phase inverse (4)

C'est une chromatographie d'adsorption liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire se distingue par son apolarité.

Elle est constituée de la silice sur laquelle des chaînes alkylées de longueur variable (C2 à C18) sont greffées au niveau des groupements silanol. La chaîne confère à la silice un caractère hydrophobe.

La phase mobile est très polaire et hydrophile. Les molécules hydrophobes vont établir des interactions avec la phase stationnaire et sont ainsi adsorbées.

Ainsi plus un soluté est apolaire plus il sera retenu au niveau de la phase solide (stationnaire). Inversement un soluté est polaire, plus il sera entraîné par la phase mobile.

b) Méthodes spectroscopiques

Après isolement et purification des métabolites secondaires, plusieurs expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) combinées avec les données de la spectroscopie de masse permettent d'établir la structure des différents composés isolés.

- Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (4)

La RMN est fondée sur l'adsorption du rayonnement électromagnétique par la matière. Mais la transition provoquée concerne le noyau de certains atomes possédant un moment magnétique et placés dans un champ d'induction magnétique B_0 .

La RMN consiste à provoquer des transitions de bas niveaux vers les niveaux supérieurs à l'aide d'une radiation de telle sorte que $\Delta E = h\nu_0$. Pour un noyau, la résonance a lieu à des fréquences de résonance d'un noyau donné dépendant de son environnement magnétique. Ceci correspond à son déplacement chimique (δ) exprimé en ppm.

La RMN Bidimensionnelle (2D) (4)

Il existe plusieurs applications de la RMN 2D.

- COSY (COrelated SpectroscopY) : permet de déterminer quels sont les hydrogènes couplés entre eux.

- HOHAHA (HOMonuclear HARTman-HAHn spectroscopy) pour les couplages ^1H - ^1H entre noyaux directement couplés ou liés à travers une succession de couplages pouvant aller jusqu'à 5.
- ROESY (Rotating from Overhauser Effect Spectroscopy) : Cette expérience permet de visualiser les corrélations dipolaires entre noyaux.
- INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfert Experiment) pour les corrélations ^{13}C - ^{13}C . C'est une expérience très peu utilisée à cause de la faible sensibilité.
- HETCOR (HETeronuclear CORrelated spectroscopy) : cette séquence permet de corréler les signaux de ^1H et ^{13}C directement liés (^1JCH)
- COLOC (Corrélation via Long range Coupling) : cette séquence permet une bonne corrélation entre les carbones quaternaires et les protons voisins.
- HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) : cette séquence est utilisée pour les corrélations directes (^1JCH).
- HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) : elle permet aussi de corréler chaque proton avec le carbone sur le quel il est attaché. Elle a l'avantage d'être plus sensible que l'expérience HETCOR.
- HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) : cette méthode permet d'obtenir des couplages longue distance (^3J).
- Spectroscopie de masse (4)

La spectroscopie de masse fournit des informations précises sur la masse moléculaire du composé et sa formule brute, mais surtout sur l'enchaînement des ions fragments.

D'une façon générale, sous l'effet du bombardement par des électrons accélérés, la molécule s'ionise et éventuellement se fragmente. La mesure des rapports masse/charge (m/z) des fragments ainsi générés permet de déterminer la masse moléculaire.

Plusieurs sources d'ionisation existent : l'impact électronique (IE), le bombardement par des atomes neutres (FAB).

c) Extraction

L'espèce fraîche est triée pour la débarrasser des impuretés que constituent les jeunes pousses des algues parasites. Ensuite l'échantillon végétal est lavé abondamment à l'eau pour éliminer le sel marin et les débris inorganiques.

Après macérations successives de l'échantillon frais pendant 15 jours avec le mélange MeOH / CHCl₃ (1/1) toutes les phases sont rassemblées et évaporées à sec pour donner un résidu de couleur brune (6,9g).

Les études préliminaires de chromatographie sur couche mince, ont permis de déterminer les conditions optimales de séparation par chromatographie sur colonne ou par HPLC.

d) Fractionnement et purification par chromatographie

Ce résidu (6,9g) est soumis à une séparation sur colonne de silice qui a permis d'obtenir les cinq fractions suivantes :

- Eluant : benzène / méthanol (98/2) , F₁ : 173,6mg ;
- Eluant : benzène / méthanol (97/3) , F₂ : 41mg ;
- Eluant : benzène / méthanol (96/4) , F₃ : 560,5mg ;
- Eluant : benzène / méthanol (90/10) , F₄ : 5222,9mg ;
- Eluant : méthanol (100%) , F₅ : 634,5mg.

F₂ subit une HPLC. Les fractions F₃ acétylée et F₄ sont soumises à une chromatographie sur colonne.

1) Fraction F₂ :

La fraction F₂ (41mg) d'aspect huileux et orangé, dissoute dans 4,1mL d'acétate d'éthyle est chromatographiée par HPLC avec détecteur à indice de réfraction et une colonne LICHROART 250.4. L'éluant utilisé est le mélange hexane / acétate d'éthyle (1/1).

Le chromatogramme a l'allure suivante : (cf. figure n°1 page 25)

On observe quatre pics. Toutes les phases correspondantes sont évaporées :

- f_1 : 2,5mg
- f_2 : 13,9mg
- f_3 : 4,5mg
- f_4 : 6,2mg

Les spectres RMN (^1H , ^{13}C et HMBC) et de masse de f_2 sont enregistrés.

2) Fraction F_3 (560,5mg) :

Une partie de la fraction F_3 est acétylée pour donner 22,2mg.

Acétylation (19)

L'échantillon est dissout dans la pyridine et on ajoute entre 0,5 et 1mL d'anhydride acétique après avoir bien agité on laisse agir pendant 24h. On ajoute ensuite du méthanol, le mélange obtenu est agité et mis au repos pendant 10 minutes puis évaporé à sec en présence du toluène.

La chromatographie sur colonne de la fraction F_3 acétylée donne entre autres une fraction f'_3 (3,3mg) éluée à l'acétate d'éthyle :

- hexane / acétate d'éthyle (9/1) ; f'_1 : 0,2 mg
- hexane / acétate d'éthyle (7/3) ; f'_2 : 0,5 mg
- acétate d'éthyle (100%) ; f'_3 : 3,3mg
- méthanol (100%) ; f'_4 : 15,2mg

Les spectres RMN ^1H et de masse de f'_3 sont enregistrés.

3) Fraction F_4 (5222,9mg) :

Pour débarrasser la fraction F_4 des sels minéraux, on effectue une partition eau-butanol. La phase butanolique est séchée et évaporée à sec pour donner un résidu (3,7326g).

Ce dernier est chromatographié sur colonne en phases inversées RP-18 avec les solvants ci-dessous et les fractions correspondantes :

- eau / méthanol (9/1) , A_1 : 1973,4mg ;
- eau / méthanol (7/3) , A_2 : 135,6mg ;
- eau / méthanol (4/6) , A_3 : 357,6mg ;
- eau / méthanol (2/8) , A_4 : 242,7mg ;

- méthanol (100%) , A₅ : 218,1mg ;
- méthanol / CHCl₃ (9/1) , B : 301,2mg ;
- CHCl₃ (100%) , C : 247,5mg.

Les spectres ¹H et de masse de la fraction B (301,2mg) sont enregistrés.

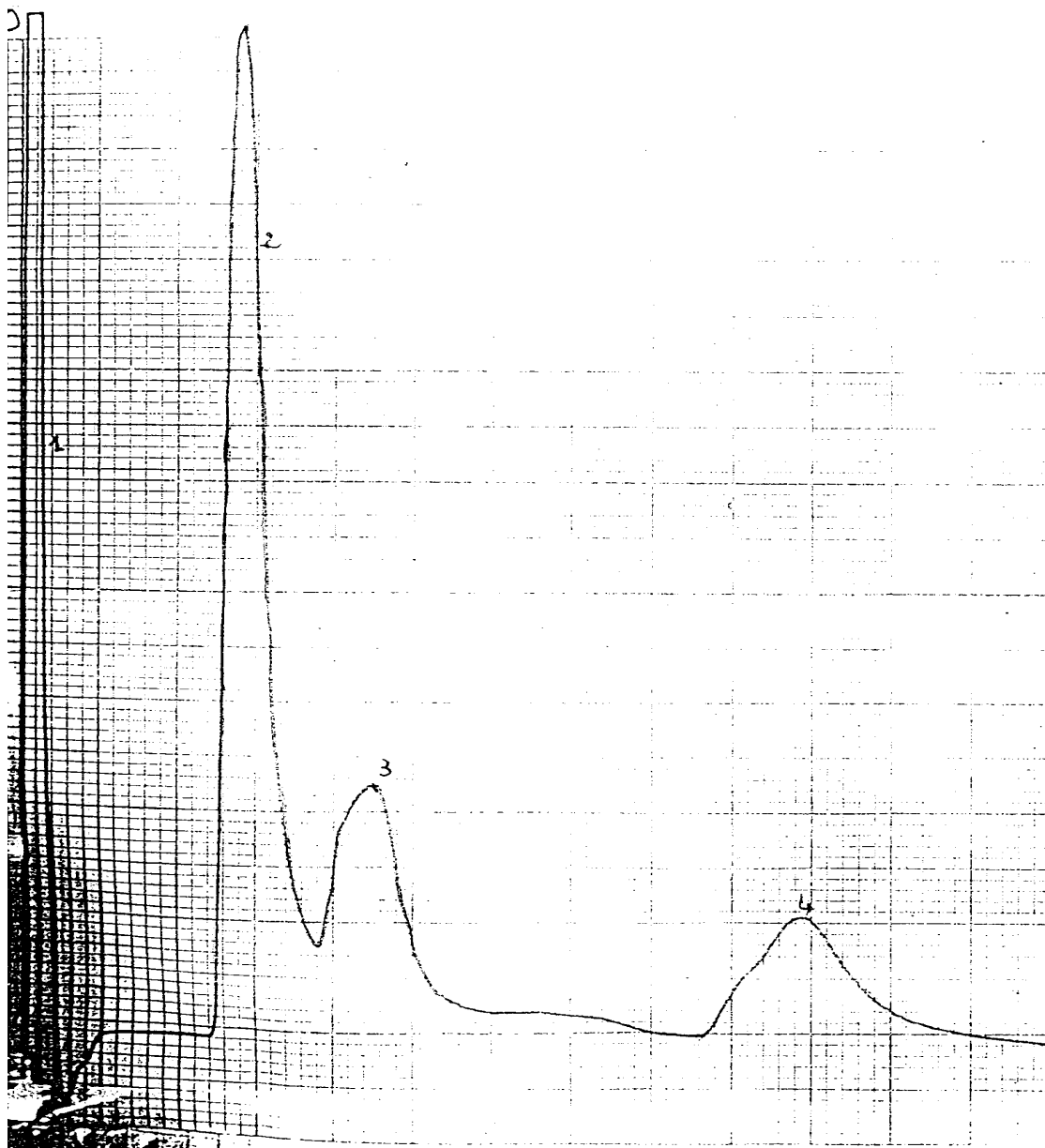


Figure n°1 : Chromatogramme de la fraction F₂.

RESULTATS

ET

DISCUSSIONS

III - RESULTATS ET DISCUSSIONS.

III-1) Détermination structurale de f_2 isolé de la fraction F_2

a) Analyse du spectre RMN ^{13}C .

L'interprétation des signaux du spectre RMN ^{13}C de la fraction (CD_3OD) (cf. figure n°2 page 31) permet de dénombrer 8 atomes de carbones. Parmi ces 8 types de carbones on note, la présence de signaux caractéristiques :
 $\delta = 130,97 \text{ ppm}$, $\delta = 115,24 \text{ ppm}$, $\delta = 114,33 \text{ ppm}$, $\delta = 145,14 \text{ ppm}$,
 $\delta = 146,19 \text{ ppm}$ et $\delta = 115,80 \text{ ppm}$, indiquant que la molécule est essentiellement aromatique (20).

Le spectre appuie également l'hypothèse de la présence des groupements éthers par les signaux observés respectivement à $\delta = 75,88 \text{ ppm}$ ($-\text{CH}_2-\text{O}$) et à $\delta = 58,49 \text{ ppm}$ ($\text{O}-\text{CH}_3$).

b) Analyse du spectre de Masse.

L'analyse du spectre de masse (cf. figure n°3 page 31) donne à $m/z = 312$ un pic d'intensité 78 % correspondant au pic de l'ion moléculaire auquel on attribue la formule brute $\text{C}_8\text{H}_8\text{Br}_2\text{O}_3$.

Le spectre révèle l'existence de deux atomes de brome correspondant aux formules respectives $(\text{C}_7\text{H}_5^{79}\text{Br}_2\text{O}_2)^+$, $(\text{C}_7\text{H}_5^{79}\text{Br}^{81}\text{BrO}_2)^+$ et $(\text{C}_7\text{H}_5^{81}\text{Br}_2\text{O}_2)^+$ (23), confirmée par l'apparition des pics de rapport $m/z = 279, 281, 283$ d'abondances relatives respectives 1/2/1, soit (66% / 100% / 64%). On remarque d'autres amas isotopiques dans le même rapport 1/2/1 à $m/z = 310, 312$ et 314 . Celui de rapport $m/z = 295$ (intensité 23%) correspondant à $(\text{C}_8\text{H}_7\text{Br}_2\text{O}_2)^+$ provient de la fragmentation de l'ion moléculaire par perte de 17 unités de masse.

Le pic de base de rapport $m/z = 281$ (intensité 100%) attribué à la formule $(\text{C}_7\text{H}_5\text{Br}_2\text{O}_2)^+$ résulte d'une rupture du groupement oxyméthyle ($\text{O}-\text{CH}_3$) à partir de l'ion moléculaire.

Le spectre de masse indique également la présence d'un composé aromatique par les fragments de rapports suivants : $m/z = 91$ (intensité 17%) relatif à la

formule $(C_7H_7)^+$ et $m/z = 107$ (intensité 12%) et correspondant à la formule $(C_7H_7O)^+$ (24) indiquant la présence du phénol. Compte tenu des valeurs des déplacements chimiques des signaux du spectre ^{13}C et de la présence de deux atomes de brome sur le spectre de masse on peut attribuer les signaux comme suit :

- $\delta = 130,97$ ppm : $C_1 - C$
- $\delta = 115,24$ ppm : $C_2 - Br$
- $\delta = 114,33$ ppm : $C_3 - Br$
- $\delta = 145,14$ ppm : $C_4 - O$
- $\delta = 146,19$ ppm : $C_5 - O$
- $\delta = 115,80$ ppm : $C_6 - H$

c) Analyse du spectre RMN 1H .

Le spectre RMN 1H (CD_3OD) (cf. figure n°4 page 32) est simple. Il montre trois types de protons qui apparaissent sous la forme de trois singulets indiquant ainsi une absence de couplage entre les protons de f_2 .

- Le singlet résonant à $\delta = 6,95$ ppm intégré à 1 H, correspond au proton du noyau benzénique.
- Le signal apparaissant à $\delta = 4,45$ ppm sous forme de singlet intégré à 2 H représente le signal du proton oxyméthylénique ($O-CH_2$).
- à $\delta = 3,42$ ppm on observe un troisième singlet intégré à 3 H correspondant à la résonance du proton oxyméthylique ($O-CH_3$) (21).

Généralement les protons du phénol formant un pont hydrogène intramoléculaire apparaissent à des déplacements chimiques élevés vers 12,5ppm (22). Ce phénomène pourrait expliquer l'absence des signaux correspondants dans le spectre 1H .

d) Analyse du spectre HMBC.

Les taches de corrélation observées sur le spectre HMBC (CD_3OD) (cf. figure n°5 page 32) permettent d'élucider les couplages hétéronucléaires suivants :

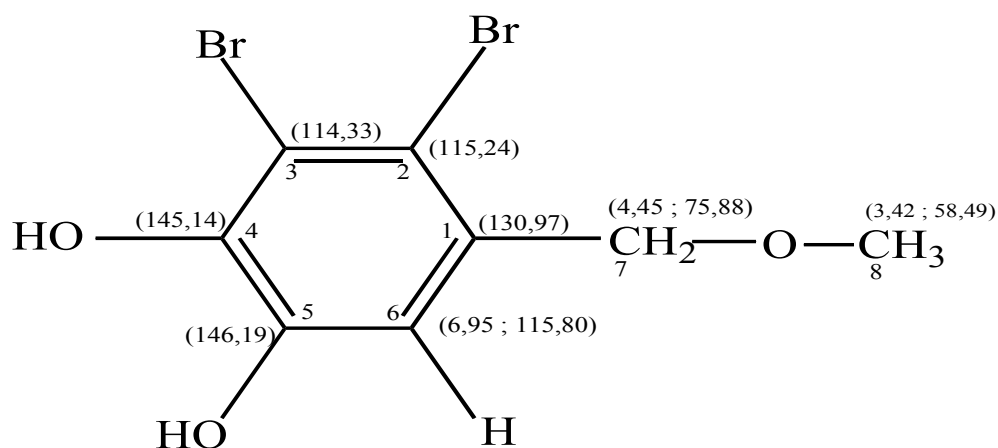
- Un couplage longue distance est visible entre le proton H-3 ($\delta = 3,42$ ppm) et l'atome de carbone C-7 ($\delta = 75,88$ ppm).
- Quant au proton méthylénique H-2 ($\delta = 4,45$ ppm), ce dernier est corrélé avec les carbones C-8 ($\delta = 58,5$ ppm), C-2 ($\delta = 115,24$ ppm) et C-1 ($\delta = 130,97$ ppm).
- L'analyse du spectre HMBC permet également d'observer des couplages entre H-1 ($\delta = 6,95$ ppm) et les carbones C-7 ($\delta = 75,88$ ppm), C-2 ($\delta = 115,24$ ppm) et C-5 ($\delta = 146,19$ ppm).

Le tableau n°1 permet d'appuyer les attributions précédentes.

Tableau n°1 : Comparaison entre les déplacements chimiques calculés et ceux observés (22).

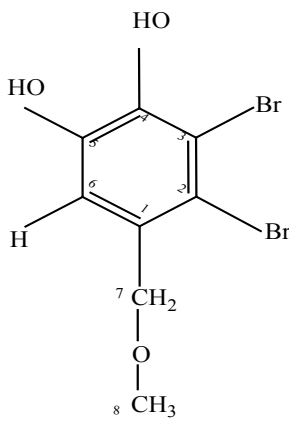
Atome de carbone	δ Calculés	δ Observés dans le spectre
1	$\delta_1 = 128,5 + 3,2 + 3 - 7,4 + 9,24 = 136,54 \text{ ppm}$	130,97 ppm
2	$\delta_2 = 128,5 - 5,8 + 3,2 - 3,1 + 1,4 - 7,4 = 117,8 \text{ ppm}$	115,24 ppm
3	$\delta_3 = 128,5 - 5,8 + 3,2 - 12,8 - 0,1 + 1,4 = 114,4 \text{ ppm}$	114,33 ppm
4	$\delta_4 = 128,5 + 26,9 - 12,8 + 3,2 + 1,6 -$	145,14 ppm
5	$0,5 = 146,9 \text{ ppm}$	146,19 ppm
6	$\delta_5 = 128,5 + 26,9 - 12,8 + 1,6 - 0,1 - 1,6$ $= 142,5 \text{ ppm}$ $\delta_6 = 128,5 - 12,8 - 3,1 + 1,6 + 1,4 - 1,6 = 114 \text{ ppm}$	115,80 ppm

La combinaison des résultats des spectres RMN et de masse permet de proposer la structure suivante :



3,4-dibromo-5-(méthoxyméthyl) pyrocatéchol

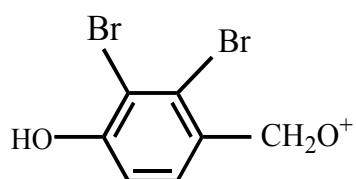
Tableau n°2 : Caractéristiques RMN (^1H et ^{13}C)

	Numéro des atomes carbones	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (ppm)
	1	-	130,97
	2	-	115,24
	3	-	114,33
	4	-	145,14
	5	-	146,19
	6	6,95	115,80
	7	4,45	75,88
	8	3,42	58,49

SM:

$\text{M} (312 ; 78\%) : \text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3\text{Br}_2$; $[\text{M}-\text{OH}] (295 ; 23\%) : (\text{C}_8\text{H}_7\text{Br}_2\text{O}_2)^+$

$[\text{M}-\text{CH}_3\text{O}] (281 ; 100\%) : (\text{C}_7\text{H}_5\text{Br}_2\text{O}_2)^+$



$(\text{C}_7\text{H}_7\text{O})^+ : (107 ; 12\%)$; $(\text{C}_7\text{H}_7)^+ : (91 ; 17\%)$

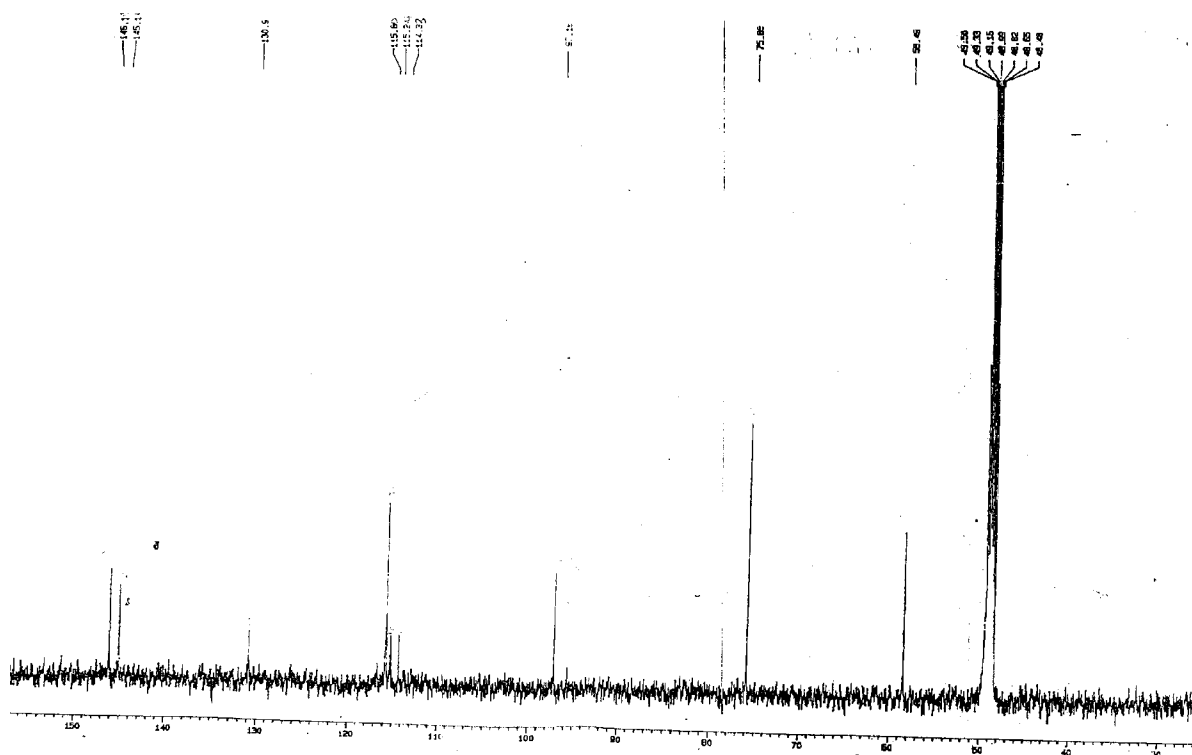
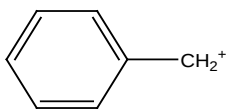
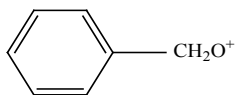


Figure n°2 : Spectre RMN ^{13}C du dibromophénol

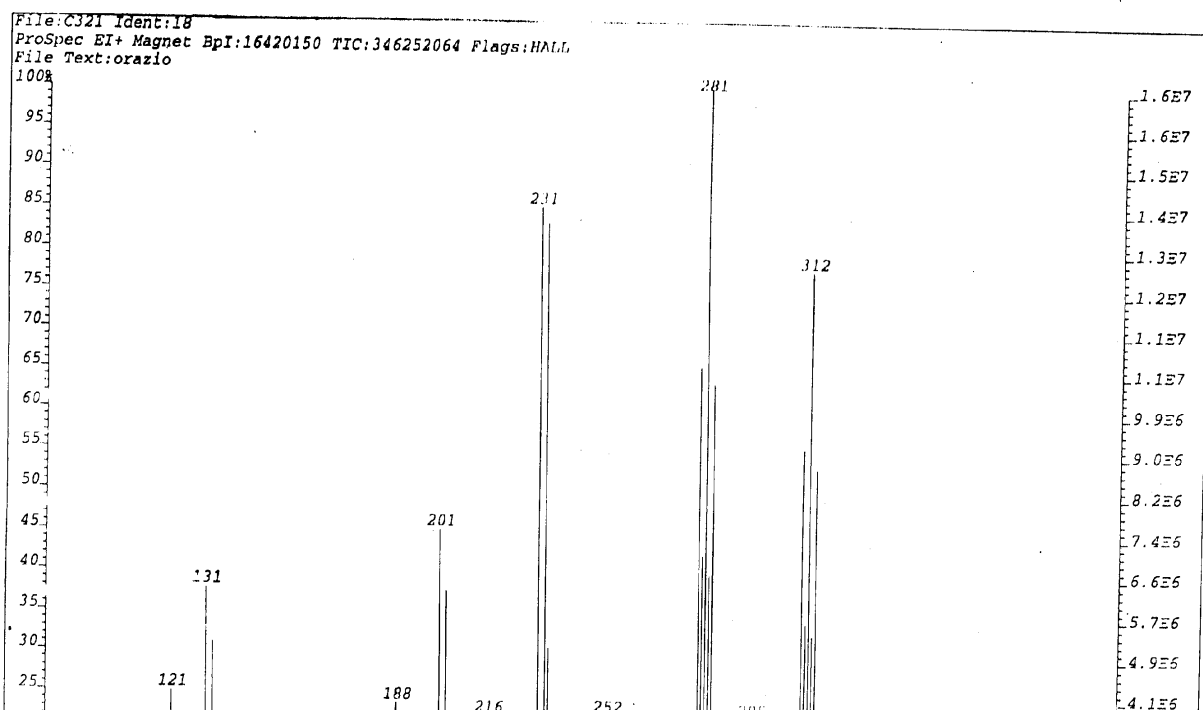


Figure n° 3 : Spectre de masse du dibromophénol

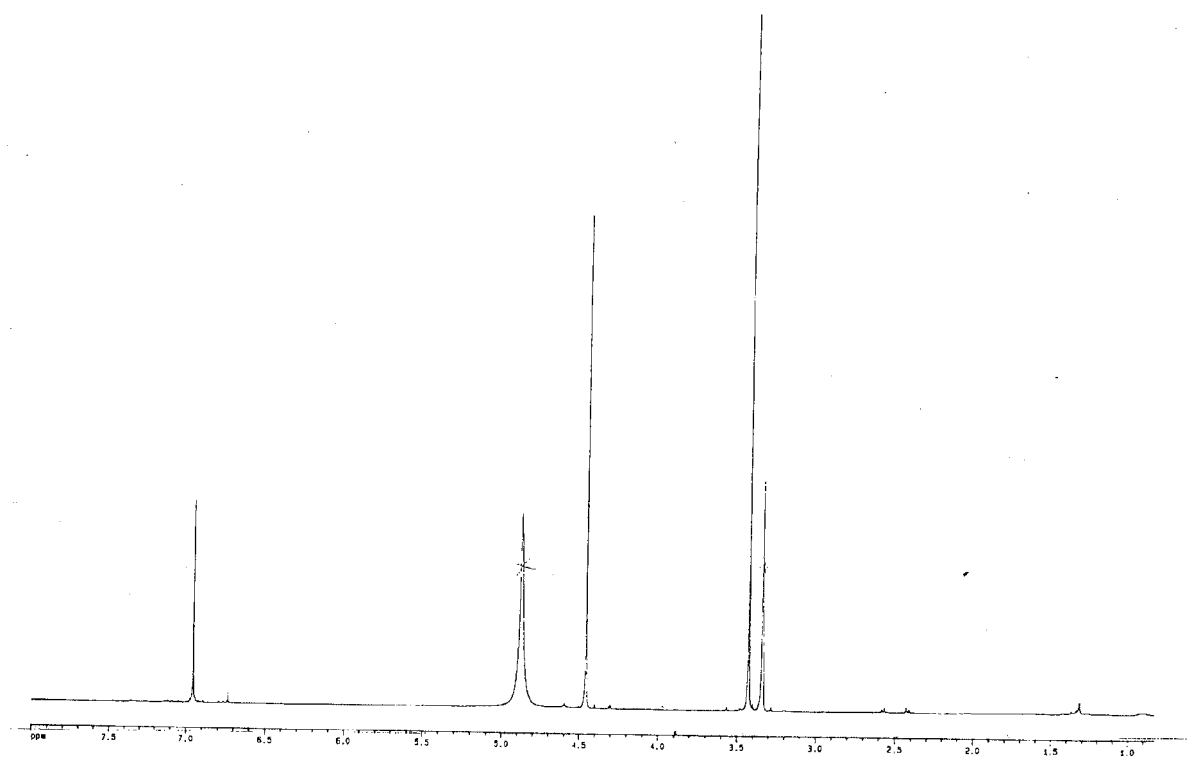


Figure n°4 : Spectre RMN ^1H du dibromophénol

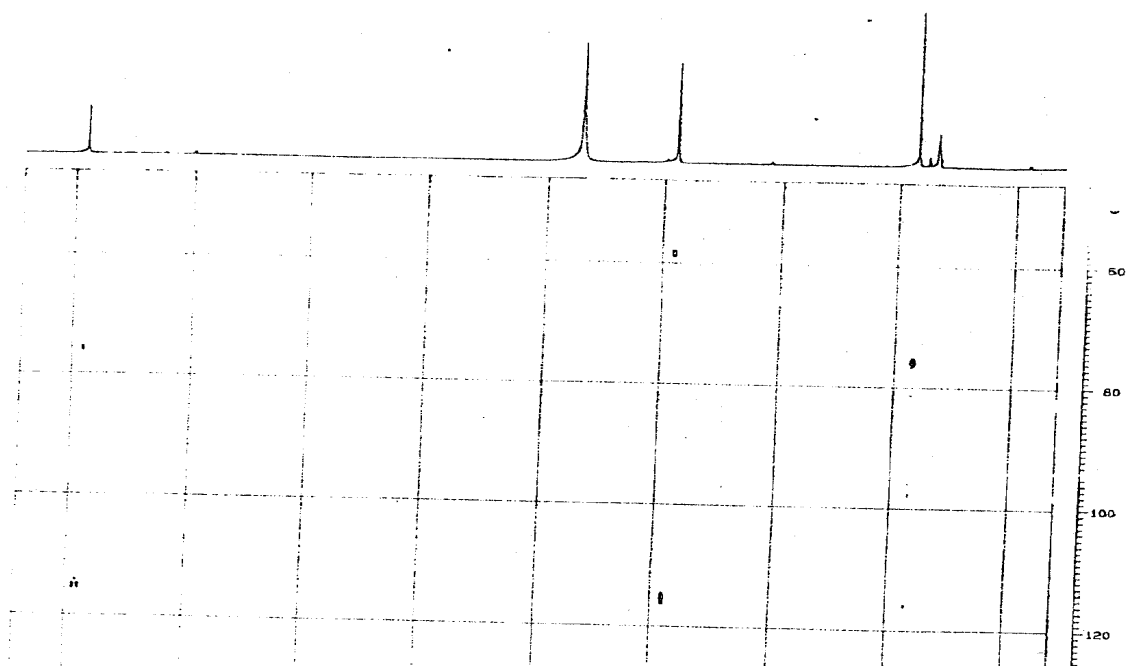


Figure n°5 : Spectre HMBC du dibromophénol

III-2) Détermination structurale de f_3' isolée de la fraction F_3

a) Analyse du spectre RMN ^1H

Le spectre RMN ^1H (CDCl_3) (cf. figure n°6 page 36) montre un doublet à $\delta = 4,48 \text{ ppm}$ ($J = 10\text{Hz}$) relatif au groupement ($-\text{CH}-\text{O}$) indiquant un couplage $1',2'$ -diaxial attribué au proton anomérique β . Le signal ($4,95\text{ppm}$) du proton $1''$ apparaissant sous forme de doublet avec la constante de couplage 5Hz indique un couplage $2''$ -axial, $1''$ -équatorial relatif à l'anomère α . La présence de ces protons anomériques α ($4,95\text{ppm}$) et β ($4,48\text{ppm}$) indique l'existence de deux résidus de glucides.

Les 4 types de signaux sur le spectre ^1H apparaissant à des déplacements chimiques :

- $[3,95\text{ppm} ; 3,68\text{ppm}]$ (doublets dédoublés) ($J = 12\text{Hz}$ et $J = 5\text{Hz}$), d'une part
- $[4,3\text{ppm}$ (doublet dédoublé) ($J = 10\text{Hz}$ et $J = 5\text{Hz}$); $4,12\text{ppm}$ (massif)], d'autre part ;

indiquent la présence du glycérol dans le résidu. Ils sont attribués aux protons en position 1 et 3, relatifs au groupement (CH_2-O).

En outre le proton de la position 2 du glycérol sous forme de doublet dédoublé, correspondant au proton méthinique ($-\text{CH}-\text{O}$) est observé à ($\delta = 5,2\text{ppm}$).

On remarque également la présence des doublets dédoublés centrés à $\delta = 5,4 \text{ ppm}$ et $\delta = 5,48 \text{ ppm}$ relatifs aux protons $4'$ et $4''$ avec les mêmes constantes de couplage ($J=7,5\text{Hz}$ et $J = 2,5\text{Hz}$). Les protons $3'$ centrés à

$\delta = 5,02$ ppm ($J = 10\text{Hz}$ et $J = 7,5\text{Hz}$), $3''$ à $\delta = 5,28$ ppm ($J = 10\text{Hz}$ et $J = 5\text{Hz}$) et $2''$ résonant à $\delta = 5,12$ ppm ($J = 10\text{Hz}$ et $J = 5\text{Hz}$) observables dans le spectre sont attribués au proton méthylénique de ($\text{CH}_2\text{-O}$). On observe deux triplets relatifs aux protons $5'$ à $\delta = 3,85$ ppm ($J = 5\text{Hz}$) et $5''$ résonant à $\delta = 4,2$ ppm ($J = 7,5\text{Hz}$). Ces signaux sont caractéristiques au proton du groupement (-CH-O).

L'oxyméthylène résonne sous forme de massif à $\delta = 3,77$ ppm.

Le spectre ^1H montre aussi une série de signaux sous forme de 7 singulets relatifs aux groupes acétyles résonant entre 1,98ppm et 2,17 ppm.

L'analyse des résultats du spectre ^1H de f_3 et leur comparaison avec les données spectrales disponibles dans la littérature (25), permettent de conclure qu'il s'agit du digalactosyldiacylglycérol (DGDG).

b) Analyse du spectre de masse

Le spectre de masse (cf. figure n°7 page 36) indique l'apparition du pic de rapport $m/e = 763,6$ (intensité 2,5%) correspondant à la formule brute $(\text{C}_{31}\text{O}_{22}\text{H}_{41})^+$ avec onze degrés d'insaturation, dont sept sont attribués aux groupements acétyles du composé, deux provenant aux carbonyles des chaînes acyles de la partie glycérol et deux autres confirmant la présence de deux cycles.

Cette formule est en accord avec l'hypothèse (cf. p.25) du digalactosyldiacylglycérol (DGDG). Le spectre révèle également qu'à partir du fragment $(\text{C}_{31}\text{O}_{22}\text{H}_{41})^+$ de rapport $m/e = 763,6$ une série de pic avec des intervalles de 14 unités de masse correspondant à des CH_2 de rapports suivants : $m/e = 763,6$ (2,5%) ; 749,7 (4%) ; 727,9 (4,8%) ; 713,9 (15%).

Le pic de rapport $m/e = 671,7$ (intensité 12%) provient d'une perte de 42 unités de masse soit $(\text{C}_3\text{H}_6)^+$ correspondant à trois groupements de CH_2 . Cette analyse met en évidence les sept homologues justifiant la présence de chaînes acyles.

On remarque, en plus un pic de rapport $m/e = 429,7$ d'intensité 16,5% et de formule $(\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{O}_{13})^+$, qui est issue d'une perte de 100 unités de masse soit $(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2)^+$ de $(\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{O}_{15})^+$ de rapport $m/e = 529$. Ainsi on peut penser que ce

fragment $(C_{16}H_{27}O_{13})^+$, proviendrait d'une partie du DGDG non acétylé avec un degré d'insaturation égale à quatre : dont deux pour les carbonyles des chaînes acyles et les deux autres confirmant la présence des deux cycles. Cette hypothèse est confirmée par le pic observé à $m/e = 413,7$ provenant d'une perte de CH_2 à partir du pic $m/e = 429,7$ attribué à la formule brute $(C_{15}H_{25}O_{13})^+$.

L'étude du spectre de masse révèle la présence des acides gras dans la fraction, par le pic situé à $m/e = 210,9$ (intensité 6%) correspondant à la formule

$(C_{15}H_{31})^+$ issue de la décarboxylation de $C_{16:0}$ de l'acide palmitique (3).

Cependant l'ion relatif à $C_{19:0}$ ($C_{19}H_{38}O_2$) de rapport $m/e = 298,8$ apparaît avec une intensité de 36%. Le pic de base de formule $(C_{21}H_{43})^+$ (intensité 100%) est observé à $m/e = 294,7$. Ce dernier provient d'une perte de 45 unités de masse par décarboxylation à partir de l'acide béhénique $C_{22:0}$, montrant la présence massive d'acide gras dans le résidu. Le pic à $m/e = 309$ (intensité 10%) de formule $(C_{22}H_{45})^+$ résulte de la décarboxylation de l'acide gras $C_{23:0}$ ($C_{23}H_{46}O_2$). La formule $(C_{25}H_{51})^+$ de pic situé à $m/e = 350,8$ (intensité 12%) provient d'un détachement du groupement carboxyle à partir de $C_{26:0}$ de l'acide cérotique.

L'ion moléculaire correspondant apparaît à $m/e = 396,9$ (intensité 13%) de formule brute $C_{26}H_{52}O_2$.

Après analyse on peut proposer la structure suivante :

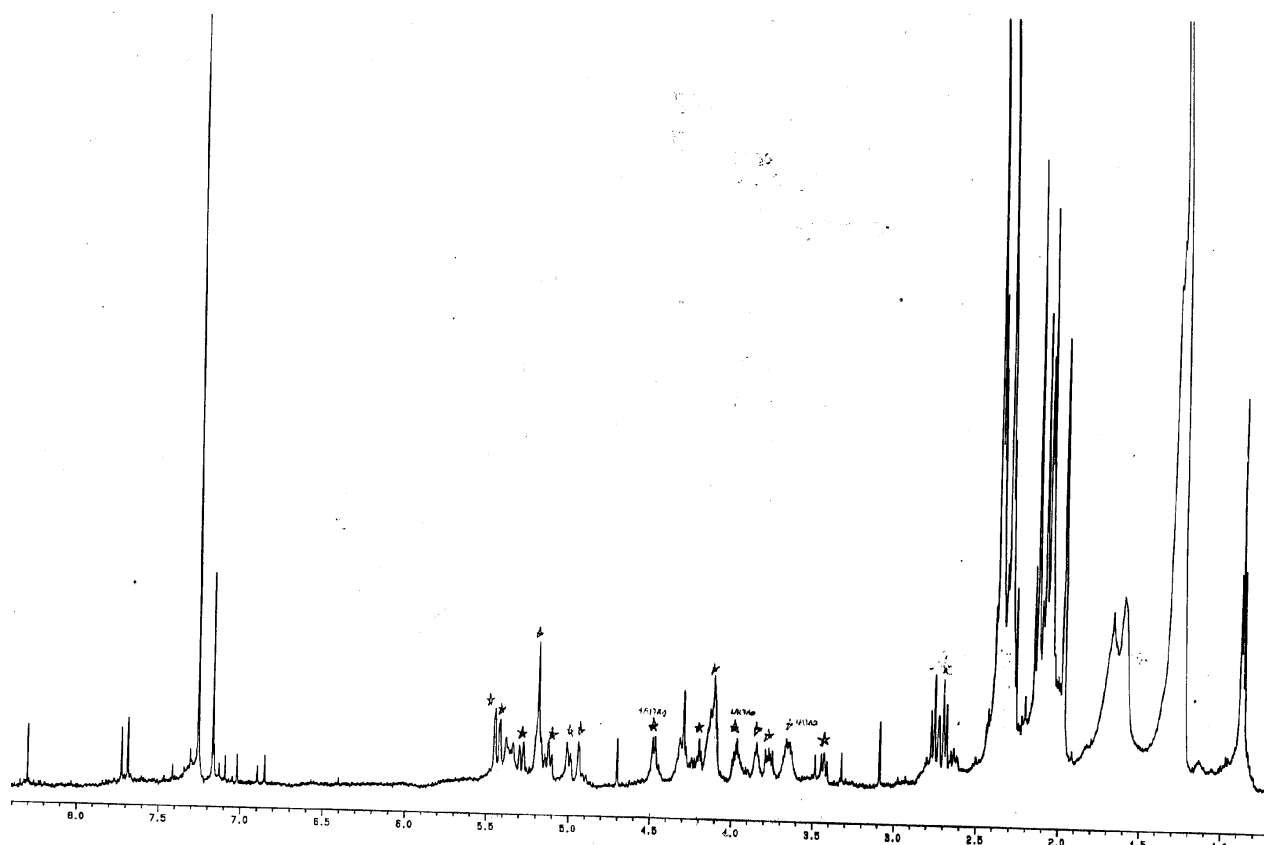
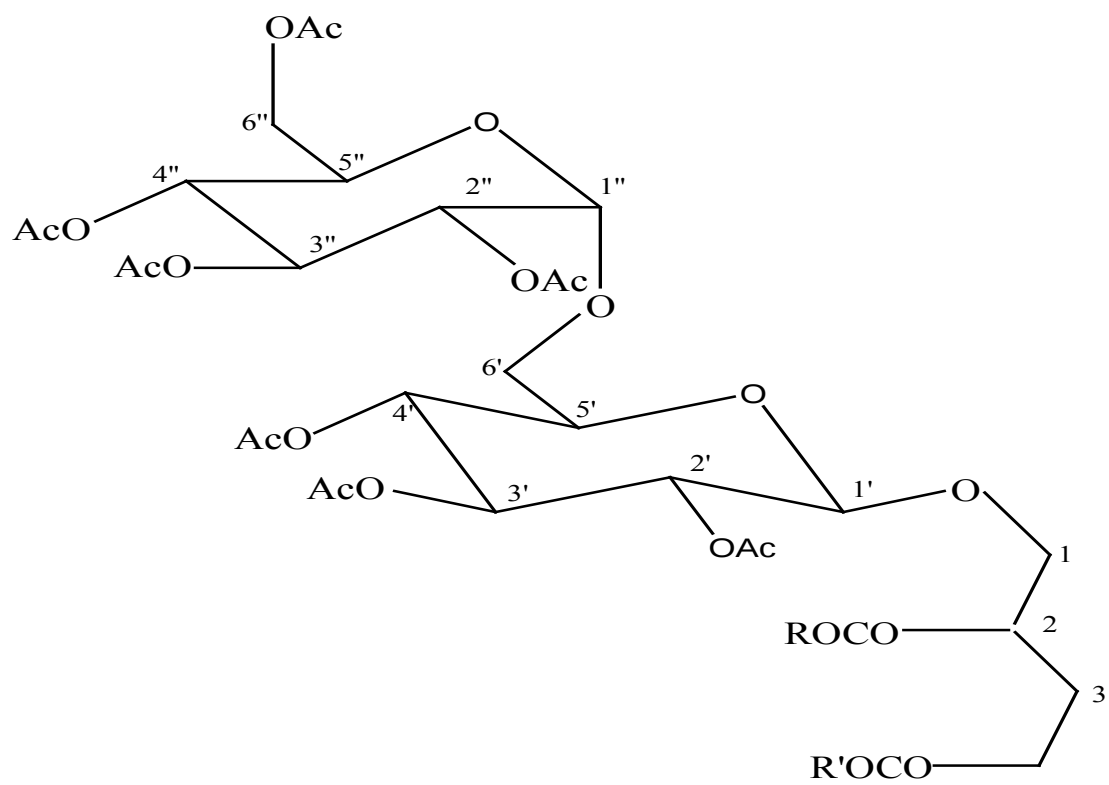


Figure n°6 : Spectre RMN ^1H de DGDG peracétylé.

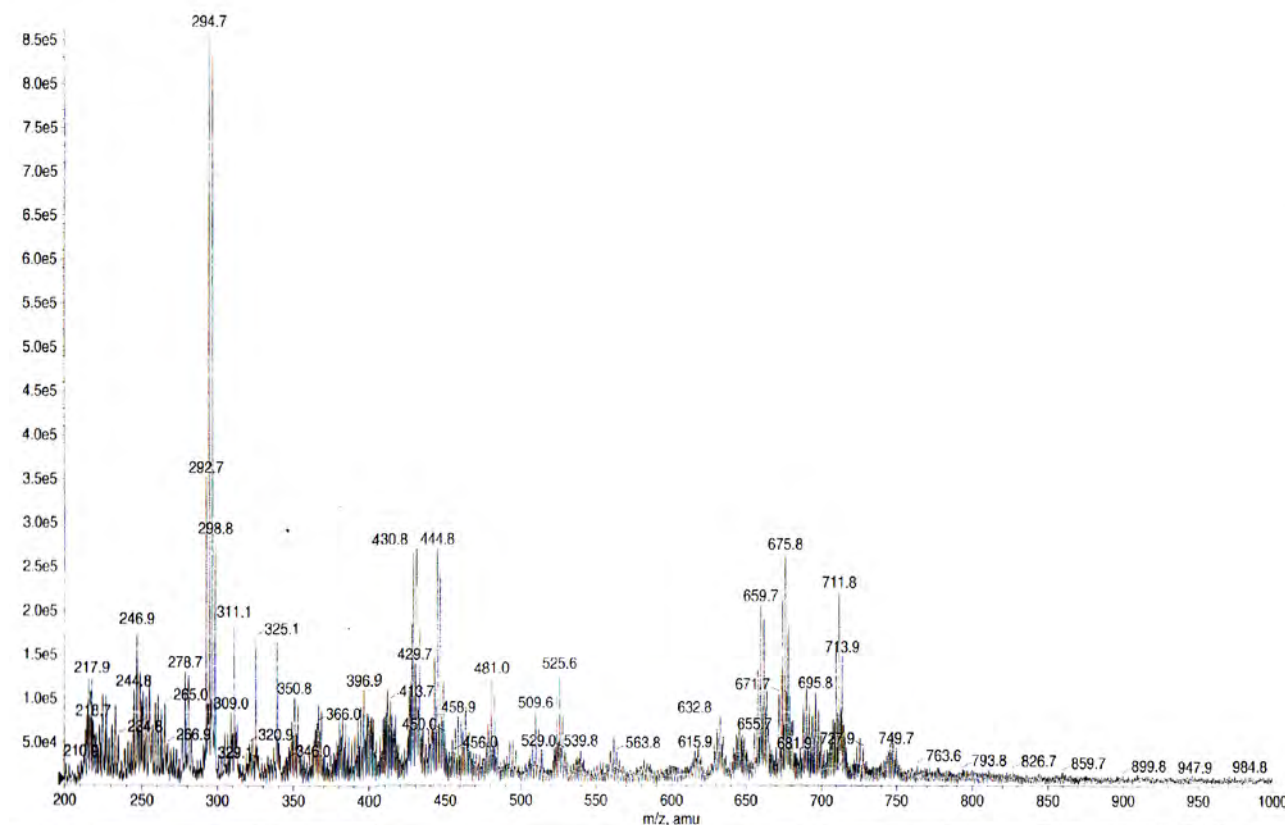


Figure n°7 : Spectre de masse de DGDG peracétylé.

II-3) Détermination structurale de la fraction B isolée de F_4

a) Analyse du spectre RMN ^1H

L'analyse du spectre RMN ^1H (CDCl_3) (cf. figure n°8 page 39) permet en outre de mettre en évidence la présence de quatre types de signaux sous forme de doublet dédoublé :

- d'une part à [3,67ppm ($J = 10\text{Hz}$ et $J = 5\text{Hz}$), 4,13ppm ($J = 10\text{Hz}$ et $J = 5\text{Hz}$)] ;
- d'autre part [(4,23ppm ($J = 15\text{Hz}$ et $J = 5\text{Hz}$), 4,53ppm ($J = 10\text{Hz}$ et $J = 5\text{Hz}$)).

Ils sont attribués aux protons en position 1 et 3 de la partie glycérol.

Le massif observé à $\delta = 5,35\text{ppm}$ représente le proton de la position 2 du glycérol.

Le spectre ^1H montre un signal sous forme de doublet à $\delta = 4,8$ ppm ($J = 5\text{Hz}$) relatif au groupement (CH-O) définissant un couplage 2'-axial, 1'-équatorial attribué au proton anomérique α . La présence des protons thiométhyléniques ($\text{CH}_2\text{-S}$) est indiquée par l'apparition des signaux à $\delta = 2,96$ ppm du doublet dédoublé avec les constantes de couplage $J = 12\text{Hz}$ et $J = 5\text{Hz}$ relatifs au proton 6'a et le massif à $\delta = 3,4$ ppm correspondant à 6'b.

On remarque également un triplet à $\delta = 3,14$ ppm de constante de couplage $J = 10\text{Hz}$.

L'apparition des signaux à $\delta = 0,95$ ppm sous forme de deux triplets indiquent la présence des groupes méthyles de deux chaînes acyles.

Le massif centré à $\delta = 2,35$ ppm est caractéristique du méthylène (en position α) de la fonction CO. Le singulet élargi à $\delta = 1,35$ ppm est relatif à $(\text{CH}_2)_n$.

Les résultats RMN ^1H comparés avec les données de la littérature permettent d'affirmer que la fraction B contient du sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) (25).

b) Analyse du spectre de masse

La présence marquée du pic de rapport $m/e = 414,3$ (intensité 32,5%), attribué à la formule $(\text{C}_{14}\text{O}_{12}\text{SH}_{25})^+$ montre la présence du sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) dans le spectre de masse (cf. figure n°9 page 39) (25).

Ce pic provient du rapport $m/e = 429,1$ (intensité 4%) par perte de 15 unités de masse.

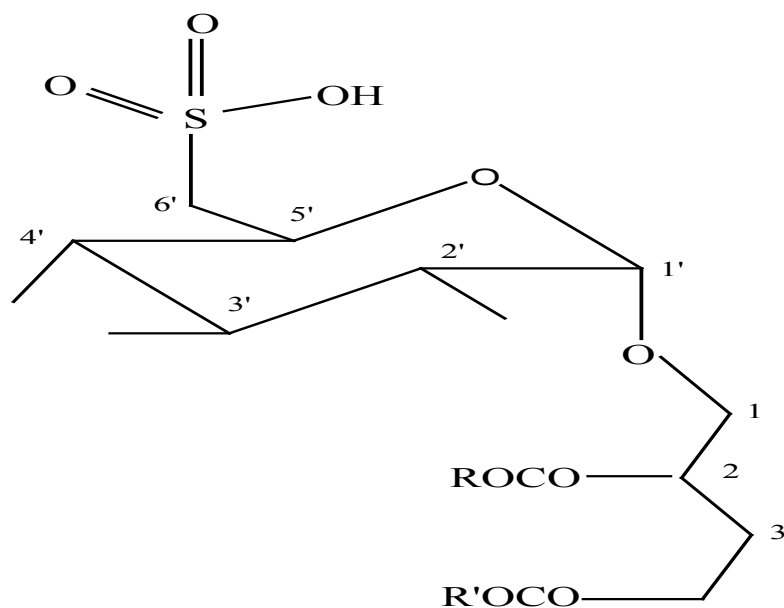
Cependant, le pic de base apparaissant au rapport $m/e = 413,2$ (intensité 100%), est attribué à la formule $(\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{O}_{13})^+$ montrant en plus du SQDG, la présence de DGDG dans le résidu.

On observe une série de pics de rapports m/e compris entre 477 et 575,3 qui sont issus des pics de rapports m/e entre 675,4 et 773,6 par scission du fragment $(\text{C}_5\text{O}_5\text{H}_6\text{S})^+$.

Par ailleurs les pics entre $m/e = 675,4$ et $m/z = 773,6$ se distinguent par 14 unités de masse atomique ou 28 unités de masse atomique.

Ces pics proviendraient de l'ion moléculaire par perte du fragment $(C_4O_5H_5S)^+$ et donneraient une dizaine d'homologues pour le SQDG parce que la différence de masse ($773,6 - 657,4$) équivaut à 9 groupements CH_2 .

On peut ainsi proposer la structure suivante :



Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

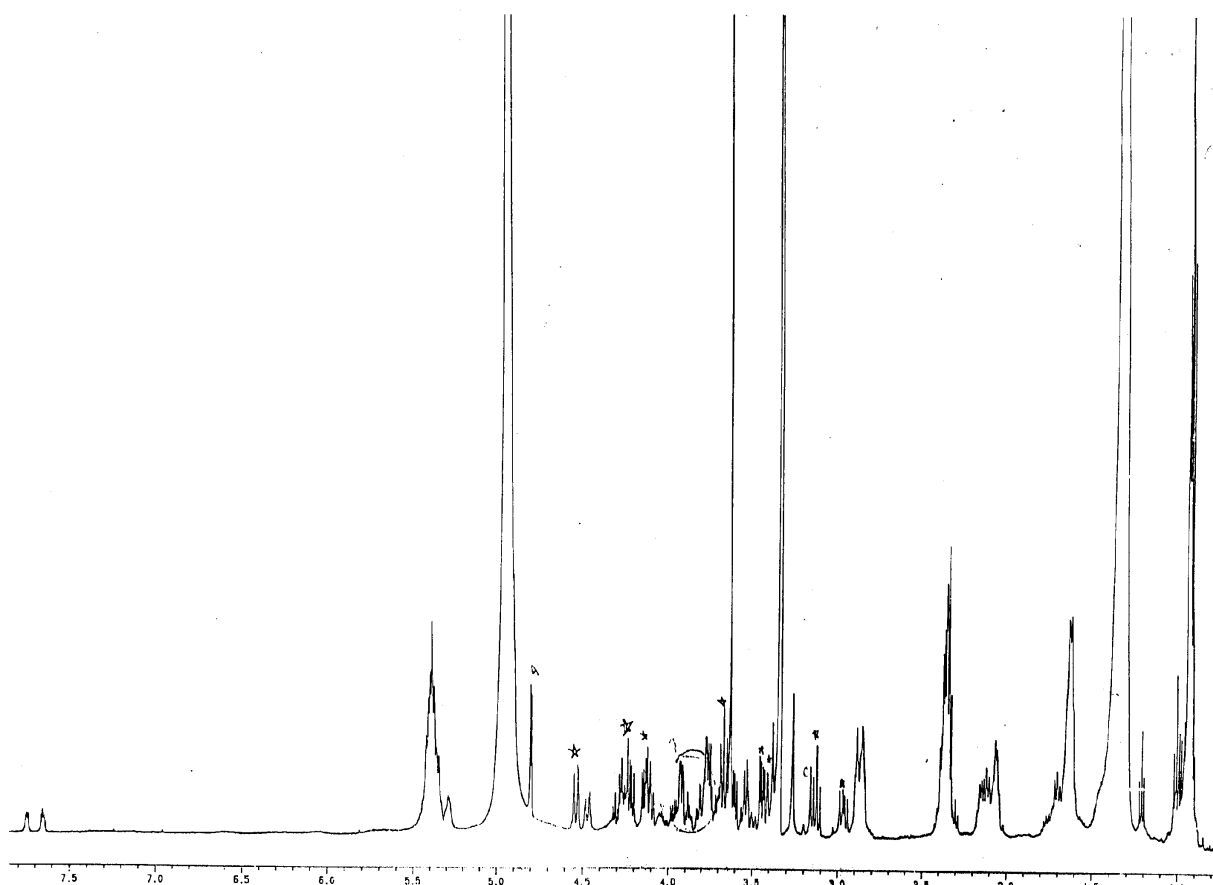


Figure n°8 : Spectre RMN ^1H de SQDG.

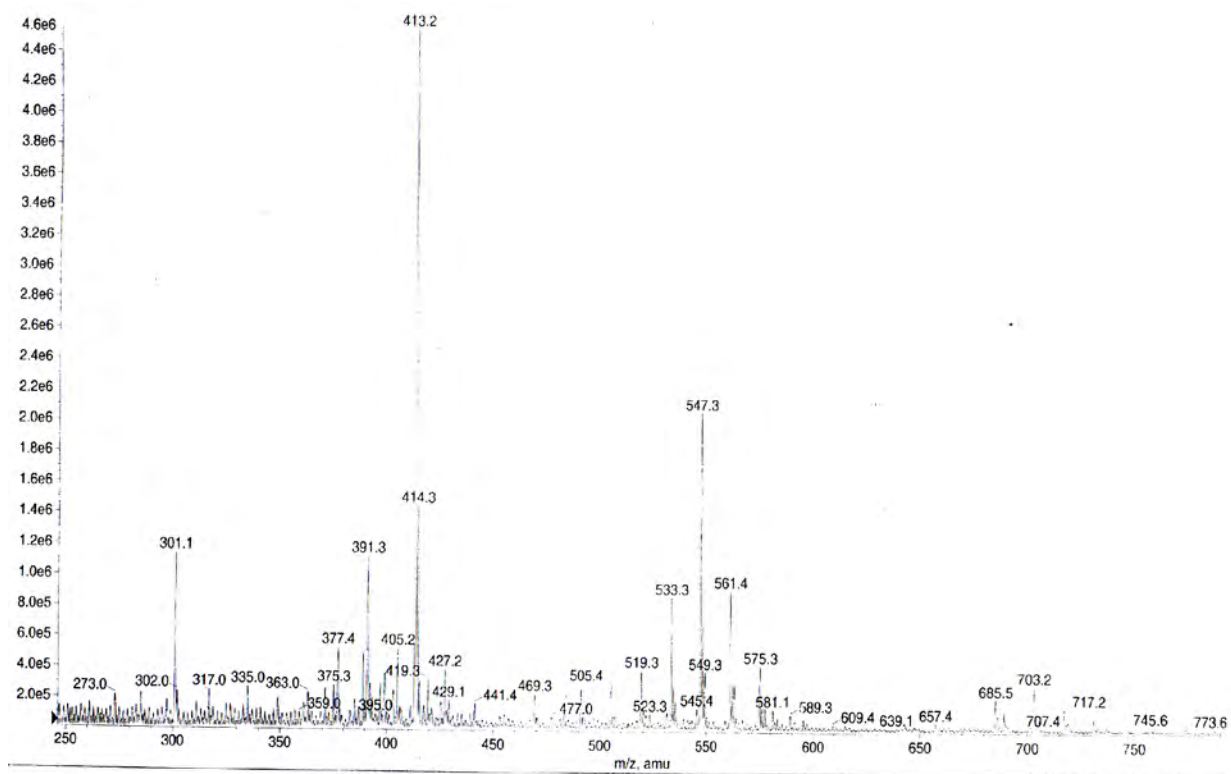


Figure n°9 : Spectre de masse du SQDG.

CONCLUSION

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'algue rouge la Rhodomélacée *Polysiphonia harveyi*.

Nous avons procédé au fractionnement dans la deuxième partie en utilisant les techniques chromatographiques: chromatographie sur couches minces, chromatographie sur colonne de silice normale et en phases inversées (RP-18). La chromatographie liquide (CLHP) avec détecteur à indice de réfraction a permis d'isoler les composés pratiquement purs.

Dans la troisième partie les structures ont été établies sur la base des données spectroscopiques de RMN (^1H , ^{13}C , HMBC) et de masse.

La combinaison des résultats des spectres de corrélation hétéro- nucléaires, et de masse nous a permis d'identifier trois métabolites secondaires, isolés à partir de l'algue *Polysiphonia harveyi* dont :

- un dibromophénol : le 3,4-dibromo-5-(méthoxyméthyl) pyrocatéchol ;
- deux glycéroglycolipides : un digalactosyldiacylglycérol (DGDG) et un sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG).

Pour la connaissance de la nature des chaînes acyles des formules du digalactosyldiacylglycérol (DGDG) et du Sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG), nous procéderons à des extractions sur des quantités d'échantillon beaucoup plus importantes afin d'obtenir des fractions de masses appréciables.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) M.Y. Bodian., Thèse de DEA ; Systématique et biologie des algues macrophytes collectées pendant la période hivernale dans la zone incluant Dakar et la petite côte (Août à Décembre 1997) .UCAD., pp...(2000)
- (2) P. Gayral., les algues morphologie, cytologie, reproduction, écologie, pp.3-4 (1975)
- (3) M.S.Diop., Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences ; Détermination structurale de biomolécules polaires isolés d'organismes marins de la cote sénégalaise. UCAD, pp...(2003)
- (4) M. Fofana., Thèse de 3ème cycle : Isolement, étude structurale et chimique de métabolites secondaires d'organismes de la côte sénégalaise. UCAD, pp... (2007)
- (5) M.C. Delorme., Thèse de DEA ; Contribution à l'étude d'une Rhodophycée sénégalaise., p.7 (1985)
- (6) H.G. Choi., M.S. Kim., M.M. Guiry. and G.W. Saunders., Phylogenetic relationships of *Polysiphonia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) and its relatives based on anatomical and nuclear small-subunit rDNA sequence data, pp.1465-1476 (2001)
- (7) A.M. Rizk., H.S. Al-Easa and J.M. Kornprobst., the phytochemistry of the macro and blue-green algae of the Arabian Gulf. Faculty of science –University of Qatar., pp.84, 545-551 (1999)
- (8) J.F .Batey.and J.R . Turvey., Galactan sulphate of the red alga *P.lanosa* carbohydr. Res., 43, pp.133-134 (1975)
- (9) H. Colin. and J. Augier., New glucide in Florideae of the *Polysiphonia* genus., C. R. Acad. Sci., 208, pp.1450-1453 (1939)
- (10) B. Wickberg., Isolation of 2 L-amino-3-hydroxy-1-propanesulphonic acid from *P.fastigiata*,Acta Chem.Scand.,12, pp.506-511 (1957),
- (11) B. Wickberg., Structure of a glyceritol glycoside from *Polysiphonia fastigiata* and *Corallina officianalis*, Acta Chem. Scand., 11, pp.1183-1186 (1959)
- (12) T .Saito. and Y. Ando., Bromine compound in seaweed.I.A. bromophenolic compound from the red alga, *Polysiphonia morrowii*., Nippon Kagaku Zasshi 76, p.478 (1955)
- (13) M. Aknin., A. Samb., J. Miralles., V. Costantino., E. Fattorusso. and A. Mangoni, Polysiphenol, a new brominated 9,10-dihydrophenathrene from Senegalese red alga *Polysiphonia ferulacea*, Tetrahedron Lett., 33, pp.555-558 (1992)

- (14) K.W. Glombitza., I. Sukopp. And H. Wiedenfeld., Antibiotics from algae.XXXVI. Rhodomelol and methylrhodomelol from *Polysiphonia lanosa*, Planta Med., 5, pp.437-440 (1985)
- (15) M.M. Laur., Application of gas chromatography to the study of the fatty acids of Rhodophyceae, C.R. Acad. Sci., 253, pp.966-968 (1961)
- (16) F. Yu., F. Zeng., L.Jiang. and B. Zhou, Subunit composition and chromophore content of R- phycoerythrin from *P.urceolata*, Shengwu Huaxu Yu Shengwu Wuli Xuebo, 22, pp.211-227 (1990)
- (17) H.I. Heiba., S.A. Al-Nagdy., A.M. Rizk and M.M. Durgham., the amino acid composition of source common marine algae from Qatar, Qatar Univ. Sci. J.,13, pp.219-225 (1993)
- (18) H.S Al-Easa., J.M. Kornprobst and, A.M. Rizk, Major sterol composition of some algae from Qatar, phytochemistry., 39, pp.373-374 (1995)
- (19) V. Costantino., E. Fattorusso., A.J. Mangoni.,Org. Chem., 58, pp. 186-191 (1993)
- (20) W. Kemp., Organic Spectroscopy third edition, pp. 117, 151,20 (1991)
- (21) C. Pascual., J. Meier. et W., simon. Helv.Chim, Acta, 49 , p.215 (1996)
- (22) R.M. Silverstein., G.C. Basler., T.C. Morill., Identification spectrométrique de composés organique, p.220 (1991)
- (23) R. Breslow., N.J. Turro., spectrographie de masse New York, pp.20-23 (1966)
- (24) E. Hoffmann., J. Charrette., V. Stroobat., Spectrométrie de Masse, Cours et exercices corrigées 2^oédition, pp.368-374 (1999)
- (25) M.S. Diop., A. Samb., Identification de glycolipides isolés d'algues et de cnidaires de la côte sénégalaise C.R. Chimie 7, pp.966-971 (2004)

RESUME

Dans le cadre de ce travail, l'étude sur la composition chimique de l'algue rouge *Polysiphonia harveyi* a conduit à l'identification d'un métabolite secondaire dibromé et de deux familles de glycéroglycolipides.

Les techniques chromatographiques utilisées notamment la chromatographie sur couches minces, chromatographie sur colonne de silice normale et en phases inversées (RP-18) et la CLHP ont permis le fractionnement et l'isolement de composés pratiquement purs.

Les structures ont été établies sur la base des données spectroscopiques de RMN et de masse. Les corrélations hétéronucléaires $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ à longue distance sont étudiées avec le spectre HMBC.

Parmi les trois métabolites identifiés nous avons:

- un dibromophénol:
3,4-dibromo-5-(méthoxyméthyl) pyrocatéchol;
- deux familles de glycéroglycolipides composés de :
7 homologues de digalactosyldiacylglycérol (DGDG) et
10 homologues sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG).

Mots clés : algue rouge, *Polysiphonia harveyi*, dibromophénol, digalactosyldiacylglycérol (DGDG), sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG).