

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE 3^e CYCLE

par

Jean MOLLION

RECHERCHES SUR LES CARRAGHEENANES ET LEUR
EXTRACTION : VARIATIONS SAISONNIERES DU
CARRAGHEENANE DE HYPNEA



Membres du Jury : MM. J. MONTREUIL

Président

M. BODARD

Rapporteur

M. QUILLET

Examineur

B. FOURNET

Examineur

Soutenue le 21 décembre 1977.

*A mes Parents,
A ma fille Krista.*

AVANT - PROPOS

Je remercie le Professeur BODARD, de l'Université de Lille I, pour avoir dirigé mes recherches.

Je suis reconnaissant envers les Professeurs MONTREUIL et FOURNET, de l'Université de Lille I, pour leur aide matérielle et leurs conseils.

Je tiens à remercier également le Professeur McCANDLESS, de McMaster University (Canada), pour m'avoir accepté dans son laboratoire, et m'avoir initié à de nouvelles techniques.

Le Directeur de l'Océanographie et des Pêches maritimes du Sénégal m'a fourni une aide matérielle pour cette étude et je lui en exprime ma profonde gratitude.

Ma gratitude va également à Monsieur l'Abbé QUILLET qui a bien voulu faire partie de mon Jury et dont les conseils m'ont toujours été très utiles.

Je remercie Mademoiselle Michèle DELECOURT qui a bien voulu taper ce manuscrit.

TABLE DES MATIERES

	PAGE
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
CHAPITRE II	
HISTORIQUE DES RECHERCHES SUR LES CARRAGHENANES	2
II ₁ - LES DIFFERENTS CARRAGHENANES	2
II ₂ - PRINCIPALES SOURCES DE CARRAGHENANES	18
II ₃ - VARIATIONS SAISONNIERES DES CARRAGHENANES DE DIFFERENTES ALGUES	20
II ₄ - VARIATIONS DU CONTENU EN CARRAGHENANE D'ECHANTILLONS RECOLTES A DIFFERENTES PROFONDEURS	21
II ₅ - LOCALISATION DU CARRAGHENANE DANS LES CELLULES DE <i>C. crispus</i>	21
CHAPITRE III	
MATERIEL ET METHODES	23
III ₁ - TECHNIQUES GENERALES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DU CARRAGHENANE	23
III ₂ - MESURE DES CARACTERES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DES CARRAGHENANES	29

III ₃ - TECHNIQUES PARTICULIERES EMPLOYEES DANS CETTE ETUDE	35
---	----

CHAPITRE IV

VARIATIONS SAISONNIERES DU CARRAGHENANE DE <i>HYPNEA</i> AU SENEGAL	41
IV ₁ - TRAVAUX PRELIMINAIRES A L'ETUDE DES VARIATIONS SAISONNIERES	41
IV ₂ - ANALYSE DU CARRAGHENANE EXTRAIT PAR LYOPHILISATION A PARTIR DES ECHANTILLONS DE <i>H. musciformis</i> DE DERIVE	45
IV ₃ - ANALYSE DU CARRAGHENANE DE <i>H. musciformis</i> EXTRAIT PAR LE CETAVLON	52
IV ₄ - ANALYSE DU CARRAGHENANE DE <i>H. cervicornis</i> EXTRAIT PAR LE CETAVLON - COMPARAISON AVEC <i>H. musciformis</i>	54

CHAPITRE V

FRACTIONNEMENT DU CARRAGHE- NANE DE <i>HYPNEA</i>	55
V ₁ - FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS PRECIPITES PAR LE CETAVLON	55
V ₂ - FRACTIONNEMENT DU CARRAGHENANE DE <i>H.</i> <i>musciformis</i> EXTRAIT PAR LYOPHILISATION ET SOUMIS A L'ACTION DE L'ACETONE	59
V ₃ - RESUME DES RESULTATS DU FRACTIONNEMENT ET DISCUSSION	61

CHAPITRE VI

ANALYSE COMPARATIVE PAR SPECTROPHOTOMETRIE INFRAROUGE
DES CARRAGHENANES PROVENANT
DE *H. musciformis* ET *H. cervicornis* 63

 VI₁ - RESULTATS 63

 VI₂ - DISCUSSION 63

CHAPITRE VII

DISCUSSION GENERALE ET
CONCLUSIONS 65

BIBLIOGRAPHIE 67

TABLE DES TABLEAUX

		PAGE
TABLEAU 1	- COMPARAISON DES DIFFERENTS CONSTITUANTS DE L'AGAR-AGAR ET DU CARRAGHENANE	11
TABLEAU 2	- DIFFERENTES TECHNIQUES D'EXTRACTION PAR L'EAU DU CARRAGHENANE	26
TABLEAU 3	- DESSALAGE DE <i>H. musciformis</i> PAR L'EAU DOUCE	42
TABLEAU 4	- INFLUENCE DU DOUBLE SECHAGE SUR LE CARRAGHENANE DE <i>H. musciformis</i>	43
TABLEAU 5	- INFLUENCE DU TEMPS D'EBULLITION SUR LA QUANTITE ET LA QUALITE DU CARRAGHENANE EXTRAIT	44
TABLEAU 6	- ANALYSE DES EXTRAITS LYOPHILISES DE <i>H. musciformis</i> DE DERIVE	46
TABLEAU 7	- ANALYSE DES EXTRAITS DE <i>H. musciformis</i> PRECIPITES PAR LE CETAVLON	50
TABLEAU 8	- ANALYSE D'UN EXTRAIT DE <i>H. cervicornis</i> PRECIPITE PAR LE CETAVLON	53
TABLEAU 9	- FRACTIONNEMENT DE <i>H. musciformis</i>	56
TABLEAU 10	- FRACTIONNEMENT DE <i>H. musciformis</i>	57
TABLEAU 11	- FRACTIONNEMENT DE <i>H. cervicornis</i>	58
TABLEAU 12	- ANALYSE DES EXTRAITS LYOPHILISES DE <i>H. musciformis</i> SOUMIS A L'ACTION DE L'ACETONE ET FRACTIONNES PAR LE KCl	60

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1	- FORMULE DE DISACCHARIDE LIE 1-3 DANS LA MOLECULE DE KAPPA CARRAGHENANE	3
FIGURE 2	- MODIFICATIONS POSSIBLES DE L'UNITE 3,6 ANHYDRO-GALACTOSE DU KAPPA CARRAGHENANE (UNITE B)	4
FIGURE 3	- FORMULE LINEAIRE DU KAPPA CARRAGHENANE	5
FIGURE 4	- FORMULE LINEAIRE DU LAMBDA CARRAGHENANE	7
FIGURE 5	- FORMULE LINEAIRE DU IOTA CARRAGHENANE	8
FIGURE 6	- PRECURSEURS DES CARRAGHENANES	9
FIGURE 7	- CONFORMATIONS POSSIBLES DE D α GALACTOPYRANOSE	13
FIGURE 8	- MOLECULE DE KAPPA CARRAGHENANE	14
FIGURE 9	- LES PONTS 3,6-ANHYDRO ET LES GROUPEMENTS SULFATES NE SONT PAS REPRESENTES (d'après REES, repris QUILLET, modifié MOLLION) : CHAÎNE SPIRALEE DE CARRAGHENANE ..	15
FIGURE 10	- MOLECULE DE IOTA CARRAGHENANE	16
FIGURE 11	- DOSAGE DU 3,6 ANHYDROGALACTOSE ET DU FRUCTOSE PAR LA METHODE AU RESORCINOL	32
FIGURE 12	- VARIATIONS SAISONNIERES DES RENDEMENTS, TENEURS EN 3,6 AG et SO ₄ de <i>H. musciformis</i> DE DERIVE (EXTRAITS LYOPHILISES)	47
FIGURE 13	- VARIATIONS SAISONNIERES DE LA TENEUR EN 3,6 AG DES EXTRAITS PRECIPITES PAR LE CETAVLON PROVENANT DE <i>H. musciformis</i> FIXE	51
FIGURE 14	- SPECTRES INFRA-ROUGES DES FRACTIONS 0,3 M KCl INSOLUBLES OBTENUES A PARTIR DE <i>H. musciformis</i> ET <i>H. cervicornis</i>	64

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Sur le littoral du Sénégal les *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux et *cervicornis* J. Agardh sont rejetés en grande quantité, et sont récoltés à des fins industrielles pour en extraire le carraghenane (BODARD M., MOLLION J., 1974, 1).

En 1973 j'ai publié les résultats d'une étude préliminaire sur les caractères biochimiques de cette substance, obtenue à partir de *H. musciformis* (Wulfen) Lamouroux, *cervicornis* J. Agardh, et aff. *ceramioïdes* fide M. BODARD 1968, récoltés en différents points de la côte du Sénégal (MOLLION J., 1973, 2). L'extrait aqueux de *H. musciformis*, constitué essentiellement par du carraghenane, présente des variations saisonnières. La teneur de *H. musciformis* en substances solubles dans l'eau et le pourcentage en glucides de celles-ci varient en sens inverse.

L'étude des polysaccharides extraits de *Hypnea* présente un intérêt économique du fait que cette espèce est exploitée au Sénégal, mais aussi un intérêt théorique. Peu de recherches ont été effectuées sur le carraghenane de *H. musciformis* et encore moins sur celui de *H. cervicornis*. La plupart des travaux scientifiques ont porté sur les caractéristiques et sur la biosynthèse de ces molécules provenant de *Chondrus crispus* Stackhouse, de différentes espèces de *Gigartina* et de *Euchema*.

La présente étude tente d'expliquer les variations observées en 1973. Dans une première partie les techniques d'extraction du carraghenane sont étudiées et comparées entre elles. Cette comparaison des techniques existantes est complétée par des résultats que j'ai obtenus à partir de *H. musciformis*, permettant de préciser certaines conditions optimales d'extraction. Dans une deuxième partie, j'ai repris l'étude des variations saisonnières observées en 1973. J'ai essayé de déterminer si le carraghenane peut être considéré comme responsable de ces variations. La nature de cette molécule a été analysée.

CHAPITRE II

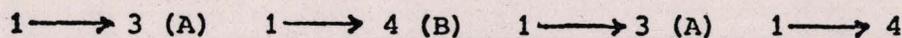
HISTORIQUE DES RECHERCHES SUR LES CARRAGHENANES.

II₁ - LES DIFFERENTS CARRAGHENANES

A l'origine, le nom de carraghenane a été utilisé pour désigner l'extrait aqueux provenant de *Chondrus crispus* et de *Gigartina stellata* (Stackhouse) Batters. Ce n'est que par la suite que l'on a mis en évidence un composé de structure semblable, et même dans certains cas identiques, chez des algues appartenant à d'autres genres.

Comme l'agar-agar, le carraghenane est constitué d'un enchaînement de galactose et de dérivés du galactose unis alternativement par liaisons 1-3 et 1-4.

Pour décrire cette structure, nous désignerons par A l'unité liée au reste de la molécule par son carbone n°3, et par B l'unité liée par son carbone n°4. Les chaînes de carraghenane peuvent donc être schématisées ainsi :



Il a été montré que les carraghenanes diffèrent chimiquement de l'agar-agar par la présence de 3,6-anhydro D galactose à la place de 3,6-anhydro L galactose, et par un plus fort pourcentage en ester sulfate (PERCIVAL E., 1954, 3 ; O'NEILL A.N., 1955, 4).

On distingue essentiellement le lambda, le kappa et le iota carraghenane. Ces différentes molécules présentent une certaine variabilité notamment dans leur composition en ester sulfate. On trouve, en outre, des précurseurs de ces carraghenanes qui sont souvent difficiles à dissocier de ces derniers. Le mu carraghenane est le précurseur du kappa, alors que le nu carraghenane est le précurseur du iota. Comme nous le verrons par la suite, cette classification des carraghenanes constitue probablement une simplification.

II_{1,a} - LE KAPPA CARRAGHENANE

La formule du kappa carraghenane a été élucidée par O'NEILL A.N. (1955, 5). Celui-ci a montré que cette molécule était constituée de D galactose, 3,6-anhydro D galactose, et d'ester sulfate, dans les rapports 6, 5, 7. L'étude enzymatique à l'aide d'une kappa carraghenase provenant de *Pseudomonas carrageenovora* (WEIGL J., YAPHE W., 1966, 6) a permis d'isoler un disaccha-

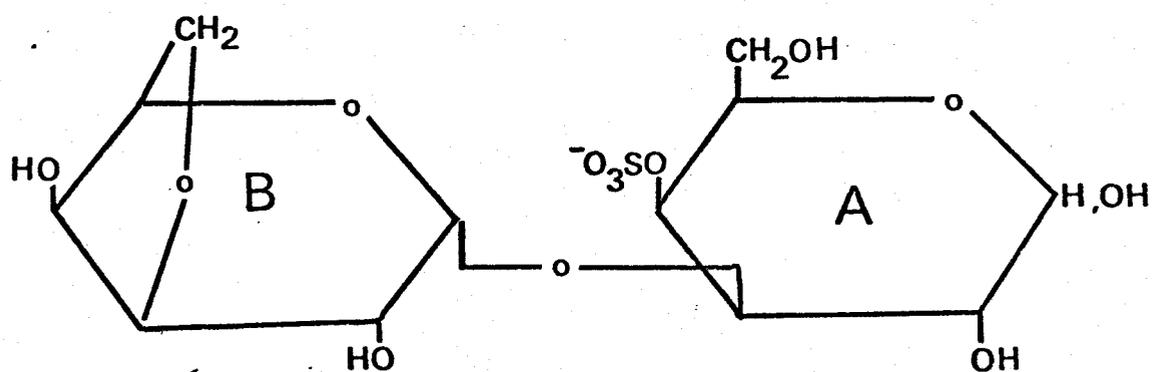
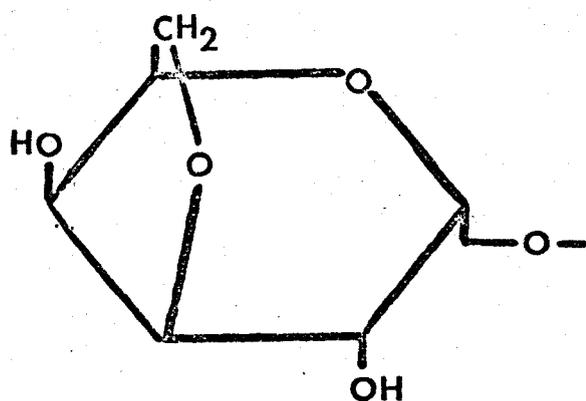
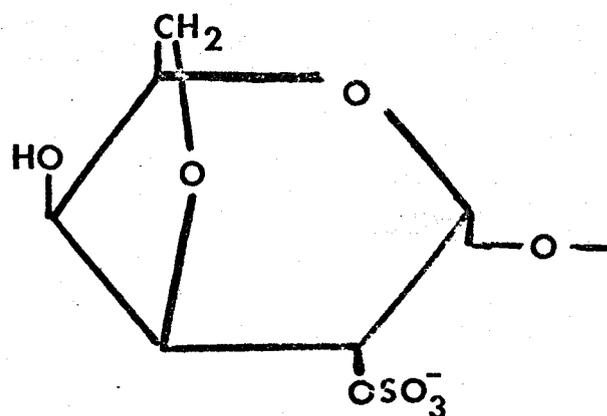


Fig. 1 - Formule de disaccharide lié 1-3 dans la molécule de kappa carraghenane.



3,6 anhydrogalactose



3,6 anhydrogalactose 2 sulfate

traitement
alcalin

galactose 6 sulfate

traitement
alcalin

galactose 2,6 disulfate

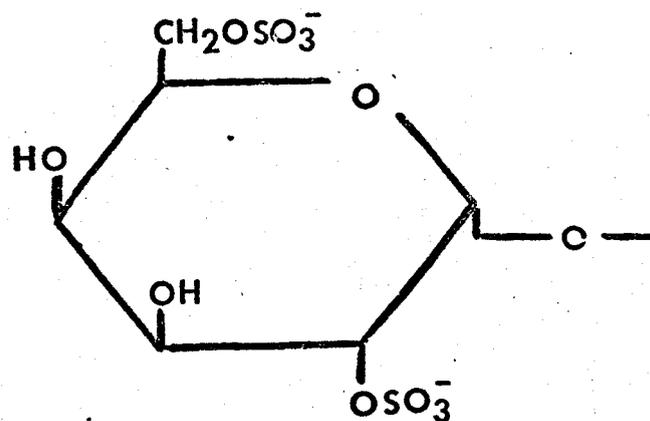
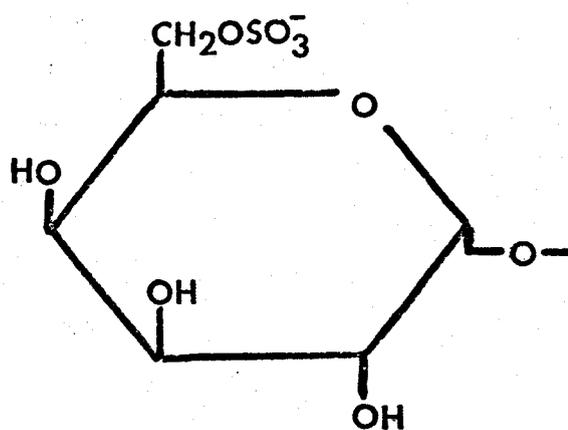


Fig. 2 - Modifications possibles de l'unité 3,6 anhydrogalactose du kappa carraghenane (unité B).

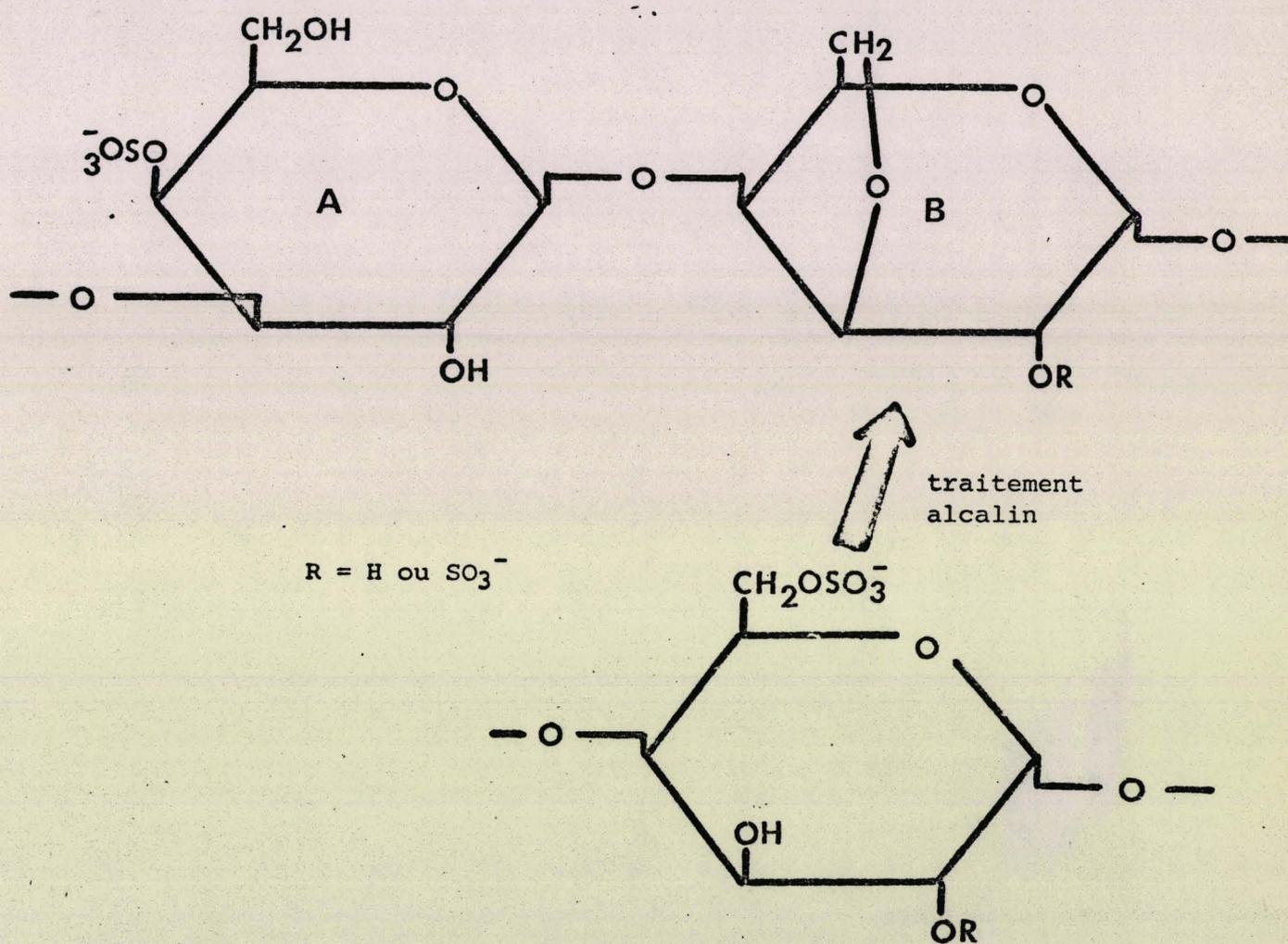


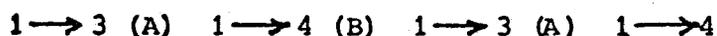
Fig. 3 - Formule linéaire du kappa carragenane.

ride qui a été identifié comme étant le 3,6-anhydro D galactopyranosyl (1-3) D galactopyranose 4 sulfate. En utilisant les symboles mentionnés plus haut, on peut désigner par A l'unité galactose 4 sulfate et par B l'unité 3,6-anhydrogalactose. La figure 1 représente le disaccharide (B) 1→3 (A).

L'unité B, contenant le pont anhydro, peut être remplacée par du galactose 6 sulfate. Le traitement alcalin à chaud du kappa carraghenane produit une libération d'ester sulfate et une augmentation de la teneur en 3,6-anhydrogalactose. Ceci indique la présence d'un galactose 6 sulfate qui se transforme en 3,6-anhydrogalactose par traitement alcalin pour constituer l'unité B.

Les analyses par méthylation (DOLAN T.C.S., 1965, 7) ont confirmé la sulfatation en C₄ de l'unité A, et ont montré une sulfatation partielle en C₂ de l'unité B. Par cette même technique il a également été montré que le galactose 6 sulfate, qui remplace l'unité B, peut être également sulfaté en C₂. La figure 2 montre les différentes formes sous lesquelles peut se trouver l'unité B du kappa carraghenane.

Par méthanolyse, avant et après traitement alcalin, il a été mis en évidence (ANDERSON N.S., REES D.A., 1965, 8) une alternance des unités A et B unies successivement par liaison 1→3 et 1→4 suivant le schéma suivant :



La figure 3 représente la formule linéaire de la molécule de kappa carraghenane ainsi que les variations possibles de son unité B.

II_{1,6} - LE LAMBDA CARRAGHENANE

La molécule de lambda carraghenane est constituée presque uniquement par du D galactose sulfaté, bien qu'elle contienne des traces de L galactose, glucose, et xylose (SMITH D.B. et al., 1954, 9). Ces deux dernières substances : sont probablement des impuretés. Une liaison 1—3 a été mise en évidence entre les unités de galactose (MORGAN K., O'NEILL A.N., 1959, 10).

L'obtention de 3,6-anhydrogalactose 2 sulfate par traitement alcalin à chaud, démontre la présence d'un galactose 2,6 disulfate lié au reste de la

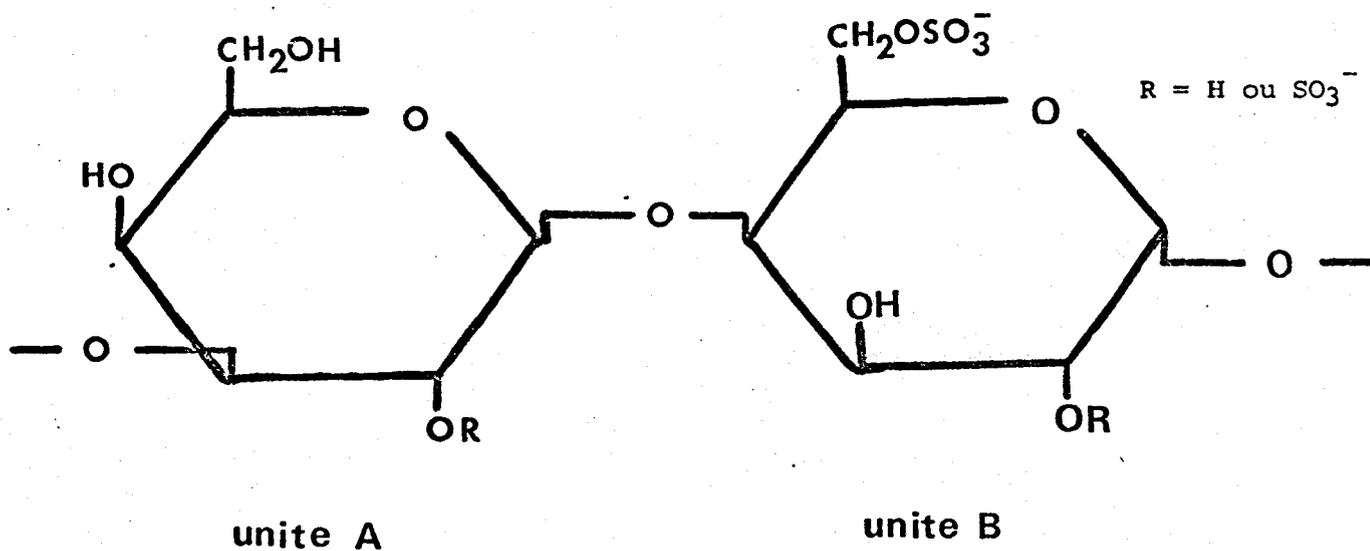


Fig. 4 - Formule linéaire du lambda carragenane.

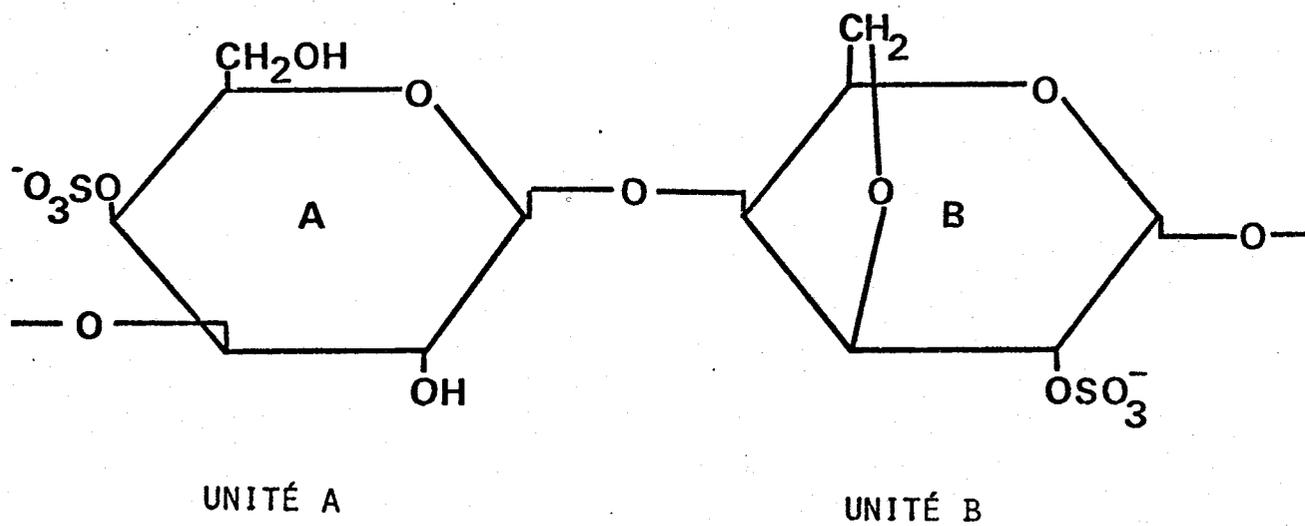
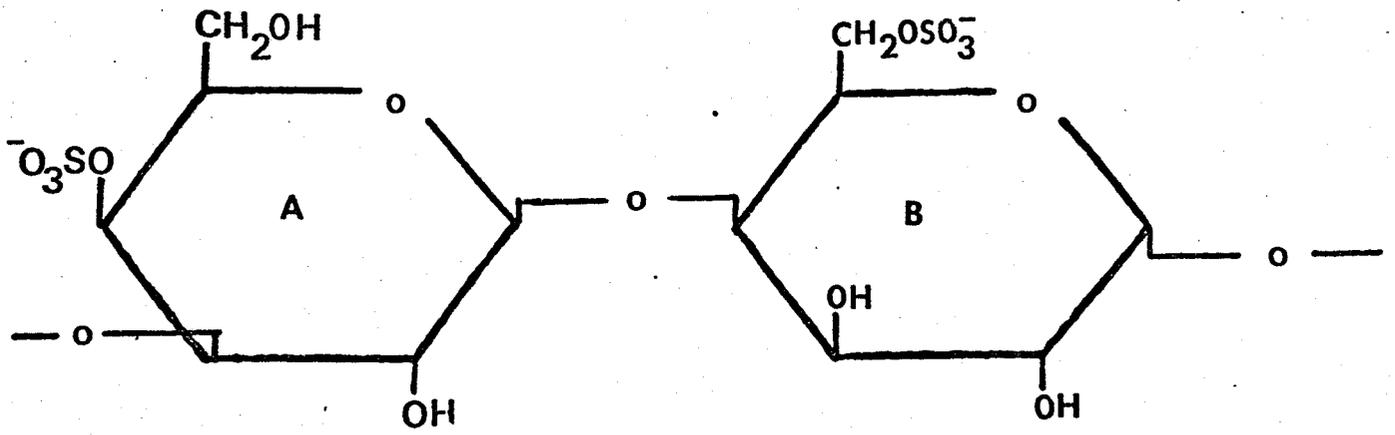
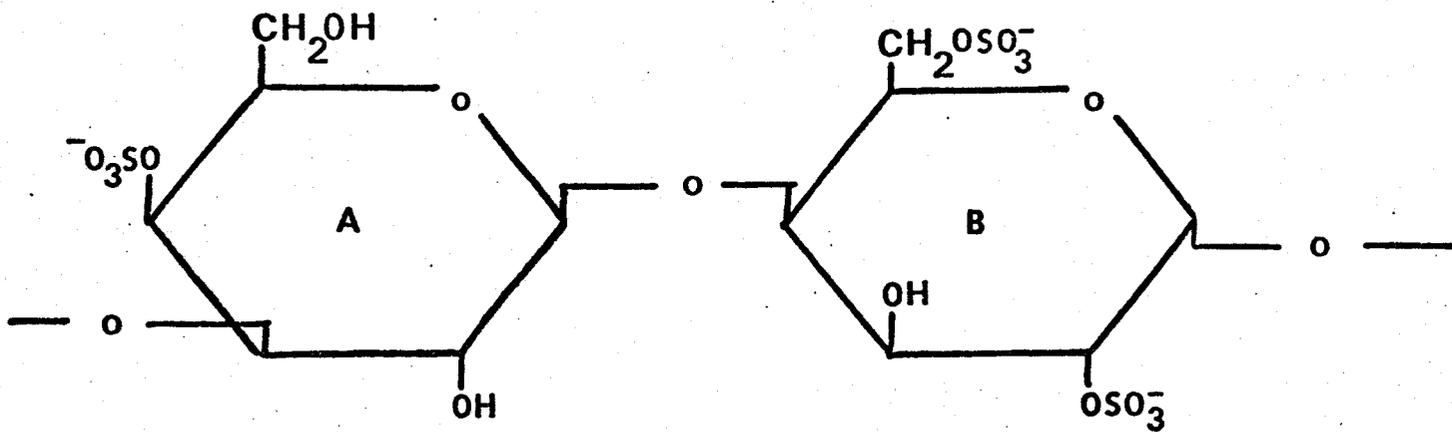


Fig. 5 - Formule linéaire du iota carraghenane.



mu carraghenane



nu carraghenane

Fig. 6 - Précurseurs des carraghenanes.



molécule par son C₄ (REES D.A., 1963, 11). Cette partie de la molécule correspond à l'unité B de la formule générale des carraghenanes. Elle peut ne pas être sulfatée en C₂. Dans ce dernier cas le traitement alcalin aboutit à la formation de 3,6-anhydrogalactose.

L'analyse par méthylation a montré que l'unité A était du D galactose pouvant être sulfaté en C₂. La figure 4 représente la formule linéaire de la molécule de lambda carraghenane.

II_{1,c} - LE IOTA CARRAGHENANE

Le iota carraghenane contient comme le kappa, une unité de 3,6-anhydrogalactose 2 sulfate alternant avec une unité de galactose 4 sulfate. Le galactose 4 sulfate est lié au reste de la molécule par son C₃ et constitue l'unité A, alors que cette liaison se fait au niveau du C₄ du 3,6-anhydrogalactose 2 sulfate qui constitue l'unité B. Le C₂ du 3,6-anhydrogalactose, qui n'est que très occasionnellement sulfaté dans le kappa carraghenane, l'est toujours dans le iota (ANDERSON N.S. et al., 1973, 12). L'unité B de cette molécule peut être remplacée par du galactose 2,6 disulfate. Cette unité de remplacement joue un rôle dans la structure tertiaire, comme nous le verrons plus loin ; le galactose 2,6 disulfate peut être transformé en 3,6-anhydrogalactose 2 sulfate par traitement alcalin à chaud. La figure 5 représente la formule linéaire du iota carraghenane.

II_{1,d} - LE MU ET LE NU CARRAGHENANE

Les mu et nu carraghenanes sont respectivement les précurseurs biologiques des kappa et iota carraghenanes.

Dans la molécule de mu carraghenane (figure 6), l'unité B est toujours un galactose 6 sulfate alors que l'unité A est identique à celle du kappa. Nous avons vu comment un galactose 6 sulfate pouvait par traitement alcalin à chaud se transformer en 3,6-anhydrogalactose. Par ce processus on peut transformer un mu carraghenane en kappa carraghenane.

Dans la nature cette transformation peut se faire grâce à une enzyme isolée des thalles de *Gigartina stellata* (LAWSON C.J. et REES D.A., 1970, 13).

Dans la molécule de nu carraghenane (figure 6) l'unité B est un galactose 2,6 disulfate alors que l'unité A est identique à celle du iota. Un

TABLEAU 1
COMPARAISON DES DIFFÉRENTS CONSTITUANTS
DE L'AGAR-AGAR ET DU CARRAGENANE

	Unité 1	Unité B	Poids moléculaire
Agar			
- agarose*	D galaçtose	L 3,6 anhydrogalaçtose	110 000 -160 000
- agaropectine	D galaçtose 6 o-méthyl D galaçtose	L 3,6 anhydrogalaçtose 4 sulfate	
Carragenane			
- kappa	D galaçtose 4 sulfate	D 3,6 anhydrogalaçtose D 3,6 anhydrogalaçtose 2 sulfate	260 000 -320 000
- mu	D galaçtose 4 sulfate	D galaçtose 6 sulfate	
- iota	D galaçtose 4 sulfate	D 3,6 anhydrogalaçtose 2 sulfate	
- nu	D galaçtose 4 sulfate	D galaçtose 2,6 disulfate	
- lambda	D galaçtose D galaçtose 2 sulfate	D galaçtose 6 sulfate D galaçtose 2,6 disulfate	330 000 -790 000

* L'unité A peut être constituée en faible pourcentage par du L galaçtose, 6 o-méthyl D galaçtose ou par du 4 o-méthyl L galaçtose (PERCIVAL E. et al., 1967, 14).

traitement alcalin à chaud permet la formation d'un pont anhydro entre le C₆ et le C₃ avec élimination de l'ester sulfate. Une molécule identique au iota carraghenane est alors formée.

Aucune enzyme n'a encore été isolée dans la nature permettant la transformation du nu en iota carraghenane.

II_{1,e} - COMPARAISON DE CES STRUCTURES AVEC CELLE DE L'AGAR-AGAR, POIDS MOLÉCULAIRES (TABLEAU 1)

L'agar-agar et le carraghenane sont les principaux galactanes extraits des algues rouges. L'agar peut être fractionné en deux constituants l'agarose et l'agaropectine. Des similitudes existent entre ces molécules et celles de carraghenane. Ce sont de longues chaînes d'unités de galactose ou de dérivés de galactose, unies alternativement par des liaisons 1-3 et 1-4 ; bien que la structure primaire de l'agar présente plus de variations que celles du carraghenane, ces 2 types de molécules sont essentiellement constituées par une répétition de deux unités que l'on peut désigner par A et B. Une liaison 1-4 unit A et B, ces disaccharides sont eux-mêmes liés entre eux par liaisons 1-3 pour former de longues chaînes. Le poids moléculaire des carraghenanes (tableau 1) varie dans des proportions considérables suivant le degré de polymérisation de ces molécules.

II_{1,f} - STRUCTURE TERTIAIRE DES MOLÉCULES DE CARRAGHENANE

La structure tertiaire de ces molécules est importante à étudier, notamment pour comprendre le processus de gélification. REES a montré que les chaînes de carraghenane se présentent sous forme d'hélice spiralée (REES D.A., 1972, 15). Si l'on reprend la nomenclature A et B pour désigner les 2 unités de la séquence élémentaire de ces molécules, comme nous l'avons fait précédemment, on peut expliquer la structure spiralée de la façon suivante :

L'unité A (liée en 3) est stable dans la conformation (C.I.) ; l'Unité B (liée en 4) se trouve dans la conformation (I.C.) à cause de l'encombrement stérique du C₆ lié soit au pont anhydro (3,6-anhydrogalactose), soit à un sulfate (galactose 6 sulfate). Ces deux conformations sont représentées dans la figure 7.

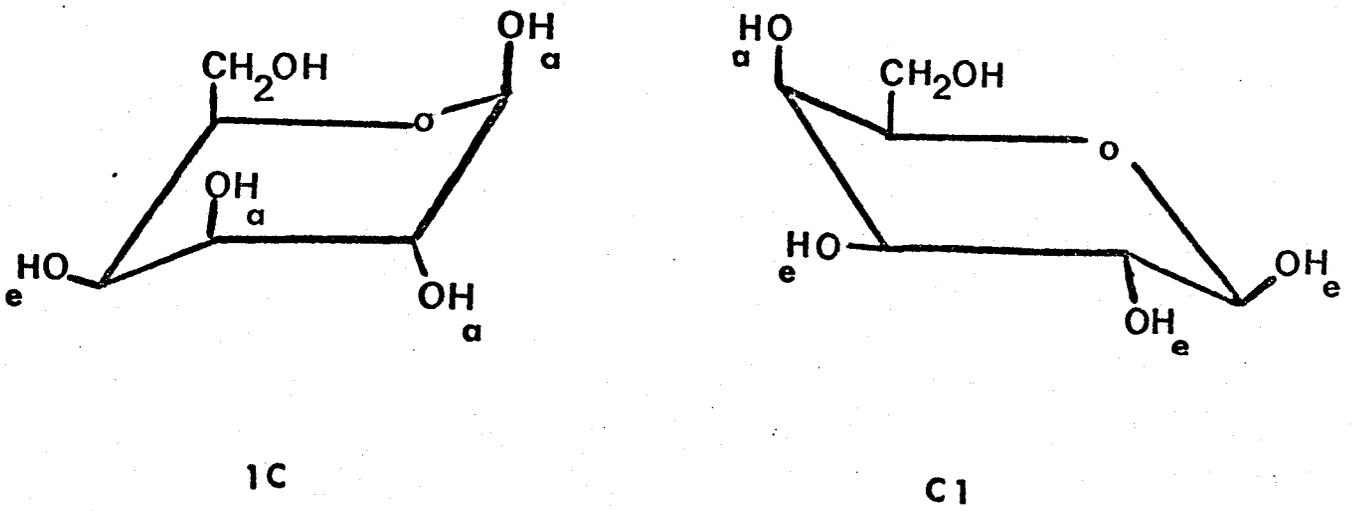


Fig. 7 - Conformations possibles de α D galactopyranose.

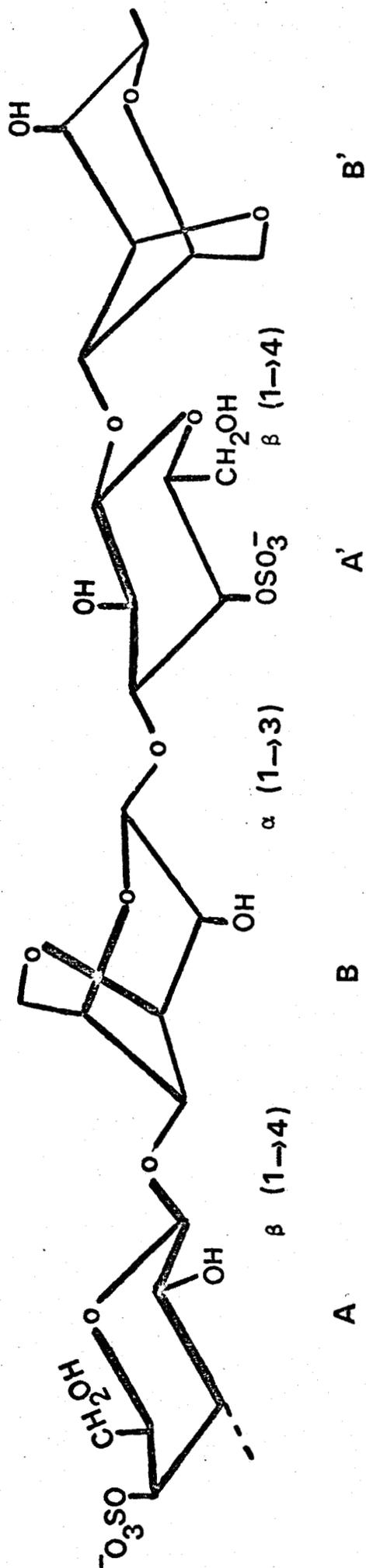


Fig. 8 - Molécule de kappa carrageenane.

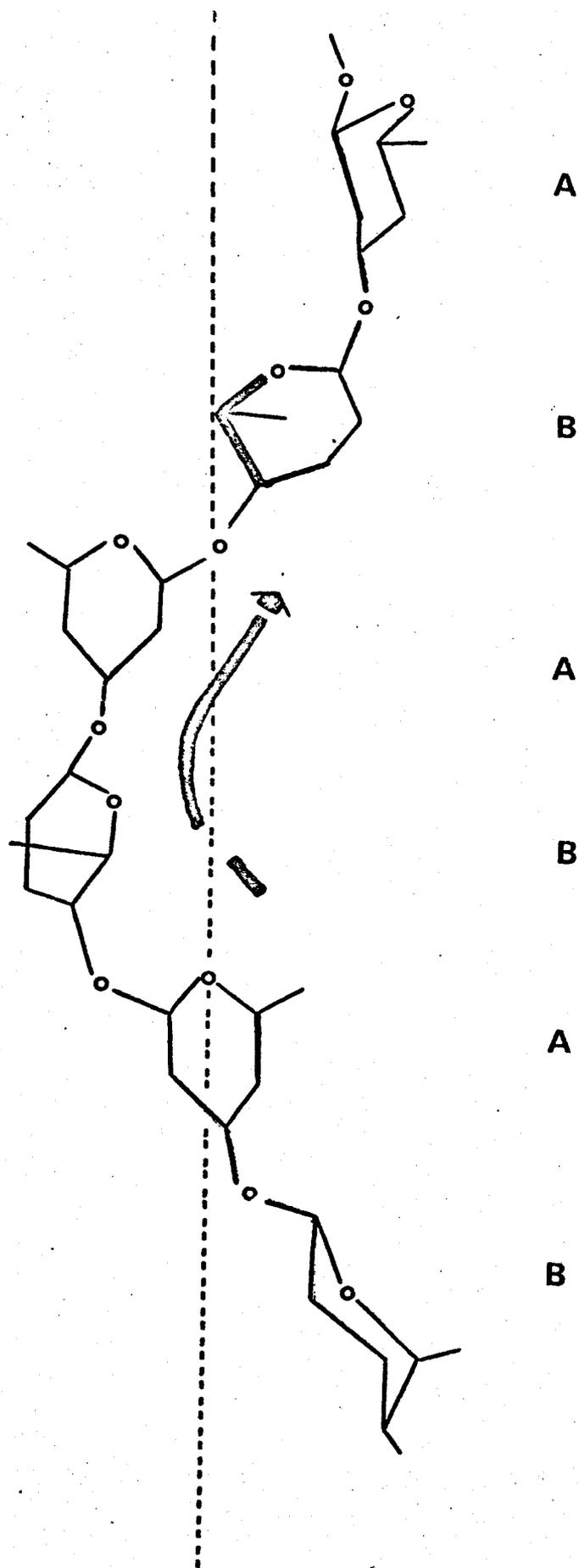


Fig. 9 - Chaîne spiralée de carraghenane.

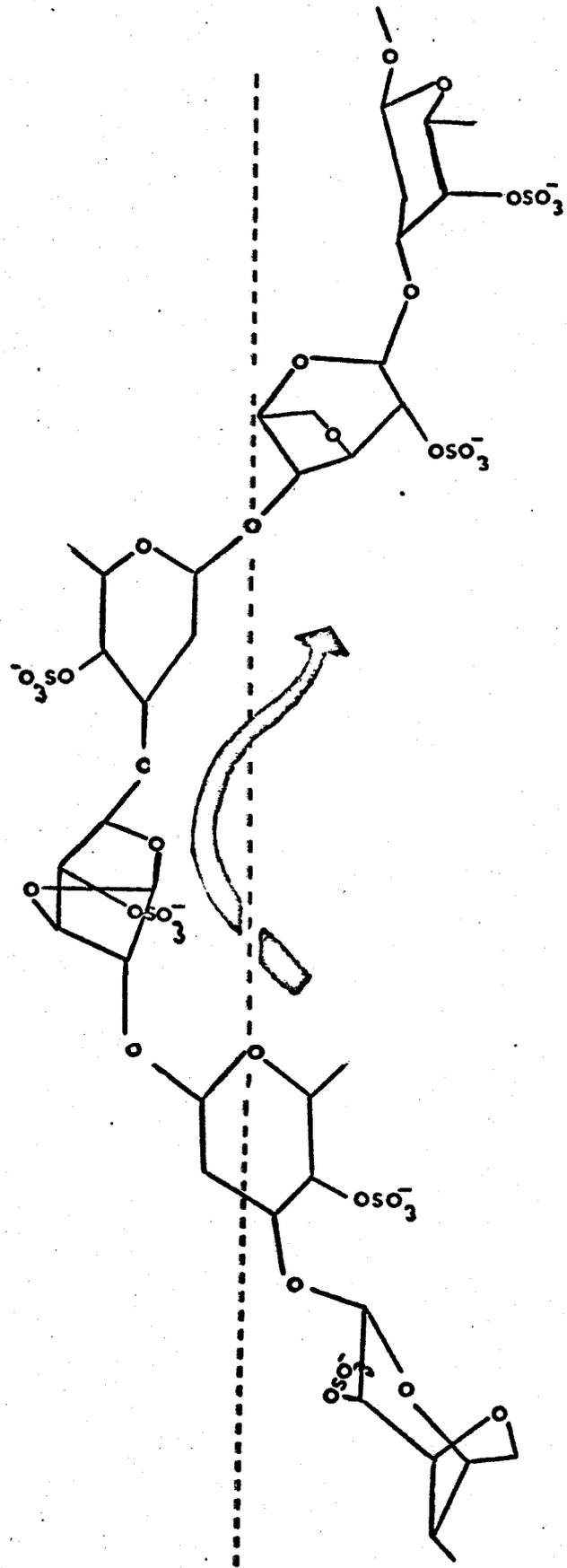


Fig. 10 - Molécule de iota carrageenane.



La structure α 1 \rightarrow 3 (C.I.) β 1 \rightarrow 4 (I.C.) contraint l'unité A' (figure 8) à être retournée par rapport à l'unité A voisine. Les molécules de carraghénane, du fait de l'orientation des unités les unes par rapport aux autres, prennent une forme en spirale (figure 9).

Les groupements sulfates placés en C₄ sur les unités A sont toujours tournés vers l'extérieur. Il en est de même des groupements sulfates placés en C₂ sur les unités B.

Dans les molécules de kappa et de iota carraghénanes tous les groupements sulfates sont tournés vers l'extérieur de la spirale (figure 10).

REES a montré que les gels de carraghénanes sont dus à la possibilité de zones de jonction entre deux chaînes spiralées qui s'associent pour former une double hélice. Ceci est possible dans les molécules de kappa et de iota carraghénanes, tous les groupements sulfates étant orientés vers l'extérieur de la spirale.

L'association de deux chaînes spiralées est rompue lorsque l'unité 3,6-anhydrogalactose de l'une des chaînes est remplacée par du galactose 6 sulfate. Cette modification de structure entraîne un changement d'orientation de l'une des chaînes qui, ainsi déviée, peut s'associer avec une chaîne de carraghénane voisine pour reformer une double hélice. Il se forme ainsi un réseau tridimensionnel de molécules de carraghénanes. La présence de nombreuses unités latérales, appelées "kinks" par REES, aboutit à la formation d'un gel de pouvoir gélifiant affaibli mais présentant une grande élasticité (REES D.A., 1972, 16). Cette propriété peut présenter des avantages en industrie.

Dans la molécule de lambda carraghénane un groupement sulfate est fixé en C₂ sur l'unité A. Celui-ci est tourné vers l'intérieur de la spirale et empêche l'association avec une deuxième chaîne spiralée. Les lambda carraghénanes, pour cette raison, ne forment pas de gel.

D'une façon générale, il faut souligner que les différents types de carraghénanes décrits présentent eux-mêmes une certaine variabilité dans leur composition en sulfate et dans leur structure tertiaire.

MCCANDLESS, grâce à des expériences immunologiques, distingue plusieurs

types de kappa et de lambda carraghenanes (McCANDLESS E.L. et al., 1973, 17). Grâce à des anticorps spécifiques de chaque molécule, une nouvelle classification des carraghenanes est entrain d'apparaître.

II_{1,g} - NATURE DU CATION LIÉ AUX GROUPEMENTS SULFATE DES CARRAGHENANES

Dans l'algue vivante les carraghenanes se trouvent sous forme de sel de potassium, sodium, calcium et dans certains cas de magnésium. Ces ions sont liés aux groupements sulfates négatifs. Leur proportion varie d'une espèce à l'autre et se trouve modifiée par l'addition de certains cations lors de l'extraction de ces polysaccharides. RAMARAO et al. 1967, 18) a trouvé dans les couches de l'extrait aqueux provenant de *H. musciformis* les cations suivants : K⁺ 6,35 % ; Na⁺ 1,55 % ; Ca⁺⁺ 0,03 % ; Mg⁺ 0,055 %. Ces chiffres sont exprimés par rapport au poids sec de l'extrait avant incinération. L'ion K⁺, en neutralisant les sulfates des carraghenanes, permet le rapprochement des chaînes de cette molécule, alors que l'ion Na⁺ hydraté, à cause de son plus grand diamètre, ne peut pas être aussi efficace. On comprend ainsi que la nature du cation lié au carraghenane ait une influence sur la formation des gels. La consistance de ces derniers peut être augmentée par l'addition de KCl lors de l'extraction.

II₂ - PRINCIPALES SOURCES DE CARRAGHENANES

- *Chondrus crispus*, *Gigartina stellata* et *Iridaea cordata* (Turner) Bory, Gigartinaceae, Gigartinales.

Pendant longtemps le *C. crispus* et le *G. stellata* ont constitué la seule source de carraghenane. Jusqu'à une époque récente on a cru que ces deux espèces contenaient à la fois du kappa et du lambda carraghenanes. Aujourd'hui on sait que les deux générations macroscopiques, constituant le cycle de reproduction de *C. crispus*, de *G. stellata* et de *I. cordata*, ne contiennent que l'une ou l'autre de ces molécules. Ces espèces présentent comme toutes les Rhodophyceae un cycle de reproduction trigénétique. Le gamétophyte haploïde donne naissance après fécondation à un carposporophyte diploïde microscopique. Ce dernier vit en parasite sur le gamétophyte et libère des carpospores qui germent en donnant naissance à une génération diploïde, le tétrasporophyte.

Celui-ci libère par méiose des tétraspores qui germent en redonnant naissance au gamétophyte. Les analyses chimiques ont montré que le tétrasporophyte ne contient que du lambda carraghenane, alors que le gamétophyte contient exclusivement du kappa carraghenane et des précurseurs de celui-ci (McCANDLESS E.L. et al., 1973, 19).

Le pourcentage de carraghenane contenu dans *C. crispus*, mesuré par McCANDLESS, varie entre 50 % et 65 %. Des pourcentages du même ordre de grandeur sont obtenus à partir d'*Iridaea cordata*.

- *Hypnea*, Hypneaceae, Gigartinales.

Le kappa carraghenane est également obtenu à partir du genre *Hypnea*. Les polysaccharides de *H. musciformis* (Wulfen) Lamouroux (HAMILTON R.D. et CARROL J.J., 1962, 20), et de *H. spicifera* (Suhr) Harvey (CLINGMAN A.L. et NUNN J.R., 1959, 21) ont été analysés. Ces deux espèces contiennent un kappa carraghenane identique à celui obtenu à partir de *C. crispus*. Cette dernière molécule se trouve en quantité égale dans les phases haploïdes et diploïdes de *H. musciformis* et constitue la quasi totalité des carraghenanes de cette plante (McCANDLESS E.L., 1974, 22). Le pourcentage de cette molécule dans *H. musciformis* varie entre 25 % et 40 % pour les plantes en provenance du Sénégal (MOLLION J., 1973, 23), et entre 40 % et 50 % pour les plantes en provenance des Antilles (MOLLION J., résultats non publiés). J'ai mesuré le contenu en carraghenanes de *H. cervicornis* J. Agardh dans mon étude de 1973. Celui-ci est du même ordre de grandeur que celui de *H. musciformis*.

- *Euchema spinosum* J. Agardh et *Agardhiella tenera* (J. Agardh) Schmitz, Soleriaceae, Gigartinales.

Le iota carraghenane est produit principalement par le *Euchema spinosum*. *Agardhiella tenera* semble contenir également ce polysaccharide (DE BOER J.A., LAPOINTE B.E. et C.F. D'ELIA, 1976, 24). Ces deux espèces appartiennent à la famille des Soleriaceae. D'une façon générale toutes les Soleriaceae, dont on a effectué l'analyse chimique, contiennent du iota carraghenane, à l'exception de *Euchema cottonii* qui contient du kappa carraghenane.

II₃ - VARIATIONS SAISONNIERES DES CARRAGHENANES DE DIFFERENTES ALGUES

Des variations saisonnières dans le contenu en carraghenanes du *Chondrus crispus* et de *Euchema* sp. ont été signalées. J'ai, moi-même, décrit un phénomène identique dans l'*Hypnea musciformis* et *H. cervicornis*. J'en parlerai dans la seconde partie de cette étude

MATHIESON a observé des variations saisonnières de la teneur en carraghenanes et de la quantité totale de glucides de *C. crispus*. Celles-ci se font dans le même sens, et sont inversement proportionnelles aux variations de la teneur en protéines (MATHIESON A.C. et TVETER E., 1975, 25). Il est à noter que ce que MATHIESON désigne par teneur en carraghenanes est en fait la teneur en extrait aqueux de l'échantillon.

NEISH a mis en évidence l'effet de l'addition d'azote sur le *C. crispus* de culture. Le taux de croissance de cette espèce est fortement augmenté par l'addition d'azote. Cependant les algues dont la croissance est ainsi stimulée, présentent une teneur en carraghenanes assez faible. Cette dernière valeur augmente rapidement dès que l'on supprime la source d'azote (NEISH A.C., SCHACKLOCK P.F., 1971, 26).

DAWES a observé chez diverses espèces d'*Euchema* une relation inversement proportionnelle entre la teneur en glucides et la teneur en 3,6 anhydrogalactose. Cette dernière valeur est proportionnelle à la teneur en carraghenanes. La teneur en protéines varie en sens inverse de celle des glucides (DAWES C.J. et al., 1974, 27). DAWES précise que le rapport entre protéine et glucide augmente chez les plantes en croissance rapide.

J'ai observé des variations saisonnières du pourcentage en extrait aqueux que l'on peut obtenir à partir de *H. musciformis*. Ces variations sont inversement proportionnelles à celles de la teneur en glucides de cet extrait (MOLLION J., 1973, 28). L'étude qui fait suite à cette première partie tente d'expliquer ce phénomène.

II₄ - VARIATIONS DU CONTENU EN CARRAGHENANE D'ÉCHANTILLONS RECOLTES A DIFFÉRENTES PROFONDEURS

FULLER et al., 1972, 29) a montré que des échantillons de *C. crispus* prélevés dans la zone littorale sont caractérisés par un pourcentage en extrait aqueux plus faible que celui de cette même plante provenant de l'infralittoral. Il en déduit que les espèces se trouvant immergées en permanence ont une teneur en carraghénanes plus élevée que celles découvertes à marée basse. Ceci montre qu'une augmentation du contenu en phycocolloïde n'est pas une adaptation à la dessiccation. Il existe une profondeur pour laquelle le pourcentage en glucides de l'extrait aqueux de *H. musciformis* présente un maximum (MOLLION J., 1973, 30). Celle-ci dépend de la température de l'eau de mer qui diminue lorsque l'on s'éloigne de la surface. La teneur en glucides la plus élevée est obtenue pour une température particulière. Les algues se trouvant à la profondeur correspondant à cette température auront une teneur en glucides maximum.

DAWES et al., 1974, 31) a comparé le carraghénane de *Euchema isiforme*, espèce littorale, avec celui de *E. nudum* qui croît dans l'infralittoral. La première espèce présente un plus fort pourcentage en glucides et en 3,6 anhydrogalactose, mais une plus faible teneur en protéines. Des échantillons de *E. nudum* transplantés de -10 m à -2 m de profondeur ont montré une augmentation du pourcentage en glucides et en 3,6 AG, et une diminution de la teneur en protéines par rapport à celle de la même espèce laissée *in situ*. DAWES suggère que le rapport $\frac{\text{protéine}}{\text{glucide}}$ d'une plante est caractéristique de son état physiologique.

II₅ - LOCALISATION DU CARRAGHENANE DANS LES CELLULES DE *C. crispus*

MCCANDLESS a montré par des techniques immunologiques que le carraghénane était concentré dans les parois des cellules de *C. crispus*. En utilisant des anticorps spécifiques, cet auteur a mis en évidence l'emplacement et la nature du carraghénane dans les tissus haploïdes et diploïdes de cette espèce. Lorsque des coupes pratiquées dans un gamétophyte sont imprégnées d'une solution contenant un antikappa carraghénane, on observe une précipitation du carraghénane contenu dans les parois cellulaires. Aucune réaction n'est observée

lorsque l'on fait agir un antilambda carraghenane sur ces mêmes coupes. Ceci confirme que cette génération contient exclusivement du kappa carraghenane. Par cette même technique il a été montré que les parois des cellules du tétrasporophyte ne contiennent que du lambda carraghenane. Cette molécule est déjà présente dans les cellules du carposporophyte. De même les parois des tétraspores donnant naissance au gamétophyte contiennent déjà du kappa carraghenane (McCANDLESS E.L. et al., 1975, 32). Ceci prouve que le type de carraghenane produit est bien sous la dépendance de l'état haploïde ou diploïde de cette espèce.

CHAPITRE III

MATERIEL ET METHODES

III₁ - TECHNIQUES GENERALES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DU CARRAGHENANE

III_{1,1} - EXTRACTION DU CARRAGHENANE

Le carraghenane représente la presque totalité des substances hydrosolubles contenues dans les algues exploitées pour l'obtention de cette molécule.

La principale phase de l'extraction consistera donc à faire agir l'eau bouillante sur une certaine quantité d'algues, et à séparer la phase soluble des débris insolubles par filtration. Le carraghenane contenu dans le filtrat peut être isolé par diverses techniques de précipitation. Dans certaines extractions la totalité des constituants de la phase soluble est recueillie par élimination de l'eau, c'est le cas du carraghenane obtenu par lyophilisation.

Entre la précipitation parfaitement sélective du carraghenane et l'isolement de l'extrait aqueux dans sa totalité, tous les types d'extractions existent, conduisant à un produit plus ou moins pur. Ainsi certains agents chimiques précipitent plus sélectivement le carraghenane que d'autres.

III_{1,1,a} - TRAITEMENT PREALABLE A L'EXTRACTION

- SECHAGE

Afin de pouvoir, ultérieurement, mesurer les résultats d'une extraction, il est nécessaire de disposer d'échantillons parfaitement secs et dessalés. Les algues sont débarrassées de leur sel par rinçage à l'eau douce. Le séchage préliminaire se fait en général au soleil. Un séchage complet est obtenu en plaçant les échantillons au moins 24 heures dans un dessiccateur ou une étuve à vide. Il faut souligner que la plupart des algues à carraghenanes sont fortement hydrophile et que même un échantillon apparemment sec contient environ 20 % d'eau si il n'a été séché qu'à l'air libre.

- BROYAGE

Le broyage de l'algue sèche peut être effectué manuellement dans un mortier. McCANDLESS (1973, 33) réalise cette opération mécaniquement en plaçant les algues dans un broyeur à bille de type "Dangoumeau" après les avoir trempées dans N₂ liquide.

- FRACTION ORGANOSOLUBLE

Les algues contiennent des substances solubles dans l'acétone et l'alcool bouillant, notamment des lipides, dont il est préférable de se débarrasser avant de les soumettre à l'extraction par l'eau. On fait agir successivement de l'acétone et de l'éthanol à 80 % bouillant. Ce traitement a pour effet, d'une part de solubiliser les lipides ainsi que d'autres substances organosolubles telles que les pigments, d'autre part de rompre les liens entre les protéines et les carraghénanes. Cette dernière liaison est mal connue, il semble qu'elle soit suffisamment forte pour empêcher l'extraction de l'eau de environ 1 % du carraghénane chez *C. crispus* (McCANDLESS E.L., communication personnelle).

Apparemment les seuls résultats publiés sur l'action d'un tel traitement sont ceux de McCANDLESS (1973, 34) sur le *C. crispus* et de moi-même sur le *H. musciformis*. La teneur en matières solubles dans l'acétone et l'alcool bouillant de cette dernière espèce varie entre 11 % et 15 % (voir deuxième partie de cette étude). Aucune valeur n'est donnée pour le *C. crispus*.

III_{1,1,b} - PREMIERE PHASE DE L'EXTRACTION : OBTENTION D'UN EXTRAIT AQUEUX

On peut extraire la fraction aqueuse de l'algue en faisant agir de l'eau, soit bouillante, soit à une température proche du point d'ébullition. Le temps d'action de l'eau est également important. Comme on le verra plus loin, une action de l'eau bouillante prolongée finit par détériorer les molécules de carraghénane.

Le pH a également une importance. A ma connaissance, aucune étude systématique de l'influence du pH sur l'extraction du carraghénane n'a été effectuée. Par une telle méthode on a pu déterminer que le pH optimal d'extraction de l'agar du *Gracilaria* était d'environ de 8 (KIM H.D., 1970, 35).

D'une façon générale, l'action de l'eau est renforcée par l'addition d'acides ou de bases, mais les acides sont à éviter car ils dégradent le carraghénane (SMIDSRÖD O. et al., 1967, 36). D'après MATHIESON et al., 1975, 37) un pH élevé diminue la viscosité, mais augmente le pouvoir gélifiant. Enfin l'extraction est facilitée par la présence de certains cations qui

peuvent se lier aux carraghenanes. La plupart des procédés industriels font usage de ces cations dans des proportions et à des concentrations bien définies. Les procédures d'extraction suivantes ont été utilisées :

. HAMILTON fait agir sur le *C. crispus* et le *H. musciformis* une solution aqueuse, tamponnée à pH 9 par du borate (sic), pendant une heure à 80°. Une concentration de 1 % d'algues est utilisée (HAMILTON R.D., CARROL J.J., 1962, 38). Le carraghenane de *H. musciformis* est isolé par action de l'eau bouillante pendant une heure. Une concentration de 0,5 % d'algues est utilisée (RAMARAO K., KRISHNAMURTHY V., 1967, 39). CLINGMAN extrait le carraghenane de *H. spicifera* par une solution aqueuse d'acide acétique à pH 4, dans laquelle il fait passer de la vapeur d'eau pendant une heure (CLINGMAN A.L., NUNN J.R., 1959, 40). MATHIESON utilise une technique développée par la compagnie "Marine Colloids". Celle-ci consiste en une action de l'eau bouillante additionnée de 0,33 % de CaO pendant 18 à 22 heures. C'est cette dernière technique qui a été utilisée pour *Chondrus crispus*. Une concentration de 1,6 % d'algues est utilisée (MATHIESON A.C., TVETER E., 1975, 41). DE BOER utilise également cette technique pour l'extraction chez *Agardhiella tenera*, mais avec une concentration de 5 % d'algues et une ébullition de 4 heures (DE BOER J.A. et al., 1976, 42). McCANDLESS emploie la procédure suivante pour *C. crispus* : 2 g d'algues sèches sont broyées et dégraissées, puis soumis à l'action de 500 ml de Na HCO₃ à 90° pendant une heure. Les débris insolubles sont repris par filtration et soumis une deuxième fois à l'action de Na HCO₃ à 90° pendant 1/2 heure. On recueille un deuxième extrait par filtration que l'on ajoute au premier. Chaque filtration se fait à travers de la laine de verre et successivement sur 3 filtres Sartorius de porosité décroissante égale à 12 µ, 3 µ et 1,2 µ. MSHIGENI K.E. (1972, 43) extrait le carraghenane de *Hypnea cervicornis*, *Chordacea* Kuetzing et *nidifica* J. Agardh de la façon suivante : 20 g d'algues sont placées dans une solution de 700 ml d'eau à laquelle on a ajouté 15 ml de NaOH à 2 %. On porte le tout à ébullition pendant 1/2 heure. Les algues sont ensuite broyées. On ajoute 300 ml d'eau à la solution contenant les débris en suspension et on porte le tout à ébullition pendant 2 heures au bain marie. On prolonge cette ébullition de 1/2 heure après y avoir ajouté 50 g de celite (facilite la filtration). L'extrait obtenu est ensuite filtré sous pression.

TABLEAU 2

DIFFÉRENTES TECHNIQUES D'EXTRACTION PAR L'EAU DU CARRAGHENANE

auteur	RAMAROA	HAMILTON	CLINGMAN	MATHIESON	DE BOER	MCCANDLESS	MSHIGENI
algue soumise à l'extraction	<i>H. muscif.</i>	<i>C. crisp.</i>	<i>H. spicif.</i>	<i>C. crisp.</i>	<i>Agardhiella tevera</i>	<i>C. crisp.</i>	<i>H. cervicornis</i> <i>H. chordacea</i> <i>H. nidifica</i>
compos. de sol. aqueuse	eau	eau + borate pH 9	ac. acétique pH 4	eau + 0,33 % CaO	eau + 0,35 % CaO	NaHCO ₃ 0,5 M	eau + NaOH 0,01M
% algue	0,5 %	1 %		1,6 %	5 %	0,15 %	2 %
temps extract.	1 hr	1 hr	1 hr	18-22 hr	4 hr	90 mn	3 hr
températ. extract.	100°	80°	100°	100°	100°	90 °	100°



Le tableau 2 résume les différentes techniques d'extraction employées par les auteurs. Apparemment aucune étude systématique sur l'influence des différents facteurs mentionnés dans ce tableau n'a été entreprise.

III_{1,1,c} - DEUXIEME PHASE DE L'EXTRACTION : ISOLEMENT DU CARRAGHENANE

- LES TECHNIQUES DE LYOPHILISATION ET DE CONGELATION ET DECONGELATION RAPIDE

Le procédé de lyophilisation a été utilisé par PERCIVAL, E. et al. (1967, 44). Il permet l'isolement de la totalité de l'extrait aqueux. La solution de carraghenane est portée à une température de - 80° et placée dans un lyophilisateur. On obtient une poudre sèche prête à être analysée. On peut obtenir un même résultat en soumettant la solution de carraghenane à une congélation suivie d'une décongélation rapide par immersion dans un récipient contenant de l'eau. On recueille un gel que l'on fait sécher à l'étuve (RAMARAO K., KRISHNAMURTHY V., 1967, 45).

- LA TECHNIQUE DE PRECIPITATION PAR L'ALCOOL

Le carraghenane est précipité par addition de 2,5 volumes d'alcool à 80 % à l'extrait aqueux. L'alcool isopropylique précipite plus sélectivement le carraghenane que l'alcool éthylique. On recueille le précipité par filtration ou centrifugation. Celui-ci est déshydraté par action successive d'alcool à 95 % d'éther anhydre et séché en présence de P₂O₅ sous vide. Cette technique est utilisée par HAMILTON, CLINGMAN et MATHIESON (mêmes références que les techniques d'extraction par l'eau).

- LA TECHNIQUE DE PRECIPITATION PAR LE CETAVLON

Le Cetavlon* est un ion ammonium quaternaire qui précipite sélectivement les molécules chargées négativement, et par conséquent le carraghenane qui contient des groupements sulfates (SCOTT J.E., 1960, 46). McCANDLESS (1973, 47) réalise cette précipitation de la façon suivante : 100 ml d'une solution à 2 % de Cetavlon sont utilisés pour précipiter le filtrat résultant de l'extraction de 2 g de *C. crispus* sec

* Bromure de cetyltriméthyl ammonium.

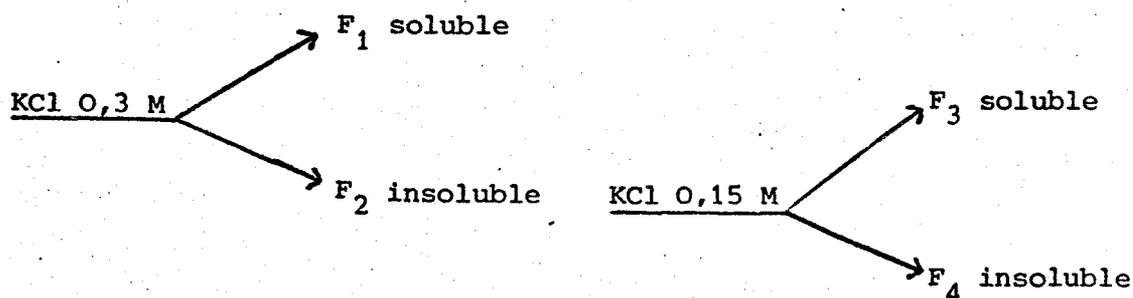
dans environ 800 ml de Na HCO_3 . Le Cetavlon en excès est éliminé par action de l'eau distillée sur le précipité recueilli par centrifugation. Le complexe Cetavlon-carraghenane est rompu par action de l'acétate de Na saturé dans de l'éthanol à 80 %. Cette opération est répétée 5 fois. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation, le complexe Cetavlon-carraghenane ne doit en aucun cas être exposé à la dessiccation par l'air ; pour cette raison on utilise la centrifugation et non la filtration pour récupérer le carraghenane entre chaque lavage. L'acétate de Na est éliminé par deux actions successives de l'éthanol à 80 % à chaud. Le carraghenane libre est déshydraté par de l'éthanol à 95 % et de l'éther anhydre puis mis en dessiccateur en présence de P_2O_5 sous vide. Cette technique est également employée par DE BOER et al., 1976, 48).

III_{1,1,d} - FRACTIONNEMENT

Par cette technique on peut séparer deux fractions de carraghenane ayant des pouvoirs gélifiants différents. Une solution de 0,24 % de carraghenane est préparée, et soumise à l'action du KCl à une concentration de 0,3 M. On obtient ainsi une fraction soluble F_1 et une fraction insoluble F_2 , que l'on sépare par centrifugation (SMITH D.B. et COOK W.H., 1953, 49). Chaque fraction est précipitée dans 2,5 volumes de 2 propanol à 80 %. Les chlorures sont éliminés par 3 lavages par le 2 propanol à 80 %. Chaque fraction est déshydratée par de l'éthanol à 95 %, de l'éther anhydre et mise en dessiccateur en présence de P_2O_5 sous vide.

Un sous-fractionnement de la fraction insoluble F_2 par le KCl 0,15 M peut également être effectué suivant les mêmes modalités. On obtient une fraction soluble F_3 et une fraction insoluble F_4 que l'on sépare par centrifugation.

Ce processus de fractionnement, utilisé par McCANDLESS (1973, 50) peut être schématisé ainsi :



III₂ - MESURE DES CARACTERES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DES CARRAGHENANES

III_{2,1} - CARACTÈRES PHYSIQUES

Les deux principaux paramètres physiques d'un carraghenane, qui intéressent directement l'industrie utilisant cette substance, sont le pouvoir gélifiant et la viscosité. Le pouvoir gélifiant est la force exprimée en gramme/cm² qu'il faut appliquer sur la surface d'un gel pour le rompre. On utilise pour cela un piston que l'on place contre la surface du gel, et auquel on applique différentes forces par addition de poids. Le pouvoir gélifiant dépend de la température. En général, on effectue cette mesure à 20°. L'addition de KCl augmente le pouvoir gélifiant.

La viscosité est la propriété que possèdent les fluides de ralentir le mouvement imprimé à des corps qui y sont plongés sans modifier l'état d'équilibre final du mobile. La viscosité est mesurée en poise ou centipoise à l'aide d'un appareil appelé viscosimètre.

III_{2,2} - CARACTÈRES CHIMIQUES

1) MESURE DU POURCENTAGE EN GLUCIDES

Etant donné qu'il est difficile d'isoler un carraghenane pur, il est nécessaire d'évaluer par certains tests chimiques le degré de pureté de celui-ci. On peut avoir une bonne estimation de ce degré de pureté en mesurant la teneur en glucides des extraits obtenus. On peut utiliser pour cela, soit la méthode au phénol sulfurique (DUBOIS M. et al., 1956, 51), soit la méthode à l'orcinoïl sulfurique (TILLSMAN J., PHILIPPI K. modifiée RIMINGTON C. *in* MONTREUIL, 1970, 52 ; TILLSMAN J., PHILIPPI K., 1929, 53; RIMINGTON C., 1931, 54). Ces mesures sont basées sur la mesure au spectrophotomètre de la coloration donnée par les hexoses en présence de certains réactifs.

- La méthode au phénol sulfurique

Dans le cas du dosage d'un carraghenane on utilise le galactose comme échantillon de référence.

Réactif : solution de phénol à 5 % , H₂SO₄ concentré

Gamme étalon de galactose : on prépare les concentrations de galactose 2 mg/ml, 4mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml et 10 mg/ml.

Réaction colorée : dans un tube à essais, on verse 1 ml de solution de galactose ou d'une solution de carraghenane de concentration maximale 10 mg/ml. On ajoute 1 ml de solution de phénol à 5 %. On introduit ensuite dans chacun des tubes, violemment sous pression, 5 ml de H_2SO_4 concentré. On agite, on laisse refroidir, et on lit au spectrophotomètre à 487 m μ la densité optique. On utilise comme témoin une solution préparée de la même façon, mais dans laquelle la solution sucrée est remplacée par de l'eau distillée.

- *La méthode à l'orcinoI sulfurique* (MONTREUIL J., SPIK G., 1963, 55)

Dans le cas du dosage d'un carraghenane, on utilise le galactose comme échantillon de référence.

Réactif : solution d'orcinoI : 1,5 g d'orcinoI dans H_2SO_4 à 30 %
(V/V)

Solution : à 60 ml de H_2SO_4 pour 100 ml de H_2O

Gamme étalon de galactose : solutions à 100 μ g/ml, 150 μ g/ml, 200 μ g/ml. Tous les tubes à doser sont additionnés de quelques gouttes de chloroforme + 1 goutte de HCl concentré.

Réaction colorée : dans un tube à essais, on verse 1 ml de solution à doser, de concentration maximale de 400 μ g/ml d'ose, 2 ml de solution d'orcinoI et 15 ml de H_2SO_4 à 60 %. Les tubes sont agités, placés au bain marie à 80° pendant 20 minutes, refroidis sous un courant d'eau, et placés à l'obscurité pendant 45 minutes. On lit au spectrophotomètre à 510 m μ la densité optique. On utilise comme témoin une solution préparée de la même façon, mais dans laquelle la solution sucrée est remplacée par de l'eau distillée.

Il est certain que l'utilisation du galactose, comme échantillon de référence, ne permet de mesurer exactement que le pourcentage en glucides des extraits contenant du galactose comme seul hexose. Les variations des réponses d'un hexose à l'autre sont faibles, à l'exception de celles obtenues avec les acides uroniques. Le carraghenane étant constitué essentiellement de galactose et de 3,6 anhydrogalactose, ces méthodes colorimétriques peuvent être considérées comme acceptables.

2) MESURE DU POURCENTAGE EN 3,6 ANHYDROGALACTOSE

Le pourcentage en 3,6 anhydrogalactose est mesuré par la méthode au résorcinol modifiée par YAPHE (YAPHE W. et ARSENAULT G.P., 1965, 56). Le fructose est utilisé comme échantillon de référence. On admet que la réponse colorimétrique du 3,6 anhydrogalactose dans ce test est égale à 92 % de celle obtenue à partir du fructose. Les modalités opératoires de cette réaction colorimétrique sont décrites ci-dessous :

Préparation des réactifs :

a) solution stock

- solution stock de fructose : 27 mg de fructose dans 50 ml de H₂O (= 3 μ mole/ml)
- solution stock de 1,1 diéthoxyéthane (acétal) : 0,822 g d'acétal (environ 1 ml) dans 100 ml de H₂O (69,6 μ mole/ml)
- solution stock de résorcinol : 150 mg de résorcinol dans 100 ml de H₂O. Cette solution conservée dans une bouteille teintée est stable une semaine

b) réactifs prêts à l'emploi

- fructose : on prépare à partir de la solution stock la gamme de concentrations suivantes 0,05 μ mole/ml, 0,1 μ mole/ml et 0,15 μ mole/ml
- acétal : dilution de la solution stock 25 fois (= 2,78 μ mole/ml)
- réactif au résorcinol : on ajoute 100 ml de HCl concentré à 9 ml de solution stock de résorcinol ; on ajoute à ce mélange 1 ml de solution d'acétal. Ce réactif est stable 3 heures

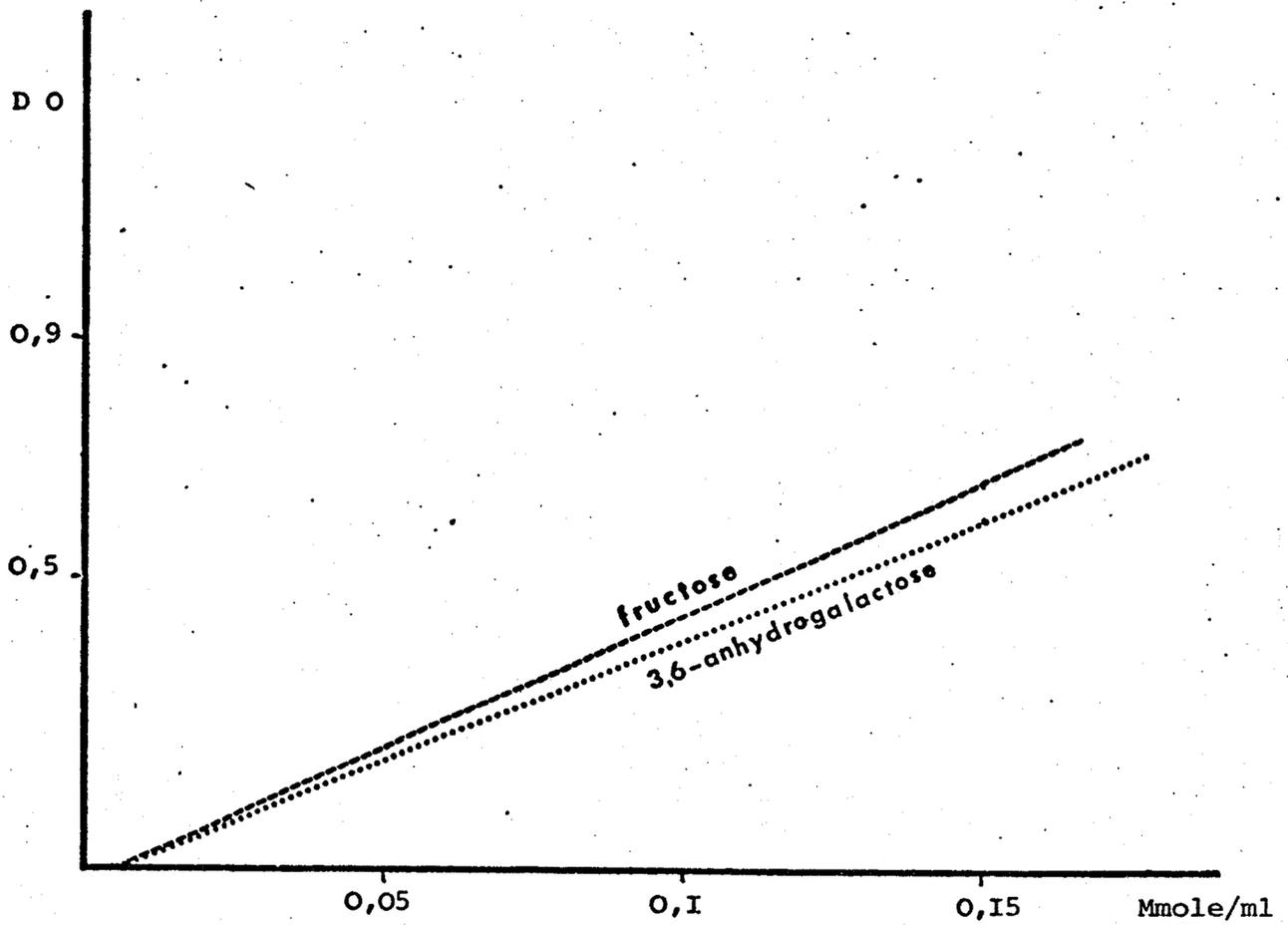


Fig. 11 - Dosage du 3,6 anhydrogalactose et du fructose par la méthode au résorsinol.

Réaction colorée : 2 ml de solution à doser, ne contenant pas plus de 0,25 μ mole de 3,6 anhydrogalactose ou de fructose sont versés dans un tube à essai que l'on place dans un bac à glace. On ajoute à cette solution 10 ml de réactif au résorcinol. On agite vigoureusement et on laisse refroidir pendant un temps compris entre 3 mn et 30 mn. Le tube est placé au bain marie à 20° pendant 4 mn, puis à 80° pendant 10 mn. On met ensuite le tube dans de la glace pendant 1,5 mn. L'absorption est mesurée au spectrophotomètre à 555 m μ , au plus tard 15 mn après la fin de la réaction. Il est nécessaire d'opérer en lumière atténuée.

Gamme étalon de fructose : la figure 11 montre la courbe obtenue à partir de la gamme étalon de fructose préparée suivant les modalités décrites ci-dessus. La courbe théorique que donnerait le 3,6 anhydrogalactose peut être déduite de celle du fructose. Les valeurs de la densité optique obtenues à partir du 3,6 anhydrogalactose sont en effet égales à 92 % de celles obtenues à partir du fructose.

3) MESURE DE LA TENEUR EN SULFATES

L'un des caractères important d'un carraghenane est son degré de sulfatation. La teneur en sulfates peut être déterminée par la méthode de JONES et LETHAM (1954, 57). Dans un tube à essai on dissout 0,5 mg de carraghenane dans 0,5 ml de HCl 2N. Les tubes sont scellés et la solution est hydrolysée pendant 3 heures à l'étuve à 110°. La solution est ensuite diluée à 10 ml. On prélève ensuite 0,5 ml de cette solution et on y ajoute 0,5 ml de 4 chloro-4'aminodiphényl. On mélange énergiquement, on obtient un précipité qu'on laisse reposer 2 heures. Une gamme étalon de sulfate est préparée avec H₂SO₄ à diverses concentrations. On fait réagir ces solutions avec le 4 chloro-4'aminodiphényl de la même façon que le carraghenane hydrolysé. Les précipités sont centrifugés et 0,3 ml

de supernatant sont prélevés et dilués à 25 ml avec HCl 0,1 N. La densité optique est lue au spectrophotomètre Unicam à 254 m μ . Celle-ci est inversement proportionnelle à la quantité de 4 chloro-4'aminodiphényl précipité par les sulfates.

4) SPECTRES INFRAROUGES

La position des groupements sulfates sur la molécule de carraghenane peut être déterminée par spectroscopie infrarouge. Les spectres infrarouges sont enregistrés avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer. Les films de carraghenane peuvent être obtenus suivant les procédés suivants :

- On verse quelques gouttes d'une solution concentrée de carraghenane dans un petit récipient dont le fond est rempli de mercure. Le tout est mis à l'étuve, la solution s'évapore, et l'on obtient un film sec de carraghenane qui repose à la surface du mercure sans y adhérer. Ce film est placé sur un portoir à fenêtre que l'on introduit dans le spectrophotomètre.
- Une autre technique plus récente m'a été indiquée par CRAIGIE J.S. (sous presse). Trois milligrammes de carraghenane sont déposés sur un disque de AgCl de 25 mm de diamètre et de 5 mm d'épaisseur sur lequel on verse 8 à 10 gouttes d'eau distillée bouillante. Le carraghenane est dissout en remuant avec une petite spatule de teflon, et on laisse évaporer dans une étuve à l'obscurité. Le disque de AgCl et son dépôt de carraghenane sont placés directement dans le spectrophotomètre. Les disques de AgCl sont réutilisables.
- Une troisième technique, plus rudimentaire, m'a été indiquée par McCANDLESS : 6 à 8 mg de carraghenane sont mélangés à du bromure de K ; ce mélange est ensuite rendu compact dans une presse jusqu'à obtention d'un film rigide translucide.

Tous les carraghenanes présentent une large bande d'absorption à 1240 cm^{-1} , caractéristique des sulfates (vibration $S = O$). Le lambda carraghenane montre une bande d'absorption entre 800 et 860 cm^{-1} , résultant de la superposition de 2 pics : 820 cm^{-1} (sulfate estérifiant un alcool primaire) et 830 cm^{-1} (sulfate esterifiant un alcool secondaire équatorial).

On observe également 2 pics, l'un à 1015 cm^{-1} l'autre à 1040 cm^{-1} . Ces 2 dernières absorptions sont remplacées par des pics à 1025 cm^{-1} et 1070 cm^{-1} dans la molécule de lambda carraghenane soumise à un traitement alcalin (STANCIOFF D.J., STANLEY N.F., 1969, 58).

Le kappa carraghenane présente un pic à 845 cm^{-1} indiquant la présence de sulfate esterifiant un alcool secondaire en position axiale (liaison C-O-S axiale du galactose 4 sulfate). On observe également des pics à $930 - 940\text{ cm}^{-1}$ et 1070 cm^{-1} caractéristiques du pont 3,6-anhydrogalactose.

Le iota carraghenane montre un pic à 805 cm^{-1} qui est toujours associé à la présence de 3,6-anhydrogalactose 2 sulfate. On n'observe pas ce pic dans le nu carraghenane précurseur du iota. Ceci indique qu'une telle absorption n'apparaît que lorsqu'il y a présence simultanée d'un groupement SO_4 fixé en C_2 et d'un pont 3,6-anhydro sur le galactose. Les recherches n'ont cependant pas permis de déterminer à quelle liaison l'on doit attribuer cette vibration (ANDERSON et al., 1968, 59). Comme le kappa carraghenane, le iota présente des pics à 845 cm^{-1} , $930 - 940\text{ cm}^{-1}$ et 1070 cm^{-1} .

MCCANDLESS (1973, 60) a mis en évidence dans le lambda carraghenane provenant de *C. crispus* la présence d'un pic d'absorption à 1608 cm^{-1} . Ce phénomène n'apparaît que si l'on a pris la précaution de dissoudre le carraghenane dans D_2O pour l'obtention d'un film. En effet, les molécules d'eau résiduelles contenues dans le carraghenane provoquent une large bande d'absorption à 1640 cm^{-1} masquant le pic obtenu à 1608 cm^{-1} . Cette dernière absorption pourrait être due à la présence d'un ion pyruvate incorporé dans la molécule de carraghenane. Ceci reste à démontrer.

III₃ - TECHNIQUES PARTICULIERES EMPLOYEES DANS CETTE ETUDE

III_{3,1} - PROBLÈMES LIÉS AUX RÉCOLTES DE *Hypnea* AU SÉNÉGAL

La récolte de *Hypnea* peut se faire soit en vue du dosage de son carraghenane en laboratoire, soit pour la production industrielle de cette substance. Dans tous les cas, les conditions de récolte ont une influence sur les caractères physiques et chimiques de l'extrait obtenu à partir de cette espèce.

a) LIEU DE RECOLTE

Pour étudier les variations saisonnières du carraghenane de *Hypnea*, je me suis servi d'échantillons de *H. musciformis* et *H. cervicornis* récoltés entre 1971 et 1975, à proximité de la localité de Joal située à 110 km au sud de Dakar. Certains échantillons dits "de dérive" ont été ramassés fraîchement rejetés sur la plage, alors que d'autres dits "fixés" ont été prélevés parmi les algues attachées aux rochers de la pointe Senti, (dans l'étage littoral) à 2 km au nord de Joal. Pour mon étude purement technique des modalités d'extraction du carraghenane, je me suis servi d'échantillons de *H. musciformis* provenant des localités d'Aldiana et de Baling situées au nord de Joal.

b) SAISONS DE RECOLTE

Le climat du Sénégal est caractérisé par 2 saisons : une saison sèche et une saison des pluies. La saison sèche dure de décembre à juin, elle est caractérisée par des températures peu élevées. Au cours de cette période, l'eau de mer de surface atteint une température minimum de 18° en janvier. La saison des pluies dure de juillet à novembre, elle est caractérisée par des températures élevées. Pendant cette saison, l'eau de mer de surface atteint une température maximum de 28° en août.

Les *Hypnea* fixés se rencontrent toute l'année sur les pointes rocheuses, avec cependant plusieurs cycles annuels de reproduction sexuelle. Ces cycles saisonniers sont responsables des variations de la quantité de plantes adultes. Les périodes de reproduction sexuelle de *Hypnea* au Sénégal ont été décrites dans un article précédent (MOLLION J., 1975, 61). On distingue deux périodes de reproduction l'une en mars, l'autre entre juin et novembre. Les *Hypnea* de dérive se déposent sur le rivage surtout pendant la saison froide (MOLLION J., D.E.A. Lille, 1975, 62).

c) RAPPORT $\frac{\text{POIDS FRAIS}}{\text{POIDS SEC}}$

Le *Hypnea musciformis* non lavé à l'eau douce présente un rapport $\frac{\text{poids frais}}{\text{poids sec}}$ égal à sept. Il faut souligner que cette algue est fortement hydrophile. J'ai trouvé une teneur en eau de 8,9 % dans un échantillon non lavé à l'eau douce, séché au soleil après avoir été récolté au Sénégal. Il est donc nécessaire, même dans un pays ensoleillé comme

le Sénégal, de sécher artificiellement les algues si l'on veut en connaître le poids sec.

d) TENEUR EN SEL

Le *H. musciformis*, séché directement après récolte dans la mer, contient environ 50 % de sel. Celui-ci peut être éliminé facilement par rinçage à l'eau douce. Du point de vue industriel, cette opération est indispensable lorsqu'il s'agit d'algues destinées à l'exportation. L'efficacité de ce rinçage à l'eau douce peut être contrôlée en mesurant la salinité de l'eau dans laquelle les algues ont baigné. Le temps d'immersion doit être suffisant pour permettre l'élimination du sel. Un temps trop long favorise une attaque par des bactéries, et des tests doivent être effectués pour déterminer les conditions optimales de cette opération.

e) STOCKAGE DES ECHANTILLONS AVANT L'EXTRACTION

On peut stocker les échantillons sous forme sèche après ou avant les avoir lavés à l'eau douce. Le séchage de l'algue salée présente l'avantage de pouvoir être entrepris immédiatement après la récolte. Un séchage après lavage à l'eau douce, dans le cas où celle-ci n'est pas disponible sur le lieu de récolte, ne peut commencer qu'après plusieurs heures. Dans le cas d'une exploitation industrielle, ceci prend une importance particulière. Le séchage d'une algue lavée à l'eau douce doit se faire dans des conditions optimales. En effet, les algues lavées à l'eau douce sont fortement exposées à la dégradation par les bactéries alors que les algues salées le sont moins. Si l'on ne dispose pas de conditions permettant un séchage rapide, on a intérêt à sécher et à stocker l'algue sous forme salée. Le *H. musciformis* stocké sous cette dernière forme sera lavé à l'eau douce ultérieurement et séché une deuxième fois.

Aucune étude n'a été effectuée de l'influence du temps de stockage sur la qualité des extraits obtenus à partir de *H. musciformis*. Une telle étude à partir de *C. crispus* a montré qu'un stockage prolongé entraînait une diminution de la viscosité de son carraghenane (FULLER S.W., MATHIESON A.C., 1972, 63).

III_{3,2} - DIFFÉRENTS TYPES D'EXTRAITS UTILISÉS POUR CETTE ÉTUDE

J'ai utilisé pour cette étude des échantillons de carraghenane extraits par deux techniques différentes. La première de ces techniques a été employée lors des extractions que j'ai effectuées en 1972 au Sénégal et dans lesquelles le carraghenane est isolé par lyophilisation. La deuxième technique a été employée en 1976 à la fois au cours d'extractions que j'ai effectuées à l'Université de Lille et McMasteur University au Canada dans le Laboratoire du Dr. McCANDLESS, elle consiste en une précipitation du carraghenane par le Cetavlon.

- EXTRACTION PAR LYOPHILISATION

La méthode employée pour effectuer ces extractions a été décrite dans un article précédent (MOLLION J., 1973, 64). Elle est caractérisée par une action de l'eau bouillante pendant 1 heure 30, une filtration sur gaze, une concentration par évaporateur rotatif et une dialyse contre de l'eau distillée pendant 24 heures. Cet extrait est ensuite lyophilisé. Les échantillons de carraghenane extraits de cette manière ont été analysés en 1972 et ont permis d'obtenir les résultats publiés en 1973. Ce sont ces mêmes échantillons qui ont fait l'objet en 1976 d'une analyse plus poussée, dont les résultats sont publiés dans cette étude.

- EXTRACTION PAR LE CETAVLON

La méthode utilisée par McCANDLESS (1973, 65) a été employée avec quelques variantes :

. deux grammes d'algues sèches sont réduits en poudre à l'aide d'un broyeur. Ceci peut être effectué manuellement dans un mortier. On peut également réaliser cette opération mécaniquement en plaçant les algues dans un broyeur à bille de type "Danguomeau" après les avoir trempées dans N₂ liquide. Cette poudre est ensuite soumise à un dégraissage par action successive d'acétone, d'éthanol à 80 % bouillant, d'éthanol à 90° et desséchée par de l'éther anhydre.

. la poudre dégraissée est soumise à l'action de 500 ml de NaHCO₃ à 90° pendant 1,5 heure, dans le cas d'une extraction simple. On peut également faire agir la solution de NaHCO₃ une première fois pendant une heure, reprendre les débris insolubles, et les soumettre à l'action de NaHCO₃

une deuxième fois pendant 1/2 heure ; cette procédure est utilisée dans le cas d'une double extraction. Cette solution est ensuite filtrée par de la laine de verre, et sur des filtres Sartorius de porosité décroissante égale successivement à 12 μ , 3 μ et 1,2 μ .

. le carraghénane contenu dans l'extrait aqueux, ainsi obtenu, est ensuite précipité par 100 ml d'une solution à 2 % de Cetavlon. Le Cetavlon en excès est éliminé par action de l'eau distillée sur le précipité recueilli par centrifugation. Le complexe Cetavlon-carraghénane est rompu par action de l'acétate de Na saturé dans de l'éthanol à 80 %. Cette opération a été répétée trois fois lors de mes premières extractions, et quatre ou cinq fois lors des extractions suivantes, la dissociation du Cetavlon s'étant avérée insuffisante. L'acétate de Na est éliminé par de l'alcool à 80 % à chaud. Cette dernière opération est répétée deux fois.

. le carraghénane libre est déshydraté par de l'éthanol à 95 % et de l'éther anhydre mis en dessiccateur en présence de P_2O_5 sous vide.

- EXTRAITS UTILISES DANS CETTE ETUDE

Les deux modalités d'extractions décrites ci-dessus, ont permis d'obtenir quatre types d'extraits :

- a) Les extraits lyophilisés non soumis à l'action de l'acétone : ils ont été obtenus en 1972 par lyophilisation.
- b) Les extraits lyophilisés soumis à l'action de l'acétone : certains extraits obtenus en 1972 par lyophilisation, ont été dégraissés, en 1976, par action de l'acétone et de l'éthanol, suivant le processus indiqué ci-dessus.
- c) Les extraits soumis à un broyage manuel et précipités par le Cetavlon : ceux-ci ont été obtenus en 1976, lors des recherches effectuées à Lille. Le processus d'extraction simple avec dégraissage, suivi d'une précipitation par le Cetavlon a été utilisé. La dissociation du Cetavlon, après précipitation de certains de ces extraits, n'a pas toujours été complète.
- d) Les extraits soumis à un broyage mécanique et précipités par le Cetavlon : ceux-ci ont été obtenus en 1976, lors des recherches effectuées au Canada. Le processus de la double extraction, avec dégraissage, suivi d'une précipitation par le Cetavlon a été utilisée.

- FRACTIONNEMENT

Un fractionnement par le KCl 0,3 M a été effectué, suivant la procédure utilisée par McCANLDESS, décrite plus haut. Le carraghenane de certains échantillons a été soumis à un sous-fractionnement par le KCl 0,15 M.

III_{3,3} - MÉTHODES UTILISÉES DANS CETTE ÉTUDE POUR L'ANALYSE DU CARRAGHENANE :

Le pourcentage en glucides a été mesuré en utilisant alternativement la méthode au phénol sulfurique et la méthode à l'orcinol sulfurique, décrites plus haut. Le pourcentage en 3,6 anhydrogalactose a été mesuré par la méthode au résorcinol sulfurique modifiée par YAPHE, décrite précédemment. Le fructose est utilisé comme témoin. La teneur en sulfates a été mesurée par la méthode de JONES et LETHAM, décrite plus haut. Des spectres infrarouges ont été obtenus en utilisant un spectrophotomètre Perkin Elmer. Les films de carraghenane sont préparés en mélangeant cette substance avec du KBr, suivant le processus mentionné précédemment.

CHAPITRE IV

VARIATIONS SAISONNIERES

DU CARRAGHENANE DE HYPNEA

AU SENEGAL

J'ai dans cette étude repris les extraits aqueux de *H. musciformis*, obtenus par lyophilisation lors de mes recherches de 1972, présentant les variations saisonnières mentionnées ci-dessus. Ceux-ci ont été soumis à une analyse approfondie. Une extraction de nouveaux échantillons de cette même espèce a également été effectuée. La technique de précipitation par le Cetavlon, décrite ci-dessus, a également été utilisée. Les extraits obtenus ont été analysés. Le carraghénane d'un échantillon de *H. cervicornis* a également été étudié.

IV₁ - TRAVAUX PRELIMINAIRES A L'ETUDE DES VARIATIONS SAISONNIERES

J'ai voulu vérifier par des analyses chimiques que certaines méthodes de récolte et d'extraction, adoptées pour cette recherche, ne détérioraient pas le carraghénane obtenu. J'ai également essayé de déterminer les conditions optimales de récolte compte tenu de la situation locale.

- CONDITIONS OPTIMALES DE RINÇAGE À L'EAU DOUCE

J'ai mesuré l'efficacité de l'élimination du sel sur des échantillons de *H. musciformis* récoltés à Baling, à 90 km au sud de Dakar, et soumis à différentes conditions de rinçage à l'eau douce. Les résultats de ces expériences sont exprimés dans le tableau 3. Un temps d'immersion dans l'eau de 10 minutes semble suffisant. Un volume d'eau inférieur à 4,5 l pour 85 g d'algues ne permet pas une élimination totale du sel. Ce rapport, qui est égal à 5,3 l d'eau pour 100 g d'algues semble suffisant pour un dessalage maximum. D'autres tests ont en effet montré que la quantité de sel éliminé reste la même pour un volume d'eau supérieur.

- INFLUENCE DU DOUBLE SÉCHAGE SUR LE CARRAGHÉNANE EXTRAIT DE *H. musciformis*

Le rinçage à l'eau douce ne peut souvent pas se faire immédiatement après la récolte et il est alors nécessaire de procéder à un séchage préliminaire avant le séchage définitif afin d'éviter la dégradation par les bactéries.

TABLEAU 3

DESSALAGE DE *H. musciformis* PAR L'EAU DOUCE

algues sèches salées	action de l'eau douce		algues sèches dessalées	sel éliminé
	volume	temps d'immersion		
85 g	4,5 l	10 mn	44 g	48,2 %
87 g	4,5 l	20 mn	45 g	48,2 %
54 g	1,0 l	10 mn	33 g	38,8 %



TABLEAU 4
 INFLUENCE DU DOUBLE SÉCHAGE SUR LE
 CARRAGHENANE DE *H. musciformis*

lieu et date récolte	simple séchage		double séchage	
	% en extrait ¹ aqueux	P. gélifiant ²	% en extrait ¹ aqueux	P. gélifiant ²
Aldiana 23/3/77	37,1 %	194 g	38,0 %	140 g
Baling 9/6/77	44,0 %	360 g	36,5 %	282 g

¹ extractions avec précipitation par l'alcool.

² solution de 1 % de carraghenane + 0,5 % KCl.



TABLEAU 5

INFLUENCE DU TEMPS D'ÉBULLITION SUR LA QUANTITÉ ET LA QUALITÉ DU CARRAGENANE EXTRAIT

n° échantillon	<u>ébullition 1 heure</u>		<u>ébullition 2 heures</u>		<u>ébullition 3 heures</u>	
	% en extrait aqueux	P. gélifiant*	% en extrait aqueux	P. gélifiant*	% en extrait aqueux	P. gélifiant*
352A	43,5 %	135 g	42,6 %	96 g	38,3 %	28 g
371A	44,0 %	360 g			39,8 %	290 g

* solution de 1 % de carragenane + 0,5 % KCl



L'influence des deux modes de séchage sur le carraghenane est montrée dans le tableau 4.

L'influence du double séchage sur la quantité d'extrait aqueux obtenu, n'est pas très nette. On observe une baisse du pouvoir gélifiant de l'extrait aqueux, ce qui semble indiquer une détérioration du carraghenane.

- RECHERCHE DU TEMPS OPTIMAL D'ÉBULLITION

J'ai soumis les échantillons de *H. musciformis* à l'action de l'eau bouillante pendant un temps variable. Le tableau 5 exprime les résultats obtenus à partir d'échantillons dont le carraghenane a été extrait avec précipitation par l'alcool. Ces expériences montrent qu'une extraction à 100° de 2 heures et plus se traduit par une baisse de la quantité et de la qualité du carraghenane, par rapport à ce que l'on obtient après une heure d'extraction.

IV₂ - ANALYSE DU CARRAGHENANE EXTRAIT PAR LYOPHILISATION A PARTIR DES ECHANTILLONS DE *H. musciformis* DE DERIVE

VI_{2,1} - RAPPEL DES RÉSULTATS OBTENUS EN 1973

En 1972 des extraits lyophilisés non dégraissés ont été obtenus par extraction de *H. musciformis* de dérive. La teneur en extrait aqueux de ces échantillons présente des variations saisonnières. Celles-ci sont inversement proportionnelles à celles du pourcentage en glucides de ces extraits, mesurées par la méthode au phénol sulfurique (MOLLION J., 1973, 66). J'ai émis l'hypothèse que cette relation inverse était imputable au manque de sélectivité du processus de lyophilisation et que l'extrait aqueux contenait de nombreuses impuretés en plus du carraghenane. Une analyse plus approfondie s'est avérée nécessaire afin de vérifier cette hypothèse.

IV_{2,2} - ANALYSE DES RÉSULTATS ACTUELS

En 1976 l'analyse des extraits obtenus en 1972 a été reprise. La teneur en glucides a été mesurée en utilisant la méthode à l'orcinol sulfurique. Le

TABLEAU 6
 ANALYSE DES EXTRAITS LYOPHILISÉS
 DE *H. musciiformis* DE DÉRIVE

date de récolte	rendement de l'extraction	% en glucides	% 3,6 AG	% SO ₄
4/1/72	26,2 %	58,2 %	23,9 %	21,2 %
24/3/72	17,8 %	79,3 %	26,6 %	15,9 %
12/4/72	18,8 %	65,4 %	26,6 %	19,9 %
4/5/72	19,8 %	55,9 %	21,7 %	19,5 %
13/5/72	22,4 %	56,1 %	19,6 %	20,2 %
1/6/72	31,3 %	47,4 %	19,3 %	22,4 %
3/7/72	25,8 %	52,5 %	20,4 %	-
31/7/72	32,8 %	50,0 %	21,8 %	15,5 %
3/10/72	29,2 %	52,6 %	21,5 %	17,7 %



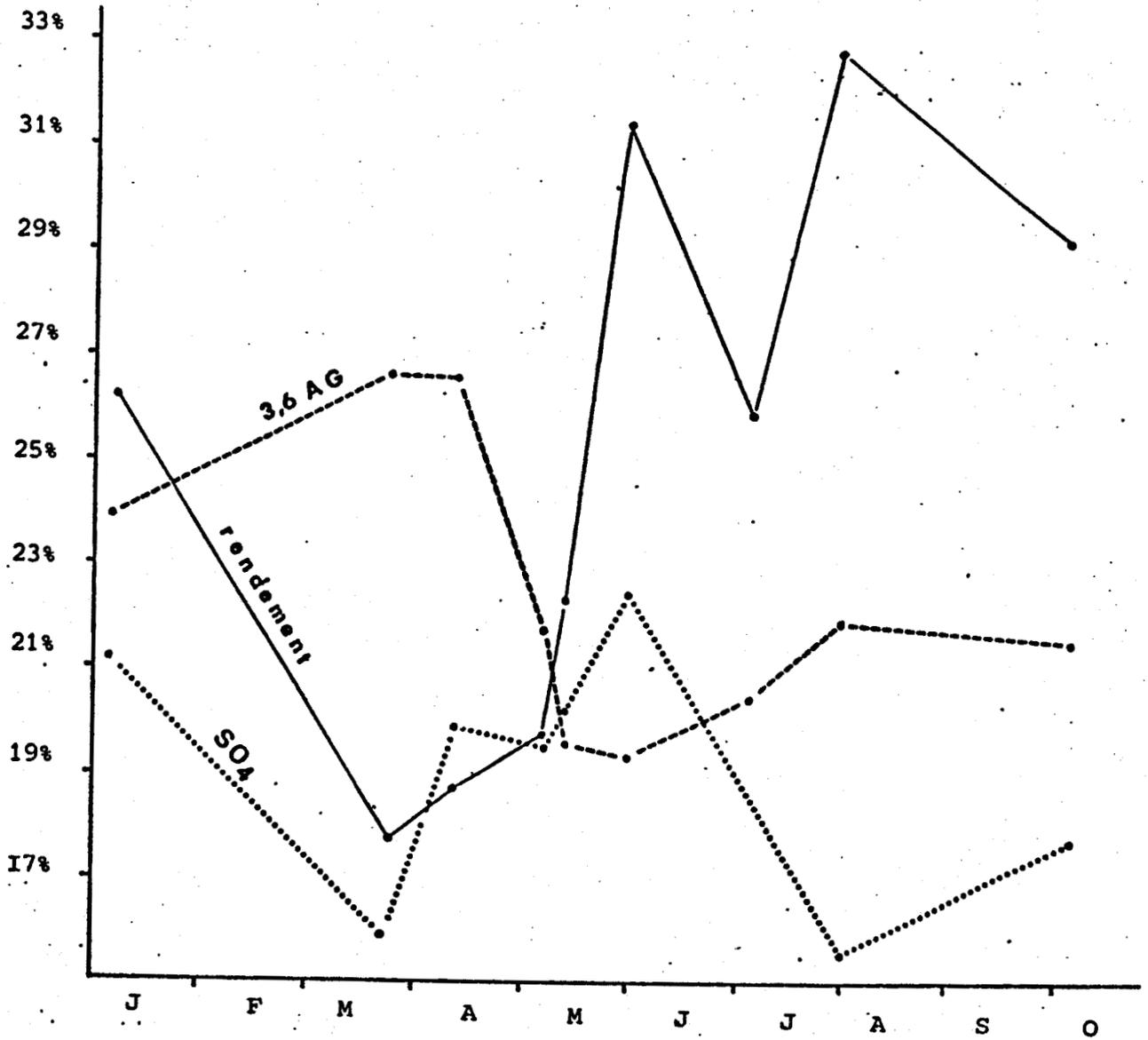


Fig. 12 - Variations saisonnières des rendements, teneurs en 3,6 AG et SO₄ de *H. musciformis* de dérive (extraits lyophilisés).

principal carraghenane de *H. musciformis* étant le Kappa carraghenane, j'ai mesuré la teneur en 3,6 anhydrogalactose des extraits provenant de ces échantillons. J'ai également mesuré la teneur en sulfate.

Le tableau 6 montre que le rendement de l'extraction varie en sens inverse de la teneur en glucides des extraits analysés. Ceci confirme les résultats de 1972 à partir des mêmes échantillons. La teneur en 3,6 AG varie dans le même sens que la teneur en glucides. On peut très approximativement essayer d'estimer l'importance du Kappa carraghenane en multipliant par 2 le pourcentage en 3,6 AG, et en ajoutant à cette valeur le pourcentage des sulfates. Ce calcul est très grossier du fait que les pourcentages des différents constituants ne tiennent pas compte des erreurs dues aux interférences entre les différents sucres dans les tests colorés. Les résultats obtenus par cette estimation indiquent que le Kappa carraghenane est le constituant essentiel des glucides contenus dans l'extrait aqueux, et que le rapport kappa carraghenane sur glucides est proche de 1.

On observe également une variation de la teneur en sulfate qui est inversement proportionnelle à celle de la teneur en 3,6 A.G. (fig. 12). Ceci indique que le taux de sulfatation du Kappa carraghenane varie saisonnièrement. Entre janvier et juin les variations de la teneur en sulfate se font dans le même sens que celles du rendement en extrait aqueux, et sont quantitativement du même ordre de grandeur.

IV_{2,3} - DISCUSSIONS À PROPOS DE CES ANALYSES

La relation inverse entre la teneur de *H. musciformis* de dérive en extrait aqueux et le pourcentage en glucides de celui-ci, semblent indiquer qu'une substance non glucidique est présente dans cet extrait en plus du carraghenane. Une augmentation de la quantité de substances non glucidique entraîne une augmentation du poids total de l'extrait aqueux et une diminution du pourcentage en glucides de cet extrait.

En 1976, j'ai voulu savoir si les groupements SO_4 portés par les molécules de carraghenane pouvaient être responsables de ces variations.

On sait que les différentes molécules de carraghenane ne portent pas le même nombre de groupements SO_4 , et que la biosynthèse de ces molécules se fait avec sulfatation progressive. Ceci permet d'envisager une certaine

variabilité dans la teneur en sulfates de ces molécules. Ces variations peuvent être dues, d'une part à une hétérogénéité dans la composition en carraghenane, plusieurs fractions de cette molécule étant présentes ; d'autre part à un état d'avancement variable de la biosynthèse d'un carraghenane particulier.

L'étude du degré de sulfatation de ces molécules présente non seulement un intérêt théorique, mais aussi un intérêt pratique pour l'industrie. Une relation a en effet été démontrée entre la teneur en sulfates et le pouvoir gélifiant d'un agar (FUSE T. et H. YOSHII, 1974, 67). Il est vraisemblable qu'il en est de même pour le carraghenane.

Le pourcentage en kappa carraghenane exprimé par rapport aux glucides totaux, est relativement constant au cours de l'année. Ceci implique que, si un autre polysaccharide est présent en quantité non négligeable dans l'extrait aqueux, son pourcentage ne peut présenter que de faibles variations. Il est peu probable que les différentes valeurs observées dans la teneur en sulfates soient dues à la présence, en quantité variable, d'un carraghenane autre que kappa. Il est vraisemblable que le degré de sulfatation du kappa carraghenane soit le seul responsable de ces variations saisonnières. Ce degré de sulfatation variable du kappa carraghenane explique la relation inversement proportionnelle entre la teneur en sulfates et la teneur en 3,6 anhydrogalactose. Les changements de la teneur en sulfates suffisent à expliquer celles du rendement en extrait aqueux entre janvier et juin. Les variations du rendement entre juin et octobre restent à expliquer.

On peut conclure que le pourcentage en carraghenane de l'extrait aqueux de *H. musciformis* est sensiblement constant au cours de l'année. Ce carraghenane est constitué essentiellement par la fraction Kappa, et semble avoir une teneur en sulfates variable. Cette teneur en sulfates pourrait être responsable, tout au moins pendant une partie de l'année, des modifications saisonnières observées dans la teneur en extrait aqueux.



TABLEAU 7
ANALYSE DES EXTRAITS DE *H. musciformis*
PRÉCIPITÉS PAR LE CETAVLON

n° échantillon	type et date de récolte	fraction organosoluble	rendement de l'extraction	% 3,6 AG
325 A	fixé 12/12/74	15,6 %	33,4 %	25,8 %
326 A	fixé 15/ 1 /75	12,8 %	35,8 %	30,1 %
330 A	fixé 27/ 3 /75	14,6 %	31,1 %	32,1 %
332 bis A	fixé 25/ 4 /75	15,5 %	36,0 %	28,5 %
332 quint A	fixé 28/ 5 /75	16,1 %	32,4 %	25,4 %
308 A	dérive 13/10/74	11,6 %	31,2 %	27,0 %



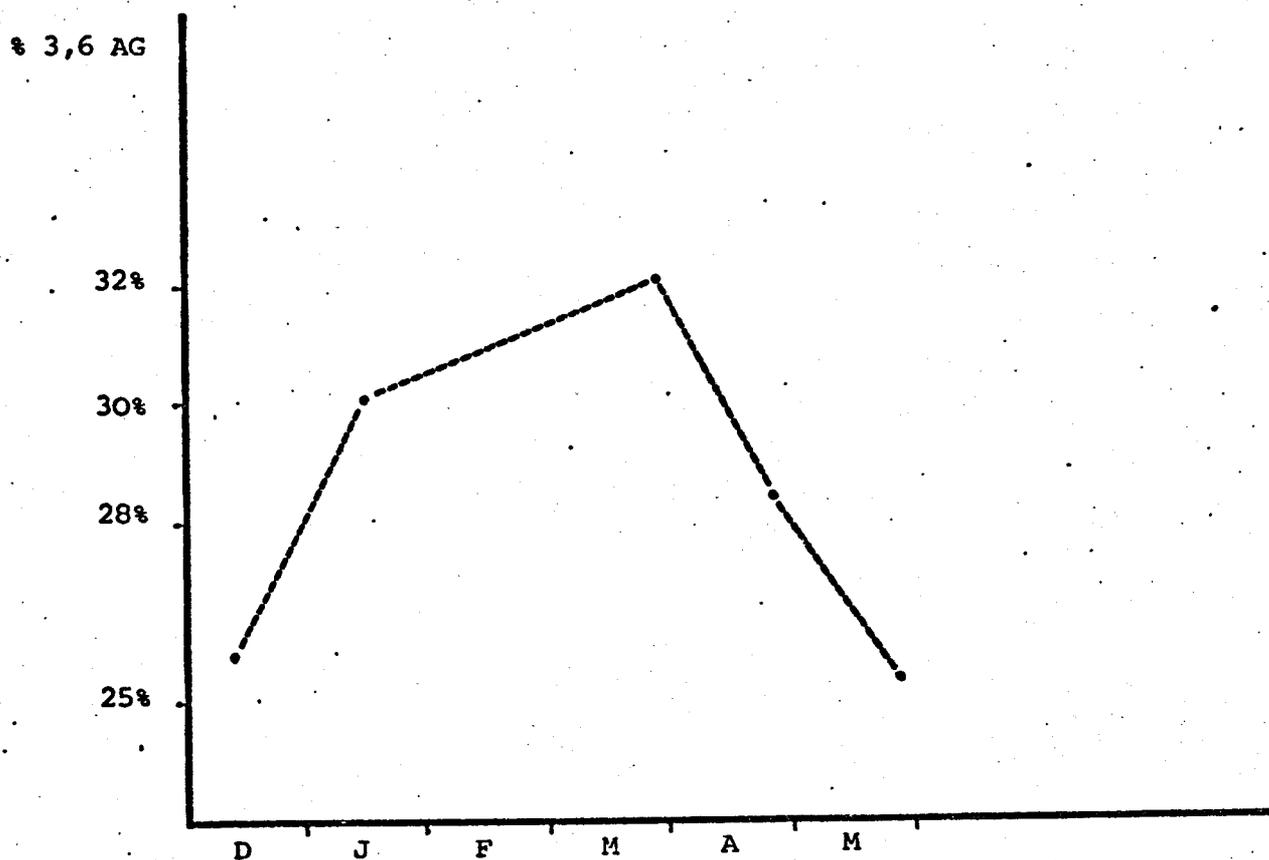


Fig. 13 - Variations saisonnières de la teneur en 3,6 AG des extraits précipités par le Cetavlon provenant de *H. musciiformis* fixé.

IV₃ - ANALYSE DU CARRAGENANE DE *H. musciformis* EXTRAIT PAR LE CETAVLON

J'ai utilisé pour cette étude des extraits soumis à un broyage mécanique et précipités par le Cetavlon après double extraction. Les échantillons de *H. musciformis* analysés ont été prélevés fixés sur la Pointe de Senti à Joal à différentes périodes de l'année. Un échantillon de *H. musciformis* de dérive a également été récolté et soumis aux mêmes techniques d'extraction.

Le tableau 7 montre les résultats des extractions de *H. musciformis* fixé et de dérive.

IV_{3,1} - RÉSULTATS DE L'EXTRACTION

Les algues contiennent un certain nombre de composés solubles dans l'acétone et l'alcool bouillant, notamment des lipides. Ces substances sont dissoutes lors du dégraissage des échantillons (voir techniques). Le pourcentage de ces composés, chez les échantillons fixés, est voisin de 15 % et reste sensiblement constant au cours de l'année.

Le pourcentage de ces substances, dans l'*H. musciformis* de dérive étudié, est légèrement inférieur à celui des échantillons fixés. On ne peut cependant pas considérer cette observation à partir d'un échantillon unique comme étant significative. Les seules variations saisonnières observées sont celles du 3,6 AG et ne sont pas importantes. On observe une teneur maximum en 3,6 AG en mars (fig. 13). Les valeurs obtenues à partir de l'échantillon de dérive analysé sont du même ordre de grandeur que celles obtenues à partir des échantillons fixés.

IV_{3,2} - DISCUSSION : COMPARAISON DES EXTRACTIONS PAR LE CETAVLON ET PAR LYOPHILISATION

La teneur en 3,6 AG des échantillons analysés ci-dessus varie suivant le même mode saisonnier que celui des extraits obtenus par lyophilisation à partir des échantillons de dérive. L'amplitude des variations chez ces derniers est cependant plus importante.

TABLEAU 8
ANALYSE D'UN EXTRAIT DE *H. cervicornis*
PRÉCIPITÉ PAR LE CETAVLON

type et date de récolte	fraction organosoluble	rendement de l'extraction	% 3,6 AG	% hydrates de glucide (orcinol)
fixé 28/11/74 (échant. n°323A)	15,1 %	23,3 %	28,1 %	64,7 %



La teneur en 3,6 AG des extraits par lyophilisation est nettement inférieure à celle des extraits précipités par le Cetavlon. Ceci est dû au processus d'extraction plutôt qu'au type de récolte. En effet, lorsqu'ils sont soumis à un même processus de précipitation par le Cetavlon, les échantillons fixés et de dérive libèrent des extraits dont les teneurs en 3,6 AG sont semblables. Il semble que le produit obtenu par lyophilisation contienne autre chose que du carraghenane, ce qui explique sa faible teneur en 3,6 AG. Il est probable qu'il s'agit d'amidon soluble (McCANDLESS, communication personnelle).

De même la teneur en extrait aqueux est plus élevée chez les échantillons précipités par le Cetavlon que chez ceux qui ont été obtenus par lyophilisation. Le rendement de l'extraction des échantillons précipités par le Cetavlon est relativement élevé, sans doute en raison du broyage mécanique et de la double extraction auxquels ils ont été soumis.

IV₄ - ANALYSE DU CARRAGHENANE DE *H. cervicornis* EXTRAIT PAR LE CETAVLON - COMPARAISON AVEC *H. musciformis*

J'ai utilisé pour cette étude un échantillon de *H. cervicornis* récolté à l'état fixé sur la pointe de Senti à Joal. Celui-ci a été soumis à un broyage manuel et précipité par le Cetavlon après extraction simple.

Le tableau 8 montre les résultats de cette extraction.

La teneur en 3,6 AG de *H. cervicornis* est du même ordre de grandeur que celui de *H. musciformis*. Le rendement de l'extraction de *H. cervicornis* est inférieur à celui obtenu à partir d'échantillons d'*H. musciformis*, comme on peut s'y attendre du fait de la double extraction de ces derniers.

CHAPITRE V

FRACTIONNEMENT DU

CARRAGHENANE DE HYPNEA

V₁ - FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS PRECIPITES PAR LE CETAVLON

Un fractionnement par le KCl a été effectué sur le carraghenane de *H. musciformis* et de *H. cervicornis* précipités par le Cetavlon lors des extractions effectuées à Lille.

L'élimination du Cetavlon faisant suite à la précipitation n'a été effectuée que d'une manière incomplète en ce qui concerne les échantillons n°325A et 330A. Ceci peut être mis en évidence par le fait que l'échantillon 325A présente un rendement à l'extraction, exprimé dans le tableau n°9, très supérieur à celui obtenu lors de son extraction ultérieure au Canada, avec élimination totale du Cetavlon (tableau n°7).

Un fractionnement par le KCl a également été effectué sur les carraghenanes des échantillons n°332bisA et 323A, qui ont été extraits avec élimination totale du Cetavlon.

V_{1,1} - FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS DANS LESQUELS LE CETAVLON N'A ÉTÉ ÉLIMINÉ QUE PARTIELLEMENT

Le résultat de l'extraction et du fractionnement des échantillons n°325A et 330A de *H. musciformis* est exprimé dans le tableau n°9.

La fraction 0,3 M KCl soluble F₁ varie entre 10 et 12 % du carraghenane total avant l'action du KCl, alors que la fraction 0,3 M KCl insoluble F₂ représente environ 60 % de celui-ci. F₁ et F₂ ont des teneurs en glucides comparables, mais F₁ a une teneur en 3,6 AG très inférieure à celle de F₂ et ceci ne peut être qu'accentué si l'on admet que cette dernière fraction est surestimée (voir techniques). Le faible pourcentage en 3,6 AG de F₁ semble indiquer que celui-ci contient un carraghenane autre que Kappa.

Le traitement par le KCl 0,15 M de la fraction F₂ provenant de l'échantillon 325A permet d'obtenir une fraction soluble F₃ et insoluble F₄. F₃ présente un pourcentage très faible par rapport à F₄. Ceci montre que le traitement de la fraction insoluble F₂ par un KCl de concentration plus faible, ne permet de rendre soluble qu'une très petite fraction de F₂. Cette fraction est donc relativement homogène du point de vue solubilité.

TABLEAU 9

FRACTIONNEMENT DE *H. musciformis*

- échantillon n° 325A, récolte 15/12/74

type fixé, rendement de l'extraction 47,8 %

% glucides 48,9 %

% 3,6 AG 22,3 %

fractionnement 0,3 M KCl

F₁ soluble 11,9 %

% glucides 49,5 %

% 3,6 AG 7,4 %

F₂ insoluble 59,4 %

% glucides 58,7 %

% 3,6 AG 28,6 %

fractionnement 0,15 M KCl

F₃ soluble 8,2 %

% glucides 91,6 %

% 3,6 AG 25,1 %

F₄ insoluble 85,3 %

% glucides 81,4 %

% 3,6 AG 39,9 %

- échantillon n°330A, récolte 27/3/75

type fixé, rendement de l'extraction : indéterminé

% glucides 55,7 %

% 3,6 AG 25,5 %

fractionnement 0,3 M KCl

F₁ soluble 10,1 %

% glucides 97,8 %

% 3,6 AG 11,3 %

F₂ insoluble 66,8 %

% glucides 71,7 %

% 3,6 AG 36,7 %



TABLEAU 10

FRACTIONNEMENT DE *H. musciformis*

- échantillon 332bisA, récolte 25/4/75

type fixé, rendement de l'extraction 28,3 %

% glucides 62,7 %

% 3,6 AG 25,9 %

fractionnement 0,3 M KCl

F₁ soluble 12,0 %

% 3,6 AG 7,9 %

F₂ insoluble 66,9 %

% 3,6 AG 33,7 %



TABLEAU 11

FRACTIONNEMENT DE *H. cervicornis*

- échantillon 323A, récolte 28/11/74

type fixé, rendement de l'extraction 23,3 %

% glucides 64,7 %

% 3,6 AG 28,1 %

fractionnement 0,3 M KCl

F₁ soluble 10,8 %

% 3,6 AG 0,4 %

F₂ insoluble 67,0 %

% 3,6 AG 32,2 %

La teneur en 3,6 AG très élevée de la fraction F₄ indique que celle-ci est probablement constituée par du Kappa carraghenane presque pur.

V_{1,2} - FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS APRÈS ÉLIMINATION TOTALE DU CETAVLON

a) FRACTIONNEMENT DE *H. musciformis*

On obtient des résultats (tableau n°10) très proches de ceux obtenus à partir des extraits dont le Cetavlon n'a été éliminé que partiellement. Ceci permet de penser que la contamination par le Cetavlon des extraits provenant des échantillons 325A et 330A n'était pas très importante.

b) FRACTIONNEMENT DE *H. cervicornis*

On obtient une fraction (tableau n°11) 0,3 M KCl soluble F₁ d'importance analogue à celle obtenue à partir de *H. musciformis*, mais ayant une teneur en 3,6 AG presque nulle. Ceci semble indiquer que *H. cervicornis* contient un carraghenane autre que Kappa quantitativement plus important que celui que l'on observe chez *H. musciformis*. Ce carraghenane de quantité non négligeable reste cependant d'importance très faible par rapport au Kappa carraghenane. Ces résultats ne portent que sur l'analyse d'un échantillon et doivent être confirmés par l'étude d'un plus grand nombre d'extraits de cette espèce.

V₂ - FRACTIONNEMENT DU CARRAGHENANE DE *H. musciformis* EXTRAIT PAR LYOPHILISATION ET SOUMIS A L'ACTION DE L'ACETONE

Certains extraits lyophilisés en 1973, provenant de *H. musciformis* de dérive, ont été "dégraissés" par action de l'acétone et de l'éthanol bouillant (voir techniques). Ceux-ci ont ensuite été soumis à un fractionnement par le KCl 0,3 M.

TABLEAU 12

ANALYSE DES EXTRAITS LYOPHILISÉS DE
H. musciformis SOUMIS À L'ACTION DE L'ACÉTONE
ET FRACTIONNÉS PAR LE KCL

- date de récolte 8/2/72, soluble acétone-alcool : 0 %

rendement	20,4 %	— fractionnement 0,3 M KCl	F ₁ soluble	15,2 %	% glucides	54,8 %
% glucides	100,1 %				% 3,6 1G	12,1 %
% 3,6 AG	30,9 %		F ₂ insoluble	61,3 %	% glucides	68,1 %
					% 3,6 AG	32,8 %

- date de récolte 23/2/72, fraction organosoluble : 14,2 %

rendement	23,8 %	— fractionnement 0,3 M KCl	F ₁ soluble	17,7 %
% glucides	71,8 %			
% 3,6 AG	26,6 %		F ₂ insoluble	52,8 %

- date de récolte 10/3/72, fraction organosoluble : 1 %

rendement	20,8 %	— fractionnement 0,3 M KCl	F ₁ soluble	25,0 %	% glucides	37,5 %
% glucides	74,3 %				% en 3,6 AG	7,1 %
% 3,6 AG	30,5 %		F ₂ insoluble	62,1 %	% glucides	68,5 %
					% 3,6 AG	31,1 %



On observe après dégraissage des teneurs en glucides et 3,6 AG plus fortes (tableau 12) que celles mesurées à partir d'extraits obtenus également par lyophilisation, et non soumis à l'action de l'acétone. Ceci s'observe dans tous les cas, qu'il y ait élimination de matière par action de l'acétone ou non (fraction organosoluble : 0 %). Pour pouvoir expliquer ce phénomène, il faudrait mesurer les teneurs en glucides et 3,6 AG avant et après dégraissage.

La fraction soluble F_1 , obtenue après action du KCl 0,3 M sur les extraits dégraissés, est relativement importante. La teneur en glucides de F_1 est faible par rapport à celle observée lors du fractionnement des échantillons extraits par le Cetavlon. Le pourcentage de la fraction F_1 est inversement proportionnel à sa teneur en glucides et en 3,6 AG. Il semble que ce soit dans cette fraction que se retrouve la substance non glucidique variable (éventuellement les sulfates variables) de l'extrait aqueux à laquelle il a été fait allusion au début de cette étude.

V₃ - RESUME DES RESULTATS DU FRACTIONNEMENT ET DISCUSSION

V_{3,1} - RÉSUMÉ DES RÉSULTATS

- Le fractionnement du carraghenane de *H. musciformis* fait apparaître une fraction 0,3 M KCl soluble F_1 qui varie entre 10 et 12 % dans le cas d'échantillons précipités par le Cetavlon, et entre 12 et 25 % pour des échantillons extraits par lyophilisation et dégraissage. Le pourcentage en 3,6 anhydrogalactose de la fraction F_1 est toujours faible par rapport à celui de la fraction 0,3 M KCl insoluble F_2 .

- Le fractionnement par le KCl 0,3 M d'échantillons de *H. musciformis* extraits par lyophilisation et soumis à l'action de l'acétone a permis de mettre en évidence une relation inversement proportionnelle entre le pourcentage de F_1 et la teneur en glucides et 3,6 AG de celui-ci.

- Le sous-fractionnement par le KCl 0,15 M de la fraction F_2 de *H. musciformis* extrait avec précipitation par le Cetavlon ne permet de rendre soluble qu'un très faible pourcentage de cette fraction.

- La fraction F_1 de l'échantillon de *H. cervicornis* est d'importance analogue à celle obtenue à partir de *H. musciformis*, mais a une teneur en 3,6 AG presque nulle.

V_{3,2} - DISCUSSION

La fraction F₁ de *H. musciformis* présente une teneur en glucides élevée comparable à celle de F₂. Ceci semble indiquer que ces deux fractions sont essentiellement constituées par du carraghenane. La très faible teneur en 3,6 AG de F₁ montre que cette fraction contient un carraghenane autre que kappa. Ce dernier carraghenane n'est pas quantitativement très important ; le pourcentage de la fraction F₁ est toujours faible chez tous les échantillons fractionnés.

Il semble que la fraction F₁ de *H. cervicornis* contienne un carraghenane autre que le kappa carraghenane (teneur en 3,6 AG presque nulle), plus abondant que celui obtenu à partir de cette même fraction dans *H. musciformis*.

Le sous-fractionnement de la fraction F₂ de *H. musciformis* par le KCl 0,15 M ne permet de rendre soluble qu'un faible pourcentage de cette fraction. Ce qui indique qu'elle est relativement homogène.

CHAPITRE VI

ANALYSE COMPARATIVE PAR
SPECTROPHOTOMETRIE INFRAROUGE
DES CARRAGHENANES PROVENANT DE
H. musciformis ET *H. cervicornis*

VI₁ - RESULTATS

Les fractions insolubles F₂ provenant du fractionnement par le KCl 0,3 M des extraits d'un échantillon de *H. musciformis* et de *H. cervicornis* ont été analysées. Ceci n'a pas été possible pour les fractions solubles F₁ correspondantes, la quantité de matériel obtenu n'étant pas suffisante pour une analyse.

La figure 14 montre les spectres obtenus à partir des fractions F₂ de l'échantillon de *H. musciformis* n°332bisa et de *H. cervicornis* n°323A. L'amplitude des différents pics constituant ces spectres n'est pas très grande. Ceci peut s'expliquer de la manière suivante : lors de la confection de disques de bromure de K mélangé avec du carraghenane, une très faible concentration de cette dernière substance a été utilisée, en raison des très petites quantités disponibles pour cette analyse. Ces faibles concentrations n'ont pas permis d'obtenir des spectres très contrastés.

VI₂ - DISCUSSION

Les spectres de *H. musciformis* et de *H. cervicornis* sont identiques. Ceux-ci présentent une large bande centrée sur 1240 cm^{-1} , caractéristique de la vibration S = 0 des sulfates et qui nous indique, comme on pouvait s'y attendre, qu'il s'agit de polysaccharides sulfatés. On observe un pic à 930 cm^{-1} caractéristique du 3,6 anhydrogalactose, et un pic à 845 cm^{-1} caractéristique du galactose 4 sulfate.

Tous ces caractères laissent envisager soit un Kappa carraghenane soit un iota. Aucun pic n'est observé à 805 cm^{-1} , ce qui indique une absence de galactose 2 sulfate, caractéristique du iota. Ces molécules ne sont donc pas des iota carraghenanes. Il semble que les molécules analysées soient uniquement des kappa carraghenanes.

Ceci confirme que le kappa carraghenane est le constituant principal de l'extrait aqueux de *H. musciformis* et de *H. cervicornis*.

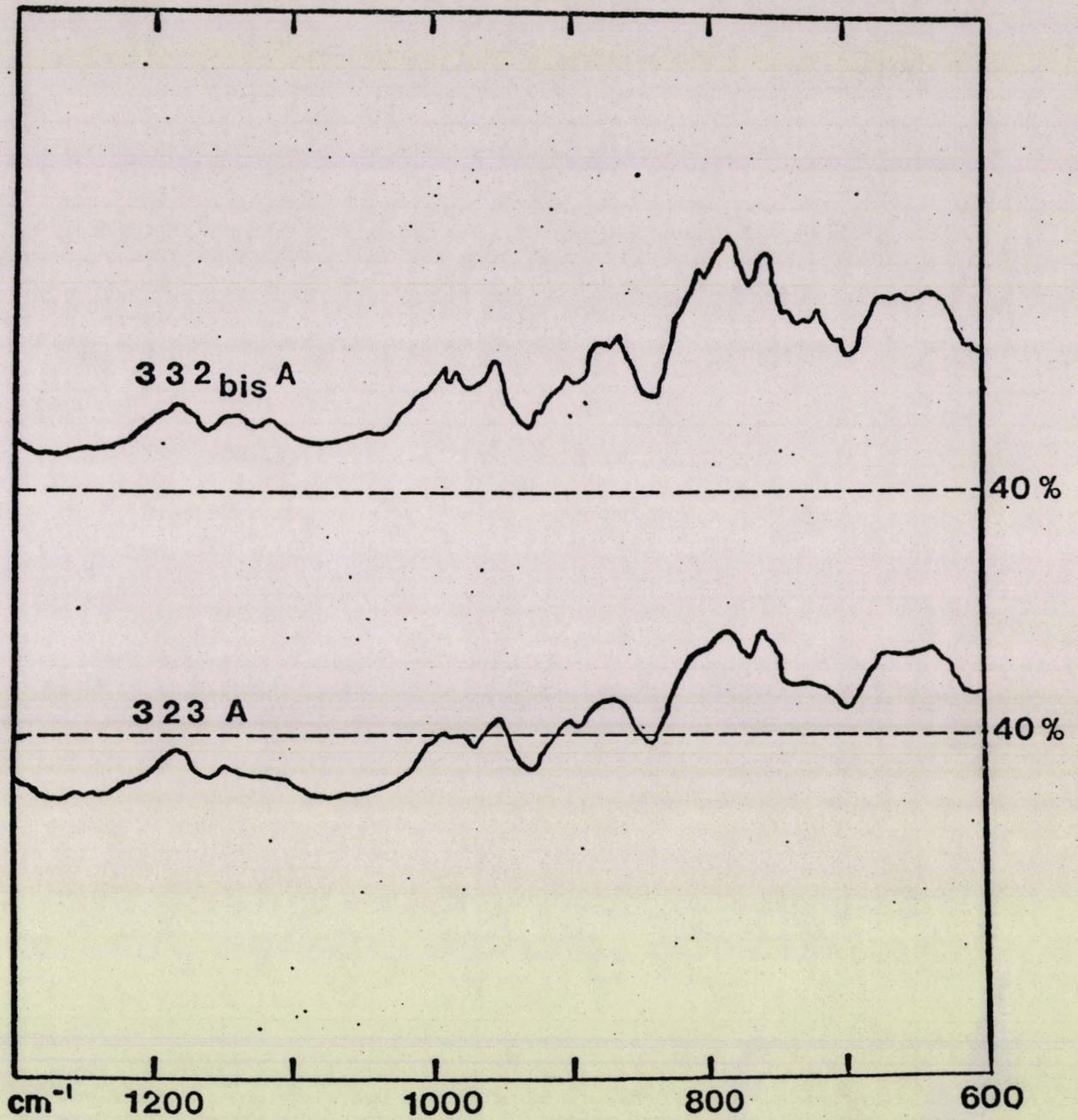


Fig. 14 - Spectres infra-rouges des fractions 0,3 M KCl insolubles
obtenues à partir de *H. musciformis* et *H. cervicornis*.

CHAPITRE VII

DISCUSSION GENERALE

ET

CONCLUSIONS

Bien que l'analyse d'un plus grand nombre d'extraits soit nécessaire pour pouvoir expliquer avec certitude certains phénomènes, l'étude menée à Lille et au Canada a permis de mettre en évidence un certain nombre de caractères du carraghenane des 2 espèces d'*Hypnea* étudiées.

- L'extrait aqueux de *Hypnea musciformis* et de *H. cervicornis* est constitué presque uniquement par du kappa carraghenane. Le rapport entre la quantité du kappa carraghenane et la quantité totale de glucides est relativement constant au cours de l'année chez *H. musciformis* (tableau 6).
- La teneur en extrait aqueux lyophilisé de *H. musciformis* de dérive varie saisonnièrement et présente un minimum en mars ; on observe des variations inverses si l'on mesure la teneur en 3,6 anhydrogalactose.

La mesure de la teneur en sulfate montre que celle-ci varie dans le même sens que la teneur en extrait aqueux entre janvier et juin.

Ces résultats peuvent s'expliquer de la façon suivante : la mesure du 3,6 AG, par les différentes méthodes colorimétriques ne tient pas compte de la quantité de sulfate fixée sur cette molécule. Le poids total de l'extrait aqueux est constitué par le poids du carraghenane et des sulfates qui lui sont liés. La relation inversement proportionnelle entre la teneur en extrait aqueux d'un échantillon et sa teneur en 3,6 AG, n'est donc qu'apparente. Si l'on tient compte des sulfates liés au 3,6 AG, on constate que les variations de celui-ci se font dans le même sens que celles de la teneur en extrait aqueux entre janvier et juin.

Il semble donc que les variations saisonnières de la teneur en extrait aqueux de *H. musciformis* soient dues aux variations du taux de sulfatation du carraghenane de celui-ci, au moins pendant une partie de l'année.

Il est difficile de dire si les variations saisonnières observées chez *H. musciformis* de dérive au Sénégal constituent un phénomène général. Le taux de sulfatation variable des extraits de carraghenane décrits dans cette étude, peut être en relation avec la biosynthèse de cette molécule. Comme je l'ai déjà dit, la formation de 3,6 anhydrogalactose peut se faire par perte du groupement sulfate d'une unité galactose 6 sulfate et formation d'un pont entre le C₆ et le groupement OH du C₃. Ce processus aboutit à une diminution

du taux de sulfatation de la molécule de carraghenane et pourrait constituer une étape importante de la biosynthèse de celle-ci.

Chez les autres algues à carraghenane, aucune mesure de la teneur en sulfate, à diverses époques de l'année, n'a été effectuée. Il n'est donc pas possible de savoir s'il y a variation du taux de sulfatation du carraghenane.

Chez le *Euchema* sp., les analyses de DAWES mentionnées ci-dessus montrent qu'il existe des variations saisonnières de la quantité de carraghenane par rapport à celle des glucides. Mon étude montre que apparemment de telles variations n'existent pas chez *H. musciformis*.

L'étude de MATHIESON sur le *C. crispus*, mentionnée également plus haut, ne permet pas de dire s'il existe des variations du carraghenane de cette espèce, du fait que seule la quantité totale d'extrait aqueux est mesurée.

- Les extraits aqueux, précipités par le Cetavlon, obtenus à partir de *H. musciformis* fixé, ne présentent que des variations saisonnières de leur teneur en 3,6 AG. Ces variations se font suivant le même mode que celui observé à partir de *H. musciformis* de dérive. Aucune mesure de la teneur en sulfates n'ayant été effectuée, il n'est pas possible de dire si ceux-ci sont responsables de ce phénomène.
- Le processus d'extraction par lyophilisation ne permet pas d'obtenir un carraghenane aussi pur que celui obtenu par précipitation avec le Cetavlon.
- Le fractionnement par le KCl des extraits provenant de *H. musciformis* et de *H. cervicornis* semble indiquer qu'il existe en petite quantité, dans ces échantillons, un carraghenane autre que kappa. Ce carraghenane de nature inconnue est un peu plus important dans *H. cervicornis* que dans *H. musciformis*.

L'un des buts de cette étude était d'expliquer les variations de la teneur en carraghenane des extraits de *H. musciformis* observées lors de précédents travaux en 1973. Les résultats obtenus montrent qu'un degré de sulfatation variable du carraghenane peut expliquer ces variations.

D'autres travaux sont nécessaires afin de déterminer si ce phénomène est général.

B I B L I O G R A P H I E

- ANDERSON N.S. et D.A. REES, 1965. - The repeating structure of some polysaccharide sulfates from red seaweeds. *Proc. 5th Seaweed Symp., Halifax, Nova Scotia*, p. 243, (8).
- ANDERSON N.S., T.C.S. DOLAN, A. PENMAN, D.A. REES, G.P. MUELLER, D.J. STANCIOFF et N.F. STANLEY, 1968. - Carrageenans. IV. Variations in the structure and gel properties of kappa carrageenan, and the characterization of sulfate esters by infrared spectroscopy. *J. Chem. Soc. C.*, 90 : 602-606, (59).
- ANDERSON N.S., T.C.S. DOLAN et D.A. REES, 1973. - Carrageenan. VII. Polysaccharides from *Euchema spinosum* and *E. cottonii*. Covalent structure of iota carrageenan. *J. Chem. Soc. Perkin*, 1 : 2173-2176, (12).
- BODARD M. et J. MOLLION, 1974. - La végétation infralittorale de la petite côte sénégalaise. *Bull. Soc. Phycol. de France*, 19 : 193-221, (1).
- CLINGMAN A.L. et J.R. NUNN, 1959. - Red seaweed polysaccharides. Part III. Polysaccharides from *Hypnea specifera*. *J. Chem. Soc.*, 81 : 493-498 (21, 40).
- DAWES C.J., J.M. LAWRENCE, D.P. CHENEY et A.C. MATHIESON, 1974. - Ecological studies of Floridian *Euchema* (Rhodophyta, Gigartinales). III. Seasonal variation of carrageenan, total carbohydrate, protein and lipid. *Bull. Mar. Sci.*, 24 (2) : 286-299, (27, 31).
- DE BOER J.A., B.E. LAPOINTE et C.F. D'ELIA, 1976. - Effects of nitrogen concentration on growth rate and carrageenan production in *Neogardhiella baileyi*. *Contribution from the Woods Hole Oceanographic Institution*, (24, 42, 48).
- DOLAN T.C.S., 1965. - PH. D. thesis, Edinburgh, (7).
- KIM D.H., 1970. - Economically important seaweeds, in Chile - 1) *Gracilaria*. *Bot. Mar.*, XIII : 140-162, (35).
- DUBOIS M., K.A. GILLES, J.K. HAMILTON, P.A. RIBERS et R. SMITH, 1956. - Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, 28 : 350-356, (51).

- FULLER S.W. et A.C. MATHIESON, 1972. - Ecological studies of economic red algae. IV. Variations of carrageenan concentration and properties in *Chondrus crispus* Stackhouse. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 10 : 49-58, (29, 63).
- FUSE T. et H. YOSHII, 1974. - Effect of the chemical composition on gelation in agar. *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, 48 (8) : 451-457, (67).
- HAMILTON R.D. et J.J. CARROL, 1962. - A comparison of polysaccharides of *Hypnea musciformis* and *Chondrus crispus*. *Nature*, 196 : 1200, (20, 38).
- JONES A.S. et D.S. LETHAM, 1954. - A submicro method for the estimation of sulphur. *Chem. Ind. London*, p. 662-663, (57).
- LAWSON C.J. et D.A. REES, 1970. - An enzyme for the metabolic control of polysaccharide conformation and function. *Nature*, 227 : 392, (13).
- MCCANDLESS E.L., J.S. CRAIGIE et J.A. WALTER, 1973. - Carrageenan in the gametophytic and sporophytic stages of *Chondrus crispus*. *Planta*, 112 : 201-212, (17, 19, 33, 34, 47, 50, 60, 65).
- MCCANDLESS E.L., 1974. - Biological regulation of carrageenan structure. *Communication of the VIIIth. International Seaweed Symposium, Bangor*, (22).
- MCCANDLESS E.L. et M. GORDON MILLS, 1975. - Carrageenan in the cell walls of *Chondrus crispus* Stack. (Rhodophyceae, Gigartinales) I. Localization with fluorescent antibody. *Phycologia*, 14 : 275-281, (32).
- MATHIESON A.C. et E. TVETER, 1975. - Carrageenan ecology of *Chondrus crispus* Stackhouse. *Aquat. Bot.*, 1 : 25-43, (37-41).
- MOLLION J., 1973. - Etude préliminaire des *Hypnea* au Sénégal comme source de phycocolloïdes. *Bot. Mar.*, XVI : 221-223, (2, 23, 28, 30, 64, 66).
- MOLLION J., 1975. - Etude quantitative d'une formation végétale marine de l'infralittoral supérieur au Sénégal. *Bull. de l'I.F.A.N.*, 37 (3) : 537-554, (61).
- MOLLION J., 1975. - La végétation littorale et infralittorale de la petite côte sénégalaise. D.E.A., Université de Lille I, (62).

- MONTREUIL J. et G. SPIK, 1963. - Microdosage des glucides - monographie n°1. Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux. Université de Lille I, (55).
- MORGAN K. et A.N. O'NEILL, 1959. - Degradative studies on lambda carrageenin. *Can. J. Chem.*, 37 : 1201, (10).
- MSHIGENI K.E., 1976. - Field cultivation of *Hypnea* (Rhodophyta) spores for carrageenan : prospects and problems. *Bot. Mar. Allem.*, 19 (4) : 227-230, (43).
- NEISH A.C. et P.F. SHACKLOCK, 1971. - Greenhouse experiments on the propagation of strain T₄ of Irish Moss. *Atlantic Regional Laboratory, N.R.C., Halifax*, (26).
- O'NEILL A.N., 1955. - 3,6 anhydrogalactose as a constituent of kappa carrageenin. *J. Amer. Chem. Soc.*, 77 : 2837, (4).
- O'NEILL A.N., 1955. - Derivatives of 4 O_BD galactopyranosyl 3,6 anhydra D galactose from kappa carrageenin. *Ibid.*, 77 : 6324, (5).
- PERCIVAL E., 1954. - The mercaptolysis of the polysaccharide from *Chondrus crispus*. *Chem. Ind. London*, p. 1487, (3).
- PERCIVAL E. et R.H. McDOWELL, 1967. - Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. *Academic Press, London and New York*, p. 147, (14, 44).
- RAMAROA K. et V. KRISHNAMURTHY, 1967. - Study of the preparation and properties of the phycocolloid from *Hypnea musciformis* (Wulf.) Lamour. from Veraval Gujarat coast. *Bot. Mar.*, XI : 129-133, (18, 39, 45).
- REES D.A., 1963. - The carrageenan system of polysaccharides. Part. I. The relation between the kappa and the lambda components. *J. Chem. Soc.*, 85 : 1821, (11).
- REES D.A., 1972. - Shapely polysaccharides. *Biochem. J.*, 126 : 257-273, (15, 16).
- RIMINGTON C., 1931. - The carbohydrate complex of the serum proteins. II. Improved method for isolation and redetermination of structure. Isolation of glucosaminodimannose from protein of ox blood. *Biochem. J.*, 25 : 1062, (54).

- SCOTT J.E., 1960. - Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissue. *Methods Biochem. Anal.*, 8 : 145-197, (46).
- SMIDSRØD O., B. LARSEN, A. PERNAS et A. HAUG, 1967. - The effect of alkali treatment on the chemical heterogeneity and physical properties of some carrageenans. *Acta Chem. Scand.*, 21 : 2585-2598, (36).
- SMITH D.B. et W.H. COOK, 1953. - Fractionation of carrageenin. *Arch. Biochem. Biophys.* 45 : 232-233, (49).
- SMITH D.B., W.H. COOK et J.L. NEAL, 1954. - Physical studies on carrageenin and carrageenin fractions. *Ibid.*, 53 : 192, (9).
- STANCIOFF D.J., et N.F. STANLEY, 1969. - Infrared and chemical studies on algal polysaccharides. *Proc. VI Intl. Seaweed Symposium*, p. 595-609, (58).
- TILLSMAN J. et K. PHILIPPI, 1929. - The carbohydrate content of the important proteins of foodstuffs and a colorimetric procedure for the determination of nitrogen free sugar in protein. *Biochem. Z.*, 215 : 36-60, (53).
- TILLSMAN J., PHILIPPI K. modifié RIMINGTON C. in MONTREUIL J., Lille, 1970, (52).
- WEIGL J. et W. YAPHE, 1966. - The enzymic hydrolysis of carrageenan by *Pseudomonas carrageenovora* : purification by a kappa carrageenase. *Can. J. Microbiol.*, 12 : 939, (6).
- YAPHE W. et G.P. ARSENAULT, 1965. - Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and 3,6 anhydrogalactose in polysaccharides. *Anal. Biochem.*, 13 : 143-148, (56).

