

50376  
1981  
1

50376  
1981  
1

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

T H E S E

*présentée à*

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

*pour obtenir le grade de*

DOCTEUR DE 3ème CYCLE

en Biochimie appliquée



DANIEL CHRISTIAEN

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DE L'AGAR-AGAR DE GRACILARIA VERRUCOSA  
(GRACILARIACÉES-GIGARTINALES). (FACTEURS BIOLOGIQUES ET  
PHYSICOCHIMIQUES INFLUENÇANT SA QUALITÉ ET SA PRODUCTION INDUSTRIELLE)

Membres du Jury : Professeur MONTREUIL, Président  
Professeur BODARD, Rapporteur  
Professeur FOURNET, Rapporteur  
Professeur MAGNE, Examineur

Soutenue le : 3 mars 1981

## REMERCIEMENTS

Au terme de ces deux années d'études, je voudrais remercier, ici, tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation du présent mémoire.

J'exprime, envers Monsieur le Professeur MONTREUIL, ma profonde reconnaissance, pour la confiance qu'il m'a faite en acceptant ma candidature en Biochimie appliquée. En me permettant de dialoguer avec les membres de son équipe de recherche, il a rendu mon travail possible.

Toute ma gratitude va vers Monsieur le Professeur BODARD qui m'a accueilli dans son Laboratoire et confié ce sujet. Je lui suis reconnaissant de la patience et de l'amitié qu'il m'a portées et qui ont stimulé mes recherches.

J'ai été très touché par la sympathie que Monsieur le Professeur FOURNET m'a toujours témoignée. Prodigue en conseils, il a su me guider dans mes réflexions et mon travail. Il a su aussi me rendre enthousiaste à chercher et je voudrais l'en remercier très sincèrement. Derrière lui, ce sont les membres de son Laboratoire que je remercie et plus particulièrement, Christine BRUVIER, pour sa disponibilité et sa gentillesse, ainsi que Yves LEROY pour ses compétences en chromatographie en phase gazeuse.

J'adresse mon profond respect à Monsieur le Professeur MAGNE qui m'honore en acceptant de juger ce travail et dont l'avis éclairé me sera très utile.

Que Monsieur l'Abbé QUILLET, qui, en me recevant dans son Laboratoire l'espace de deux stages, a bien voulu partager ses connaissances dans le domaine des phycocolloïdes, reçoive mes plus vifs remerciements. Mon amitié et ma reconnaissance s'adressent aussi à Madame DE LESTANG-BREMONT pour ses conseils.

Je tiens à associer dans mes remerciements Monsieur RICART pour son aide dans l'interprétation des spectres infrarouges, Monsieur le Professeur LOUCHEUX et le Laboratoire de Chimie macromoléculaire qui ont aimablement mis à ma disposition leur matériel de spectroscopie infrarouge et de

viscosimétrie, enfin l'Institut du Cancer qui a réalisé la détermination des acides aminés avec leur autoanalyseur.

Je ne voudrais pas oublier Madame DANOÛT qui m'a soulagé de la vaiselle et à travers elle, ce sont tous les membres du Laboratoire d'Algologie que je remercie. Ils ont su entretenir l'ambiance et la disponibilité qui rendent le travail moins ardu.

Mais c'est à Michèle DELECOURT que je dois la mise en forme de ce mémoire. La qualité de sa dactylographie a valorisé efficacement ma rédaction. Plus qu'à la Secrétaire c'est à l'amie que je dis merci.

Mes pensées reconnaissantes vont également à tous mes amis et proches qui, à des degrés divers, ont essuyé avec moi mes échecs et encouragés mes réussites. Leur présence m'a beaucoup aidé.

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION .....	1
--------------------	---

## PREMIERE PARTIE

### CHAPITRE I

HISTORIQUE .....	3
------------------	---

## DEUXIEME PARTIE

### CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES .....	18
II <sub>1</sub> - L'ALGUE - BIOLOGIE DE <i>GRACILARIA VERRUCOSA</i> ....	18
II <sub>2</sub> - EXTRACTION DE L'AGAR-AGAR .....	24
II <sub>3</sub> - SPECTRES INFRA-ROUGES .....	25
II <sub>4</sub> - ANALYSES BIOCHIMIQUES .....	26
II <sub>41</sub> - DOSAGE DES SUCRES TOTAUX .....	26
II <sub>42</sub> - DOSAGE DU 3,6 ANHYDROGALACTOSE .....	27
II <sub>43</sub> - DOSAGE DES SULFATES .....	29
II <sub>44</sub> - DOSAGE DES ACIDES URONIQUES .....	33
II <sub>45</sub> - DOSAGE DES PROTEINES ET ANALYSE DES ACIDES AMINES ,	34
II <sub>46</sub> - DOSAGE DE LA GLUCOSAMINE .....	35

II <sub>5</sub>	- CHROMATOGRAPHIE .....	36
II <sub>51</sub>	- CHROMATOGRAPHIES SUR PAPIER .....	36
II <sub>52</sub>	- CHROMATOGRAPHIES EN PHASE GAZEUSE .....	37
II <sub>6</sub>	- PROPRIÉTÉS PHYSIQUES .....	38
II <sub>61</sub>	- DETERMINATION DE LA FORCE DU GEL .....	38
II <sub>62</sub>	- MESURE DE LA VISCOSITE .....	39
II <sub>63</sub>	- DETERMINATION DU POINT DE GELIFICATION .....	39
II <sub>64</sub>	- DETERMINATION DU POINT DE FUSION .....	40
II <sub>7</sub>	- TEST RAPIDE POUR ÉVALUER LE RENDEMENT EN AGAR SANS PASSER PAR L'EXTRACTION .....	40

### TROISIEME PARTIE

#### C H A P I T R E III

SPECTRES INFRAROUGES .....	42
III <sub>1</sub> - RÉSULTATS .....	42
III <sub>2</sub> - INTERPRÉTATION ET DISCUSSION .....	42

#### C H A P I T R E IV

CHROMATOGRAPHIES EN PHASE GAZEUSE .....	53
IV <sub>1</sub> - RÉSULTATS .....	53
IV <sub>2</sub> - INTERPRÉTATIONS .....	53

#### C H A P I T R E V

CHROMATOGRAPHIES SUR PAPIER .....	63
-----------------------------------	----

## QUATRIEME PARTIE

### LES RESULTATS BIOLOGIQUES ET LEURS DISCUSSIONS

#### CHAPITRE VI

VARIATIONS SAISONNIERES .....	70
VI <sub>1</sub> - VARIATIONS DES POIDS SECS DES ALGUES ET DES RENDEMENTS EN AGAR .....	70
VI <sub>11</sub> - RESULTATS .....	70
VI <sub>12</sub> - INTERPRETATIONS .....	70
VI <sub>2</sub> - VARIATIONS DE LA TENEUR EN SUCRES .....	74
VI <sub>21</sub> - RESULTATS .....	74
VI <sub>22</sub> - INTERPRETATIONS .....	75
VI <sub>3</sub> - DOSAGE DES SULFATES .....	79
VI <sub>31</sub> - RESULTATS .....	79
VI <sub>32</sub> - INTERPRETATIONS .....	80
VI <sub>4</sub> - AUTRES PRODUITS DE SUBSTITUTION (ACIDE GLUCURONIQUE) .....	81
VI <sub>41</sub> - RESULTATS .....	81
VI <sub>42</sub> - INTERPRETATIONS .....	82
VI <sub>5</sub> - CONCLUSION SUR LES VARIATIONS SAISONNIERES ....	82

#### CHAPITRE VII

VARIATIONS EN FONCTION DES GENERATIONS .....	84
VII <sub>1</sub> - POIDS SECS ET RENDEMENTS .....	84

VII <sub>11</sub> - RESULTATS .....	84
VII <sub>12</sub> - INTERPRETATIONS .....	85
VII <sub>2</sub> - CONCLUSION .....	87

## CHAPITRE VIII

VARIATIONS DANS LES VARIETES CLONIQUES .....	89
--	----

VIII <sub>1</sub> - VARIATION DANS LE POIDS SEC DES ALGUES ET LE RENDEMENT EN AGAR .....	89
---	----

VIII <sub>11</sub> - RESULTATS .....	89
--------------------------------------	----

VIII <sub>12</sub> - INTERPRETATIONS .....	89
--	----

VIII <sub>2</sub> - VARIATION DANS LA COMPOSITION CHIMIQUE .....	92
--	----

## CINQUIEME PARTIE

### CHAPITRE IX

CONCLUSION .....	95
------------------	----

BIBLIOGRAPHIE .....	99
---------------------	----

## TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 - DERIVES METHYLES DE L'AGAR-AGAR. I - ISOLEMENT DU 2,4,6-TRI-O-METHYL-D-GALACTOSE (d'après ARAKI 1956) <sup>12</sup> ..	6
FIGURE 2 - DERIVES METHYLES DE L'AGAR-AGAR. II - ISOLEMENT DU 3,6 ANHYDRO-2-O-METHYL-L-GALACTOSE (d'après ARAKI 1956) <sup>12</sup> .....	7
FIGURE 3 - FORMULE DE L'AGAROBIOSE (d'après HIRASE ET ARAKI 1954) <sup>42</sup> .....	8
FIGURE 4 - FORMULE DE L'AGAROSE (d'après ARAKI 1958) <sup>14</sup> .....	10
FIGURE 5 - L'ACIDE PYRUVIQUE DANS LA MOLECULE D'AGAROSE (d'après HIRASE 1957) <sup>43</sup> .....	12
FIGURE 6 - STRUCTURES CHIMIQUES DE L'AGAR-AGAR PROPOSEES PAR DUCKWORTH et YAPHE (1971) <sup>32</sup> .....	15
FIGURE 7 - COUPES TRANSVERSALES ET LONGITUDINALE D'UNE FRONDE DE <i>GRACILARIA VERRUCOSA</i> (d'après KIM 1970) <sup>51</sup> .....	19
FIGURE 8 - COUPE TRANSVERSALE D'UN CONCEPTACLE MÂLE DE <i>GRACILARIA VERRUCOSA</i> (d'après KLING 1978) <sup>52bis</sup> .....	20
FIGURE 9 - COUPE TRANSVERSALE D'UNE FRONDE D'UN THALLE TETRASPORO- PHYTIQUE DE <i>GRACILARIA VERRUCOSA</i> (d'après KLING 1980, comm. pers.) .....	22
FIGURE 10 - CYCLE BIOLOGIQUE DE <i>GRACILARIA</i> (d'après KIM 1970) <sup>51</sup> ....	23
FIGURE 11 - COURBES SUIVANT LA LIBERATION DU 3,6 ANHYDROGALACTOSE (EN UNITE DO) EN FONCTION DU TEMPS D'HYDROLYSE .....	28
FIGURE 12 - METHODE GRAPHIQUE DE CALCUL DE LA QUANTITE DE SULFATES PAR LA TECHNIQUE DU TEMOIN INTERNE .....	32
FIGURE 13 - SPECTRE INFRAROUGE D'UN FILM D'AGAR-AGAR EXTRAIT DE <i>GRACILARIA VERRUCOSA</i> (THALLES MELANGES) .....	43
FIGURE 14 - SPECTRE INFRAROUGE D'UN FILM D'AGAR-AGAR EXTRAIT DE <i>GRACILARIA VERRUCOSA</i> (THALLE FEMELLE) .....	44
FIGURE 15 - SPECTRE INFRAROUGE D'UN FILM D'AGAR-AGAR EXTRAIT DE <i>GRACILARIA VERRUCOSA</i> (THALLE MÂLE) .....	45
FIGURE 16 - SPECTRE INFRAROUGE D'UN FILM D'AGAR-AGAR EXTRAIT DE <i>GRACILARIA VERRUCOSA</i> (THALLE TETRASPOROPHYTIQUE) .....	46

FIGURE 17 - SPECTRES INFRAROUGES DE FILMS DE CARRAGHENANES .....	47
FIGURE 18 - SPECTRE INFRAROUGE DE FILM D'AGAR-AGAR EXTRAIT DE GRACILARIA HENRIQUESIANA (d'après MOLLION, comm. pers.) .....	48
FIGURE 19 - SPECTRE INFRA-ROUGE DE FILM D'AGAR-AGAR EXTRAIT DE GRACILARIA COMPLANATA (d'après AKAHANE et IZUMI 1976) <sup>1</sup> .....	49
FIGURE 20 - MISE EN EVIDENCE D'UN PIC A 850 cm <sup>-1</sup> EN SPECTROSCOPIE INFRAROUGE D'UN FILM D'AGAR-AGAR (d'après DE LESTANG, comm. pers.) .....	50
FIGURE 21 - CHROMATOGRAMME EN PHASE GAZEUSE D'UN AGAR HYDROLYSE PAR H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ET PERACETYLE, EXTRAIT DE GRACILARIA VERRU- COSA (THALLES MELANGES) TEMOIN .....	54
FIGURE 22 - CHROMATOGRAMME EN PHASE GAZEUSE D'UN TEMOIN 6-O-METHYL- GALACTOSE PERACETYLE .....	55
FIGURE 23 - CHROMATOGRAMME D'UNE COCHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DU MELANGE AGAR-TEMOIN ET 6-O-METHYL-GALACTOSE .....	56
FIGURE 24 - CHROMATOGRAMME D'UNE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DE L'ECHANTILLON AGAR-TEMOIN AYANT SUBI UNE ATTAQUE ALCALINE (NaOH 1,5 % - 90°C - 3h) .....	57
FIGURE 25 - FIGURE DE SYNTHÈSE - SUPERPOSITION DES CHROMATOGRAMMES EN PHASE GAZEUSE DE L'AGAR-TEMOIN ET DU 6-O-METHYL- GALACTOSE .....	58
FIGURE 26 - FIGURE DE SYNTHÈSE - SUPERPOSITION DES CHROMATOGRAMMES EN PHASE GAZEUSE DE L'AGAR-TEMOIN ET DE L'AGAR APRES ATTAQUE ALCALINE .....	59
FIGURE 27 - FIGURE RESUMEE - IDENTIFICATION DES PICS DE CHROMATO- GRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DU TEMOIN AGAR .....	62
FIGURE 28 - CHROMATOGRAPHIE (5/5/1/3) SUR PAPIER WHATMAN 3 D'UN ECHANTILLON D'AGAR APRES HYDROLYSE SULFURIQUE (Méthode SEAMAN <i>et coll.</i> 1954) <sup>84</sup> - REVELATION A L'OXALATE D' ANILINE .....	64
FIGURE 29 - CHROMATOGRAPHIE (5/5/1/3) SUR PAPIER WHATMAN 3 D'UN ECHANTILLON D'AGAR APRES HYDROLYSE PAR ACIDE TRIFLUORO- ACETIQUE (4N, 4h - 100°C) - REVELATION A L'OXALATE D' ANILINE .....	65
FIGURE 30 - CHROMATOGRAPHIE (5/5/1/3) SUR PAPIER WHATMAN 3 D'UN ECHANTILLON D'AGAR HYDROLYSE PAR L'ACIDE TRIFLUORO- ACETIQUE (4N, 4h - 100°C) EN PRESENCE DU TEMOIN GLUCURONOLACTONE ET 6-O-METHYL-GALACTOSE .....	66
FIGURE 31 - CHROMATOGRAPHIE (5/5/1/3) SUR PAPIER WHATMAN 3 D'UN ECHANTILLON D'AGAR HYDROLYSE PAR L'ACIDE TRIFLUORO- ACETIQUE (4N, 4h - 100°C) - REVELATION A LA NINHYDRINE .....	67

FIGURE 32 - CHROMATOGRAPHIE (5/5/1/3) SUR PAPIER WHATMAN 3 D'UN ECHANTILLON D'AGAR HYDROLYSE PAR LA METHODE SEAMAN - REVELATION A LA NINHYDRINE .....	69
FIGURE 33 - COURBE DES VARIATIONS DES POIDS SECS DES ALGUES EN FONCTION DES SAISONS (MOYENNES) .....	72
FIGURE 34 - COURBE DES VARIATIONS DES RENDEMENTS EN AGAR EN FONCTION DES SAISONS (MOYENNES) .....	73
FIGURE 35 - COURBE DES VARIATIONS DE LA TENEUR EN SUCRES TOTAUX (MOYENNES) EN FONCTION DES SAISONS .....	76
FIGURE 36 - COURBE DES VARIATIONS DE LA TENEUR EN 3,6 ANHYDRO-GALACTOSE EN FONCTION DES SAISONS .....	77
FIGURE 37 - DROITE DE REGRESSION ( $y = - 0,6 x + 35,3$ ) REPRESENTANT LA RELATION ENTRE POIDS DE L'ALGUE ET RENDEMENT EN AGAR .....	91
FIGURE 38 - DROITE DE REGRESSION ( $y = - 0,13 x + 15,4$ ) REPRESENTANT LA RELATION ENTRE TENEUR EN SUCRES ET TENEUR EN PROTEINES .....	93
FIGURE 39 - CHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION PROTEIQUE A L'AUTOANALYSEUR BECKMAN APRES HYDROLYSE HCl 5,6N 4h - MISE EN EVIDENCE DE LA GLUCOSAMINE .....	97

## TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1	- DENSITES OPTIQUES DES ECHANTILLONS D'AGAR TESTES PAR LA METHODE DE REES (1961) <sup>7B</sup> EN FONCTION DU TEMPS D'HYDROLYSE .....	27
TABLEAU 2	- MODE OPERATOIRE DE LA DETERMINATION COLORIMETRIQUE DES SULFATES AVEC LE CHLORANILATE DE BARIUM (d'après BERTOLACINI et BARNEY 1957) <sup>21</sup> .....	31
TABLEAU 3	- RESULTATS DES DOSAGES DE SULFATES PAR LA METHODE DE BERTOLACINI ET BARNEY (1957) <sup>21</sup> .....	32
TABLEAU 4	- RESULTATS DES DOSAGES DU 3,6 ANHYDROGALACTOSE PAR LA METHODE DE REES 1961 <sup>7B</sup> MODIFIE, SUR L'ALGUE ENTIERE ...	41
TABLEAU 5	- DOSAGE PAR LE CALCUL DES AIRES DES PICS DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASES GAZEUSES OBTENUES A PARTIR DE L'AGAR-TEMOIN AVANT ET APRES ATTAQUE ALCALINE .....	60
TABLEAU 6	- VARIATIONS SAISONNIERES DES POIDS SECS DES ALGUES ET DES RENDEMENTS EN AGAR .....	71
TABLEAU 7	- VARIATIONS SAISONNIERES DE LA TENEUR EN SUCRES (GALACTOSE ET 3,6 ANHYDROGALACTOSE) DE L'AGAR-AGAR ....	75
TABLEAU 8	- VARIATIONS SAISONNIERES DE LA TENEUR EN SULFATES DE L'AGAR-AGAR .....	79
TABLEAU 9	- VARIATIONS SAISONNIERES DE LA TENEUR EN ACIDE GLUCURONIQUE DE L'AGAR-AGAR .....	81
TABLEAU 10	- POIDS SEC DES ALGUES EN FONCTION DES GENERATIONS ET RENDEMENT EN AGAR CORRESPONDANT (MOYENNES) .....	84
TABLEAU 11	- COMPOSITION EN SUCRES DE L'AGAR-AGAR EN FONCTION DES GENERATIONS (MOYENNES) .....	85
TABLEAU 12	- TENEUR EN SULFATE EN FONCTION DES GENERATIONS (MOYENNES) .....	86
TABLEAU 13	- TENEUR EN ACIDE GLUCURONIQUE EN FONCTION DES GENERATIONS (MOYENNES) .....	87
TABLEAU 14	- VARIATIONS DANS LE POIDS SEC DES ALGUES ET LE RENDEMENT EN AGAR-AGAR .....	90
TABLEAU A1	- ENSEMBLE DES RESULTATS DES DOSAGES BIOCHIMIQUES, ECHANTILLON PAR ECHANTILLON .....	EN ANNEXE
TABLEAU A2	- MESURES PHYSIQUES DES GELS D'AGAR OBTENUS DES EXTRAITS SAISONNIERS .....	EN ANNEXE

INTRODUCTION

L'introduction du mémoire, soutenu en octobre 1978 pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies, précisait l'actualité de notre sujet. En particulier, nous avons pu à l'époque, extraire un agar-agar de qualité voisinant avec celui que l'on trouve dans le commerce. Toutefois, dans le milieu commercial, les industriels se plaignent d'un certain nombre de variations dans les rendements en agarose. En fait, la molécule d'agar-agar est encore assez mal connue.

Les questions que nous nous sommes posées étaient de savoir qui, des variations dues aux saisons, de celles dues aux générations, telles que les ont observées les canadiens (McCANDLESS 1973<sup>60</sup> - 1975)<sup>61</sup> pour les carraghenanes, ou encore des variétés dans l'espèce, était responsable de l'irrégularité des rendements.

Nous nous sommes demandé quelles modifications de la molécule apparaissent, tant du point de vue de ses substituants que de sa conformation spatiale et quel en était le retentissement sur les propriétés physiques du gel.

Il nous a fallu, par rapport à un échantillonnage statistique, définir la moyenne des valeurs de rendements en colloïde et la qualité chimique de celui-ci pour les comparer à celles obtenues au niveau de pieds répertoriés ou mis en culture suivie.

Ce préalable indispensable porte sur l'ensemble des analyses couvertes par deux années de relevés systématiques.

Le but de notre étude est donc de maîtriser ces variations, en définissant le type d'algues à cultiver (générations, souches, etc...) et les conditions de culture (engrais, température, lumière, etc...). L'établissement de ces paramètres passait obligatoirement par une connaissance plus précise de la molécule et de ses composants secondaires : sulfates, méthyls, pyruvates ou acides uroniques. Enfin, ceci devrait nous permettre la mise au point

de tests rapides de qualité telle que l'estimation directe de la teneur en agar par le dosage du 3,6 anhydrogalactose, résidu spécifique.

De là, nous pourrions proposer un mode de culture d'algues et des critères de sélection, à l'aide des tests rapides de qualité, dont nous parlions ci-dessus, indispensables aux industriels.

Par ailleurs, du point de vue fondamental, il était intéressant d'essayer de comprendre le rôle des mucilages dans la physiologie de l'algue qui préside à sa répartition écologique ou à sa résistance à la dessiccation (QUILLET et DE LESTANG 1974)<sup>53</sup>. Le mode de traitement industriel aura à en tenir compte.

Une première partie historique tentera de traduire l'évolution de nos connaissances sur l'agar, depuis sa découverte au Japon et l'isolement de la molécule par PAYEN en 1859<sup>71</sup>. Nous envisagerons les perspectives de recherches ouvertes par les travaux canadiens (McCANDLESS *et coll.* 1973)<sup>60</sup> qui se sont intéressés aux variations de la composition chimique des colloïdes.

Nous ferons le point sur les méthodes de culture et de sélection, encore pionnières dans ce domaine très particulier de la génétique des algues.

La deuxième partie, "Matériel et Méthodes", nous permettra de préciser les techniques utilisées, tant du point de vue de la culture et de la sélection, que de celui des analyses biochimiques.

La troisième partie fera la synthèse de nos résultats biochimiques. Nous essaierons de mettre en évidence les variants dans la composition moléculaire de l'agar-agar susceptibles d'influencer la qualité du gel.

Enfin, une quatrième partie envisagera les causes biologiques des variations biochimiques et précisera, si possible, le rôle physiologique du colloïde dans l'algue.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I

HISTORIQUE

"Dans les premiers jours de l'année 1856, un voyageur, M. de MONTRAVEL, venant de Chine, remettait au général MORIN une substance commerciale, sous forme de longues et très minces lanières blanches, réunies par deux ligatures en petites bottes désignées sous le nom de *mousse de Chine*, et qu'on avait dite extraite d'un lichen attaché aux arbres, dans le sud de la Chine, très abondant aux îles méridionales de l'archipel des Philippines..

"En examinant dans mon laboratoire un échantillon que je dus à l'obligeance de notre confrère, je reconnus dans cette matière, dépourvue de structure organique, la présence de plusieurs principes immédiats solubles dans l'eau (0,0607), et une faible quantité dans l'alcool (0,007) ; la plus grande partie, insoluble dans l'eau froide, s'y gonflait beaucoup, (...)

"Mais la propriété la plus remarquable de la substance insoluble dans l'eau froide était : 1° de se dissoudre dans l'eau bouillante, laissant indissous les corpuscules azotés et des traces d'autres corps étrangers ; 2° de donner à chaud une solution qui se prenait en gelée incolore et diaphane par le refroidissement, donnant ainsi une consistance *gélatineuse* à 500 fois environ son poids d'eau pure, ou formant, à poids égal, 10 fois plus de gelée que la meilleure gélatine animale. La préparation des gelées légères est en effet la destination de cette substance et le but de sa fabrication chez les Chinois. On l'emploie au même usage dans nos colonies, notamment à la Réunion, ainsi que nous l'a fait savoir M. MORIN fils. (...)"

C'est dans ces lignes publiées par PAYEN (1859)<sup>71</sup> qu'apparut, pour la première fois aux physiologistes, ce produit qu'il appela "gélouse", nom scientifique de l'agar-agar (qui est lui l'appellation malaisienne).

Il en fit l'analyse élémentaire dont voici les résultats :

	I	II	Moyenne
Carbone	42,81	42,73	42,77
Hydrogène	5,71	5,84	5,775
Oxygène	51,48	51,43	51,445
	100,00	100,00	100,000

et proposa  $C_6H_{10}O_5$  comme formule globale.

Après avoir décrit l'intérêt économique de ce "principe immédiat", pour produire des gelées à bas prix et sans les inconvénients des gélatines et autres colles de poisson (ichthyocolle) en usage à l'époque, il tenta de découvrir l'origine de cette substance ; il la rencontra dans une plante marine connue sous le nom "d'algue de Java", encore appelée *Gelidium corneum*.

Il mit alors au point la première technique d'extraction qui consiste à traiter successivement l'algue à froid par l'acide acétique ou chlorhydrique étendu, l'eau, l'ammoniaque faible (0,03), suivi d'abondants lavages qui laissent dissoudre 53 % de son poids en calcaire, sels, matières colorables et autres substances organiques étrangères à la gélose. Cette dernière, contenue dans le tissu résistant, en est extraite à l'aide de l'ébullition dans l'eau. Le liquide, décanté, bouillant, se prend en gelée diaphane par le refroidissement.

La nature glucidique du colloïde fut confirmée par la suite grâce aux travaux de BAUER (1884)<sup>26</sup> qui identifia, dans les produits d'oxydation par l'acide nitrique, la présence d'acides galactarique et oxalique. L'agar fut dès lors considéré comme un galactane, et LÜDTKE (1929)<sup>56</sup> confirma cette thèse en isolant du D-galactose par hydrolyse complète.

En 1921, NEUBERG et OHLE<sup>67</sup>, par d'autres travaux, précipitaient des ions sulfates avec le barium. PIRIE (1936)<sup>76</sup> séparait, par acétolyse, un D et un L-galactose ; l'existence de ce dernier fut vérifiée par HANDS et PEAT<sup>41</sup> en 1938.

L'hydrolyse de l'agar, par les acides minéraux, libère du galactose et de l'acide lévulinique. Ce dernier fut interprété par PERCIVAL *et coll.*<sup>73</sup> (1938) comme étant le produit de dégradation d'un 3,6 anhydro-galactose. Dès 1937, ARAKI<sup>6</sup> séparait l'agar par acétylation, en deux fractions : une neutre qu'il appela "agarose" et une chargée "agaropectine". En 1944, PERCIVAL<sup>74</sup> mettait en évidence, par hydrolyse chloridrique diluée, des groupements ester sulfates qui entraient dans la composition d'un polysaccharide acide, lequel, séparé par électrodialyse et remis en solution, ne forme plus de gel.

Les hydrolyses partielles acides (ARAKI 1944a)<sup>7</sup> ou enzymatiques ont permis l'obtention de disaccharides. L'oxydation périodique et les techniques de méthylation ont élucidé la structure de l'agar.

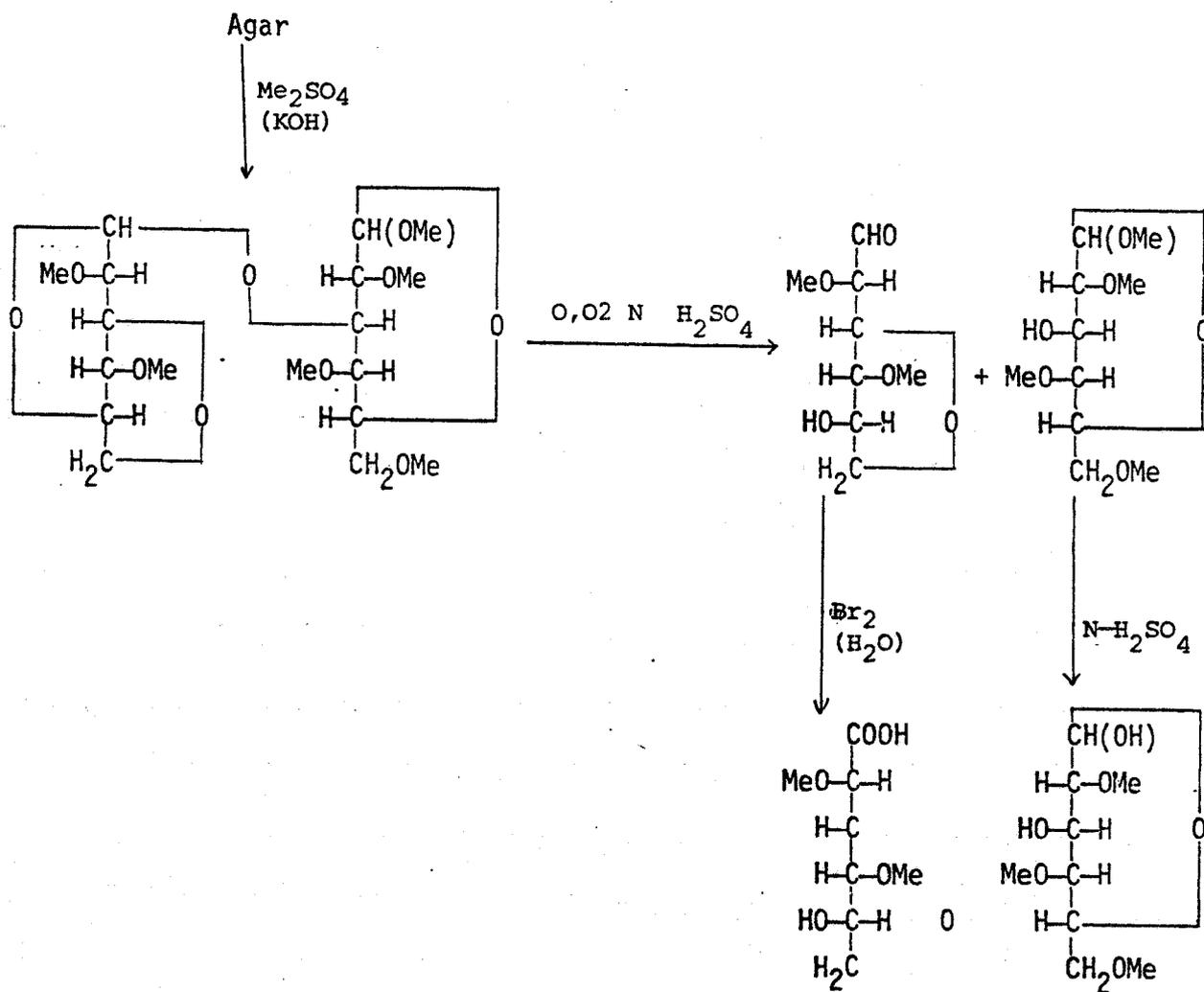
Ainsi, suivie d'une méthylation, l'hydrolyse sulfurique à 6 % (ARAKI et HIRASE 1953)<sup>9</sup> révèle la présence de 2,4,6 tri-O-méthyl-D-galactose (65 %) et de 3,6 anhydro 2,4 di-O-méthyl-L-galactose (13 %). Ces auteurs ont ainsi pu établir que les unités de D-galactose se présentaient sous la forme pyranique et étaient liées en C1-C3 (fig. 1).

La méthanolyse d'un agar méthylé (ARAKI 1944b)<sup>8</sup> fait apparaître du 3,6 anhydro-2-O-méthyl-L-galactose, isolé sous forme de diméthylacétal. ARAKI et HIRASE (1953)<sup>9</sup> en déduirent que le 3,6 anhydro-L-galactose est lié en C1-C4 et que ces résidus sont présents dans la conformation pyranique (fig. 2). La formule de l'agarobiose, ainsi appelée par HIRASE et ARAKI (1954)<sup>42</sup>, représentée par la figure 3, fut généralement acceptée. On admit également, que le peu d'ester sulfurique de l'agar était fixé en C6 du L-galactose (ARAKI 1966)<sup>16</sup> et que

FIGURE 1

## DERIVES METHYLES DE L'AGAR-AGAR

I - Isolement de 2,4,6-tri-O-méthyl-D-galactose  
(d'après ARAKI 1956)<sup>12</sup>



acide 2,4-di-O-  
méthyl-3,6-anhydro-  
L-galactonique

2,4,6-tri-O-  
méthyl-D-galactose



FIGURE 2

DERIVES METHYLES DE L'AGAR-AGAR

II - Isolement du 3,6 anhydro-2-O-méthyl-L-galactose  
(d'après ARAKI 1956)<sup>12</sup>

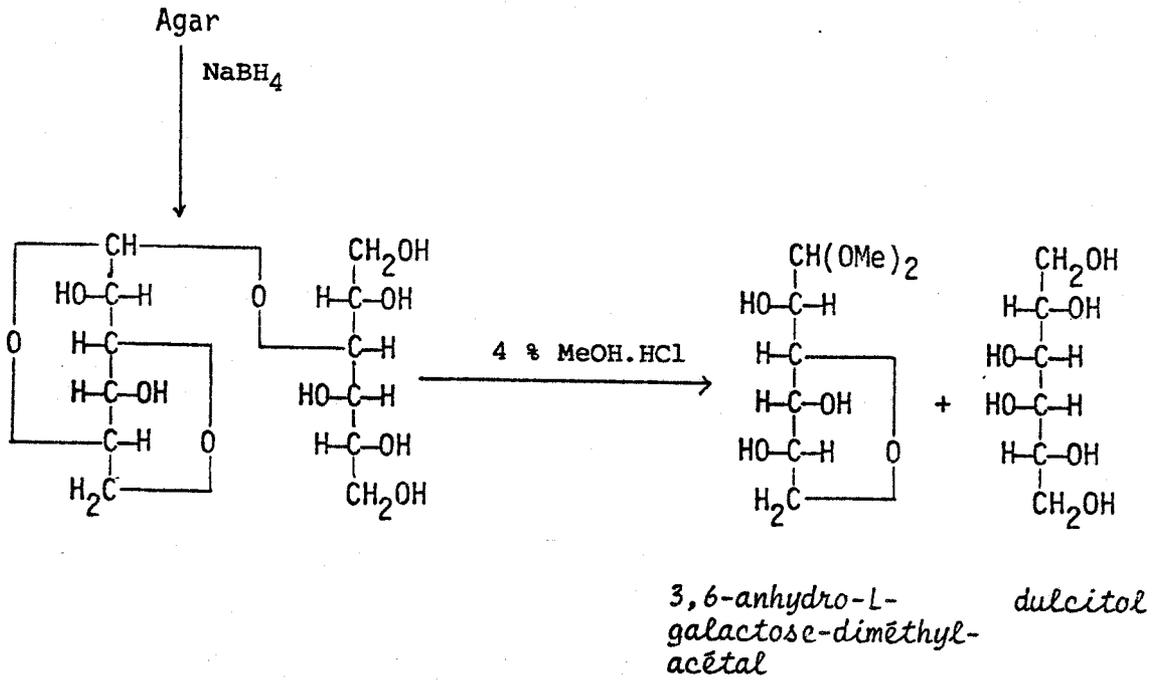
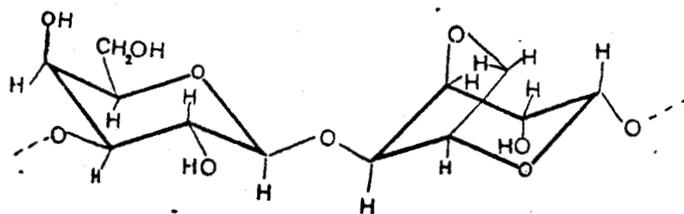


FIGURE 3

FORMULE DE L'AGAROBIOSE (d'après HIRASE ET ARAKI 1954)<sup>42</sup>3,6 anhydro-4-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-L-galactose

celui-ci pouvait constituer le précurseur du 3,6 anhydro-L-galactose. En fait, la faible proportion de sulfate dosable est sans rapport avec celle du 3,6 anhydro-galactose (0,1 à 0,9 %  $\text{SO}_4$  pour 10 à 13 % anhydro-galactose). On pense donc que le 3,6 anhydro-galactose fait partie intégrante de la structure polysaccharidique, mais l'hypothèse selon laquelle des ponts 3,6 anhydro se formeraient dans certaines conditions à partir du 6- $\text{SO}_4$ -L-galactose n'est pas à écarter. Le mode d'extraction ne sera donc pas négligeable quant à la nature du produit fini.

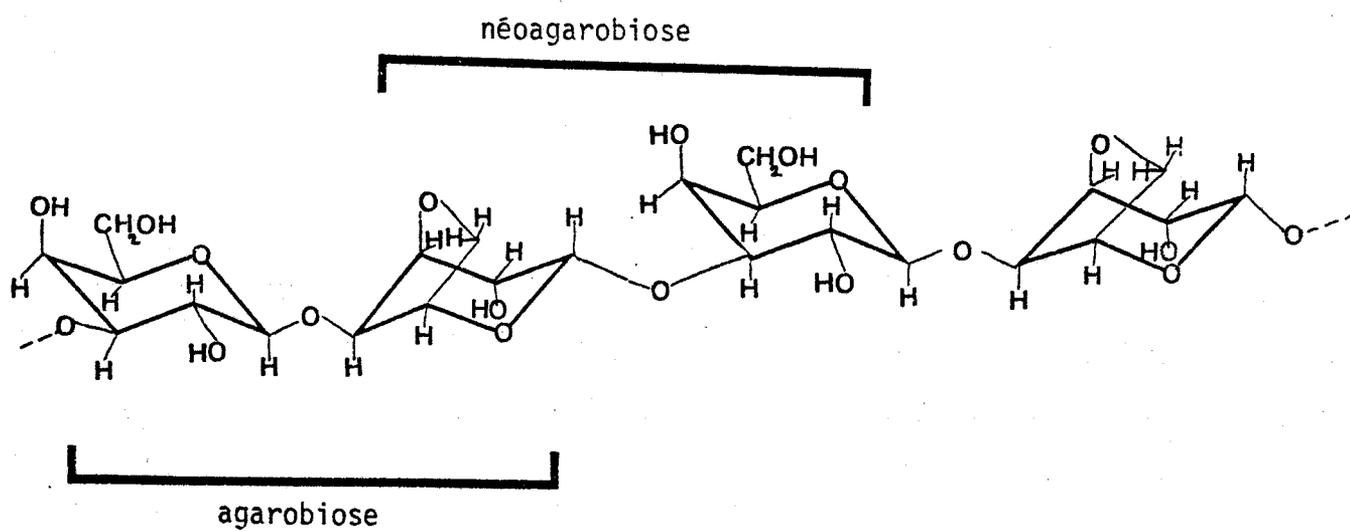
Le même disaccharide fut obtenu à partir du mucilage de *Gloiopeltis furcata* (HIRASE et coll. <sup>44</sup> 1958) par l'action d'une enzyme extraite de *Pseudomonas kyotensis*. GRAN <sup>40</sup> (1902) observait déjà qu'une enzyme appelée "gélase", isolée d'organismes marins *Haliotus giganteus*, *Turbo cornutus*, était capable de dégrader l'agar. De même, des microorganismes possèdent une enzyme dénommée "agarase" capable d'hydrolyser le polysaccharide.

ARAKI et ARAI <sup>11</sup> (1956) isolèrent un nouveau disaccharide : le néoagarobiose, issu de l'hydrolyse par l'enzyme extraite de *Pseudomonas kyotensis* et séparé par chromatographie sur colonne de charbon. Il s'agit d'un isomère de l'agarobiose : le 3,6 anhydro-L-galactosyl-D-galactose. Ces mêmes auteurs suggérèrent alors que le polysaccharide de base constituant l'agar était un polymère linéaire : l'agarose, formé d'une combinaison de ces deux disaccharides comme unités de répétition (fig. 4) (ARAKI 1958) <sup>14</sup>.

CLINGMAN et coll. <sup>25</sup> (1957) ont également isolé des produits de méthylation, du N-phényl-2, 3, 4, 6-tétra-O-méthyl-L-galactosamine et quelques di-O-méthyl-galactoses, interprétés comme étant des résidus de méthylation incomplète. Il n'a plus été question de ces produits par la suite.

La chromatographie sur papier de l'hydrolysate d'un agar par acide dilué (0,1 N) fait apparaître de l'acide pyruvique (HIRASE 1957) <sup>43</sup>. Il démontra par une dégradation contrôlée (0,5 N Méthanolique) que l'acide pyruvique faisait partie intégrante de la molécule et qu'il s'agissait du 3,6 anhydro-4-

FIGURE 4  
FORMULE DE L'AGAROSE (d'après ARAKI 1958)<sup>14</sup>



O-[4,6-O-(1-carboxyéthylidène)- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-L-galactose-di-méthyl-  
acétal (fig. 5), confirmé par YOUNG *et coll.* (1971)<sup>104</sup>.

Comme autre produit secondaire, ARAKI (1937)<sup>6</sup> avait pu doser de l'acide  
glucuronique. YING KIN et YAPHE (1972)<sup>103</sup> signalent la présence de L-galactose  
2,6-di-sulfate et de 3,6 anhydro-L-galactose-2-sulfate dans certaines espè-  
ces.

ARAKI a publié plus de vingt articles sur l'étude de la composition  
chimique de l'agar-agar. Citons ses travaux parus en 1957 sur l'isolement  
d'un tétrasaccharide par hydrolyse enzymatique (ARAKI et ARAI 1957)<sup>13</sup>. Ceux  
de 1969<sup>18</sup> sur la structure de l'agaropectine, montrent qu'elle serait composée  
des mêmes unités de répétition que l'agarose, mais dans lesquelles le L-  
galactose serait remplacé par du galactose-sulfate et certain D-galactose  
par l'acide pyruvique.

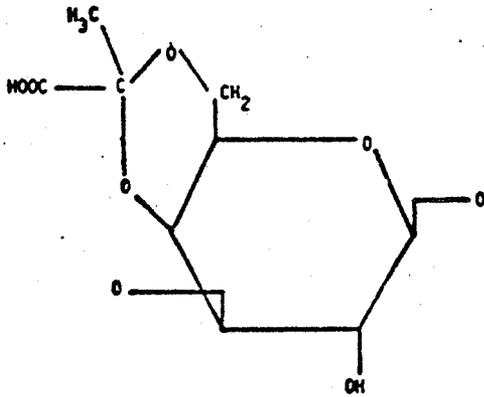
En 1957, le *Manual of Microbiological methods* définit pour la première  
fois l'agar : "L'agar est un phycocolloïde dérivé des Rhodophycées qui forme  
un gel entre 33 et 39°C et fond à 70°C". Mais YAPHE, dans les années 60,<sup>101</sup> jugea  
cette définition insuffisante et proposa : "L'agar est un mélange de polysac-  
charides dérivés de certaines espèces agarophytes contenant l'unité agarose".

La structure exacte de la molécule demeure encore confuse, car son  
étude se heurte au fait que l'origine des échantillons est très hétérogène.  
Les produits commercialisés sont en effet issus de l'extraction de plusieurs  
agarophytes, de manière à obtenir un gel aux propriétés physiques requises.

La teneur en hexoses fluctue en fonction de l'algue : 65 % pour *Gelidium*  
*amansii*, 48 % pour *Gracilaria confervoïdes* (HONG *et coll.* 1969)<sup>46</sup>. Ces auteurs  
ont précisé que, selon les espèces, la concentration en galactose pouvait  
passer de 27 à 41 % et celle du méthyl-galactose de 2 à 21 %, tandis que  
la teneur en anhydrogalactose variait peu. Ils ont établi une corrélation

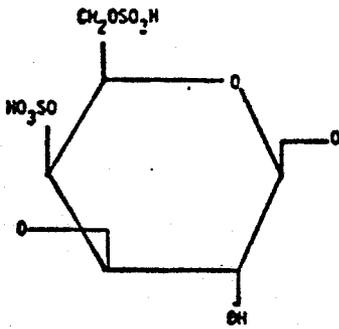
FIGURE 5

L'ACIDE PYRUVIQUE DANS LA MOLECULE  
D'AGAROSE (d'après HIRASE 1957)<sup>43</sup> ET  
AUTRES SUBSTITUANTS

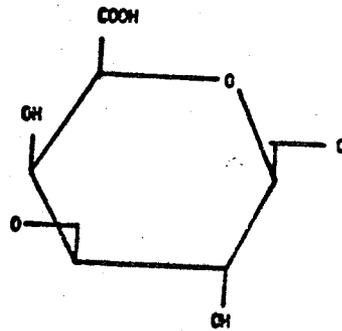


Groupement acide pyruvique

Galactose sulfate



Acide glucuronique



entre la taxonomie des agarophytes et le type de polysaccharide. Par ailleurs, les résidus peuvent substituer la molécule à des degrés divers. ARAKI *et coll.*<sup>17</sup> (1967) rapportent que certaines espèces et, parmi elles, les *Gracilaria* avaient des teneurs variables en 6-O-méthyl-galactose. GUISELEY en 1970<sup>39</sup> a vérifié ce point en analysant plus de cinquante échantillons de *Gracilaria* et a évalué l'incidence de ces variations sur la température de gélification. De même, on peut rencontrer du 4-O-méthyl-L-galactose, du 2-O-méthyl-D-galactose et de faibles proportions de L-galactose et D-xylose (ARAKI *et coll.*<sup>17</sup> 1967). Par contre, YAPHE et DUCKWORTH (1971)<sup>102</sup> font remarquer que si les teneurs en D-galactose et 6-O-méthyl-galactose fluctuent largement, le rapport molaire entre 3,6 anhydro-galactose et le total D-galactose-6-O-méthyl-galactose reste toujours voisin de 1.

Nos connaissances sur la molécule d'agar-agar ont évolué depuis l'hypothèse des deux polysaccharides (neutre-chargé) émise par ARAKI en 1937.<sup>5</sup> Elle fut considérée comme une grossière simplification par DUCKWORTH et YAPHE en 1971.<sup>32</sup> Ils ont tenté de séparer plus efficacement l'agarose de l'agaropectine, en utilisant les différences de solubilité des fractions en fonction de la température, puis en passant les produits sur DEAE cellulose ( $\text{Cl}^-$ ). Par ces techniques, ils ont mis en évidence l'hétérogénéité de l'agar qui est en fait substitué, à des degrés variables, par des groupements chargés  $\text{SO}_3^{--}$  et neutres  $\text{CH}_3\text{O}$ .

IZUMI (1972)<sup>49</sup> a séparé l'agar de *Gracilaria verrucosa*, en 5 fractions, sur une colonne de chromatographie (Dowex 1 x 2). L'analyse chimique montre que ces fractions contiennent des proportions croissantes de galactose, d'acides uroniques et de résidus sulfates, et des proportions décroissantes de 6-O-méthyl-galactose et de 3,6 anhydrogalactose dans l'ordre d'élu-tion de la colonne. La somme des contenus molaires en anhydrogalactose et en résidus sulfates de toutes les fractions s'élève approximativement à la

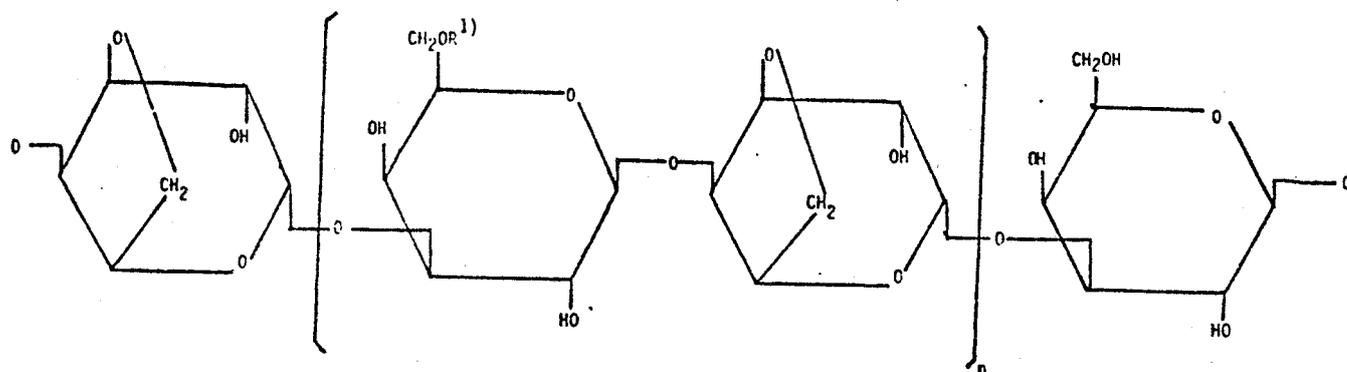
moitié du contenu molaire en hexoses totaux. D'autres chromatographies confirmèrent cette hétérogénéité. IZUMI (1970)<sup>48</sup> suggère que l'agar est, en fait, une famille de polysaccharides variant entre deux extrêmes de macromolécules : l'une, formée de galactose, non sulfaté, plus ou moins méthylé, composée de séquences répétées d'agarobiose ; et l'autre, de galactose sulfaté, non méthylé avec des proportions inférieures en anhydrogalactose. Cette définition de la structure a été corrigée par les travaux de DUCKWORTH et YAPHE en 1971.<sup>32</sup> Pour ces auteurs, elle présente trois extrêmes dans sa conformation. Ils les nomment : agarose neutre, agarose pyruvate peu sulfaté et galactane sulfaté (fig. 6). Sa masse moléculaire est d'environ 120 000 (REES 1965)<sup>80</sup>. Elle diffère du carraghénane par un taux inférieur en groupements sulfates et la présence de 3,6 anhydro-L-galactose, à la place du 3,6 anhydro-D-galactose.

Ces résultats ont été confirmés par d'autres dégradations enzymatiques, HONG et coll. (1969)<sup>46</sup> et GORDON et coll. (1977)<sup>38</sup> ont analysé les produits d'hydrolyses enzymatiques (enzymes extraites de bactéries marines *Pseudomonas atlantica*, YAPHE 1957<sup>100</sup>) d'une part en chromatographie en couche mince, d'autre part en <sup>13</sup>C nmr.

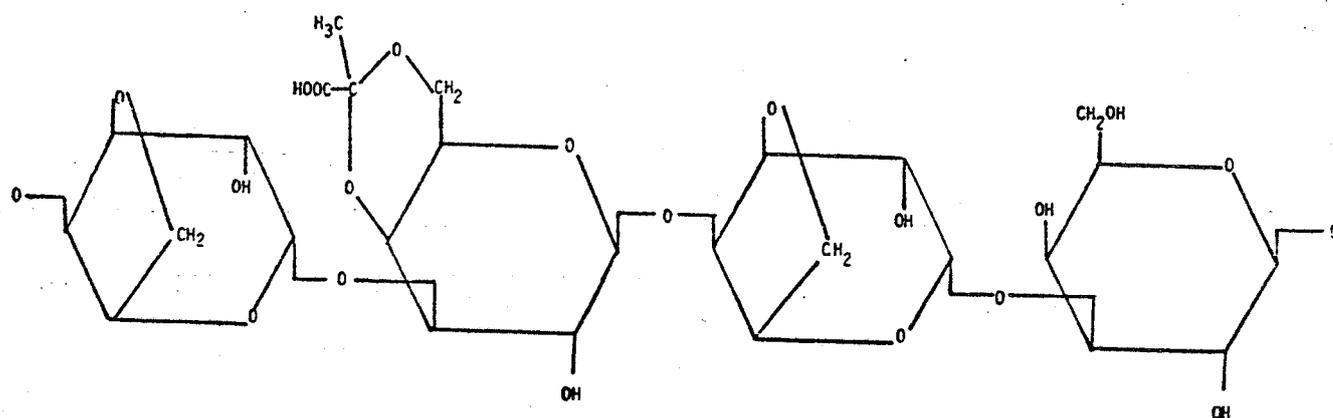
La plupart des auteurs ont constaté de notables différences entre agars commerciaux et entre ceux extraits d'agarophytes voisins. Cependant, toutes les études concernant l'agar ont négligé l'aspect biologique des algues. Les Rhodophycées libérant des phycocolloïdes sont des espèces trigénétiques avec alternance de phases haploïde et diploïde. MARSHALL et coll. (1949)<sup>63</sup> émirent les premiers l'hypothèse selon laquelle le rythme des saisons et celui des générations pouvaient influencer la force de gel d'un carraghénane. BLACK et coll. en 1965<sup>22</sup>, FULLER en 1971<sup>37</sup>, RIGNEY en 1971<sup>81</sup>, vérifièrent cette hypothèse et isolèrent, de *Chondrus crispus*, deux types de carraghénanes liés au rythme saisonnier. En 1972, McCANDLESS et RICHER<sup>59</sup> montrèrent que le produit libéré par le tétrasporophyte était plus visqueux que celui extrait d'un mé-

FIGURE 6  
 STRUCTURES CHIMIQUES DE L'AGAR-AGAR  
 PROPOSEES PAR DUCKWORTH ET YAPHE (1971)<sup>32</sup>

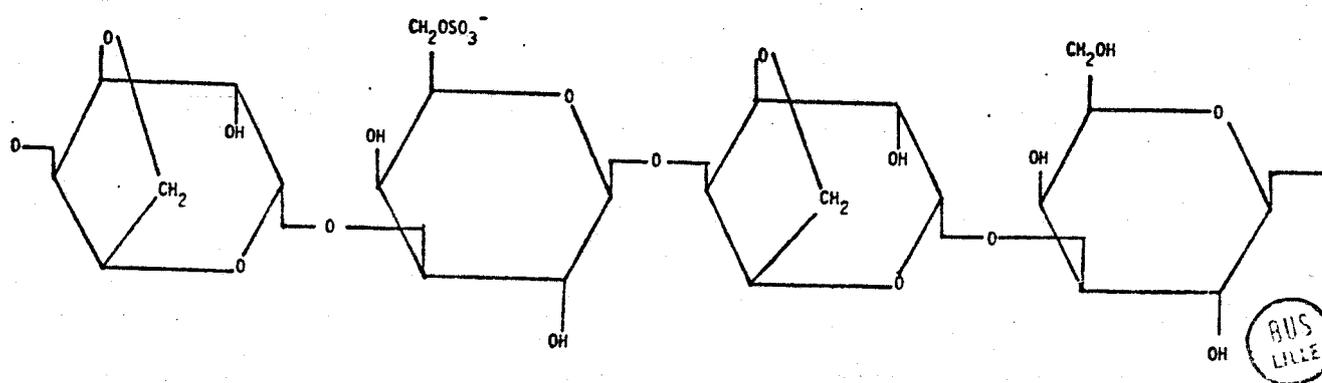
Agarose neutre



Agarose pyruvaté



Galactane sulfaté



BUS  
LILLE

lange de pieds indifférenciés de cette espèce. C'est en 1973 que McCANDLESS<sup>60</sup> démontra l'existence de  $\lambda$  carraghenane au niveau du tétrasporophyte et de  $\kappa$  carraghenane au niveau du gamétophyte, selon la nomenclature définie par les travaux de SMITH *et coll.* (1954)<sup>85</sup> et clarifiée par ceux de ANDERSON *et coll.* (1968a, b, c)<sup>3, 4, 5</sup> et DOLAN et REES (1965)<sup>31</sup>. Cette année-là, PICKMERE *et coll.* (1973)<sup>75</sup> observaient le même phénomène dans le genre *Gigartina*, puis en 1975 McCANDLESS<sup>61</sup> sur *Irideae cordata*. Enfin, MOLLION (1977)<sup>64</sup> étudiait les variations saisonnières de *Hypnea musciformis* et *H. vicornis*. Pour ANDERSON *et coll.* (1968a)<sup>3</sup> il existerait un précurseur, le  $\mu$  carraghenane, qui, en se sulfatant, donnerait naissance aux différents types de carraghenanes.

Il faut attendre le IX<sup>ème</sup> Symposium international des Algues marines pour que pareille étude soit entreprise pour l'agar par KIM et HENDRIQUEZ (1978)<sup>52</sup>. Ces auteurs montrent l'existence d'une relation entre rendements, force de gel et générations de *Gracilaria verrucosa*. Ils remarquent, en effet, que les gamétophytes libèrent plus de colloïde que les tétrasporophytes, mais ont la force de gel la plus basse. PENNIMAN (1977)<sup>72</sup> n'avait pas remarqué, quant à lui, de différences significatives dans les rendements en agar entre pieds gamétophytiques et tétrasporophytiques de *Gracilaria verrucosa*. OZA en 1978 observe, tout au long de l'année, des variations dans les rendements et la force de gel, d'agars extraits de *Gracilaria cortica* de la côte de Veraval en Inde. Il ne précise pas le nombre d'échantillons testés ni la génération de l'algue.

Présentée dès le début des années 1970 par YAPHE, la biosynthèse des carraghenanes a été précisée par CRAIGIE et WONG (1978)<sup>26</sup>. DE LESTANG et QUILLET (1974)<sup>53</sup> mettaient en évidence le rôle des sulfates fixés sur les chaînes polysaccharides des phycocolloïdes, en établissant une corrélation entre le degré de substitution et la répartition des algues le long

de l'estran. Ainsi, si le métabolisme et le rôle physiologique des carraghe-  
nanes commencent à être bien connus, ceux de l'agar-agar demeurent encore  
étrangers aux biologistes.

Une étude à la fois biologique et biochimique se justifiait donc pour  
tenter d'éclaircir ces points encore obscurs. De plus, KIM et HENRIQUEZ  
(1978)<sup>52</sup> pensent que les études chimiques de l'agar extrait de pieds, de pha-  
ses génétiques différentes, contribueront à augmenter les rendements en colloï-  
de et à obtenir un produit plus homogène. Ceci répondrait aux problèmes des  
industriels.

DEUXIEME PARTIE

## CHAPITRE II

### MATERIEL ET METHODES

Nous avons choisi d'étudier l'agar-agar d'une seule espèce agarophyte, la Gracilaire. De cette manière, nous nous sommes affranchi du problème posé par les mélanges d'algues qui servent en fait à l'extraction du colloïde. Nous sommes ainsi sûr de bien maîtriser les variables que nous voulons mettre en évidence.

## II<sub>1</sub> - L'ALGUE - BIOLOGIE DE GRACILARIA VERRUCOSA

L'agarophyte qui nous a servi dans toutes nos manipulations a donc été exclusivement le *Gracilaria verrucosa* (Huds.)<sup>47</sup> Papenfuss<sup>69</sup> (1950). C'est une Rhodophycophyte, de l'ordre des Gigartinales et de la famille des Gracilariacées.

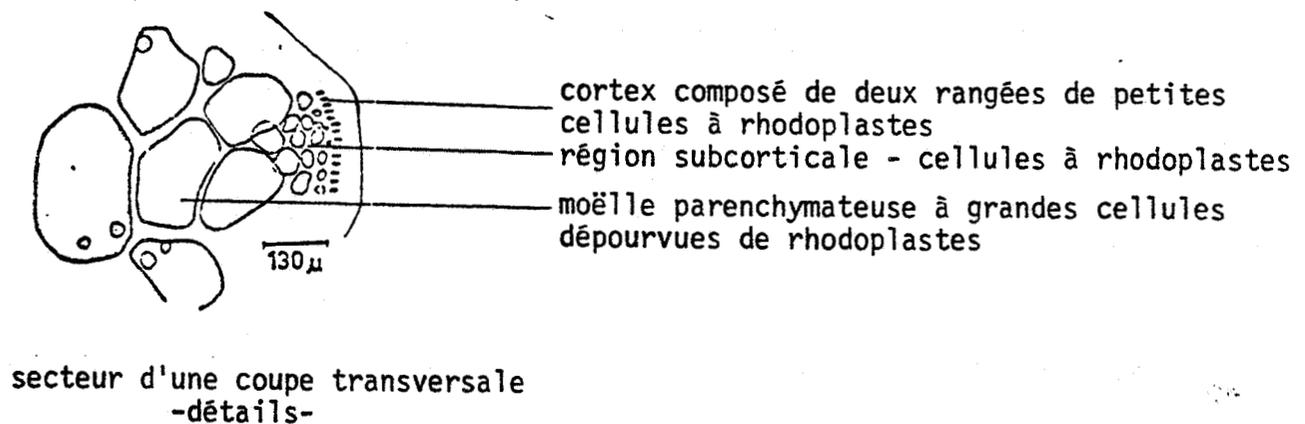
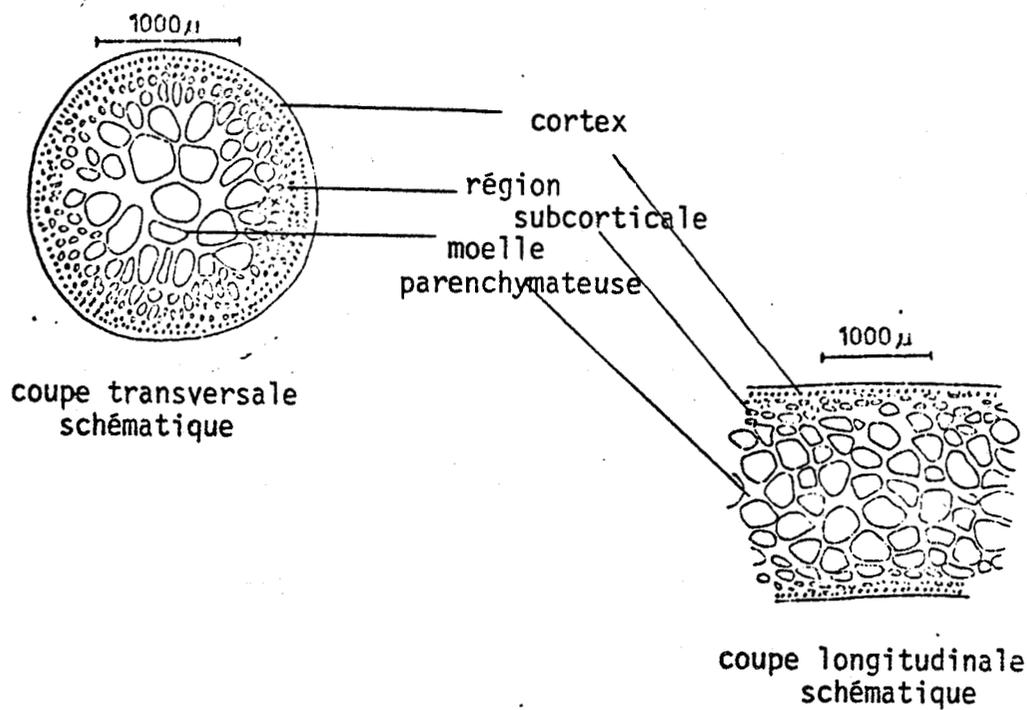
Le thalle de *G. verrucosa* est constitué de frondes cylindriques d'une longueur comprise entre 5 et 20 cm. Les rameaux primaires portent des rameaux secondaires et tertiaires de même forme. L'ensemble est fixé par un disque sur un substrat rocheux.

Du point de vue anatomique, l'algue présente, en coupe, une zone centrale ou moelle parenchymateuse, composée de grandes cellules sans plaste apparent, une région subcorticale contenant des rhodoplastes et enfin un cortex composé de deux rangées de petites cellules possédant également des rhodoplastes (fig. 7).

C'est une algue dioïque dont le cycle est trigénétique, haplodiplophasique. Les organes reproducteurs mâles se forment dans des cryptes ménagées (fig. 8) dans la région corticale du thalle. Chaque conceptacle est tapissé de cellules qui se développent en spermatocystes. A maturité, chaque spermatocyste libère une spermatie (aplanogamète) qui sort du conceptacle par un ostiole. Ce sont ces spermaties qui fécondent le gamète femelle. Les thalles femelles portent le carpogone, cellule gamétique femelle, enfermé dans un ensemble de

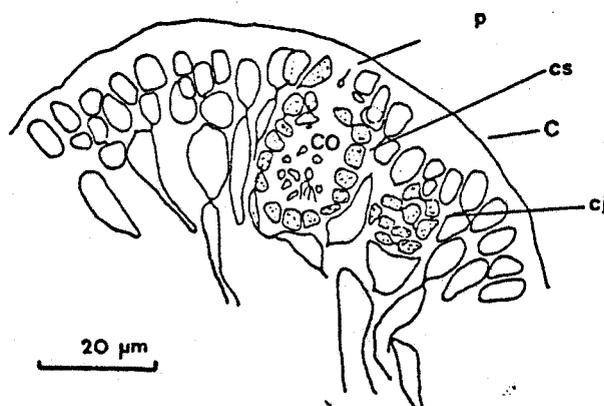
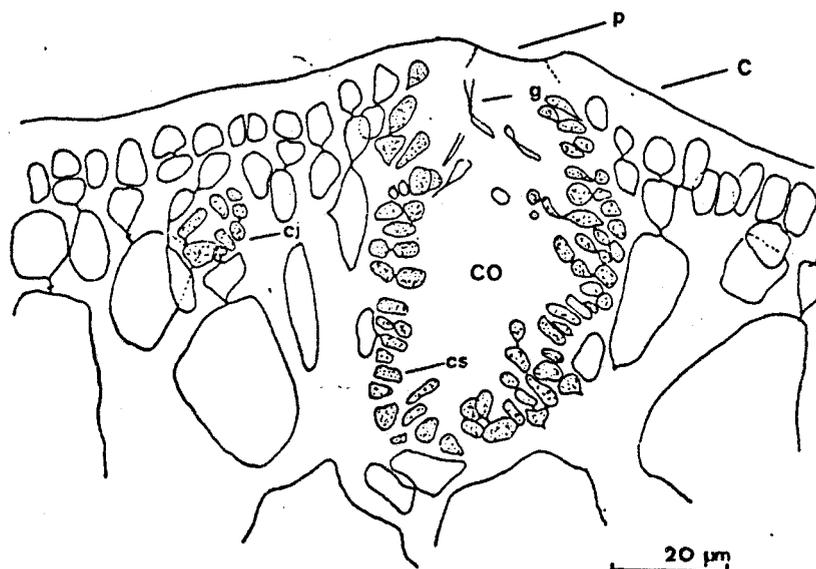
FIGURE 7

COUPES TRANSVERSALES ET LONGITUDINALE D'UNE FRONDE  
DE GRACILARIA VERRUCOSA (d'après KIM 1970)<sup>51</sup>



## FIGURE 8

COUPESTRANSVERSALES D'UN CONCEPTACLE MÂLE  
DE *GRACILARIA VERRUCOSA* (d'après KLING 1978)<sup>52bis</sup>



- Légende :
- p - pore
  - cs - cellule-mère de spermatocyste
  - cj - stade jeune d'un conceptacle
  - c - cortex
  - co - conceptacle adulte



rameaux de cellules auxiliaires banales. Après fécondation, ces cellules auxiliaires, reliées au zygote diploïde, sont à l'origine du gominoblaste ou carposporophyte, qui conduit à la formation d'une verrue globuleuse appelée cystocarpe.

Le carposporophyte, qui vit en épiphyte sur le thalle femelle, individualise des carposporocystes qui, à maturité, libèrent des carpospores diploïdes. Ces carpospores, en germant, donnent naissance à la 3ème génération : le tétrasporophyte. Ce thalle, à maturité, forme des tétrasporocystes, où a lieu la méiose qui conduit à la formation de tétraspores haploïdes (fig. 9). Ce sont celles-ci qui engendrent les pieds mâles et femelles haploïdes (fig. 10).

Le *G. verrucosa* est une algue représentée dans presque tous les océans et mers du globe. Il se rencontre sur les côtes françaises, et en particulier, pour notre région, sur la côte ouest de la Manche (de Boulogne au Cap Gris-Nez). On le trouve en abondance, à l'étage médiolittoral, dans des cuvettes sablonneuses à substrat rocheux qui retiennent l'eau à marée basse.

L'étude que nous avons entreprise dans le cadre de ce mémoire a été menée sur un cycle d'un peu plus d'un an. Elle porte sur une cinquantaine de pieds de *Gracilaria verrucosa* choisis au hasard et récoltés tous les trois mois au Cap Gris-Nez dans le Nord de la France. Les échantillons étaient immédiatement congelés pour préserver l'intégrité biochimique et décongelés au fur et à mesure des besoins.

Une coupe transversale d'un fragment d'algue réalisée au microtome à congélation, permet de déterminer le type de thalle en repérant l'existence de tétrasporocystes ou de cryptes mâles dans les tissus. La présence de cystocarpes, visibles à l'oeil nu, est suffisante pour classer les pieds femelles.

FIGURE 9

COUPE TRANSVERSALE D'UNE FRONDE D'UN THALLE TETRASPOROPHYTIQUE  
DE *GRACILARIA VERRUCOSA* (d'après KLING 1980, comm. pers.)

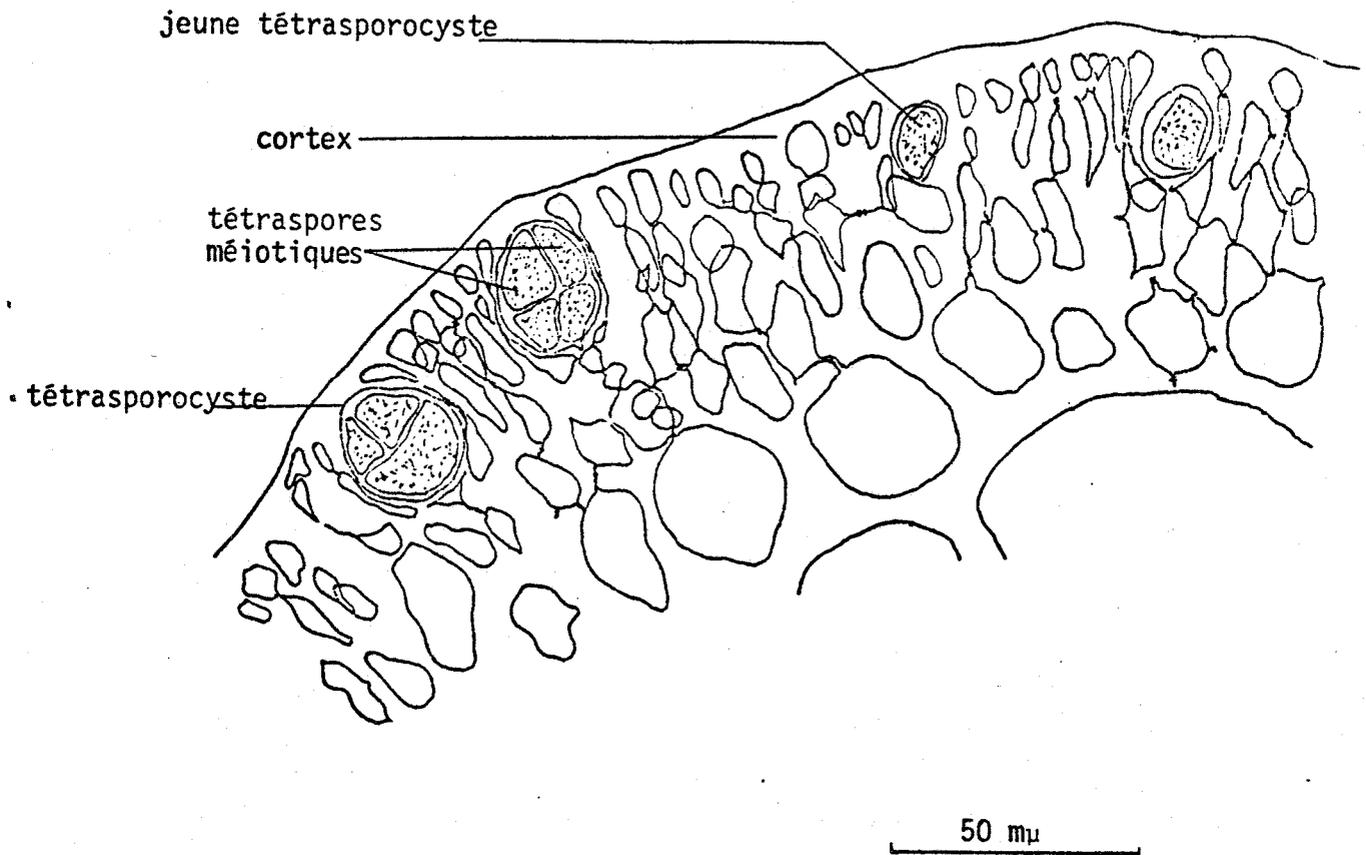
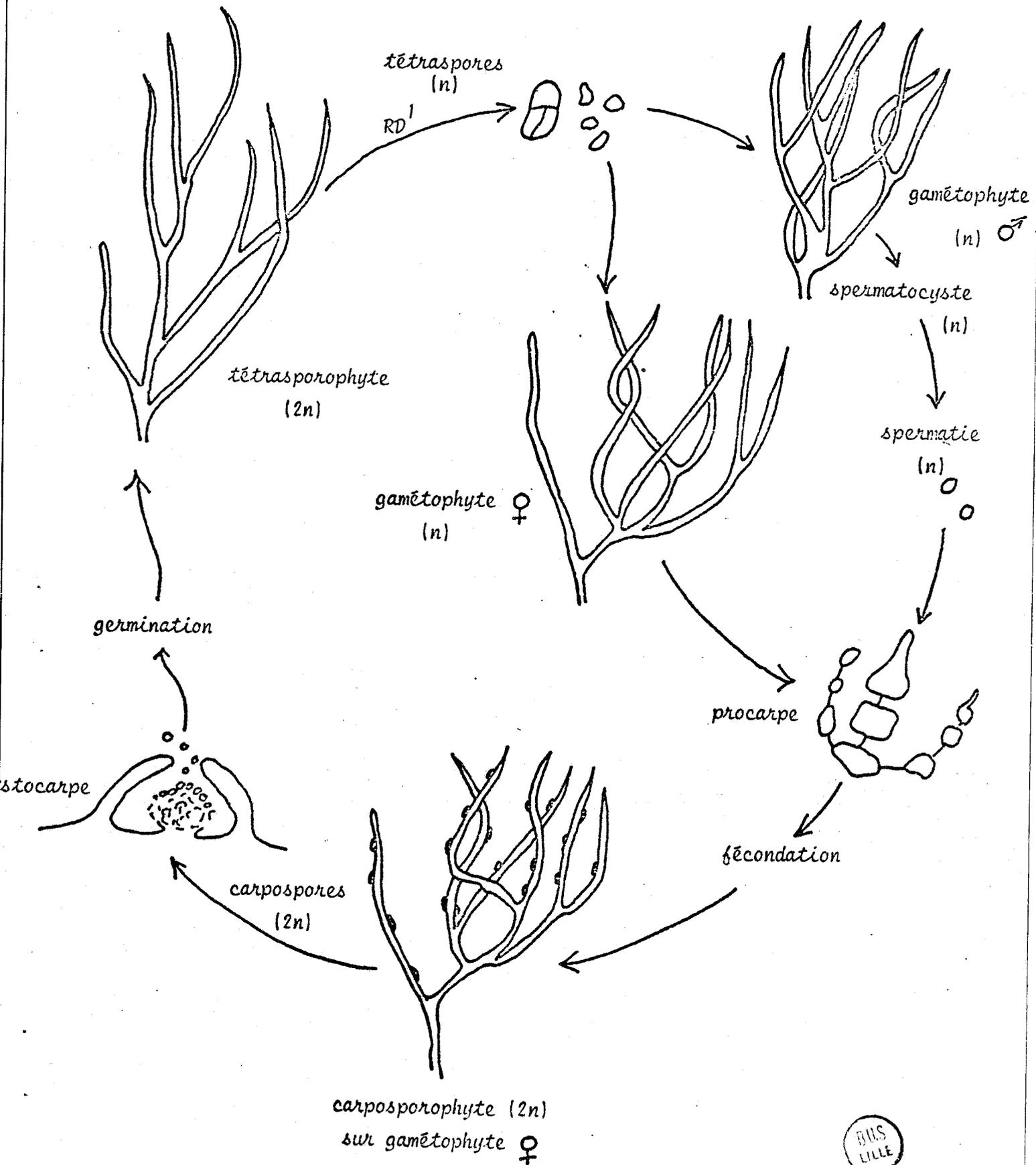


FIGURE 10



CYCLE BIOLOGIQUE DE GRACILARIA  
 (d'après KIM 1970)<sup>51</sup>

<sup>1</sup> réduction chromatique

L'échantillon, épongé de son eau à l'aide d'un papier buvard, est pesé, et une part aliquote est prélevée ; elle nous servira à mesurer le poids sec de l'algue. Celui-ci est déterminé en repesant cette part après l'avoir laissée 24 h dans une étuve à 100°C. Il sera exprimé en pourcentage de matière sèche par rapport à la matière fraîche.

## II<sub>2</sub> - EXTRACTION DE L'AGAR-AGAR

L'extraction proprement dite a subi quelques modifications par rapport à celle décrite dans une précédente publication (BODARD et CHRISTIAEN 1978a)<sup>23</sup> Nous avons préféré une méthode plus douce, de manière à préserver le plus possible l'intégrité de la molécule d'agar que nous aurons à étudier par la suite.

L'algue est lavée abondamment à l'eau distillée de façon à éliminer les impuretés (sable, coquilles, etc...) et les sels. Un passage dans l'alcool bouillant et l'acétone doit solubiliser une partie des graisses (MOLLION<sup>64</sup> 1977) et une grande fraction des pigments.

L'agar est extrait par l'eau distillée à 100°C, remuée constamment à l'aide d'un agitateur mécanique pendant six heures. La décoction est ensuite filtrée sur un tissu propre et le filtrat subira deux congélations-décongélations pour purification. Le reliquat est repris par l'alcool absolu dans lequel on le pulvérise à l'aide d'un mixer et qui le déshydrate. On recueille l'agar en poudre sur le filtre en verre frité (n°3) d'un büchner sur lequel il sera lavé par l'alcool puis par l'acétone. Le produit sec, pesé, servira à calculer le rendement de l'extraction qui sera exprimé en pourcentage d'agar sec par rapport à la masse d'algue sèche utilisée.

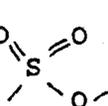
## II3 - SPECTRES INFRA-ROUGES

L'étude des spectres infra-rouges est une méthode simple et pratique pour déterminer le type de carragenane ( $\lambda$ ,  $\kappa$ ,  $\iota$ ). Nous avons voulu voir ce qu'il en était des agars et si cette technique nous permettrait de séparer quelques types d'agar en fonction de leurs caractéristiques chimiques et de leurs réponses en infra-rouge.

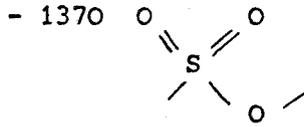
Les films d'agar sont obtenus en versant quelques gouttes d'une solution concentrée d'agar dans un petit récipient dont le fond est rempli de mercure. Le tout est mis à l'étuve à 60°C ; l'eau s'évapore et l'on obtient un film d'agar sec qui repose à la surface du mercure sans y adhérer. Ce film est placé sur un portoir à fenêtre que l'on introduit dans un spectrophotomètre Perkin Elmer. On laisse défiler les longueurs d'ondes de  $4\ 000\text{ cm}^{-1}$  à  $600\text{ cm}^{-1}$ . Le spectre d'absorption est enregistré sur papier.

Les pics obtenus sont comparés à ceux des carragenanes trouvés dans la littérature (CROSS 1964)<sup>27</sup> :

- 750-730 liaison C-S, TORRES POMBO (1972)<sup>92</sup>
- 805-810  $\text{SO}_4$  axial en  $\text{C}_2$  du 3,6 anhydrogalactose, ANDERSON *et coll.* (1968c)<sup>5</sup>
- 820  $\text{SO}_4$  équatorial en  $\text{C}_6$  du galactose
- 830  $\text{SO}_4$  axial en  $\text{C}_6$  du galactose
- 850  $\text{SO}_4$  axial en  $\text{C}_4$ , LLOYD *et coll.* (1961)<sup>57</sup>
- et liaison C-O-S, AKAHANE et IZUMI (1976)<sup>1</sup>
- 930 pont 3,6 anhydro du galactose, STANLEY (1963)<sup>87</sup>
- 1010-1050 liaison C-O axial, AKAHANE et IZUMI (1976)<sup>1</sup>
- 1060-liaison C-S, CROSS (1964)<sup>27</sup>
- 1070 pont 3,6 anhydro du galactose, STANLEY (1963)<sup>87</sup>
- 1180  $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ , CROSS (1964)<sup>27</sup>



- 1250 S = O, AKAHANE et IZUMI (1976)<sup>1</sup>



- 1410 S-O

- 1540 déformation due à la fonction NH<sub>2</sub>

- 1640 liaison CO-NH

- 1750 liaison C-O

- 2830-2815 liaison O-CH<sub>3</sub>

27  
CROSS (1964)

## II<sub>4</sub> - ANALYSES BIOCHIMIQUES

Dans cette étude nous avons voulu apprécier qualitativement et quantitativement l'ensemble des composés qui entrent dans la constitution de la molécule d'agar. Les méthodes que nous avons utilisées vont des dosages centésimaux aux chromatographies sur papiers ou en phase gazeuse.

### II<sub>41</sub> - DOSAGE DES SUCRES TOTAUX

La teneur en glucides des extraits obtenus a été estimée par la méthode colorimétrique à l'orcinol sulfurique (TILLSMAN J., PHILIPPI K. modifiée RIMINGTON *in* MONTREUIL et SPIK 1963<sup>65</sup>, TILLSMAN J., PHILIPPI K. 1929<sup>90</sup>; RIMINGTON C. 1931<sup>82</sup>). L'agar étant essentiellement composé de galactose et de 3,6 anhydrogalactose, du galactose (200 microgrammes par millilitre) est utilisé comme témoin.

## II<sub>42</sub> - DOSAGE DU 3,6 ANHYDROGALACTOSE

Le dosage colorimétrique du 3,6 anhydrogalactose, décrit par YAPHE en 1960<sup>101</sup> et modifié par REES en 1961,<sup>78</sup> s'appliquait, en particulier, aux carraghenanes. Nous nous sommes demandé si les conditions d'hydrolyse de cette méthode convenaient encore pour libérer le maximum de 3,6 anhydrogalactose de l'agar-agar. Ce polysaccharide a, en effet, une composition chimique voisine des carraghenanes, mais la proportion en esters sulfates est moindre. Les associations des chaînes d'agar sont ainsi plus nombreuses et plus denses, et devraient donc offrir plus de résistance à l'hydrolyse.

Nous avons repris le protocole expérimental du dosage de 3,6 anhydrogalactose par le résorcinol et nous avons fait varier le temps d'hydrolyse entre 10 et 30 mn, la température du bain-marie restant fixée à 80°C.

Nous avons ainsi testé trois de nos échantillons d'agar, extraits de *Gracilaria verrucosa* par le procédé que nous avons décrit dans une précédente publication (BODARD et CHRISTIAEN 1978a)<sup>23</sup>.

Le tableau 1 et la figure 11 montrent les réponses colorimétriques lues à 550 nm sur un spectrocolorimètre.

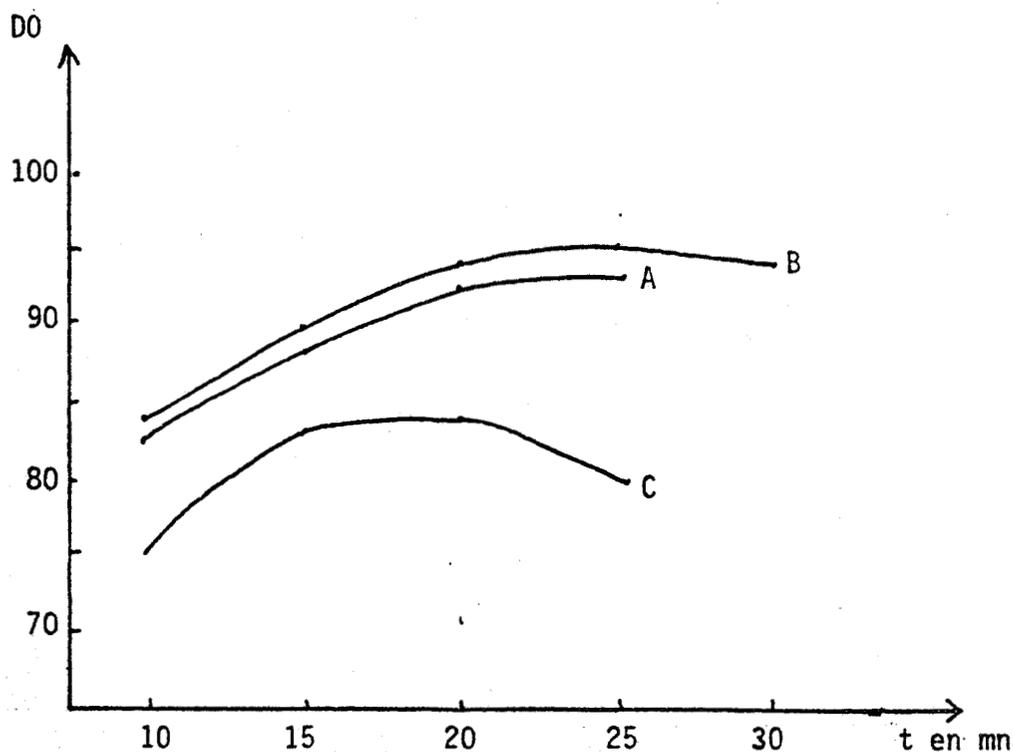
TABLEAU 1

DENSITES OPTIQUES DES ECHANTILLONS D'AGAR TESTES  
PAR LA METHODE DE REES (1961)<sup>78</sup>  
EN FONCTION DU TEMPS D'HYDROLYSE

Temps d'hydrolyse	Agar		
	A	B	C
10'	83	83	75
15'	88	90	82,5
20'	92	94	83
25'	92	95	78
30'	--	93	--

FIGURE 11

COURBES SUIVANT LA LIBERATION DU 3,6 ANHYDROGALACTOSE  
(EN UNITE D.O.) EN FONCTION DU TEMPS D'HYDROLYSE



Il semble donc, à la lecture de ces résultats, qu'au temps  $t = 10$  mn la totalité du 3,6 anhydrogalactose des agars n'est pas libérée. L'intensité de la coloration est croissante jusque 20 mn d'hydrolyse. Au delà nous constatons un plateau pour les échantillons A et B et une chute pour le C.

Ceci coïncide avec ce que la structure de la molécule d'agar nous laissait supposer. En conséquence nous préconisons un temps de traitement par l'acide au bain-marie de 20 mn de manière à avoir une libération plus complète du 3,6 anhydrogalactose.

II<sub>43</sub> - DOSAGE DES SULFATES

Le dosage des sulfates d'un agar est particulièrement délicat car la molécule est faiblement substituée en esters sulfates. Après avoir hydrolysé nos produits par HCl 1N, 1 heure à 100°C, les avoir séchés et repris deux fois par l'éthanol, nous avons essayé trois techniques de dosages : par néphélométrie, par le chloranilate de baryum et par le rhodizonate de sodium.

- Méthode néphélométrique décrite par DE LESTANG et QUILLET (1974)<sup>53</sup> :

- . une solution d'agar est préparée en dissolvant 100 mg de produit dans 10 ml d'eau distillée. De façon à ne pas perdre de produit et à éviter toute évaporation le mélange est porté à 100°C dans un tube scellé ;
- . on prélève ensuite 0,2 ml de la solution (soit 2 mg d'agar) qu'on étend à 10 ml en ajoutant de l'eau distillée par fractions à l'aide de la même pipette de manière à recueillir la totalité du prélèvement ;
- . l'hydrolyse se fait en présence d'acide chlorhydrique concentré sur 0,2 ml de solution (soit 0,2 mg d'agar), une heure à 100°C. On ajoute quelques gouttes d'acide perchlorique afin de dissoudre le sulfate de calcium susceptible de se former ;
- . lorsque le chlorure de baryum est ajouté, il se forme un précipité dont on mesure, très précisément, le trouble qu'il forme au néphélomètre et que l'on compare à des solutions témoins.

Cette technique, simple et précise qui m'a été enseignée par QUILLET lors d'un stage d'études dans son Laboratoire, n'a pu être reproduite à Lille faute d'appareil adapté.

- Détermination colorimétrique des sulfates avec le chloranilate de baryum  
(BERTOLACINI et BARNEY 1957)<sup>21</sup> :

Réactifs :

- . Préparation du chloranilate de baryum : 1 volume d'acide chloranili-  
que à 0,1 % dans l'eau est mélangé à 1 volume de chlorure de baryum  
à 5 % pendant une nuit à température ambiante. Le précipité est lavé  
à l'eau jusqu'à ce que le surnageant soit libre d'ions  $\text{Cl}^-$  (estimé  
par le nitrate d'argent). L'eau est éliminée en trois fois par centri-  
fugation ou filtration sur tube d'Alish. On lave par l'acétone puis  
par l'alcool propylique à 80 % redistillé. La poudre est séchée à  
l'éther, sous vide. Le produit est à conserver au sec et à l'abri de  
la lumière.
- . Suspension de chloranilate de baryum : la suspension, préparée extem-  
poranément, se fait dans 8 millilitres de propanol bidistillée par  
prise d'essais, avec 3 à 8 milligrammes de chloranilate de baryum. L'é-  
quilibre est réalisé après 20 mn d'agitation.
- . Tampon pH 4 : on mélange 16,4 millilitres d'une solution stock d'aci-  
de acétique M/2 à 3,6 millilitres d'une solution stock d'acétate de  
sodium M/2. On prévoit 1 millilitre de tampon par prise d'essais.
- . Solution étalons : les solutions étalons sont préparées à partir de  
sulfate de sodium ou de potassium séché à 400°C, 0,1 molaire. On dilue  
cent fois peu avant l'emploi.
- . Mode opératoire : le mode opératoire est résumé dans le tableau sui-  
vant (tableau 2) :

TABLEAU 2

MODE OPERATOIRE DE LA DETERMINATION COLORIMETRIQUE  
DES SULFATES AVEC LE CHLORANILATE DE BARIUM  
(d'après BERTOLACINI et BARNEY 1957)<sup>21</sup>

	Solution à doser	Etalons internes		Solution à doser	Blanc
solution à doser	0,1 ml (10 à 20 µg)	0,1 ml (10 à 20 µg)	0,1 ml (10 à 20 µg)	0,2 ml (20 à 40 µg)	-
solution à doser	-	0,05 ml (10 µg)	0,1 ml (20 µg)	-	-
eau	0,9 ml	0,85 ml	0,8 ml	0,8 ml	1 ml
tampon pH 4	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
suspension chloranilate de baryum	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml
<hr/>					
Total	10 ml (10 à 20 µg)	10 ml (20 à 30 µg)	10 ml (30 à 40 µg)	10 ml (20 à 40 µg)	10 ml (0 µg)

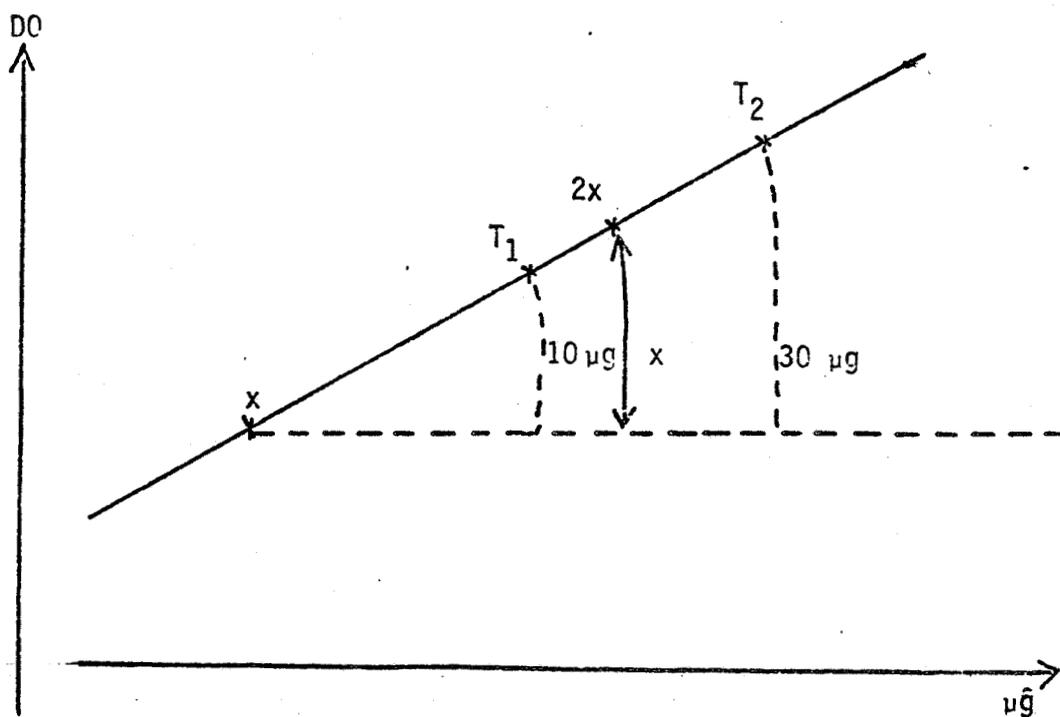
Les flacons sont agités pendant 45 mn, de façon régulière et strictement identique, sinon la réaction n'est pas homogène. Pour séparer le surnageant nous avons préféré la filtration sur papier sans cendre à la centrifugation qui ne sépare pas quantitativement et où l'adjonction de détergeant nuit au développement de la coloration. La lecture se fait immédiatement au spectromètre ultra-violet à 310 nm, dans des cuves en quartz très propres. Les résultats sont consignés dans le tableau 3.

Calculs :

Nous avons utilisé pour le calcul de la teneur en sulfates (x), la méthode du témoin interne. On peut évaluer le nombre d'unités de densité optique correspondant à x en calculant la différence de densité optique entre une prise d'essai de 2x et une autre de x. La même opération effectuée pour une prise d'essai de x plus une quantité connue de sulfate T<sub>1</sub>

$(x + T_1)$ , nous permet de connaître la valeur en  $\mu\text{g}$  de sulfate d'une unité de densité optique. De là, on déduit celle de  $x$  (fig. 12).

FIGURE 12  
METHODE GRAPHIQUE DE CALCUL DE LA QUANTITE DE SULFATES  
PAR LA TECHNIQUE DU TEMOIN INTERNE



Résultats :

TABLEAU 3  
RESULTATS DES DOSAGES DE SULFATES PAR LA  
METHODE DE BERTOLACINI ET BARNEY 1957<sup>21</sup>

Echantillons	1er essai	2ème essai	3ème essai
1 (200 $\mu\text{g}$ )	12,4 $\mu\text{g}$ 6,2 ‰	12,1 $\mu\text{g}$ 6,05 ‰	13 $\mu\text{g}$ 6,5 ‰
2 (200 $\mu\text{g}$ )	3,1 $\mu\text{g}$ 1,7 ‰	2,9 $\mu\text{g}$ 1,5 ‰	2,7 $\mu\text{g}$ 1,4 ‰
3 (200 $\mu\text{g}$ )	2,5 $\mu\text{g}$ 1,3 ‰	1,94 $\mu\text{g}$ 1,95 ‰	2,73 $\mu\text{g}$ 1,4 ‰
4 (200 $\mu\text{g}$ )	3,8 $\mu\text{g}$ 1,9 ‰	4,1 $\mu\text{g}$ 2,05 ‰	4,2 $\mu\text{g}$ 2,1 ‰
Blanc	25 DO	25 DO	23 DO

La méthode décrite est donc reproductible et les résultats sont comparables à ceux rencontrés dans la littérature et obtenus par l'application de la technique décrite par JONES et LETHAM (1954)<sup>50</sup>, mais son prix de revient est trop élevé pour des dosages fréquents. Ces résultats sont aussi comparables à ceux que nous avons nous-même obtenus lors de notre D.E.A. par l'utilisation du rhodizonate (TERHO et HARTIALA 1971)<sup>89</sup>. C'est cette dernière méthode que nous avons finalement retenue car, plus simple dans le mode opératoire, elle se prête davantage à des répétitions et évite les causes d'erreurs.

## II<sub>44</sub> - DOSAGE DES ACIDES URONIQUES

ARAKI (1966)<sup>16</sup> signalait la présence d'acides uroniques dans ses échantillons. On sait (DUCKWORTH et YAPHE 1971)<sup>32</sup> que des groupements chargés tels que les carboxyls, peuvent nuire à la formation des mailles dans le gel. Nous avons d'abord tenté d'apprécier la quantité de radicaux carboxyls libérés lors de la dégradation du polysaccharide par l'acide chlorhydrique à 12 % (méthode manométrique inspirée des travaux de DICKSON *et coll.* 1930<sup>29</sup>, TOLLENS et LEFEBVRE 1892<sup>91</sup>, TRACEY 1948<sup>93</sup>, MAHER 1949<sup>58</sup>, ANDERSON et McLAGAN 1955<sup>2</sup>, adaptée par QUILLET à son Laboratoire, comm. pers).

On hydrolyse 150 mg d'agar par l'acide chlorhydrique à 12 % dans un ballon que l'on chauffe doucement, en présence de cuivre qui joue le rôle de régulateur. On refroidit les vapeurs à l'aide d'un réfrigérant et les gaz volatils sont entraînés par un courant d'azote. On piège le CO<sub>2</sub> qui se forme par une ponce sulfurique, dans un tube en U, pesé avant et après l'opération. L'augmentation du poids correspond à la quantité de CO<sub>2</sub> libérée.

Pour 150 mg d'agar, nous avons après 2 h 30 d'hydrolyse 0,4 mg de CO<sub>2</sub>. Au bout de 24 h nous pesions 1,9 mg, quantité qui demeure inchangée après 35 h

d'hydrolyse. Cette valeur correspondrait à 5,06 % de lactone uronique ou à 2,53 % d'acide pyruvique.

Cependant, cette méthode se prête mal à une analyse de routine et nécessite des quantités élevées de substance. D'autre part, SAVARD *et coll.* (1957)<sup>83</sup> ont signalé l'interférence des hexoses dans le développement de la réaction. L'hydrolyse étant longue, la formation de CO<sub>2</sub> à partir des oses neutres, bien que plus tardive, peut fausser nos résultats. Néanmoins, cette technique nous a permis d'avoir une idée de la teneur en carboxyls. Nous avons par la suite procédé à des dosages colorimétriques par le carbazol (DISCHE 1947)<sup>30</sup>. Comme les hexoses donnent, avec le réactif au carbazol sulfurique, une coloration jaunâtre qui interfère avec celle des acides uroniques, nous avons appliqué une formule de correction (MONTREUIL *et SPIK* 1963)<sup>65</sup> :

$$\frac{\beta a - \alpha d}{\frac{ca}{50} - \frac{hd}{200}} : 1\ 000$$

- où  $\beta$  = absorbance de 1 ml de la solution à doser avec le carbazol  
 $a$  = absorbance de 200 $\mu$ g d'oses avec l'orcinol sulfurique (II<sub>461</sub>)  
 $\alpha$  = absorbance de 1 ml de la solution à doser avec l'orcinol sulfurique  
 $d$  = absorbance de 200 $\mu$ g d'oses avec le carbazol sulfurique  
 $c$  = absorbance de 50 $\mu$ g d'acides uroniques avec le carbazol sulfurique  
 $b$  = absorbance de 200 $\mu$ g d'acides uroniques avec l'orcinol sulfurique

## II<sub>45</sub> - DOSAGE DES PROTEINES ET ANALYSE DES ACIDES AMINES

Il a toujours été considéré que les protéines contenues dans les colloïdes étaient des impuretés nuisibles à la qualité du gel. Nous avons mesu-

ré le taux protéique par la méthode de LOWRY *et coll.* (1951)<sup>55</sup>.

Mais la présence d'une glucosamine repérée en phase gazeuse suggère la révision de nos conceptions sur la structure moléculaire de l'agar-agar. Nous avons donc tenté d'analyser la composition en acides aminés de la phase protéique de nos produits.

1,5 mg de poudre d'agar est hydrolysé par l'acide chlorhydrique 5,6N, en présence de 50 g d'un témoin interne norleucine, utilisé comme témoin interne, pendant 24 h à 100°C. L'hydrolysate neutralisé par la soude est évaporé à sec pendant une nuit. L'analyse des acides aminés est réalisée à l'autoanalyseur Beckman multichron, de l'Institut du Cancer à Lille.

## II<sub>46</sub> - DOSAGE DE LA GLUCOSAMINE

La trace de glucosamine repérée en chromatographie en phase gaz (II<sub>4</sub>) a pu être confirmée par un dosage centésimal.

Les hexosamines sont déterminées par la méthode d'ELSON et MORGAN (1933)<sup>35</sup> qui repose sur l'observation faite par PAULY et LUDWIG (1922)<sup>70</sup> selon laquelle la glucosamine en milieu alcalin donne avec l'acétyl acétone un chromogène qui réagit avec le réactif d'Erlich (solution chlorhydrique de para-diméthyl-amino-benzaldéhyde) pour donner une coloration rouge-violacé.

Cependant, la méthode n'est applicable qu'aux osamines libres. Nous avons suivi le protocole d'hydrolyse proposé par MONTREUIL et SPIK (1963)<sup>65</sup> qui ont pu vérifier que la libération des osamines était généralement complète après une hydrolyse de 4 h avec l'acide chlorhydrique 4N. L'action de l'acétyl acétone doit être effectuée dans des conditions rigoureuses de pH. On neutralise donc par la soude ou on élimine l'HCl sous vide, en présence d'éthanol.

## II5 - CHROMATOGRAPHIES

Une analyse qualitative de nos produits était nécessaire pour connaître les composés susceptibles de varier d'un échantillon à l'autre. Nous avons donc réalisé des chromatographies sur papier et en phase gaz.

II<sub>51</sub> - CHROMATOGRAPHIES SUR PAPIER

Chromatographie sur papier après hydrolyse sulfurique: (Méthode SEAMAN et coll. 1954)<sup>84</sup>

- on réalise une hydrolyse sur 10 mg de produit par 1 ml d' $H_2SO_4$  72 % en poids pendant 5 mn à température ambiante puis à 100°C pendant 6 h en ramenant l'acide à la normalité. On neutralise par la Barite. Le précipité est centrifugé et lavé deux fois. La solution est concentrée et on dépose 100  $\mu$ l sur le papier.

La chromatographie se déroule pendant une nuit avec le solvant :  
pyridine 5 v/Acétate d'éthyle 5 v/Acide acétique 1 v/eau 3 v. (5/5/1/3).  
On révèle les sucres par l'oxalate d'aniline et les osamines par la ninhydrine.

Comme la glucosamine repérée en phase gaz n'est pas apparue sur le chromatogramme, nous avons utilisé une autre technique d'hydrolyse :

- on hydrolyse par 1 ml d'acide trifluoroacétique 4 N pendant 4 h à 100°C sur 10 mg de produit. On évapore à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif et on reprend 2 à 3 fois par l'éthanol. Le résidu sec est remis en solution dans 100  $\mu$ l d' $H_2O$  et on dépose 30  $\mu$ l sur papier Whatman. La chromatographie est une 5/5/1/3, dans le système solvant de Partridge.

## II<sub>52</sub> - CHROMATOGRAPHIES EN PHASE GAZEUSE

400 à 500 µg d'agar lyophilisé sont chromatographiés en phase gaz après avoir été méthanolysés et rendus volatils par trifluoroacétylation (ZANETTA *et coll.* 1972)<sup>105</sup>. Nous avons obtenu un chromatogramme sur lequel nous avons pu repérer, par rapport au témoin méso-inositol, les pics correspondant au galactose. Il nous servira de référence.

Le mode opératoire est le suivant :

- 500 µg d'agar sont méthanolysés en présence de 50 µg de méso-inositol par 1 ml de mélange méthanol chloridrique 0,5 M à 80°C pendant 24 h ;
- après séchage sous azote, le résidu est trifluoroacétylé par 400 µl du mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ATFA (volume/volume) à 150°C pendant 5 mn ;
- après refroidissement, le trifluoroacétylat est réchauffé 5 minutes à 150°C (ZANETTA *et coll.* 1972)<sup>105</sup> ;
- les méthylglycosides trifluoroacétylés sont ensuite analysés en chromatographie en phase gazeuse sur colonne de silicone OV210 à 5 % sur Varaport 30, température programmée de 110°C à 220°C à raison de 2°C par minute, sous un débit de gaz vecteur (azote) de 10 ml/minute.

De façon à identifier les pics inconnus, nous avons réalisé une première chromatographie en injectant un mélange de 7 µl d'agar trifluoroacétylé et de 3 µl d'un témoin 6-O-méthyl-galactose trifluoroacétylé. Les pics dont la hauteur augmente correspondent donc à ceux du 6-mono-méthyl-galactose.

Dans le même esprit, nous avons tenté de situer les pics du 3,6 anhydrogalactose sur le chromatogramme de référence. Pour cela, nous avons traité notre produit par la soude à 1,5 % portée à 90°C pendant 3 h. On sait, en effet, depuis ARAKI (1966)<sup>16</sup> que le sulfate en C<sub>6</sub> du galactose est labile en milieu alcalin et qu'un pont 3,6 anhydro se forme. La chromatographie ré-

vèle des pics dont la hauteur augmente sensiblement par rapport à notre témoin. On en déduit qu'ils correspondent au 3,6 anhydrogalactose.

## II<sub>6</sub> - PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

### II<sub>61</sub> - DETERMINATION DE LA FORCE DU GEL

Il existe différentes méthodes de détermination de la force du gel. Le principe est toujours le même : mesure de la force de pression nécessaire pour briser un gel, dans les conditions suivantes :

- concentration : 1,5 %
- épaisseur : 3 cm
- température : 20°C
- temps d'application de la force de pression : 20 secondes

Une solution d'agar à 1,5 % est préparée par dissolution (KIM 1970)<sup>51</sup> dans de l'eau bouillante pendant 30 mn, puis versée dans un récipient et laissées à refroidir à 20°C pendant 15 heures pour obtenir la pleine force du gel. Des témoins du commerce : Prolabo et Difco pour électrophorèse, ont été pris comme référence.

Ne possédant pas de gélo-mètre Mikkansui Shiki, nous avons utilisé une balance Roberval. D'un côté nous plaçons notre solution d'agar à tester, de l'autre nous équilibrons. Nous ajustons à la surface du gel une tige de 1 cm<sup>2</sup>, fixée à une potence indépendante de la balance et nous ajoutons progressivement des poids du côté de la tare. Un délai de 20 secondes est respecté entre chaque addition de poids.

La force du gel s'exprime donc en g/cm<sup>2</sup> pour une durée de 20 secondes.

## II<sub>62</sub> - MESURE DE LA VISCOSITE

ELLIOT et GANZ (1975)<sup>34</sup> utilisent un rhéogoniomètre, à configuration cône-plan, pour caractériser des gels de carraghenane à 25°C.

Les agars ayant des propriétés voisines des carraghenanes, nous avons mesuré la viscosité de nos gels à l'aide d'un rotovisco Haake, du Laboratoire de Chimie macromoléculaire de Monsieur le Professeur LOUCHEUX à Villeneuve d'Ascq. WHYTE et ENGLAR (1976)<sup>97</sup> testent des solutions aqueuses d'agar à 1 % à la température de 65°C. C'est la méthode que nous avons utilisée.

La viscosité est calculée d'après la formule suivante :

$$\eta = \frac{M}{4\pi h\Omega} \frac{R_i^2 - R_a^2}{R_i^2 R_a^2}$$

où M = moment des forces d'entraînement (g/cm)

Ω = vitesse angulaire du corps tournant (rd/s)

h = longueur du corps tournant (cm)

R<sub>i</sub> = rayon du corps tournant

R<sub>a</sub> = rayon du godet de mesure (cm)

M est déterminé en étalonnant l'appareil avec des poids correspondant aux déviations de l'aiguille de mesure.

## II<sub>63</sub> - DETERMINATION DU POINT DE GELIFICATION

Il existe au moins deux méthodes simples pour déterminer le point de gélification d'un agar (KIM 1970)<sup>51</sup>. La température de gélification peut être mesurée au moment où le viscosimètre commence à ralentir sa rotation. Mais on peut également la mesurer en utilisant des tubes de 15 mm de diamètre et de 120 mm de long, contenant 10 ml d'une solution d'agar à une concentration déterminée. Les tubes sont inclinés légèrement et placés à 20°C. Le point

de gélification est la température à laquelle la surface de la solution d'agar forme une semi-solide. Cette méthode utilisée par WHYTE et ENGLAR (1976)<sup>97</sup> est également celle que nous avons suivie.

## II<sub>64</sub> - DETERMINATION DU POINT DE FUSION (KIM 1970)<sup>51</sup>

Des tubes à essais (12 mm/150 mm) contenant 5 ml d'agar à 2 % sont laissés toute une nuit entre 2 et 12°C. La prise en gel a lieu avec un thermomètre placé dans les tubes. Des petits trous sont réalisés à la surface du gel et les tubes sont placés dans un bain-marie dont la température croît à raison de 1°C/mn. Le point de fusion est la température à laquelle les trous sombrent en phase liquide.

## II<sub>7</sub> - TEST RAPIDE POUR ÉVALUER LE RENDEMENT EN AGAR SANS PASSER PAR L'EXTRACTION

Une des préoccupations du Laboratoire d'Algologie, compte tenu de nos premiers résultats, est de sélectionner des pieds de *Gracilaria verrucosa* ayant un taux de croissance élevé et un rendement en agar important.

La sélection des pieds a fait l'objet d'un mémoire (FOUCHET 1980)<sup>36</sup>, dans lequel nous nous sommes intéressés aux rendements en colloïde.

Nous avons pensé doser le 3,6 anhydrogalactose : composé spécifique de la fraction agar, sur le thalle entier.

On dose le 3,6 anhydrogalactose par la méthode de REES (1961)<sup>78</sup> que nous avons modifiée (II<sub>42</sub>).

L'algue est séchée au dessiccateur sous vide 24 h et broyée très finement au broyeur à billes. La poudre ainsi obtenue est placée directement

dans le mélange réactif. Celui-ci est composé de 200 ml d'HCl concentré, de 20 ml d'une solution à 0,13 % de résorcinol dans l'éthanol et de 40 ml d'eau. La réaction, dans la méthode originelle, a lieu avec 200 µg de sucre dans un volume de 10 ml de réactif ; si l'on estime le rendement en agar à 25 %, il faudra 800 mg d'algue sèche pour que le dosage soit possible.

On laisse la solution 20 mn au bain-marie à 80°C puis on refroidit 5 mn à l'eau courante et on lit la densité optique à 555 nm, comparée à celle d'un témoin agar. (tab. 4).

### Résultats

TABLEAU 4

RESULTATS DES DOSAGES DU 3,6 ANHYDROGALACTOSE PAR LA METHODE DE REES 1961<sup>78</sup> MODIFIEE, SUR L'ALGUE ENTIERE

DO	Témoin Agar 100 µg	Algue entière broyée
1	46	61,5
2	47	61,5
3	47	63

De là, on peut calculer la quantité d'agar dans notre échantillon d'algue entière :

$$\frac{0,1 \times 63}{47} = 0,13 \text{ mg d'agar dans } 0,8 \text{ d'algue sèche}$$

soit un rendement en agar estimé à 16,3 %.

## TROISIEME PARTIE

*La troisième partie de ce mémoire s'est intéressée aux résultats biochimiques et à leur discussion . Il nous est apparu, en effet, essentiel de développer une partie analytique, représentée par la spectroscopie infrarouge et les chromatographies en phase gaz et sur papier, de manière à mettre en évidence les composés susceptibles de varier.*

CHAPITRE III

SPECTRES INFRAROUGES

### III<sub>1</sub> - RÉSULTATS

Il ne nous est pas apparu indispensable de présenter ici la totalité des spectres que nous avons effectués, ceux-ci étant semblables pour l'ensemble de nos échantillons.

Nous nous sommes limité à la description des diagrammes les plus significatifs (fig. 13, 14, 15, 16). Nous les avons comparés, d'une part à ceux des carraghenanes (fig. 17), bien connus, et d'autre part à ceux obtenus à partir d'extraits d'espèces agarophytes voisines (fig. 18 et fig. 19).

### III<sub>2</sub> - INTERPRÉTATION ET DISCUSSION

Nous retrouvons sur nos diagrammes (fig. 13) un certain nombre de pics communs aux carraghenanes et aux agar-agars. Il s'agit, tout d'abord, des pics  $930\text{ cm}^{-1}$  et  $1070\text{ cm}^{-1}$ , interprétés par STANLEY (1963)<sup>87</sup> comme la vibration du pont 3,6 anhydro du galactose. Il est toujours très nettement marqué et peut être considéré comme spécifique des phycocolloïdes possédant du 3,6 anhydrogalactose dont l'agar-agar fait partie.

La présence de liaisons ester-sulfates est repérée par les pics  $1180\text{ cm}^{-1}$  (CROSS 1964)<sup>27</sup>,  $1250\text{ cm}^{-1}$  (AKAHANE et IZUMI 1976)<sup>1</sup>,  $1370\text{ cm}^{-1}$  (CROSS 1964)<sup>27</sup>. Celui à  $1410\text{ cm}^{-1}$  représente la liaison S=O (AKAHANE et IZUMI 1976)<sup>1</sup>. La place occupée par les sulfates sur la chaîne polysaccharidique n'apparaît pas nettement. Les dosages centésimaux, que nous avons effectués, confirment une faible teneur en sulfate d'agar et expliquent, contrairement au carraghenanes, riches en sulfates, la faible réponse en infrarouges.

On observe, néanmoins, un léger décrochement à  $820-830\text{ cm}^{-1}$  qui correspondrait à un sulfate en C<sub>6</sub> du galactose. A ce niveau, il ne nous est pas possible de savoir s'il est en position équatorial ou axial. A  $850\text{ cm}^{-1}$ , un

FIGURE 13  
SPECTRE INFRA-ROUGE D'UN FILM D'AGAR-AGAR EXTRAIT  
DE GRACILARIA VERRUCOSA (THALLES MELANGES)

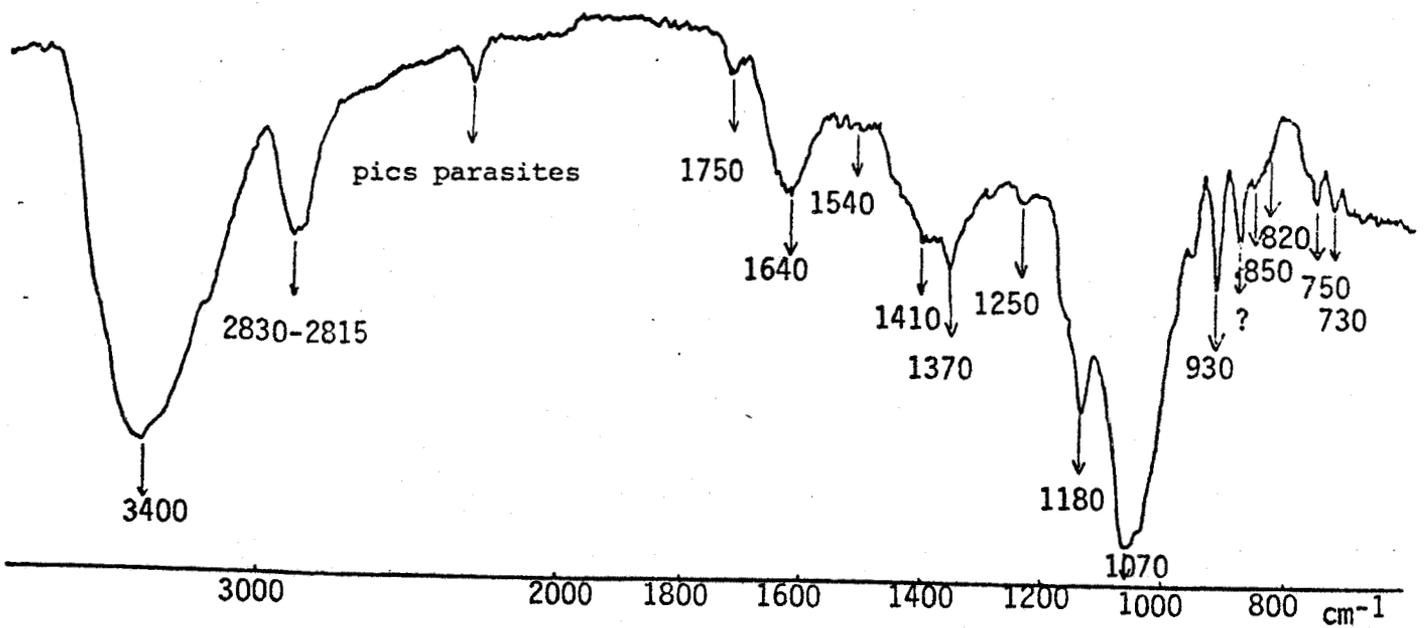


FIGURE 14

SPECTRE INFRA-ROUGE D'UN FILM D'AGAR-AGAR EXTRAIT  
DE GRACILARIA VERRUCOSA (THALLE FEMELLE)

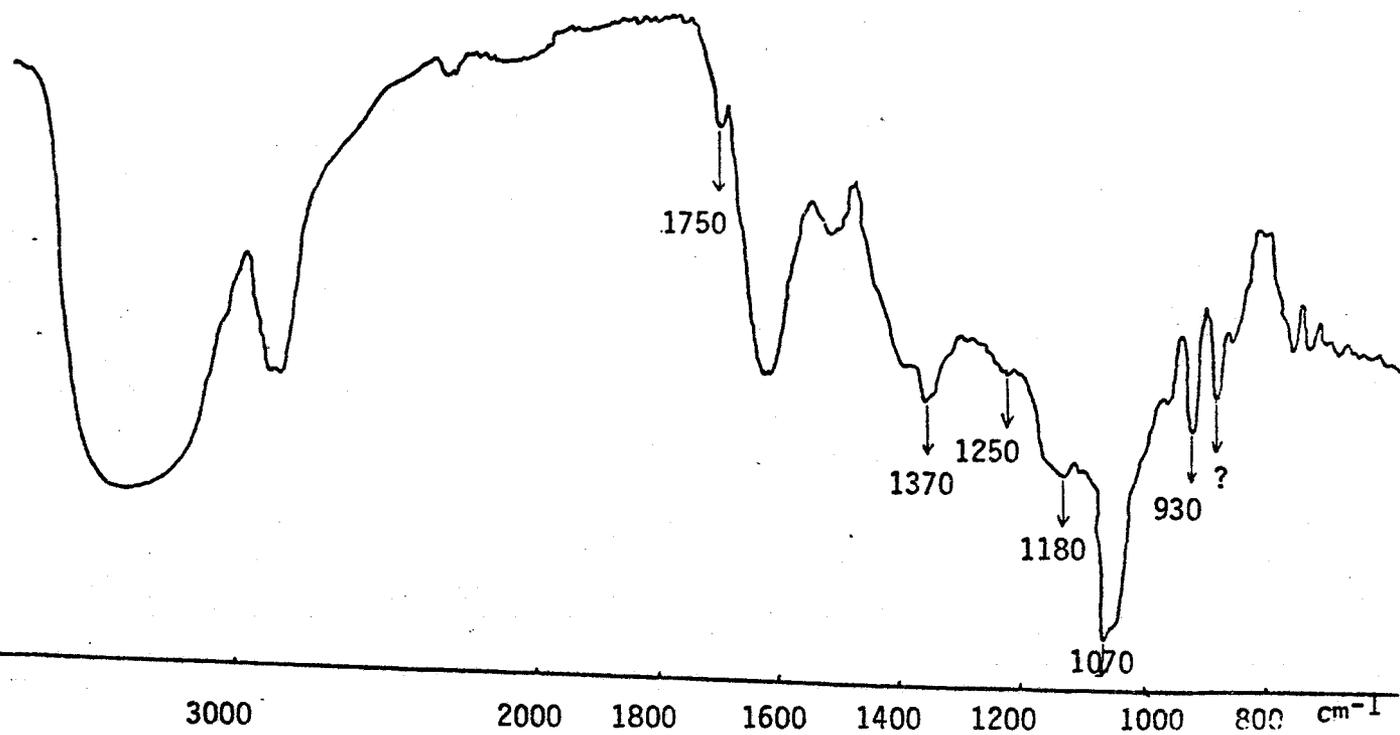


FIGURE 15

SPECTRE INFRA-ROUGE D'UN FILM D'AGAR-AGAR EXTRAIT  
DE GRACILARIA VERRUCOSA (THALLE MÂLE)

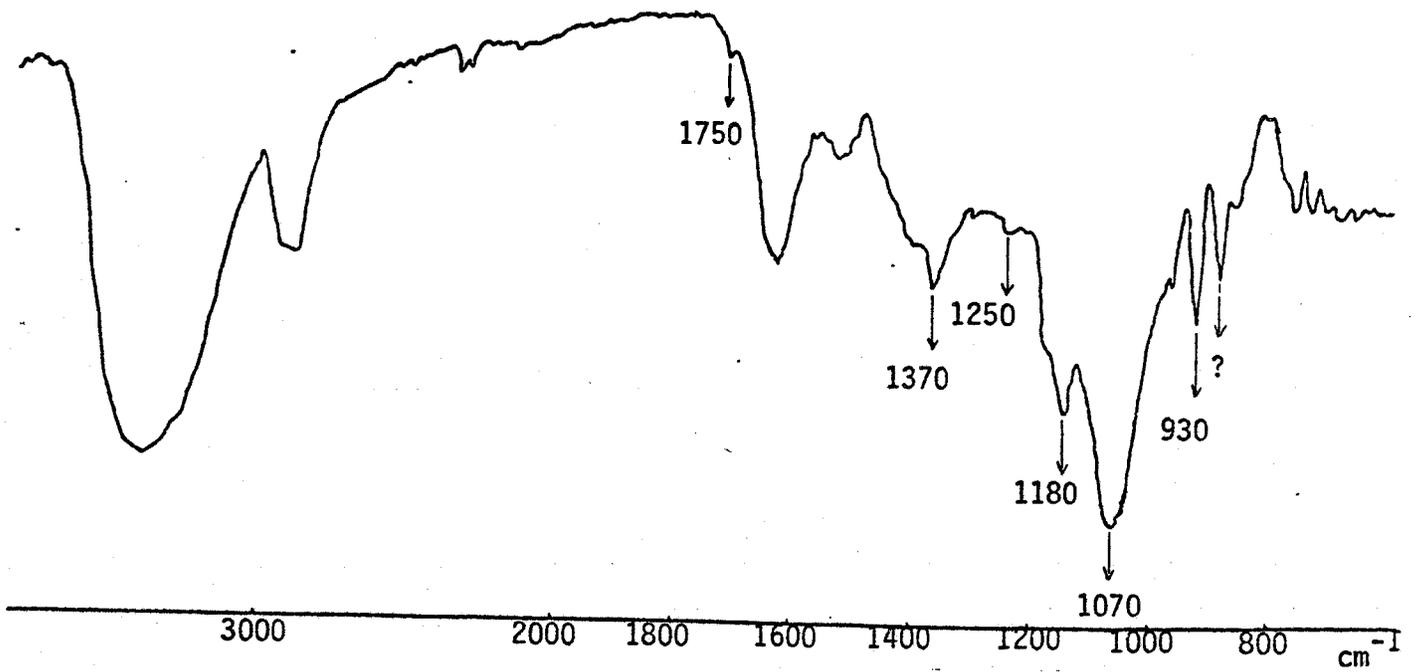


FIGURE 16

SPECTRE INFRA-ROUGE D'UN FILM D'AGAR-AGAR EXTRAIT  
DE GRACILARIA VERRUCOSA (THALLE TETRASPOROPHYTIQUE)

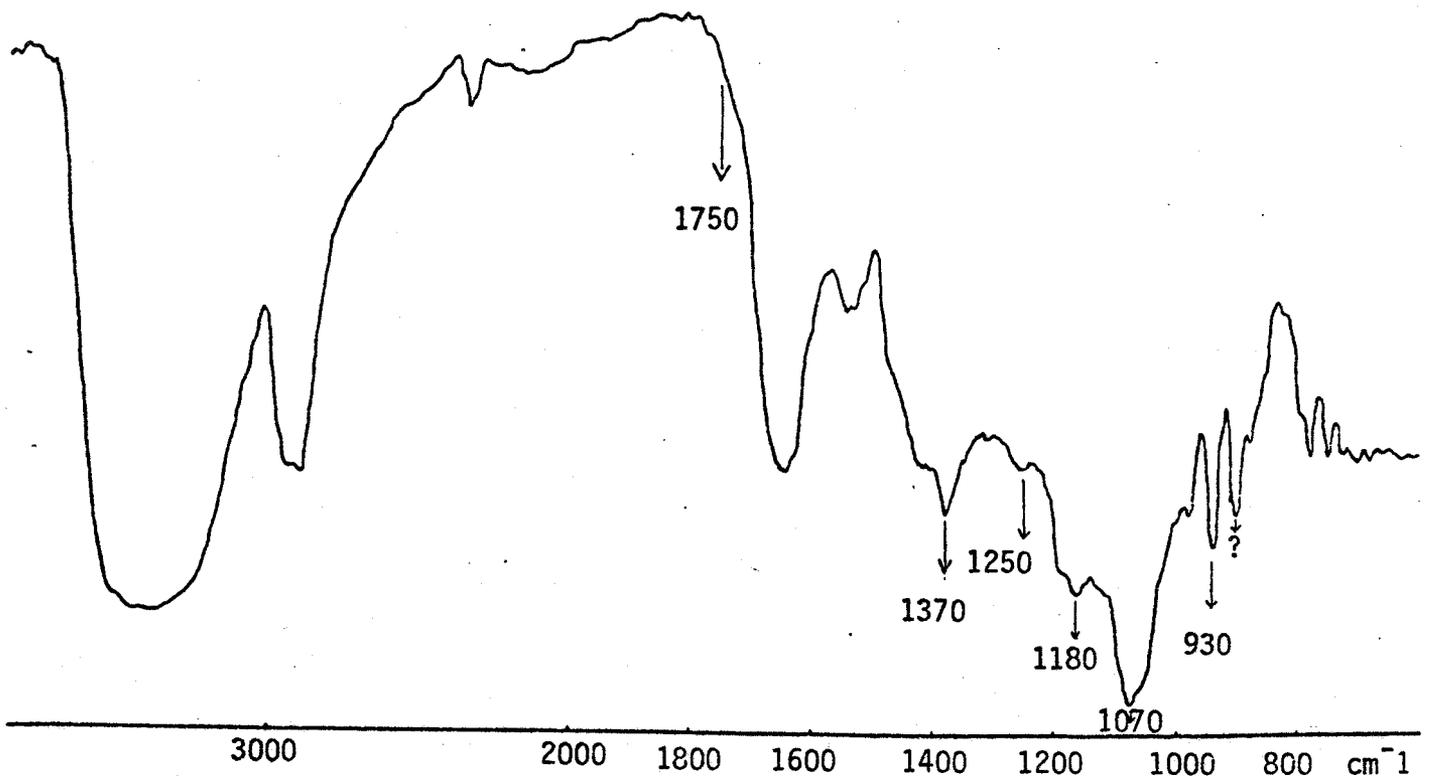


FIGURE 17

## SPECTRES INFRA-ROUGES DE FILMS DE CARRAGENANES

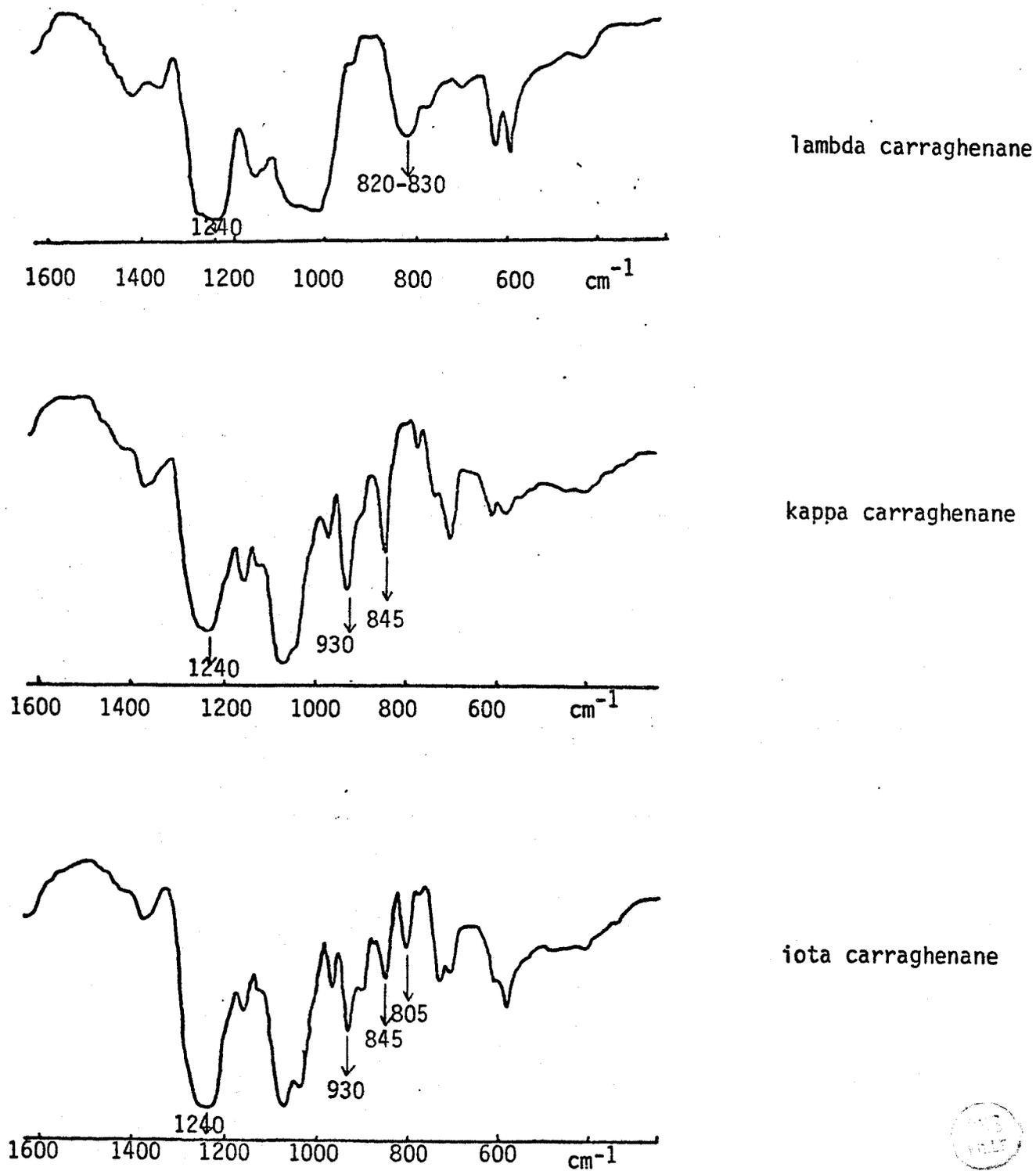


FIGURE 18

SPECTRE INFRA-ROUGE DE FILM D'AGAR-AGAR EXTRAIT  
DE GRACILARIA HENRIQUESTIANA (d'après MOLLION 1978, comm. pers.)

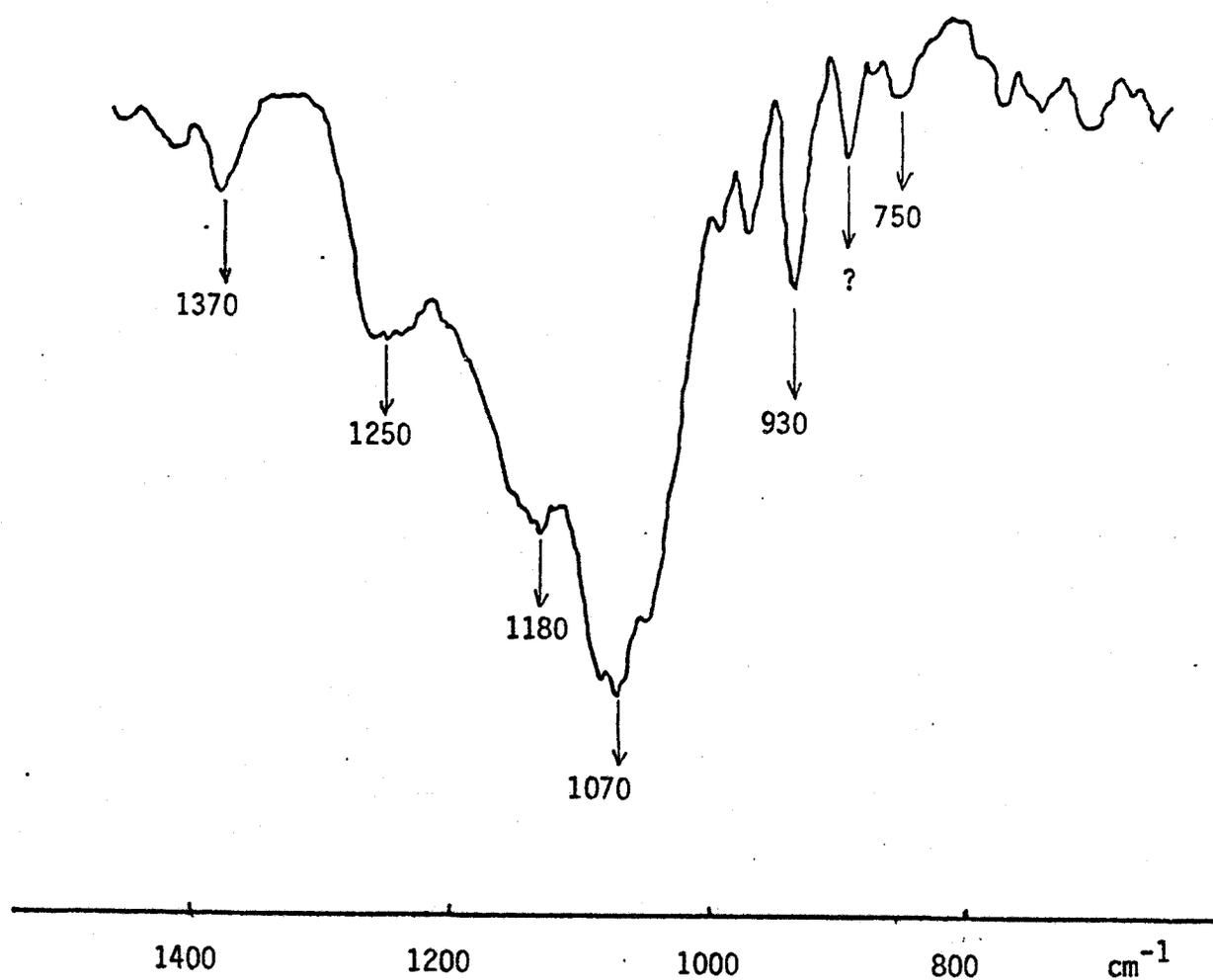
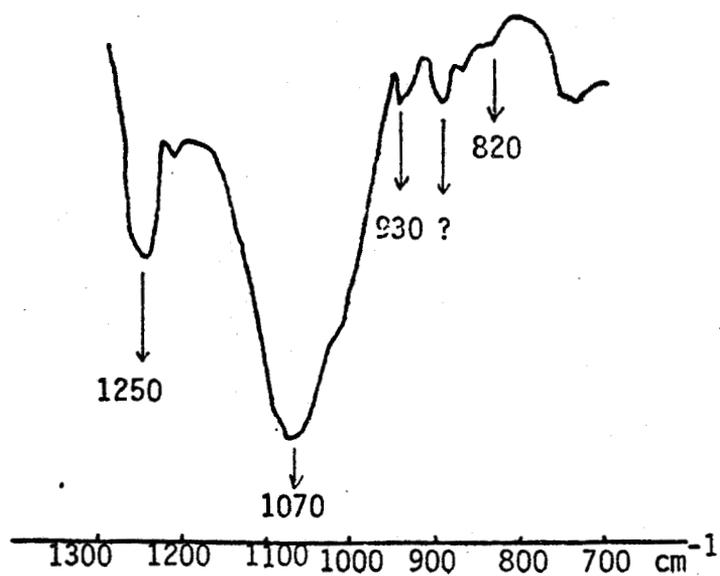


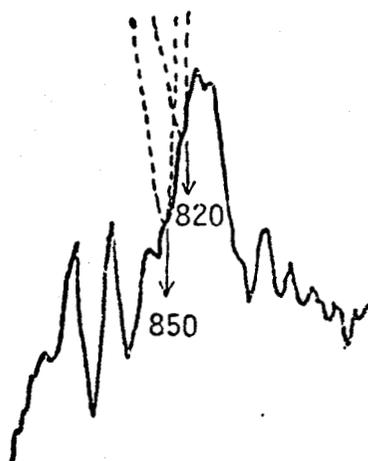
FIGURE 19

SPECTRE INFRA-ROUGE DE FILM D'AGAR-AGAR EXTRAIT  
DE *GRACILARIA COMPLANATA* (d'après AKAHANE et IZUMI 1976)<sup>1</sup>



épaulement de la courbe, traduit, selon DE LESTANG (1979, comm. pers.) une liaison C-O-S axial en C<sub>4</sub> du galactose (LLYOD *et coll.* 1961)<sup>57</sup> (fig. 20). Les travaux de AKAHANE et IZUMI (1976)<sup>1</sup> le confirment.

FIGURE 20  
MISE EN EVIDENCE D'UN PIC A 850 cm<sup>-1</sup> EN  
SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE D'UN FILM D'AGAR-AGAR  
(d'après DE LESTANG, comm. pers.)



Apparemment, le 3,6 anhydrogalactose ne porterait pas de sulfate, contrairement aux carraghenanes où un pic à 805-810 cm<sup>-1</sup> traduit selon ANDERSON *et coll.* (1968c)<sup>5</sup> un sulfate axial en C<sub>2</sub>.

TORRES POMBO (1972)<sup>92</sup> interprète les pics 750 cm<sup>-1</sup> et 730 cm<sup>-1</sup> comme des liaisons C-S et CROSS (1964)<sup>27</sup> le pic à 1060 cm<sup>-1</sup> comme un liaison C=S. Nous obtenons sur nos diagrammes de tels pics, mais nous n'avons pu vérifier ces hypothèses, ni dans la littérature ni dans nos propres manipulations.

Nous resterons donc très circonspects dans cette interprétation.

Ce qui apparaît original dans les spectres infra-rouges de films d'agar, c'est le pic à  $890\text{ cm}^{-1}$  dont nous ne pouvons malheureusement pas fournir d'interprétation. Il semble cependant caractéristique de l'agar, car on le trouve dans le cas de l'agar de *Gracilaria henriquesiana* (MOLLION 1978, comm. pers.) (fig. 18) et de *G. complenata* (AKAHANE et IZUMI 1976)<sup>1</sup> (fig. 19).

Par ailleurs, nous avons mis en évidence un certain nombre de pics originaux. En effet, l'étude de nos diagrammes révèle un couple de pics :  $1640$  et  $1540\text{ cm}^{-1}$ , qui correspondraient respectivement à la liaison peptidique CO-NH et à la déformation due à la fonction amine. Nos dosages font apparaître effectivement des protéines dans nos agars. Considérées, jusqu'alors, comme des impuretés, ces protéines, mises ainsi en évidence, ont constitué pour nous un premier élément pour reconsidérer la place et le rôle des protéines dans le colloïde.

Les pics à  $2830$  et  $2815\text{ cm}^{-1}$  résultent, d'après la littérature, de la liaison O-CH<sub>3</sub>. On sait (ARAKI et coll. 1967)<sup>17</sup> que le galactose porte un éther méthyl en C<sub>6</sub>, mais le profil peu précis de ce pic ne nous permet pas d'affirmer qu'il s'agit bien du 6 mono méthyl.galactose. Par ailleurs le spectre infra-rouge d'un agar en présence d'un témoin 6 mono méthyl, accentue un pic situé à  $1780\text{ cm}^{-1}$ . Ces résultats nous semblent donc sujets à caution et nécessitent d'autres moyens d'investigation.

Une autre particularité est venue s'ajouter à notre examen. Un pic à  $1750\text{ cm}^{-1}$  apparaît fortement marqué dans le cas d'un échantillon d'agar extrait d'un thalle femelle (fig. 14) de *Gracilaria verrucosa*, alors qu'il est moins prononcé dans le cas d'un thalle mâle (fig. 15) et est absent s'il s'agit d'un tétrasporophyte (fig. 16). Il représenterait la liaison C=O, traduisant vraisemblablement un groupement carboxylique. On dose effectivement des acides uroniques et de l'acide pyruvique.

Malheureusement, ces résultats ne sont apparus qu'une seule fois dans nos manipulations et en conséquence tous nos commentaires seraient spéculatifs.

En résumé, en dehors du cas que nous venons de citer, les spectres infrarouges ne nous apportent pas de renseignements utiles pour séparer des types différents d'agar-agar, comme c'est le cas pour les carraghenanes. Néanmoins, ils sont suffisants pour caractériser l'agar-agar par rapport aux autres phycocolloïdes. On peut, par recoupements, avoir une première idée de la structure de la molécule d'agar, en particulier au niveau de la position des sulfates sur la chaîne polysaccharidique (en C<sub>6</sub> ou/et en C<sub>4</sub> du galactose). La présence d'une vibration correspondant à une liaison peptidique nous incite à réenvisager le problème des protéines dans le colloïde. Cette question a été reprise par d'autres moyens, mais nécessite une étude très précise qui sort du cadre de ce mémoire.

CHAPITRE IV

CHROMATOGRAPHIES EN PHASE GAZEUSE

## IV<sub>1</sub> - RÉSULTATS

Nous vous présentons ci-dessous quatre chromatogrammes (fig. 21, 22, 23 et 24). Le premier (fig. 21) est celui d'un agar que l'on considèrera comme référence, car il est issu de pieds indifférenciés de *Gracilaria verrucosa*. Le second est le chromatogramme d'un témoin 6-O-méthyl-galactose qui nous a permis de révéler son spectre en chromatographie en phase gaz. Quatre pics apparaissent, correspondant aux différentes formes anomériques du produit. Le troisième est une cochromatographie de notre échantillon choisi comme référence en présence du témoin 6-mono-méthyl-galactose. Enfin, le quatrième est une chromatographie après attaque alcaline.

## IV<sub>2</sub> - INTERPRÉTATIONS

Dans la figure 21 on repère, grâce aux Rf, les 3 pics caractéristiques des formes anomériques du galactose. Les autres pics inconnus seront déduits des chromatogrammes suivants.

En superposant les chromatogrammes 1 et 3, comme le montre la figure 25, où l'on a représenté par un trait en pointillés les pics, dont la hauteur est augmentée par rapport au diagramme de référence (en traits pleins), on déduit la place qu'occupe en chromatographie en phase gaz le 6-mono-méthyl-galactose. Trois pics sont ainsi identifiés.

Après attaque alcaline, trois nouveaux pics se développent et sont mis en évidence par superposition des chromatogrammes 1 et 4 (fig. 26). Les pointillés symbolisent l'augmentation de la hauteur des pics par rapport au diagramme de référence (en traits pleins). De la même manière que précédemment, on déduit la place qu'occupe en chromatographie en phase gaz, le 3,6 anhydro-galactose.

FIGURE 21

CHROMATOGRAMME EN PHASE GAZEUSE D'UN AGAR  
HYDROLYSE PAR  $H_2SO_4$ , METHANOLYSE ET TRIFLUOROACETYLE, EXTRAIT  
DE *GRACILARIA VERRUCOSA* (THALLES MELANGES) TEMOIN

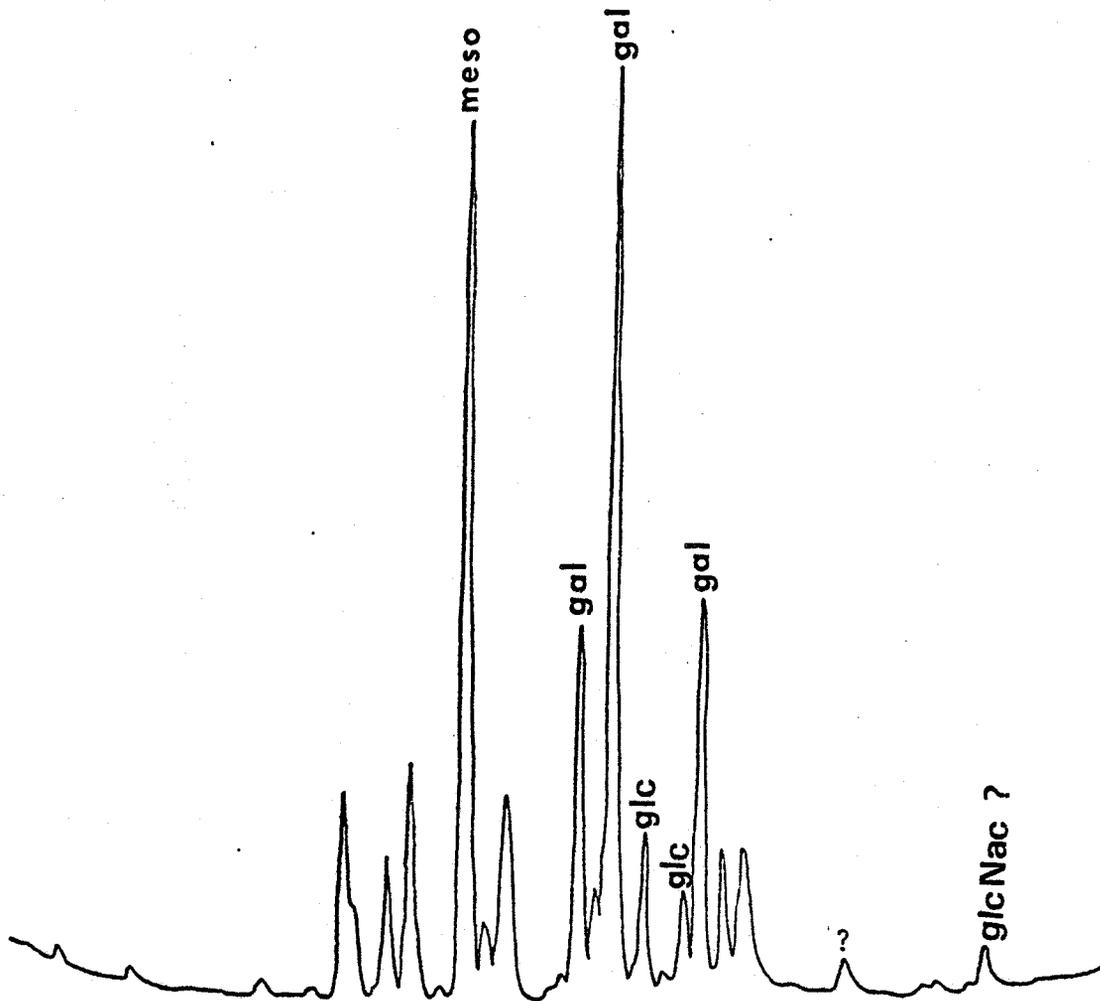


FIGURE 22

CHROMATOGRAMME EN PHASE GAZEUSE D'UN TEMOIN  
6-O-METHYL-GALACTOSE TRIFLUOROACETYLE

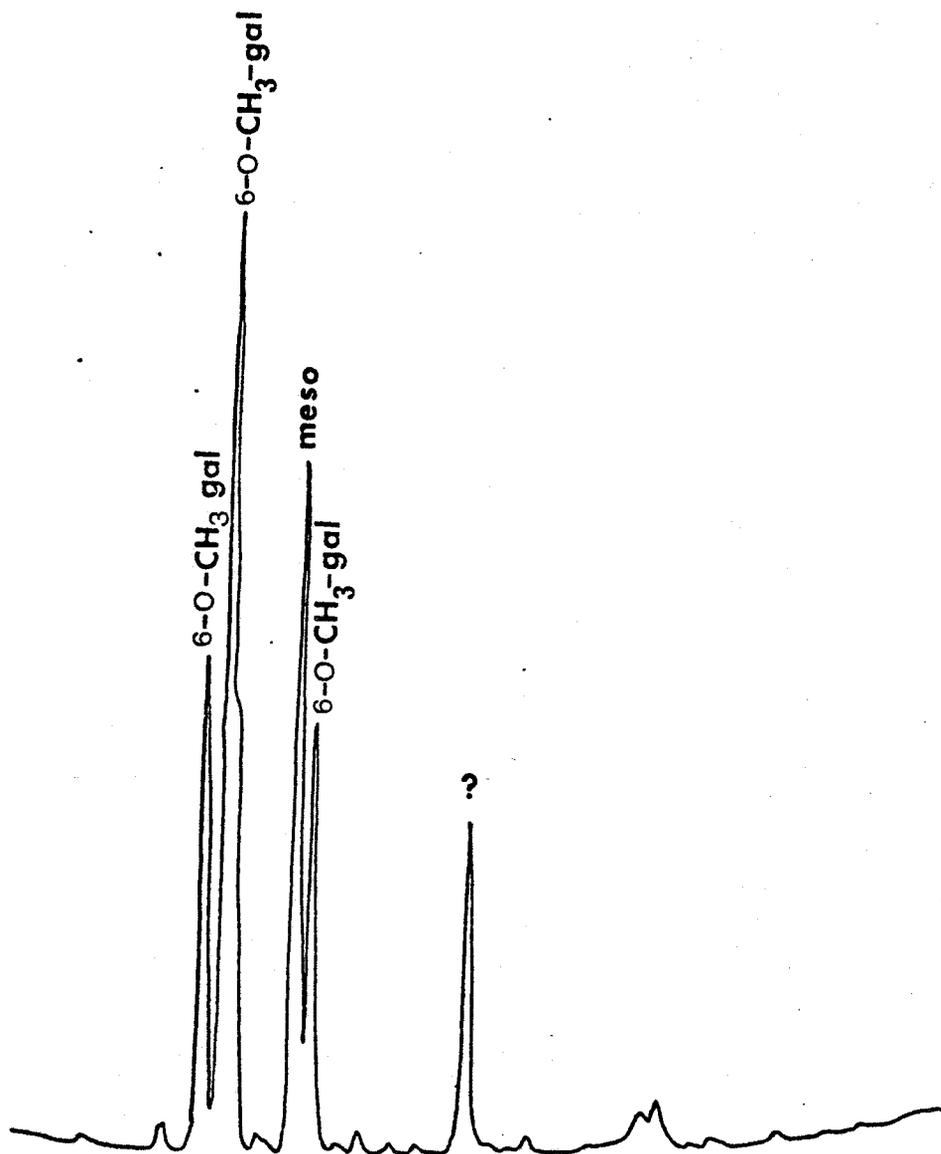
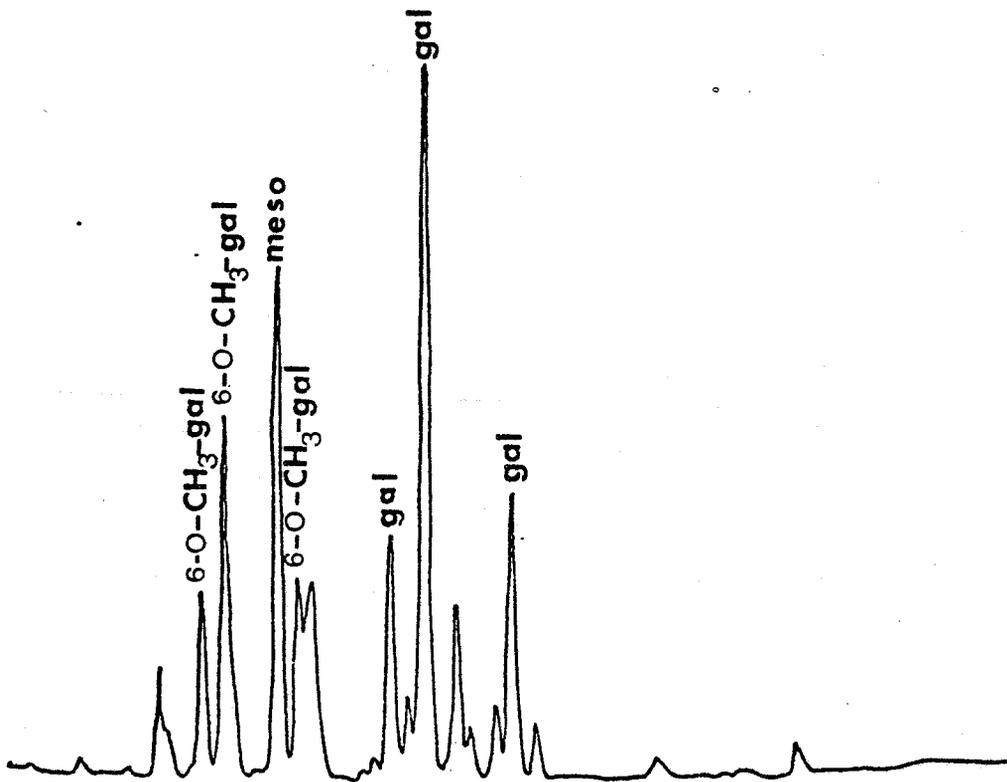


FIGURE 23

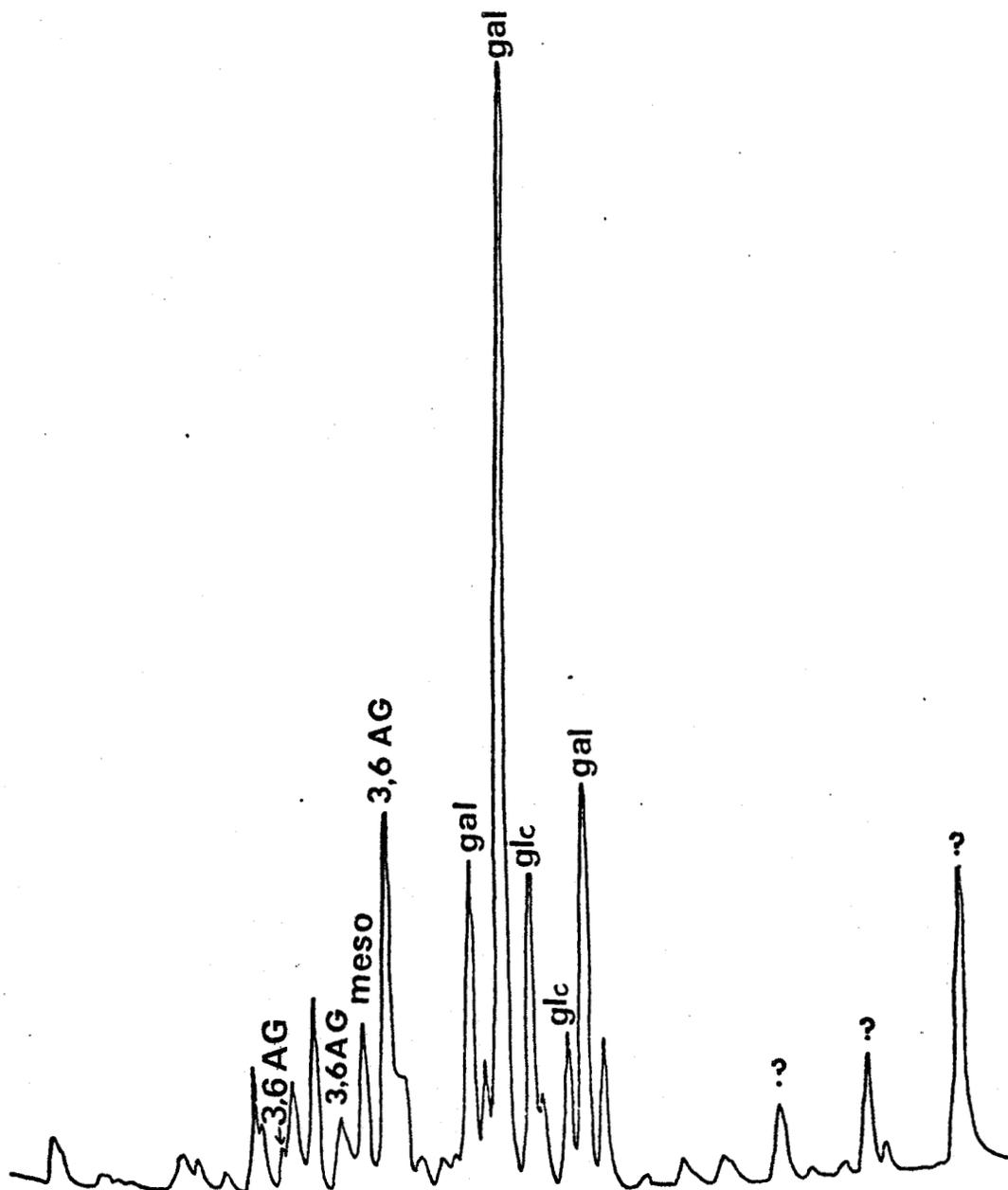
CHROMATOGRAMME D'UNE COCHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZ  
DU MELANGE AGAR TEMOIN ET 6-O-METHYL-GALACTOSE



BUS  
LILLE

FIGURE 24

CHROMATOGRAMME D'UNE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE  
DE L'ECHANTILLON AGAR TEMOIN AYANT SUBI  
UNE ATTAQUE ALCALINE (NaOH 1,5 % - 90°C -34)



RUS  
LILLE

FIGURE 25

FIGURE DE SYNTHESE - SUPERPOSITION DES CHROMATOGRAMMES  
EN PHASE GAZEUSE DE L'AGAR-TEMOIN ET DU 6-O-METHYL-GALACTOSE

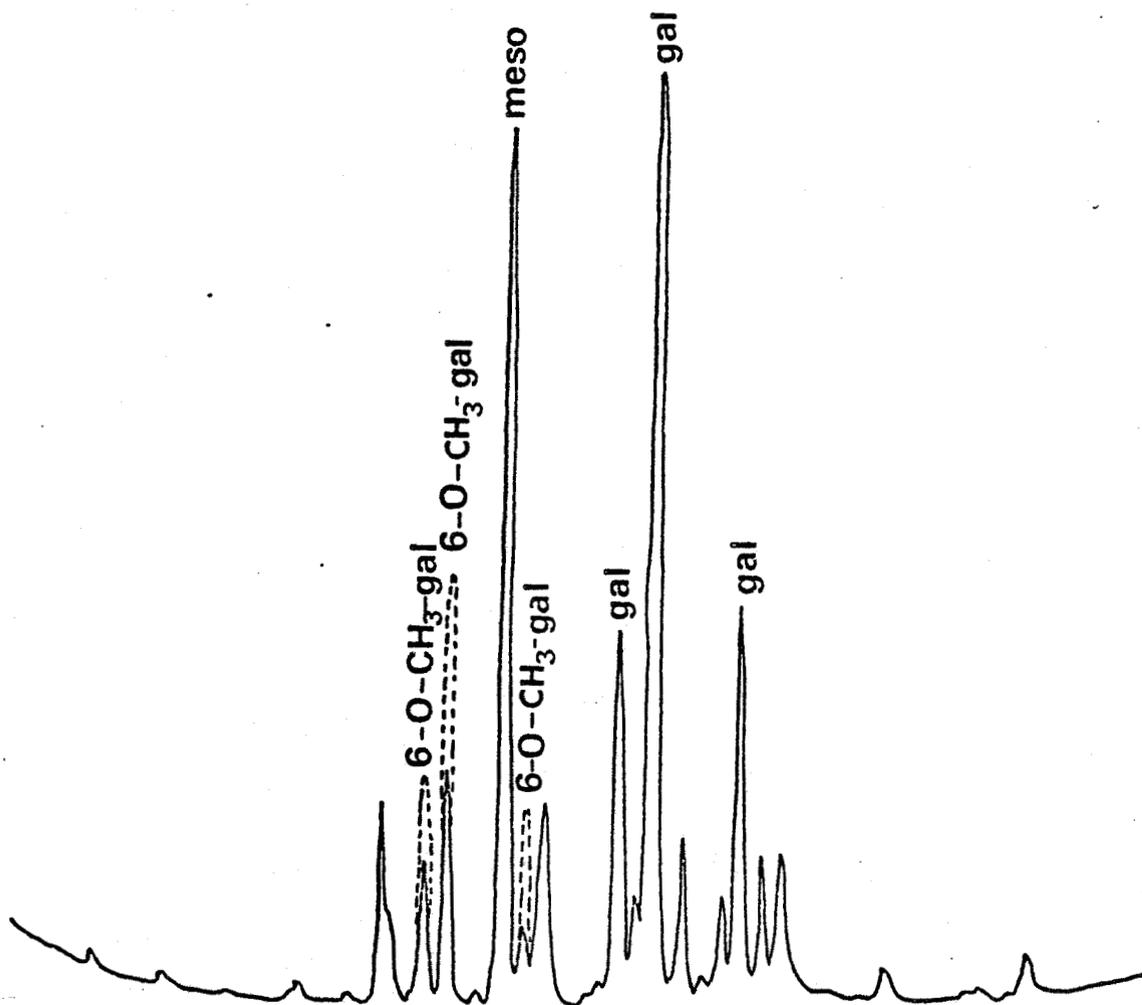
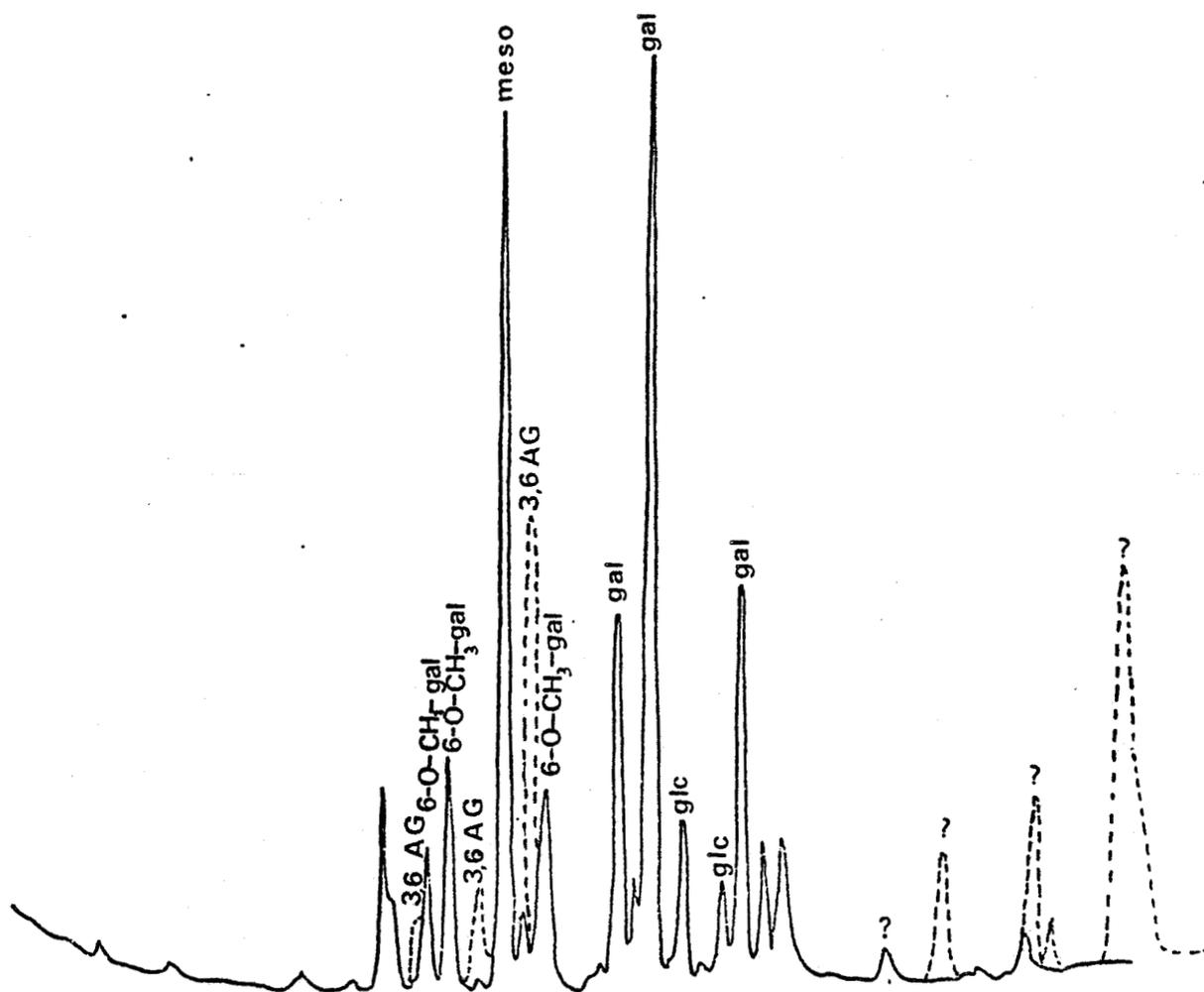


FIGURE 26

FIGURE DE SYNTHESE - SUPERPOSITION DES CHROMATOGRAMMES  
EN PHASE GAZEUSE DE L'AGAR TEMOIN ET DE L'AGAR APRES ATTAQUE ALCALINE



BUS  
LILLE

La technique qui consiste à élever quantitativement le nombre de résidus 3,6 anhydrogalactose par traitement alcalin, pouvait paraître aléatoire. Nous avons donc tenté d'évaluer le gain en 3,6 anhydrogalactose, avant et après attaque alcaline, pour le comparer à la perte relative en galactose, puisque le pont 3,6 anhydro se forme aux dépens du sulfate en C<sub>6</sub> du galactose, labile en milieu alcalin. Le tableau 5 traduit nos résultats.

TABLEAU 5  
DOSAGE PAR LE CALCUL DES AIRES DES PICS DE CHROMATOGRAPHIE  
EN PHASES GAZEUSES OBTENUES A PARTIR  
DE L'AGAR-TEMOIN AVANT ET APRES ATTAQUE ALCALINE

	Avant attaque alcaline	Après attaque alcaline
1. Galactose	42,2	34,4
2. 3,6 anhydro	3,4	6,9
3. Glucose	6,7	8,7
4. 6-O-méthyl	11,3	6,6
TOTAL (1 + 2)	45,6	41,3

La réaction n'est sans doute pas quantitative et, nous ignorons le comportement en milieu alcalin de certains résidus comme le 6-O-méthyl ou l'acide pyruvique acétal. Néanmoins, on peut, avec ces quelques réserves, considérer nos résultats suffisamment significatifs.

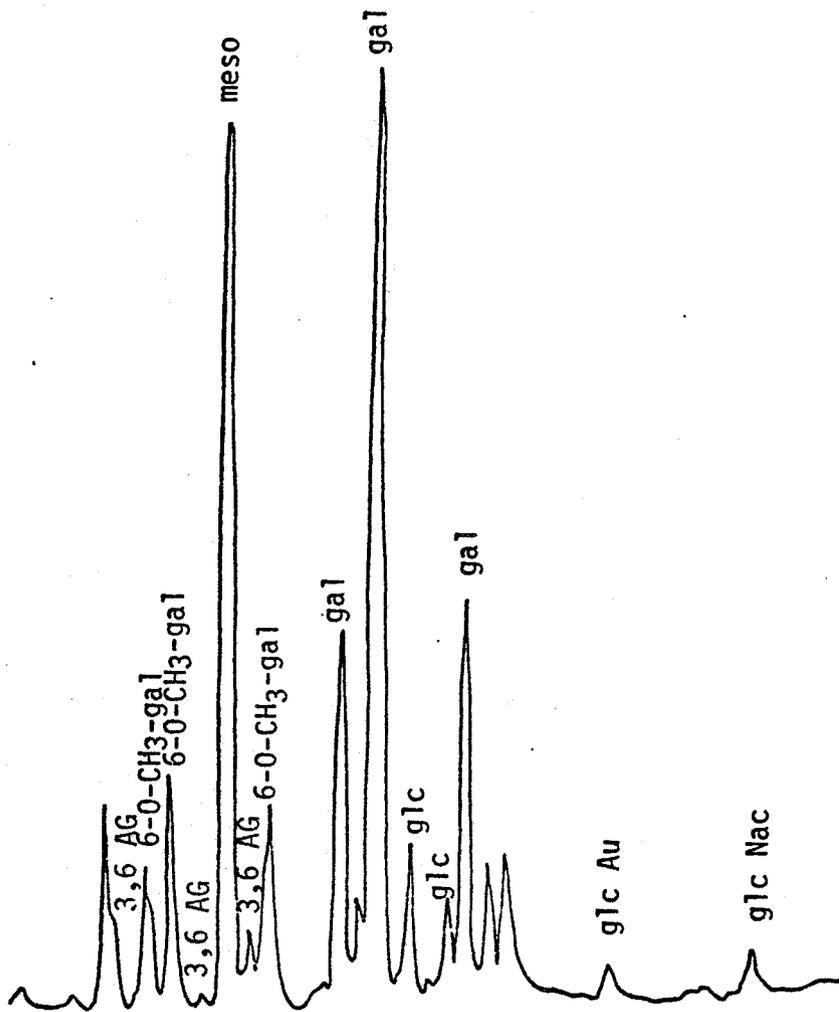
D'autres pics ont pu être déterminés grâce à leur R<sub>f</sub>. Ce sont ceux, en particulier, du glucose, probablement une impureté d'extraction et de l'acide glucuronique que nous avons pu doser par le carbazol dans d'autres manipulations.

Mais, ce qui constitue une nouveauté, c'est la présence d'une glucosamine, repérée très faiblement sur notre diagramme et dont la présence a pu être confirmée par d'autres techniques. Ce fait confirme les présomptions ressenties déjà en spectroscopie infrarouge et orientera nos études ultérieures vers la recherche d'une hypothétique fraction protéique dans l'agar-agar. Cette remarque constitue une hypothèse de travail et sort, pour l'instant, du sujet que nous nous sommes fixé.

En résumé, à partir du diagramme de référence, nous pouvons synthétiser nos résultats sur un même chromatogramme (fig. 27). Des pics demeurent encore inconnus, mais dans la mesure où ils ne sont pas sujets à fluctuations, nous les avons négligés au niveau de ce mémoire, pour nous intéresser aux résidus dosables afin d'essayer d'estimer leurs variations quantitatives.

FIGURE 27

FIGURE RESUMEE - IDENTIFICATION DES PICS DE  
CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DU TEMOIN AGAR



CHAPITRE V

CHROMATOGRAPHIES SUR PAPIER

L'agar-agar de nos échantillons a toujours résisté, en partie du moins, à l'hydrolyse. L'hydrolyse étant donc incomplète, nous avons voulu savoir si d'autres techniques ne mettraient pas en évidence des composés dont nous ignorions l'existence et qui ne seraient pas libérés par les méthodes classiques. Pour apprécier l'efficacité des hydrolyses, nous avons suivi par chromatographies 5/5/1/3 l'apparition des produits d'hydrolyse.

La figure 28 représente le chromatogramme après hydrolyse sulfurique. On repère le galactose par rapport à un témoin pur. 3 autres taches apparaissent : une première juste au-dessus du galactose est ininterprétable à ce niveau, une autre située pratiquement à la hauteur du xylose et une troisième, qui a peu migré, correspondrait vraisemblablement à des di ou polysaccharides non hydrolysés.

Nous avons repris le même échantillon, mais cette fois hydrolysé par l'acide trifluoro acétique (fig. 29). Il ne se présente pas de tache en bas du chromatogramme, ce qui nous permet de penser que l'hydrolyse est complète. On retrouve les taches au-dessus du galactose et celle à la hauteur du xylose mais dédoublée, puis une quatrième tout en haut du chromatogramme. Cette dernière est attribuée à la glucuronolactone, dont on sait qu'elle migre très rapidement.

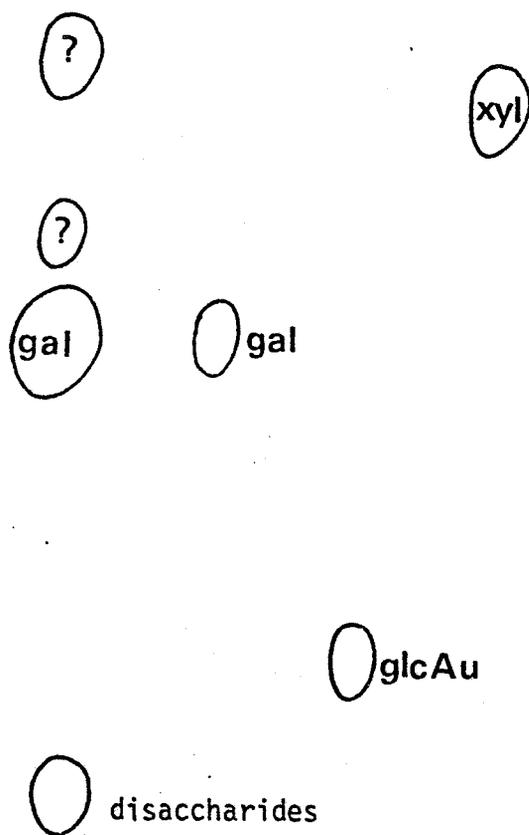
Cette analyse est confirmée par le chromatogramme suivant (fig. 30). On ne retrouve jamais l'acide glucuronique que sous sa forme lactone. Les témoins placés sur le même chromatogramme le démontrent. La tache au-dessus du galactose se révèle être du glucose, déjà repéré en phase gaz, et la dernière inconnue qui migre à la hauteur du xylose est en fait le 6-O-méthyl-galactose dont les Rf sont sensiblement voisins.

Nous avons ensuite tenté de repérer la glucosamine supposée identifiée en chromatographie en phase gaz, d'abord après l'action de l'acide trifluoro acétique (fig. 31) puis par la méthode d'hydrolyse sulfurique de SEAMAN *et coll.*

<sup>84</sup>  
(1954) (fig. 32). La révélation par la ninhydrine est toujours demeurée négative. Les quantités probablement très faibles de ce résidu, ne permettent pas, apparemment, de la mettre en évidence par ces techniques.

Les résultats obtenus dans ce chapitre confirment donc ceux obtenus dans les précédents. Les composants principaux de l'agar sont donc : le galactose, le 3,6 anhydrogalactose, le 6-O-méthyl-galactose, le glucose, (impureté ?) l'acide glucuronique et sans doute la glucosamine.

FIGURE 28  
CHROMATOGRAPHIE (5/5/1/3) SUR PAPIER WHATMAN 3 D'UN  
ECHANTILLON D'AGAR APRES HYDROLYSE SULFURIQUE  
(METHODE SEAMAN *et coll.* 1954)<sup>84</sup> - REVELATION A L'OXALATE D'ANILINE



---

Agar      Galactose      Acide      Xylose  
   Glucuro-  
   nique

FIGURE 29

CHROMATOGRAPHIE (5/5/1/3) SUR PAPIER WHATMAN 3 D'UN  
 ECHANTILLON D'AGAR APRES HYDROLYSE PAR ACIDE TRIFLUORO-  
 ACETIQUE (4N, 4h - 100°C) - REVELATION A L'OXALATE D'ANILINE

○ glucurono  
lactone

○ glucurono  
lactone

○ xyl

○ ?  
○ ?

○ gal

○ ?  
○ gal

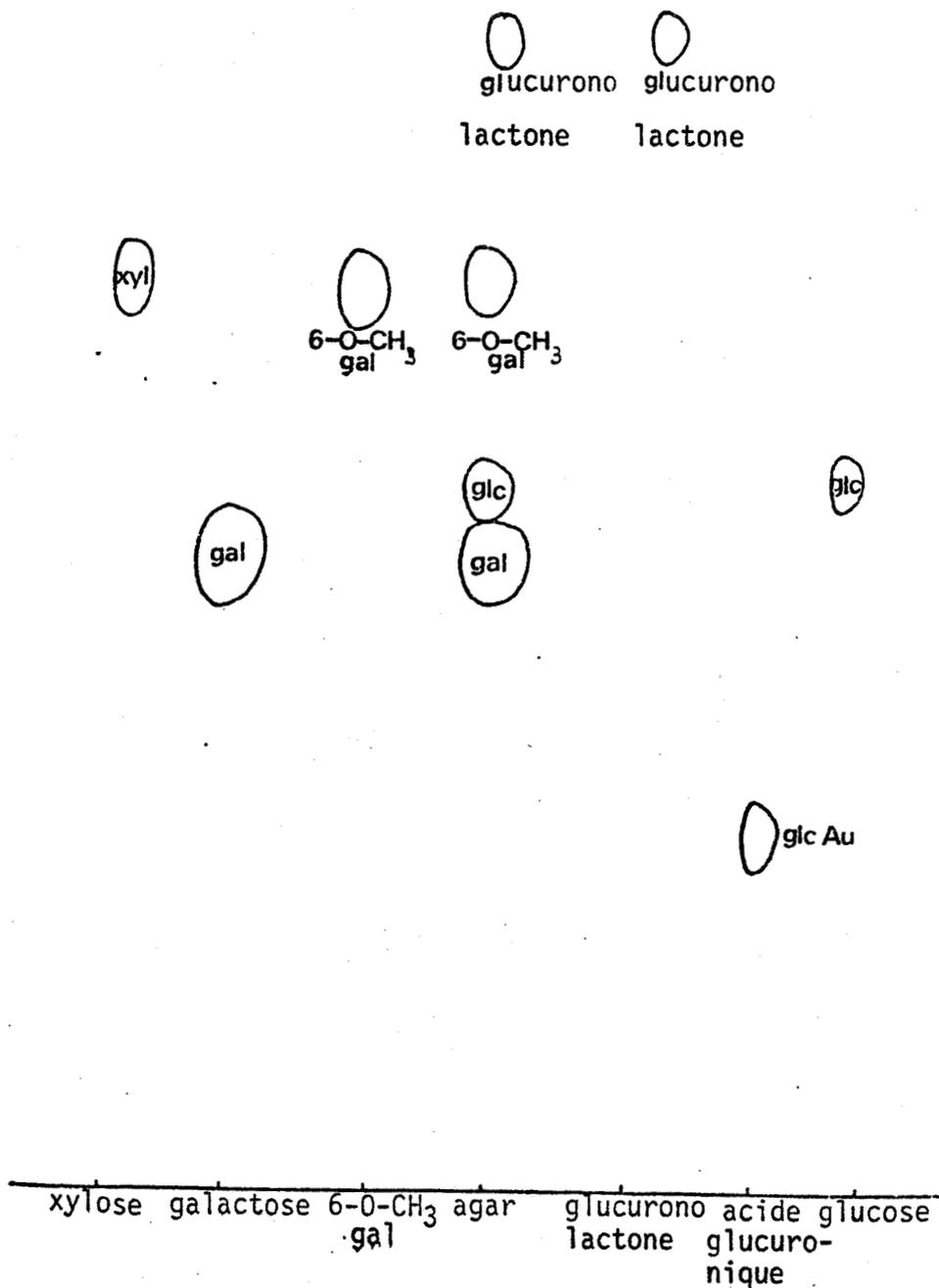
○ glcAu

Glucurono- lactone	Xylose	Acide glucuro- nique	Galactose	Agar



FIGURE 30

CHROMATOGRAPHIE (5/5/1/3) SUR PAPIER WHATMAN 3 D'UN  
 ECHANTILLON D'AGAR HYDROLYSE PAR L'ACIDE TRIFLUORO-ACETIQUE  
 (4N, 4h - 100°C) EN PRESENCE DE TEMOIN  
 GLUCURONOLACTANE ET 6-O-METHYL-GALACTOSE  
 REVELATION A L'OXALATE D'ANILINE



BUS  
LILLE

FIGURE 31

CHROMATOGRAPHIE (5/5/1/3) SUR PAPIER WHATMAN 3 D'UN  
ECHANTILLON D'AGAR APRES HYDROLYSE PAR L'ACIDE TRIFLUORO-  
ACETIQUE (4N, 4h - 100°C) - REVELATION A LA NINHYDRINE

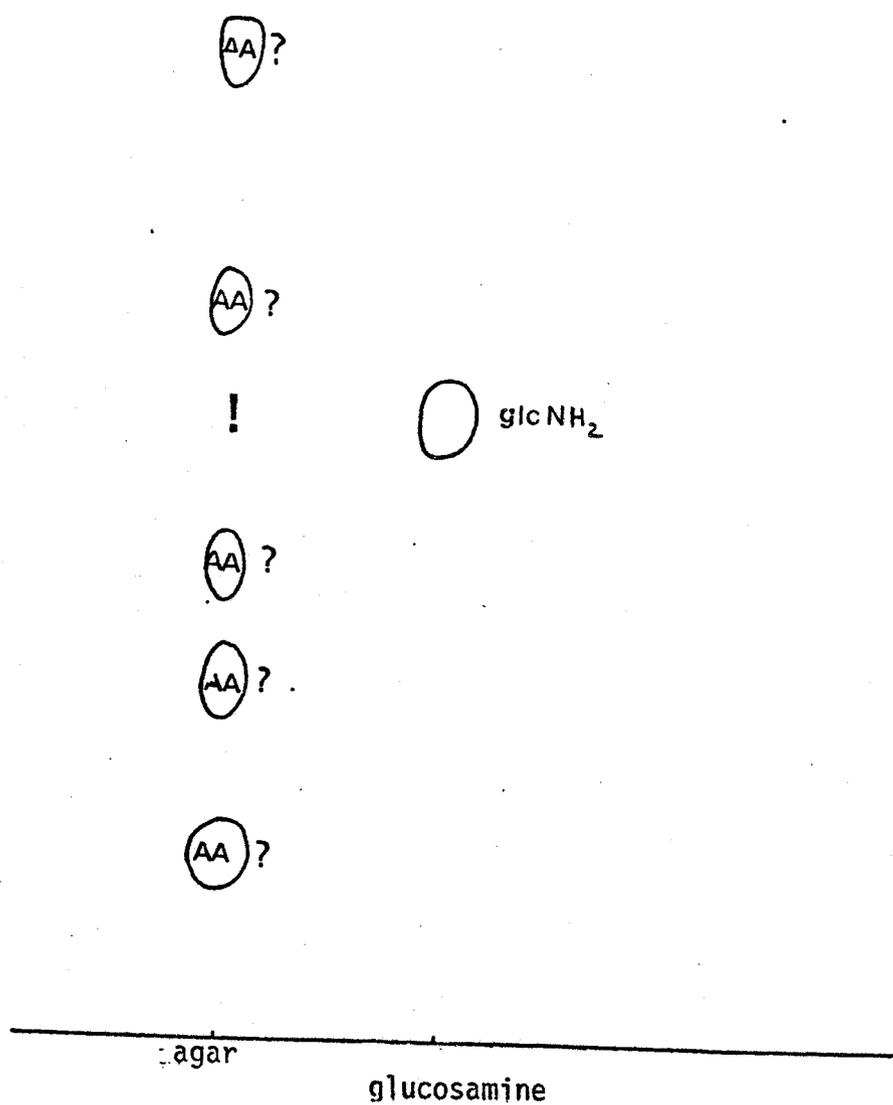
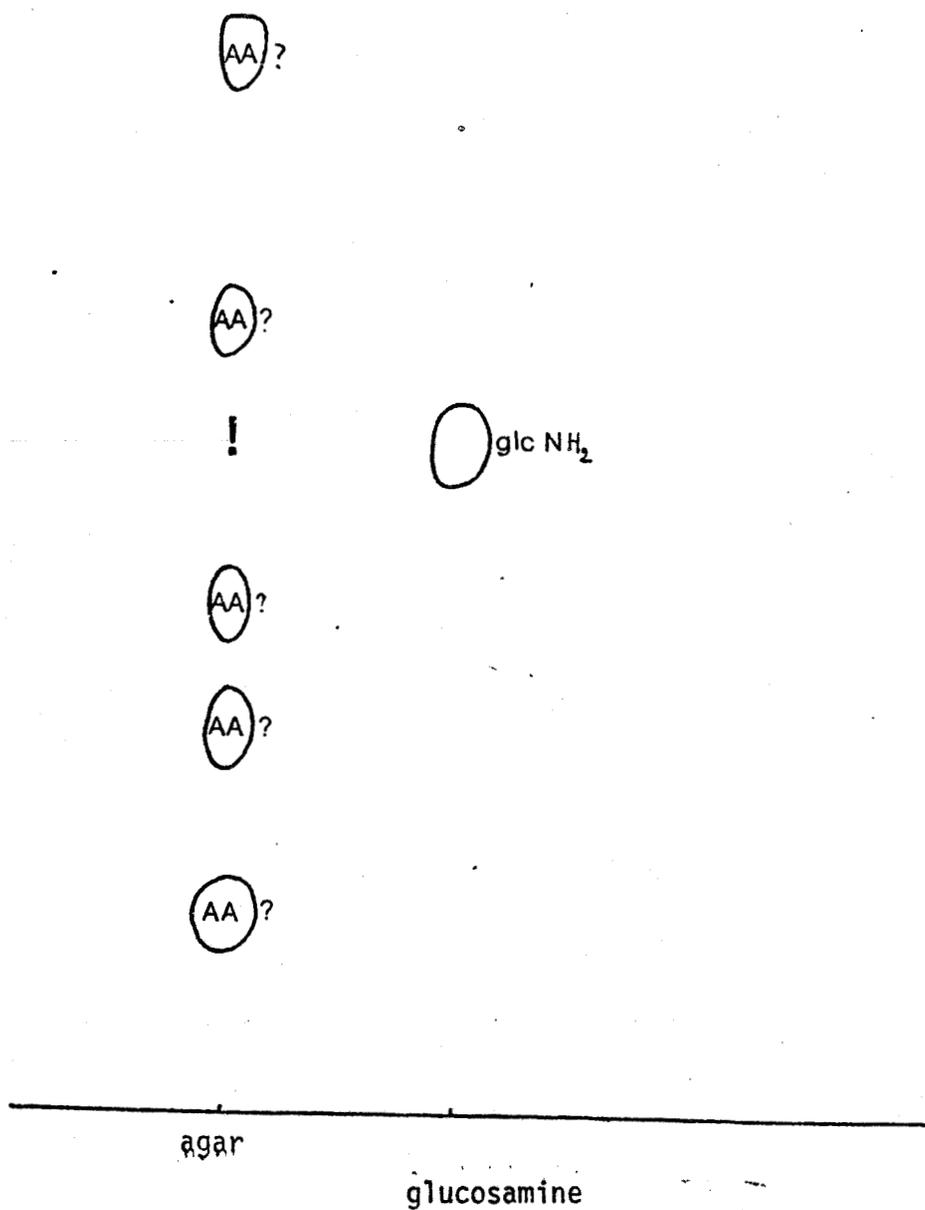


FIGURE 32

CHROMATOGRAPHIE (5/5/1/3) SUR PAPIER WHATMAN 3 D'UN  
ECHANTILLON D'AGAR HYDROLYSE PAR LA  
METHODE SEAMAN - REVELATION A LA NINHYDRINE



BUS  
LILLE

## QUATRIEME PARTIE

### LES RESULTATS BIOLOGIQUES ET LEURS DISCUSSIONS

*La composition chimique de nos échantillons d'agar-agar ayant été définie dans la troisième partie de ce mémoire, la quatrième partie s'est intéressée à sa variation. Nous avons abordé cette étude sous trois aspects. Le chapitre VI envisagera les variations saisonnières, le chapitre VII jugera l'influence du cycle biologique de l'algue et le chapitre VIII appréciera les différences individuelles au niveau des variétés cloniques, quant à la qualité du colloïde.*

CHAPITRE VI

VARIATIONS SAISONNIERES

L'analyse des variations saisonnières porte sur l'étude des poids sec de l'algue, des rendements en agar, et des dosages biochimiques (sucres totaux, 3,6 anhydrogalactose, sulfates, acides glucuroniques, protéines).

## VI<sub>1</sub> - VARIATIONS DES POIDS SEC DES ALGUES ET DES RENDEMENTS EN AGAR

### VI<sub>11</sub> - RESULTATS

Les résultats sont consignés dans le tableau 6. Nous avons calculé, pour chaque période de récolte, la moyenne et l'écart-type des valeurs des poids secs des algues et des rendements en agar. En bas du tableau 6 figurent les résultats tous pieds et toutes saisons confondus. Les figures 33 et 34 permettent de visualiser le sens des variations des moyennes du poids sec et du rendement pour chaque saison.

### VI<sub>12</sub> - INTERPRETATIONS

L'évolution de la courbe du poids sec au cours du temps passe par un minimum durant les mois d'été pour atteindre un maximum l'hiver. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la croissance de l'algue a lieu durant la période printemps-été et se traduit par un allongement sensible du thalle. La structure anatomique des tissus de *Gracilaria* montre, schématiquement, une zone corticale composée de petites cellules et une zone médullaire à grandes cellules (fig. 7). L'élongation est due essentiellement à l'augmentation de volume de ces cellules médullaires gorgées d'eau. On comprend alors les différences de masses sèches enregistrées entre les deux saisons extrêmes.

Les rendements maximums apparaissent en automne (tab. 6, fig. 34, novembre), c'est-à-dire après la période de pleine croissance. Pour comprendre ce phénomène il nous faut rapprocher ces résultats de ceux de NEISH et SCHACKLOCK (1971)<sup>66</sup>

TABLEAU 6

VARIATIONS SAISONNIERES DES POIDS SECS  
DES ALGUES ET DES RENDEMENTS EN AGAR

	Poids sec	Rendement
Juin 79	11,8 ± 5	21,1 ± 9
Septembre 79	10 ± 5	28,5 ± 8
Novembre 79	18,8 ± 5	27 ± 10
Février 80	25,1 ± 5	18,9 ± 5
Mai 80	24,9 ± 4	18 ± 5

Moyenne tous pieds confondus, toutes saisons confondues  
Poids sec = 19,4 ± 5 - Rendement = 21,5

FIGURE 33  
COURBE DES VARIATIONS DES POIDS SECS  
DES ALGUES EN FONCTION DES SAISONS (MOYENNES)

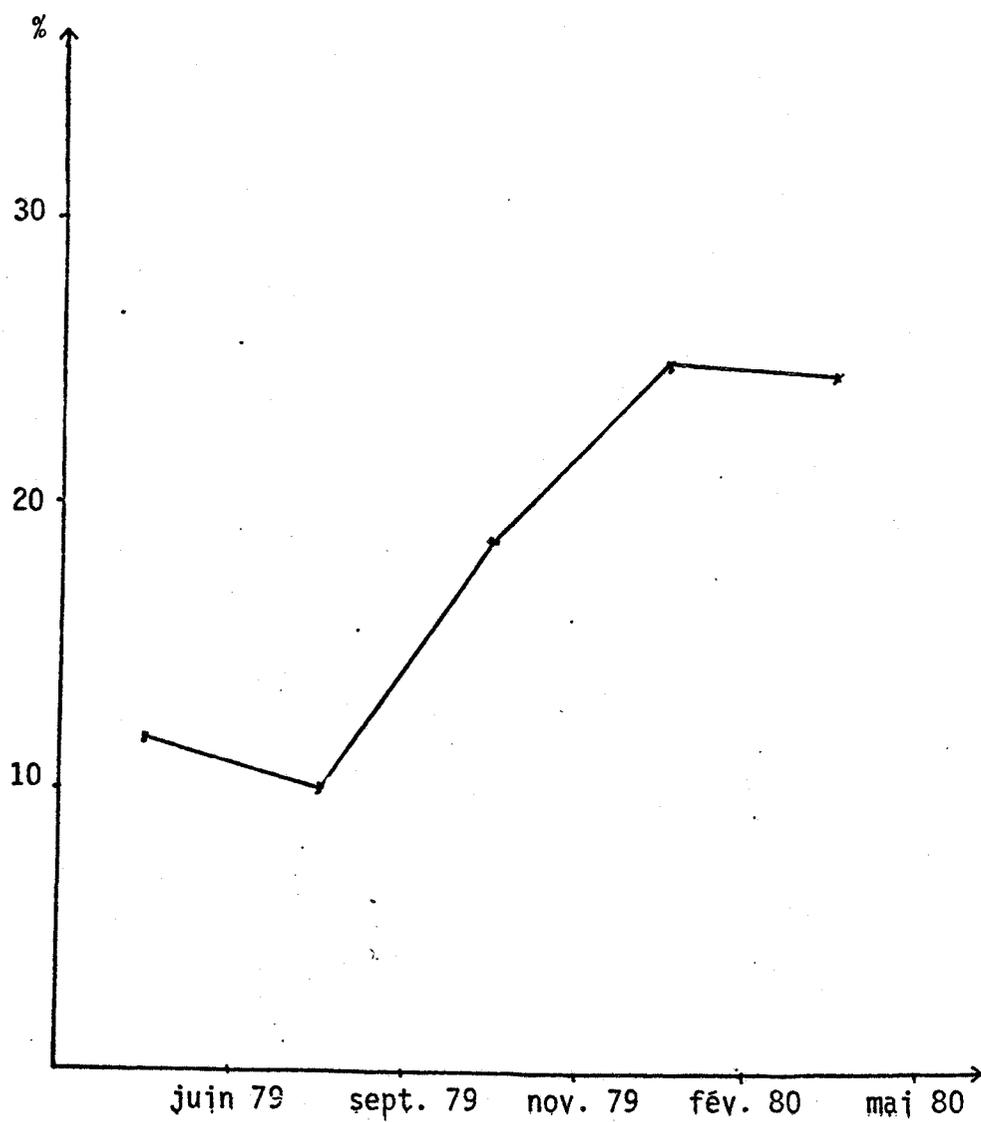
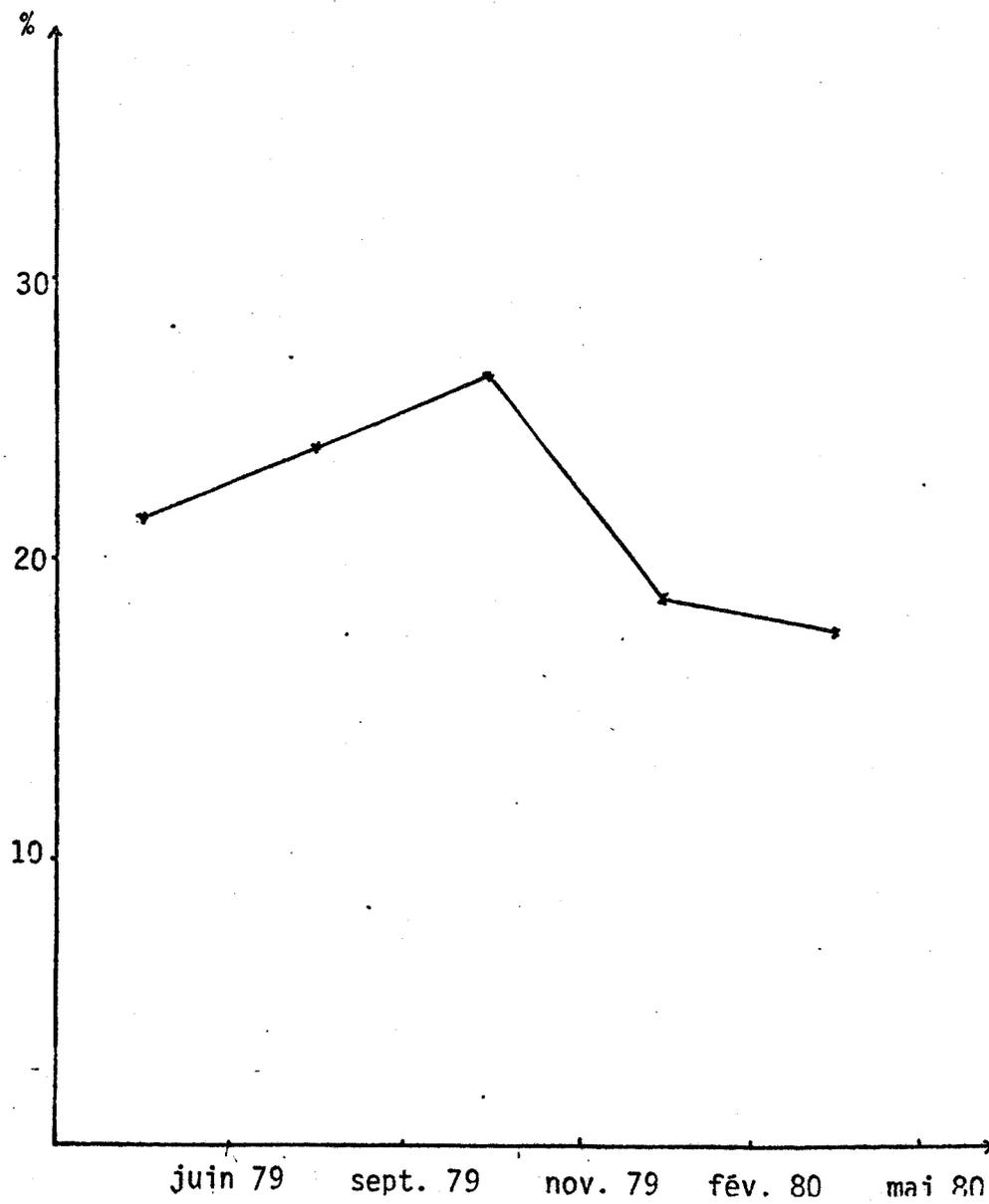


FIGURE 34  
COURBE DES VARIATIONS DES RENDEMENTS EN  
AGAR EN FONCTION DES SAISONS (MOYENNES)



obtenus en culture industrielle. L'auteur, qui a donné son nom au phénomène : "effet NEISH", avait remarqué qu'après engraissement azoté, correspondant, pour les algues, à une phase de croissance, le métabolisme s'orientait vers la production du colloïde (au détriment de celui des protéines). Les résultats que NEISH observent en culture, semblent donc être le reflet de ce que nous enregistrons dans la nature. Nous avons, par ailleurs, nous-même pu vérifier dans nos cultures semi-industrielles à Wimereux, une forte croissance des algues d'avril à août puis une stabilisation au-delà (BODARD et CHRISTIAEN 1978b)<sup>24</sup>.

## VI<sub>2</sub> - VARIATIONS DE LA TENEUR EN SUCRES

### VI<sub>21</sub> - RESULTATS

Le tableau 7 présente les moyennes obtenues sur un cycle d'un an de juin 79 à juin 80. Nous avons fait figurer les résultats des dosages des sucres totaux et du 3,6 anhydrogalactose, exprimés en pourcentage de sucres rapporté à la quantité d'agar-agar, dans la solution à analyser. La troisième colonne du tableau représente le pourcentage de sucres totaux (A) diminué du pourcentage en 3,6 anhydrogalactose (B) et rapporté au pourcentage en 3,6 anhydrogalactose :

$$\frac{\% \text{ sucres totaux} - \% \text{ 3,6 anhydro}}{\% \text{ 3,6 anhydro}} = \frac{A - B}{B}$$

Cette valeur est indicatrice de la qualité du gel. En effet, le nombre croissant de résidus 3,6 anhydrogalactose favorise la formation des agrégats d'hélices dans le processus de gélification, en imprimant une torsion à la chaîne polysaccharidique. Plus cet indice sera inférieur à 1 plus le gel sera fort.

TABLEAU 7

VARIATIONS SAISONNIERES DE LA TENEUR EN SUCRES  
(GALACTOSE ET 3,6 ANHYDROGALACTOSE) DE L'AGAR-AGAR

	SUCRES TOTAUX A	3,6 ANHYDRO B	$\frac{A - B}{B}$
Juin 79	88,8 % $\pm$ 7	38,8 % $\pm$ 2	1,28
Sept. 79	86,8 % $\pm$ 8	33,9 % $\pm$ 5	1,56
Nov. 79	78,7 % $\pm$	42,4 % $\pm$ 1,5	0,86
Fév. 80	84,8 % $\pm$	46,8 % $\pm$	0,81
Mai 80	75,9 % =	34,1 %	1,33

Les figures 35 et 36 montrent les fluctuations de ces valeurs le long de ce cycle annuel.

#### VI<sub>22</sub> - INTERPRETATIONS

Les variations de la teneur en sucres totaux sont relativement faibles (de 88,8 à 75,9 % soit 14,5 %), contrairement à celles du 3,6 anhydrogalactose qui passent de 33,9 % à 46,8 % soit une différence de 27,6 %. ASARE<sup>19</sup> (1980) fait exactement la même remarque à propos du 3,6 anhydrogalactose de *G. tikvahiae*.

Le rapport entre les sucres autres que le 3,6 anhydrogalactose et ce dernier ( $\frac{A - B}{B}$ ) s'inverse au cours des saisons (de 1,56 à 0,81). Ces fluctuations sont très importantes. Quand on regarde dans le détail échantillon par échantillon (voir tableau en annexe) on constate que pour chaque saison concernée la moyenne reflète bien le comportement individuel des échantillons, car les valeurs sont, à l'intérieur de la même période, ou toutes au-dessus de 1 ou toutes en-dessous.

De même, le pourcentage en 3,6 anhydrogalactose est relativement homo-

FIGURE 35  
COURBE DES VARIATIONS DE LA TENEUR EN SUCRES  
TOTAUX (MOYENNES) EN FONCTION DES SAISONS

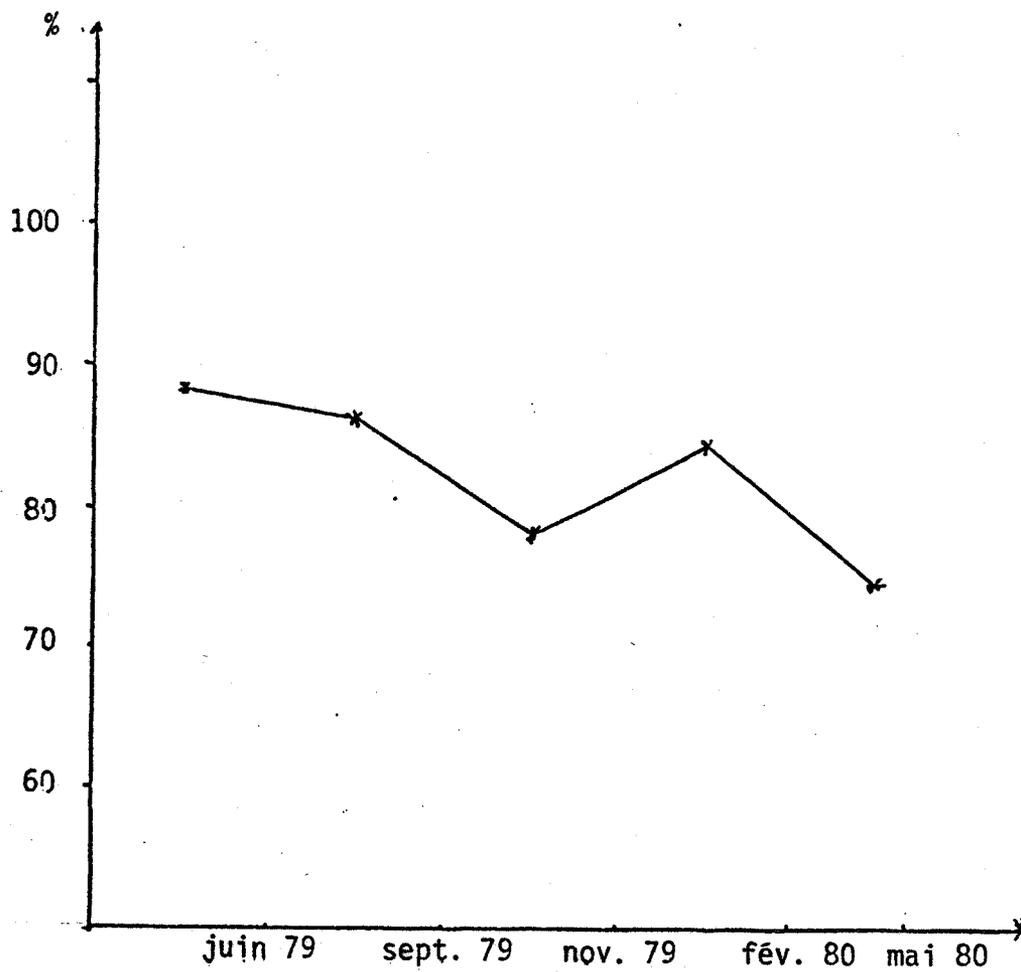
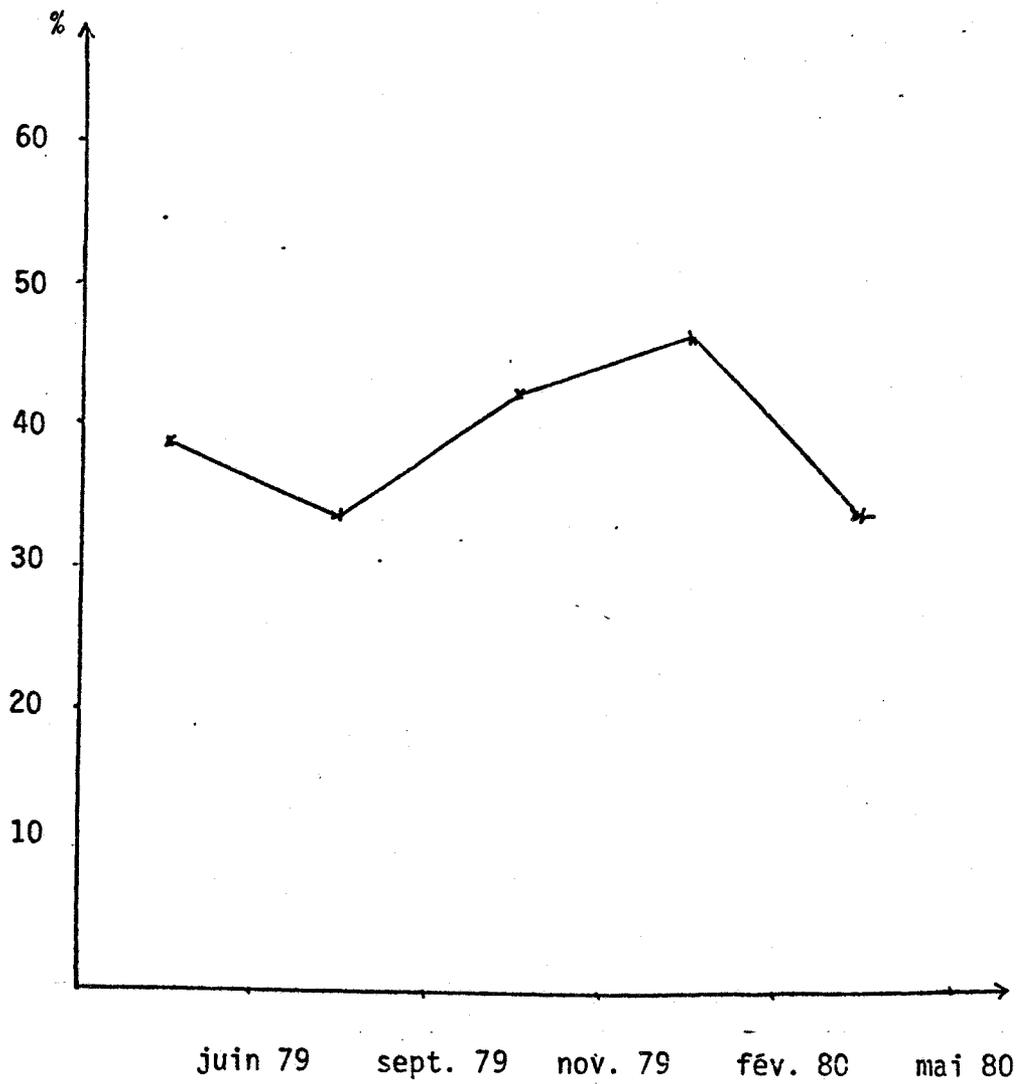


FIGURE 36  
COURBE DES VARIATIONS DE LA TENEUR EN 3,6 ANHYDRO-  
GALACTOSE EN FONCTION DES SAISONS



gène au sein de la même période d'analyses, l'écart type faible en témoigne. Des disparités plus importantes apparaissent dans le dosage des sucres totaux. L'interprétation de ces résultats doit faire intervenir les variations quantitatives des différents glucides qui entrent dans la composition de l'agar (galactose, 3,6 anhydrogalactose, acide glucuronique, glucose) et dont la part relative est susceptible de varier d'un échantillon à l'autre. Cette observation permet d'ailleurs de caractériser des souches à rendements qualitatifs différents.

La lecture du tableau 7 entraîne deux remarques. La première est que, contrairement à ce qu'affirmaient YAPHE et DUCKWORTH (1971)<sup>102</sup>, le rapport entre le galactose et 3,6 anhydrogalactose n'est pas constant ni égal à l'unité. Les résultats qu'avait obtenus YAPHE provenaient probablement de l'analyse d'un agar issu d'un mélange d'agarophytes récoltés en un point géographique donné et dans une période limitée dans le temps. Il n'a donc pas réalisé les conditions que nous nous sommes imposées et qui lui auraient permis de relever les variations relatives que nous avons observées.

La deuxième remarque concerne les enseignements que nos résultats apportent. Les périodes printanières et estivales semblent ne pas être favorables à la biosynthèse d'un colloïde de qualité. (Nous faisons déjà la même réflexion du point de vue des rendements). Il apparaît, en effet, une teneur importante en sucres (du galactose probablement) au détriment de celle en 3,6 anhydrogalactose. On retrouve une corrélation inverse en saison hivernale où la part relative en 3,6 anhydrogalactose augmente aux dépens du galactose. On peut donc penser qu'il existerait une cinétique continue dans la biosynthèse de l'agar à partir du galactose, lequel se transformerait en 3,6 anhydrogalactose au cours du temps sous certaines conditions qui restent à déterminer. Cette idée n'est pas neuve. Elle est à rapprocher d'une part de ce que nous disions plus haut de "l'effet NEISH" et de l'hétérogénéité de l'agar tel

qu'ont pu le montrer certains auteurs. Nous y voyons là la manifestation de ce que nous avons appelé la cinétique de synthèse de l'agar : les résultats publiés par ces auteurs traduisent en quelque sorte un modèle instantané de la molécule qui sera différent à une autre période. D'autre part, on pense depuis ARAKI (1966)<sup>16</sup> que le sulfate en C<sub>6</sub> du galactose constitue le précurseur du 3,6 anhydrogalactose. De nombreux auteurs (TAGAWA *et coll.* 1963<sup>88</sup>, HONG et YAPHE 1968)<sup>45</sup> ont vérifié ce point en notant l'augmentation de la teneur en 3,6 anhydrogalactose d'un phycocolloïde après traitement alcalin. Sans contredire ce fait, nous verrons que cette interprétation est insuffisante dans le cas de l'agar-agar. Nos dosages des sulfates le montrent.

### VI<sub>3</sub> - DOSAGE DES SULFATES

#### VI<sub>31</sub> - RESULTATS

Le tableau 8 résume les valeurs moyennes de la teneur en sulfate, par saison, dosées par le rhodizonate de sodium. Nous les avons exprimées en pourcentage de sulfate par rapport à la quantité totale de polysaccharide servant au dosage.

TABLEAU 8  
VARIATIONS SAISONNIERES DE LA TENEUR EN SULFATES DE L'AGAR-AGAR

	Jun 79	Sept. 79	Nov. 79	Fév. 80	Mai 80
% SO <sub>4</sub> <sup>---</sup>	1,3	0,8	2,5	1,4	-

VI<sub>32</sub> - INTERPRETATIONS

Les résultats présentés ci-dessus sont très homogènes et globalement ne varient pratiquement pas. Certaines valeurs très élevées ou très basses par rapport à la moyenne (cf. Annexe) sont le fait de pieds isolés parmi tous ceux que nous avons analysés. Ils représentent environ 20 % de l'échantillonnage répartis sur toute la période d'investigation. En conséquence, ils ne peuvent pas intervenir dans nos interprétations.

Les chiffres que nous avons obtenus sont de l'ordre de grandeur de ceux que nous pouvons relever dans la littérature. Cependant, ASARE (1980)<sup>19</sup> montre que la teneur en sulfate du phycocolloïde de *Gracilaria tikvahiae* fluctue en fonction des saisons. Elle passe de 1,6 % en hiver à 8 % en été.

En ce qui concerne l'agar de *Gracilaria verrucosa*, il semblerait que les sulfates ne sont pas causes de variabilité dans la qualité de l'agar, contrairement aux carraghenanes. Les teneurs très basses en ce résidu pouvaient déjà nous le laisser penser. Pour le moins, les fluctuations dans le taux de substitution ne pouvaient être que très faibles. Ceci montre une différence importante entre carraghenanes et agar-agar.

Par ailleurs, même si des ponts 3,6 anhydro se forment à partir du 6-sulfate-galactose *in vitro*, il ne semble pas qu'un tel phénomène se produise dans la nature. DE LESTANG et QUILLET (1976)<sup>54</sup> ont montré que le degré de sulfatation était proportionnel à la durée de l'immersion des algues lors du battement des marées. Ils ont mis en évidence un métabolisme des sulfates qui fait apparaître une fixation d'esters sulfates lors de l'immersion et une libération lors de l'immersion. Ils expliquent que le nombre croissant de sulfates le long de la chaîne polysaccharidique augmente le pouvoir hygroscopique du colloïde qui offre à l'algue immergée une résistance plus grande à la dessiccation grâce à une rétention d'eau plus importante. Or, le *Gracilaria verrucosa*

est une espèce que l'on trouve dans des cuvettes sablonneuses qui retiennent l'eau à marée basse. Elle n'a donc pas besoin de lutter contre la dessiccation. La faible proportion d'esters sulfates en serait donc le reflet. On peut comprendre également que ce taux de sulfate n'ait pas à varier dans le temps puisque ceci est indépendant des saisons, ce que confirme nos résultats.

La question de l'origine du 3,6 anhydrogalactose qui apparaît en fonction du temps reste donc posée. Un autre type de métabolisme doit donc exister, des études plus poussées seront par conséquent nécessaires.

#### VI<sub>4</sub> - AUTRES PRODUITS DE SUBSTITUTION (ACIDE GLUCURONIQUE)

##### VI<sub>41</sub> - RESULTATS

Nous avons dosé les acides glucuroniques par le carbazol. Les résultats sont consignés dans le tableau 9. Ils sont exprimés en pourcentage de glucuronique par rapport à la quantité totale d'agar dans la solution à doser. Compte tenu de la teneur importante en sucres neutres présents dans le milieu, nous avons appliqué la formule de correction décrite dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

TABLEAU 9  
VARIATIONS SAISONNIERES DE LA TENEUR EN  
ACIDE GLUCURONIQUE DE L'AGAR-AGAR

	Juin 79	Sept. 79	Nov. 79	Fév. 80	Mai 80
% acide glucuronique	2,6	4	2,5	5,2	-

## VI<sub>42</sub> - INTERPRETATIONS

L'acide glucuronique est toujours présent dans nos échantillons. La quantité d'acide uronique reste toujours relativement faible et passe de 2,6 à 5,2. Ces résultats ne nous permettent pas de les interpréter comme facteurs variants influant sur la qualité de l'agar.

## VI<sub>5</sub> - CONCLUSION SUR LES VARIATIONS SAISONNIÈRES

L'analyse de nos résultats, collectés saison par saison, fait donc apparaître une variation dans les rendements et dans la teneur en 3,6 anhydrogalactose. Contrairement aux carraghenanes ce n'est pas le degré de substitution en ester sulfate qui est le facteur variant. Il semble que la période automne-hiver, si elle n'est pas propice à la croissance de l'algue, favorise le métabolisme du colloïde, à la fois en quantité et en qualité.

Les conditions qui président à la synthèse d'agar-agar sont encore inconnues. Une culture *in vitro* où les paramètres de croissance seraient bien définis, devrait nous permettre de préciser le déterminisme de cette biosynthèse.

Toutefois, nos interprétations tendent à montrer que tout se passe comme si l'algue orientait son métabolisme vers la croissance du thalle quand les conditions de milieu y sont favorables (bonne photopériode, teneur en nitrate suffisante, etc...) puis vers la synthèse de colloïde quand ces conditions se détériorent. Ce phénomène est à rapprocher de "l'effet NEISH" observé en culture *in vitro*.

L'hétérogénéité de la composition de l'agar-agar décrite par certains auteurs traduit à notre avis une cinétique de synthèse du phycocolloïde depuis le galactane sulfaté jusqu'à l'agarose neutre. Cette nouvelle conception

de la molécule d'agar va à l'encontre des modèles statiques proposés jusqu'ici et suggère un modèle évolutif lié aux conditions de milieu de vie de l'algue (que ces conditions soient d'ordres climatique, géographique ou écologique). Pour confirmer cette hypothèse, il nous faudrait reprendre l'étude de fractionnement de l'agar-agar sur colonne telle que l'a réalisée IZUMI (1970)<sup>48</sup>. Nous suivrions ainsi l'évolution pondérale des différentes fractions et verrions s'il existe réellement une compensation qualitative entre celles-ci. En effet, si notre idée est juste, nous devrions passer d'un galactane sulfaté pauvre en 3,6 anhydrogalactose et en 6-O-méthyl-galactose en été à un galactane peu sulfaté, riche en 3,6 anhydrogalactose et en 6-O-méthyl-galactose. Nous pourrions peut-être aussi préciser le comportement de l'acide pyruvique et de l'acide glucuronique.

Notre travail, ici présenté, constituait une étape nécessaire et indispensable pour mieux comprendre et définir la structure de l'agar-agar.

## CHAPITRE VII

### VARIATIONS EN FONCTION DES GENERATIONS

De nombreux auteurs se sont intéressés à la relation entre le cycle biologique des algues et le type de colloïde qui en résulte. On a pu ainsi définir des carraghenanes différents entre les générations gamétophytiques et sporophytiques. Nous avons repris ces études en les appliquant à l'agar-agar en tentant d'évaluer, par rapport à l'évolution des poids secs des algues, les variations dans les rendements en agar et dans la composition biochimique.

## VII<sub>1</sub> - POIDS SECS ET RENDEMENTS

### VII<sub>11</sub> - RESULTATS

En ce qui concerne les résultats par type de thalle, on retrouve la même ségrégation des poids secs que celle décrite dans l'analyse des variations saisonnières. En effet, les thalles gamétophytiques sont plus frêles que les tétrasporophytes (FOUCHER 1980)<sup>36</sup>, en particulier les pieds mâles sont très petits. Ils ont donc relativement le poids sec le plus important.

Les différences de rendement entre les différentes générations ne sont pas significatives sauf en ce qui concerne les thalles mâles (tab. 10).

TABLEAU 10  
POIDS SEC DES ALGUES EN FONCTION DES GENERATIONS  
ET RENDEMENT EN AGAR CORRESPONDANT (MOYENNES)

Sexe	Poids sec	Rendement
♂	16,7	22,8
♀	21	20,7
♂	24,2	14,1

Le nombre de pieds mâles dans la nature étant relativement restreint, il n'apparaît pas important de sélectionner le type de thalle pour des cultures et des extractions industrielles, le retentissement sur les rendements en serait faible. La moyenne des rendements tous pieds confondus et toutes saisons confondues est de 21,5 %. Le nombre de pieds tétrasporophytiques fait donc la différence et globalement on peut dire qu'il reflète la tendance générale.

#### - Variations en sucres

Nous avons évalué les taux de sucres totaux et de 3,6 anhydrogalactose par type de thalle et les avons exprimés en pourcentage de ces sucres par rapport à la quantité d'agar dans la solution. Nous avons également calculé l'indice  $\frac{A - B}{B}$  défini précédemment (tab. 11).

TABLEAU 11  
COMPOSITION EN SUCRES DE L'AGAR-AGAR  
EN FONCTION DES GENERATIONS (MOYENNES)

Type de thalle	Sucres totaux A	3,6 AG B	$\frac{A - B}{B}$
♂	86,4 ± 8	40,2 ± 6	1,18
♀	80 ± 8	38,3 ± 9	1,19
♂	74,7 ± 8	39,1 ± 5	0,93

#### VII<sub>12</sub> - INTERPRETATIONS

A ce niveau la disparité des résultats est très minime. Les pieds mâles apparaissent moins riches en sucres totaux (74,7) contrairement aux pieds tétrasporophytiques (86,4) mais par contre avec les meilleurs indices  $\frac{A - B}{B}$  avec 0,93 contre 1,18 pour les tétrasporophytes.

Les moyennes tous pieds confondus et toutes saisons confondues sont de 82,1 % pour les sucres totaux et 39,7 % pour le 3,6 anhydrogalactose. L'indice moyen  $\frac{A - B}{B}$  voisin de 1 reflète bien ce que YAPHE et DUCKWORTH (1971)<sup>102</sup> remarquaient dans leurs analyses à propos de la constance de cette valeur fixée autour de 1. Nous avons vu plus haut que cela n'était pas toujours vrai, mais nous ne retrouvons pas les mêmes fluctuations qu'alors, ce qui ne nous permet pas de faire une ségrégation en fonction des types de thalles.

#### - Variations de la teneur en sulfates

Le tableau 12 rassemble les résultats des dosages des sulfates, regroupés par type de thalle.

TABLEAU 12

TENEUR EN SULFATE EN FONCTION DES GENERATIONS (MOYENNES)

	♂	♀	♂ <sup>+</sup>
SO <sub>4</sub> <sup>1--</sup>	1,3 %	1,3 %	4,5 %

Les pieds gamétophytiques femelles et tétrasporophytiques ont sensiblement les mêmes valeurs en sulfates. Seuls les pieds gamétophytiques mâles ont un taux de sulfates très élevé par rapport à la moyenne tous pieds confondus et toutes saisons confondues, soit respectivement : 4,5 % contre 1,5 %.

Mais les écarts, lors d'un traitement industriel, seraient parfaitement inutiles car ils sont trop peu importants en nombre pour qu'une telle opération ait des retentissements sensibles sur la valeur moyenne.

Ils méritent cependant une remarque. Ce sont les pieds mâles qui ont le plus fort indice  $\frac{A - B}{B}$ , ce qui traduit une forte proportion de 3,6 anhydrogalactose par rapport aux autres sucres. Le fait qu'ils soient très

sulfatés montre une nouvelle fois que l'origine du 3,6 anhydrogalactose ne se fait pas uniquement aux dépens du galactose-6-sulfate.

#### - Autres substituants

Nous avons dosé les acides uroniques au niveau de chaque type de thalle. Nous avons rassemblé nos résultats dans le tableau 13.

TABLEAU 13

#### TENEUR EN ACIDE GLUCURONIQUE EN FONCTION DES GENERATIONS (MOYENNES)

	♂	♀	♂
Acide glucuronique	3,3 %	5,1 %	4,6 %

Les thalles tétrasporophytiques représentent les valeurs les plus basses. Sans vouloir en faire une classe à part, nous pouvons constater qu'avec leur teneur en sulfate basse par rapport aux autres types de thalles, ils fournissent globalement un agar très peu chargé (en dehors des acides pyruviques que nous n'avons pas analysés) et par conséquent de meilleure qualité. Nous le vérifierons au niveau des propriétés physiques.

## VII<sub>2</sub> - CONCLUSION

Contrairement aux carraghenanes, l'agar-agar ne semble pas, du point de vue biochimique, différer d'un type de thalle à un autre au niveau de nos expérimentations. Nos résultats montrent que les thalles tétrasporophytiques ont, tout au long de l'année les meilleurs rendements en agar. Nous avons remarqué que ceux-ci fournissaient un colloïde assez peu chargé électriquement puisque

les sulfates et les acides uroniques sont faiblement représentés. Nous avons donc un gel de qualité. Ces faits sont en contradiction avec ceux que publient KIM et HENRIQUEZ (1978). Si les forces de gel qu'ils relèvent coïncident avec nos observations, l'analyse des rendements fait apparaître un rapport inverse avec les nôtres. Toutefois, comme le nombre d'individus testés et l'écart type ne sont pas précisés, aucune conclusion objective ne peut être tirée.

Une étude plus poussée et, sans doute, plus fondamentale serait nécessaire pour déceler éventuellement des types d'agar. Une démarche originale s'impose dans ces recherches. En effet, la particularité des substituants du polysaccharide est peut-être une source pour caractériser des produits différents. Si un enzyme, le sulfohydrolase, est responsable des types de carraghénanes, il ne peut en être question ici, en regard du faible taux de sulfate de l'agar-agar. Par contre les 6-O-méthyl et l'acide pyruvique pourraient jouer un rôle pour caractériser des types d'agar.

Il est à remarquer que le carbone 6 du galactose est à une position carrefour puisqu'il concerne plusieurs substituants possibles (6-sulfate, 6-O-méthyl, le pont 3,6-anhydro, le 4,6-carboxy-éthylidène).

Un métabolisme, particulier aux agars-agars, présiderait donc à l'édification de la chaîne polysaccharidique. Celui-ci dépendrait plus, d'après nos résultats, des variations climatiques que des générations.

CHAPITRE VIII

VARIATIONS DANS LES VARIETES CLONIQUES

Dans le souci de sélectionner des variétés hautement productrices en agar-agar de qualité, condition *sine qua non* de la rentabilité industrielle, nous avons essayé d'isoler parmi tous nos échantillons des pieds répondant à ces critères.

## VIII<sub>1</sub> - VARIATION DANS LE POIDS SEC DES ALGUES ET LE RENDEMENT EN AGAR

### VIII<sub>11</sub> - RESULTATS

Si on analyse le tableau 14, échantillon par échantillon, on peut remarquer de fortes variations dans les rendements. Cette constatation nous permet de penser que, même dans un environnement écophysiological identique, la production en phycocolloïde varie. Il existerait donc des phénotypes dans l'espèce et par conséquent des génotypes favorisant la synthèse d'agar-agar.

### VIII<sub>12</sub> - INTERPRETATIONS

L'analyse des poids secs pied par pied nous permet de mettre en évidence des variétés qui ont un métabolisme important. En effet, les valeurs du poids sec passent de 5,3 % à 35 %. Ce premier critère qui serait sélectif pour différencier des algues en culture ne signifie pas forcément un haut rendement en agar. En effet, on observe une variation inverse des poids secs par rapport aux rendements. Pour en savoir plus, nous avons cherché s'il existait réellement une relation entre les poids secs et les rendements. Pour cela, nous avons figuré sur un graphe les poids secs en fonction des rendements. Nous avons obtenu un nuage de points répartis plus ou moins le long d'un axe (fig. 37). Nous avons recherché l'équation de la droite de régression linéaire à l'aide d'une calculatrice Commodore SR5190 R programmée pour la droite de régression.

TABLEAU 14  
POIDS SEC DES ECHANTILLONS SERVANT A L'EXTRACTION  
ET RENDEMENTS EN AGAR

JUIN 79	Poids sec	Rendement	SEPT: 79	Poids sec	Rendement	NOV. 79	Poids sec	Rendement
1 ♂	10	15	8 ♀	11	11,5	16 ?	14	47,6
2 ♂	13,3	16,9	9 ♀	12,4	21,5	17 ♂	13,3	-
3 ♀	11,4	14	10 ♂	15	26,8	18 ♂	13,3	31,2
4 ♂	12	21,6	11 ♂	13,6	17,5	19 ♂	27	24,2
5 ♂	5,3	31,4	12 ♀	13,3	37,3	20 ♂	-	5,6
6 ♂	8,6	35,8	13 ♂	2,3	-	21 ♀	16,7	30,7
7 ♂	22	13,3	14 ♂	2,4	30	22 ♂	25	12,4
			15 ?	-	19,7	23 ♂	16,8	37,3

FEV. 80	Poids sec	Rendement	MAI 80	Poids sec	Rendement
24 ♀	35	16,7	37 ?	14	9
25 ♀	32,5	11,7	38 ♀	20	0,5
26 ♀	17,5	25,6	39 ♂	27,5	17
27 ♂	26	11,1	40 ♀	25	23,9
28 ?	19,4	4,2	41 ?	27,5	16,4
29 ♂	24	-	42 ♀	30	13,5
30 ♀	19,6	22,7	43 ♀	28,6	18,6
31 ♂	24,6	23,7	44 ♂	22	23,4
32 ♂	25	18,4	45 ♂	25,7	23,6
33 ?	27,5	23,8	46 ♂	25	9,7
34 ♂	30	17,1	47 ♂	23,8	20,5
35 ♂	20	19,7	48 ?	30	22,6
36 ♂	8,2	52,3			





Celle-ci est :  $y = -0,6 x + 35,3$ .

Il existerait donc une relation entre poids sec et rendement. Ceci signifierait que plus le poids sec est important plus les rendements sont faibles ; autrement dit, plus l'algue oriente son métabolisme vers la croissance, moins elle fabrique de colloïde. La synthèse d'agar n'interviendrait qu'en fin de croissance de l'algue. Nous avons fait la même remarque lors de l'analyse des résultats saison par saison. Nous y voyons là, encore, une confirmation de "l'effet NEISH".

L'intérêt de cette analyse est tel qu'elle nous permet de sélectionner des souches à la fois prolifératrices et productrices d'agar, en situant le point poids sec-rendement par rapport à la droite de régression. Si le point se situe nettement au-dessus de la droite, la souche devra être conservée, en-dessous elle sera rejetée.

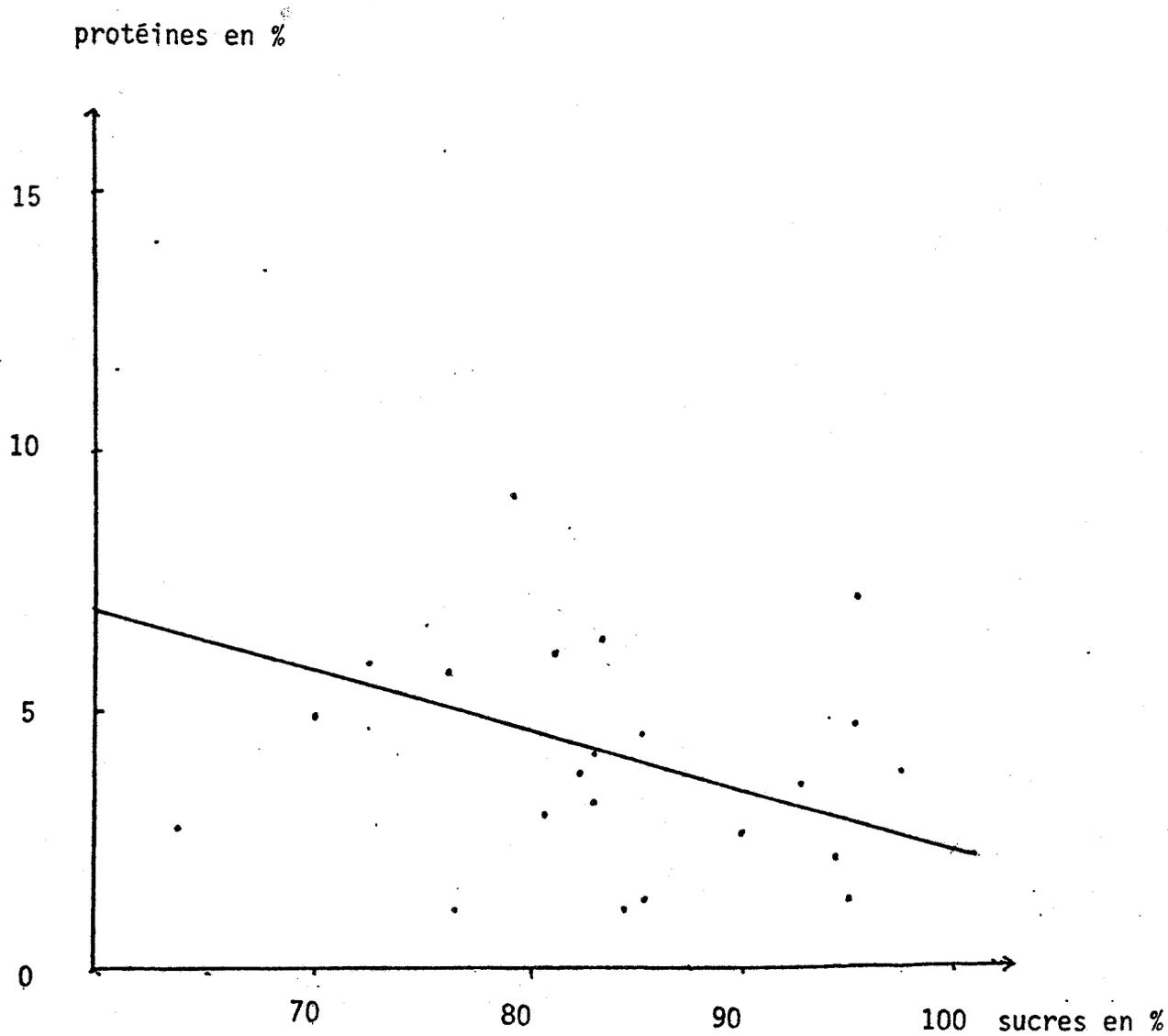
## VIII<sub>2</sub> - VARIATION DANS LA COMPOSITION CHIMIQUE

Nous avons noté, lors de l'analyse des résultats en fonction des saisons, que la teneur en sucres était relativement constante. Les pieds intéressants à relever se situent donc parmi ceux qui ont un excellent indice  $\frac{A - B}{B}$ , puisque la force de gel sera plus élevée, à condition que le taux de sulfate soit faible (YANAGAWA 1952)<sup>99</sup>. Quelques souches répondent à ces trois conditions, la 6, la 16, la 24 et la 35, (tableau en annexe A1)

En poussant plus loin l'analyse du tableau A1, on constate qu'il existe une relation entre teneur en sucres totaux et protéines. Si l'on place sur un graphe les points représentant le taux de protéines en fonction de la teneur en sucres (fig. 38), il se forme un nuage de points orientés selon un axe. Si l'on calcule comme précédemment la droite de régression sensée relier les

FIGURE 38

DROITE DE REGRESSION  $y = - 0,13 x + 15,4$  REPRESENTANT  
LA RELATION ENTRE TENEUR EN SUCRES ET TENEUR EN PROTEINES



points, on obtient l'équation d'une droite qui a pour formule :

$$y = -0,13 x + 15,4.$$

Cela signifie que les fluctuations de la teneur en sucres ne sont pas indépendantes de celles de la teneur en protéines et qu'elles varient en sens inverse. Existerait-il alors une alternative métabolique protéine/sucre au niveau de la paroi des cellules ?

C'est effectivement une question que l'on pourrait se poser. Quoiqu'il en soit nos résultats montrent que certaines variétés de *Gracilaria verrucosa* ont tendance à favoriser la synthèse de protéine aux dépens de celle du colloïde, et ce indépendamment des saisons, puisque l'on ne retrouve pas la même corrélation entre sucres totaux et teneur en protéines. Il s'agit donc d'un caractère spécifique au pied et cette observation a, par conséquent, des retombées sur la sélection. Il faudra écarter des cultures les souches produisant un agar riche en protéines.

CINQUIEME PARTIE

CHAPITRE IX

CONCLUSION

Au terme de ce Mémoire, nous pouvons tenter de synthétiser l'ensemble de nos résultats pour mieux cerner l'évolution de la molécule d'agar dans le temps et définir son rôle physiologique.

L'analyse historique de l'étude de l'agar-agar montre une convergence de pensée des différents auteurs qui ont travaillé la question : l'hétérogénéité du produit. ARAKI en 1937<sup>6</sup> définissait deux fractions : l'agarose et l'agaropectine ; YAPHE et DUCKWORTH (1971)<sup>102</sup> proposèrent trois conformations moléculaires extrêmes (fig. 6) ; enfin, IZUMI (1972)<sup>49</sup> isola cinq fractions. Nos travaux suggèrent, quant à eux, une continuité de structure. L'idée, en soi, n'est pas originale, car si l'on rapproche cette hypothèse de ce qui se passe chez les carraghenanes, REES en 1963<sup>79</sup> et McCANDLESS et CRAIGIE en 1979<sup>62</sup> parlent de précurseurs métaboliques aux  $\lambda$  et  $\kappa$  carraghenanes. Mieux, WONG et CRAIGIE (1978)<sup>98</sup> mettent en évidence l'activité d'une sulfohydrolase dans la biosynthèse des carraghenanes de *Chondrus crispus*.

Il semblerait que du 3,6 anhydrogalactose se forme au fur et à mesure du temps, peut-être aux dépens de 6-sulfate mais pas entièrement, et que son apparition serait fonction des saisons. Le facteur variant serait donc, en accord avec ASARE (1980)<sup>19</sup>, le 3,6 anhydrogalactose. Ainsi, contrairement à ce que pensaient DUCKWORTH et YAPHE (1971)<sup>32</sup> le rapport gal/3,6 anhydrogalactose n'est pas constant et d'après TSUCHIYA et HONG (1966)<sup>94</sup>, celui-ci déterminerait la qualité du gel. Cela signifie que la force de gel sera meilleure si l'agar est extrait d'échantillons de *Gracilaria* prélevés en hiver.

Par ailleurs, nous avons montré et expliqué, que les rendements en agar étaient meilleurs en saison fraîche.

Nous avons mis en évidence une relation entre les poids secs de l'algue, traduction de sa croissance, et les rendements. Nous avons interprété ce phénomène en définissant une phase de croissance, en été, où la synthèse protéique prend le pas sur celle du colloïde. Or, le "bloom" planctonique, du prin-

temps, contribue à enrichir le milieu en matière organique en été, après l'explosion démographique du plancton, propice à la croissance de l'algue. Et DEBOER (1978)<sup>28</sup> a montré, pour *Gracilaria foliifera*, un taux de croissance de cette espèce, proportionnel à la concentration du milieu de culture en azote. Par contre, il observe les rendements en agar les plus élevés (45 %) pour des algues cultivées en eau de mer non enrichie et une chute exponentielle de ceux-ci avec l'augmentation de la concentration en azote. Ces résultats semblent donc en accord avec ceux que nous avons observés dans la nature.

Mais nous sommes allé plus loin encore. En effet, nous avons pu démontrer l'existence d'une relation entre teneur en protéines, habituellement considérée comme une impureté (TAGAWA *et coll.* 1963)<sup>88</sup>, et teneur en sucre. Ainsi, si il y a compensation entre composition protéique et composition polysaccharidique, faut-il penser que deux voies métaboliques se concurrencent au niveau de la paroi, ou faut-il considérer l'agar-agar comme une glycoprotéine ? Sans vouloir donner, ici, une réponse définitive, nous avons eu la curiosité d'analyser la fraction protéique d'un de nos échantillons d'agar-agar. La figure 39 met bien en évidence la présence d'une glucosamine ; or, généralement on la rencontre à la jonction entre un polysaccharide et une protéine de la façon suivante :

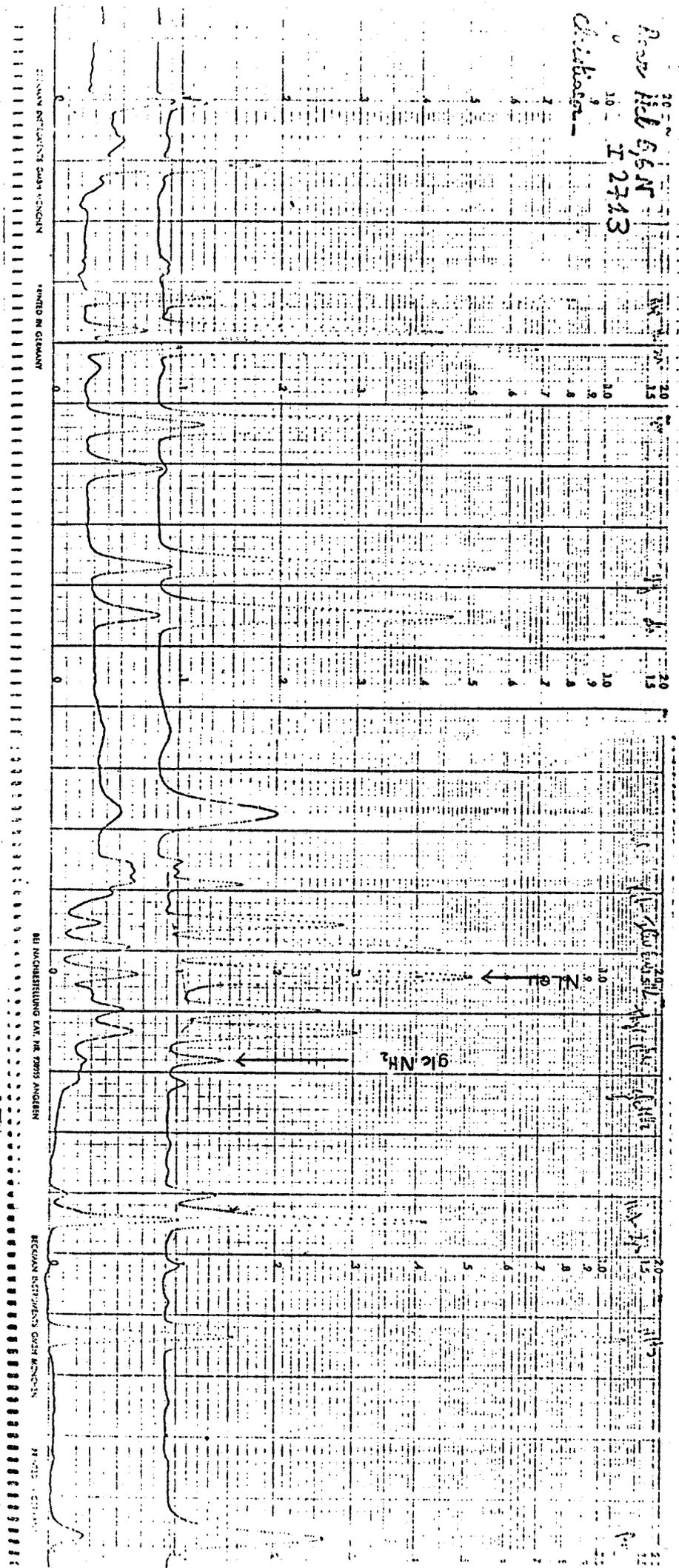


Cette supputation constitue de toute façon une hypothèse de travail.

Enfin, d'un point de vue pratique, nos résultats vont nous permettre une sélection de variétés d'agarophytes selon des critères scientifiques. L'existence de variants a été démontrée par les travaux de VAN DER MEER (1977 et 1979)<sup>95 96</sup>, mais ce qui intéresse les industriels ce sont les rendements en colloïde. Il nous faudra donc séparer en cultures des pieds ayant un taux

FIGURE 39

CHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION PROTEIQUE A L'AUTOANALYSEUR  
BECKMAN APRES HYDROLYSE HCl 5,6N 4h - MISE EN EVIDENCE DE LA GLUCOSAMINE



de croissance élevé et libérant une grande quantité d'agar. L'abaque poids sec/rendement que nous avons dressé (fig. 35) devrait permettre de situer rapidement l'algue par rapport à ces critères. De plus le test d'évaluation de la quantité de gel contenu dans les tissus, que nous avons mis au point, devrait faciliter grandement cette tâche.

Quant à la qualité de gel, il semble que ce soit davantage les conditions de culture qui interviennent. Il nous faudra donc savoir, qui, de la température, de la photopériode, de la qualité de la lumière ou des nutriments, influence la biosynthèse de l'agarose qui est, selon ARAKI *et coll.* (1958)<sup>15</sup>, la fraction gélifiante de l'agar.

Les réponses à ces questions seraient déterminantes pour les industriels quant aux choix d'installation de leurs cultures d'algues. Faut-il préférer la qualité de la lumière de la Bretagne, aux eaux chaudes de la centrale nucléaire de Gravelines, ou faut-il exporter les cultures outre-mer, en régions tropicales ?

Notre travail doit donc se poursuivre par une analyse plus fine des paramètres influençant la qualité de l'agar, par des cultures *in vitro* et par une sélection de variétés aux caractéristiques bien définies. Enfin, les analyses biochimiques devront être menées plus avant, de manière à étudier le fractionnement de l'agar et l'évolution relative de ces fractions, puis répondre à la question de la place des protéines dans le colloïde.

ANNEXES

TABLEAU A1

ENSEMBLE DES RESULTATS DES DOSAGES BIOCHIMIQUES,  
ECHANTILLON PAR ECHANTILLON

Souche	Pds sec algue	Rendement	Sucres totaux	3,6 Anh.Gal.	Glc AU	Sucres 3,6 AG	Protéines	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Juin 79	11,0 ± 5	21,1 ± 9	88,8 ± 7	38,8 ± 2	2,6 ± 1	1,20 ± 0,2	4,8 ± 2	1,3 ± 1
1	10	15	95,8	42,3	1,8	1,26	7,3	-
2	13,3	16,9	94,2	41,4	2,0	1,27	2,2	0,8
3	11,4	14	97,4	38,5	1,9	1,53	3,9	0,7
4	-	-	84,6	34,6	3,2	1,44	1,3	0
5	12	21,6	95,8	40,4	2,3	1,37	4,8	1,5
6	5,3	31,4	81,4	36,5	3,9	1,23	6,1	1,4
7	8,6	35,8	79	38,5	3,2	1,05	8,2	4
8	22	13,3	83	38,5	2,4	1,16	4,3	0,8
Sept. 79	10 ± 5	23,5 ± 8	86,8 ± 8	33,9 ± 5	4 ± 2	1,56 ± 0,3	3,3 ± 2	0,8 ± 0
9	11	11,5	72,9	31,7	6,2	1,30	5,9	0,8
10	12,4	21,5	83,4	28,4	4,5	1,94	6,4	0,5
11	15	26,8	85,1	30	8,7	1,84	4,6	0,8
12	13,6	17,5	85,1	31,7	3,6	1,69	1,4	0,7
13	13,3	37,3	83,4	30	4,9	1,78	3,2	1
14	-	-	95	-	5,1	-	1,4	1,5
15	2,3	-	100	37,5	1,2	1,67	0	0,2
16	2,4	30	93,4	41,3	0,2	1,26	3,7	-
17	0	-	-	-	-	-	-	-
18	-	19,7	83,4	41,3	1,9	1,02	-	-
Nov. 79	18,8 ± 5	27 ± 12	78,7 ± 9	42,4 ± 1	2,5 ± 1/2	0,86 ± 0,1	3 ± 2	2,5 ± 2
19	14	47,6	81,6	42	3	0,94	3	1,1
20	13,3	-	77	42	2,2	0,83	5,7	5
21	13,3	31,2	70,1	41,1	2,4	0,77	4,9	2,2
22	27	24,2	82,7	44	3,1	0,88	3,8	2,2
23	0	5,6	63,2	39,2	2,5	0,61	2,7	6,5
24	16,7	30,7	87,3	44,5	2,4	0,96	0	1,2
25	25	12,4	77	42,5	2,9	0,81	1,2	0,5
26	-	-	-	-	-	-	-	-
27	16,8	37,3	90,8	43,8	1,8	1,06	2,7	1,1
Fév. 80	25,1 ± 5	18,9 ± 5	84,8 ± 8	46,8 ± 2	5,2 ± 2	0,81 ± 0	3 ± 2	1,4 ± 1
28	35	16,7	84,7	51	9,9	0,66	3	1,2
29	32,5	11,7	71,8	45,4	3,8	0,58	5,7	1,9
30	17,5	25,6	84,7	45	4,7	0,88	4,9	2,5
31	26	10,1	78,8	47,7	6,6	0,65	6,6	2,6
32	19,4	4,2	87,1	46,5	5,8	0,87	3,8	1,1
33	24	-	75,3	46	5,9	0,64	4,9	1,2
34	19,6	22,7	71,8	45,4	7,8	0,58	5,7	1,6
35	24,6	23,7	89,4	46	2,5	0,94	4,9	0
36	25	18,4	96,5	48,1	2,9	1	4,9	0
37	27,5	23,8	90,6	49,3	4,4	0,83	4,9	1,9
38	30	17,1	81,2	47,3	2,7	0,72	4,9	0
39	20	19,7	94,1	46,2	5,2	1,03	4,9	0
40	8,1	52,3	91,8	50	7	0,84	4,9	3,8
41	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	88,9	41,6	3,8	1,14	4,9	1,2
Mai 80	24,9 ± 4	18 ± 5	75,9 ± 6	34,0 ± 10	5,1 ± 2	1,33 ± 1/2	3 ± 2	1,4 ± 1
43	14	9	65,5	20,9	7,1	2,13	4,9	1,2
44	20	0,5	-	-	-	-	4,9	-
45	27,5	17	77,8	37,5	4,2	1,07	4,9	1,2
46	25	23,9	74,1	45,9	7,2	0,61	4,9	1,2
47	27,5	16,4	82,7	56,4	6,8	0,47	4,9	1,2
48	30	13,5	79	28,2	1,4	1,8	4,9	1,2
49	28,6	18,6	69,2	26,1	8,1	1,65	4,9	1,2
50	22	23,4	80,3	33,4	0,8	1,4	4,9	1,2
51	25,7	23,6	84	23,3	5,6	2,6	4,9	1,2
52	25	9,7	66,7	33,4	5,6	1	4,9	1,2
53	23,8	20,5	79	38,6	4,8	1,05	4,9	1,2
54	30	22,6	39,5	21,9	-	0,8	4,9	1,2



TABLEAU A2

MESURES PHYSIQUES DES GELS D'AGAR A 1 %  
OBTENUS DES EXTRAITS SAISONNIERS

	Force de gel en g/cm <sup>2</sup>	Température de fusion	Température de gélification
Juin 79	242	73°C	34°C
Sept. 79	146	69°C	38°C
Nov. 79	245	72°C	35°C
Fév. 80	263	74°C	32°C
Mai 80	95	79°C	31°C
	128	72,4	34



BIBLIOGRAPHIE

1. AKAHANE T. et S. IZUMI, 1976. - *Agr. Biol. chem.* 40 (2) : 285-289.
2. ANDERSON A.J. et N.F. McLAGAN, 1955. - *Biochem J.* 59 : 638.
3. ANDERSON N.S., T.C.S. DOLAN, C.J. LAWSON, A. PENMAN et D.A. REES, 1968a. - *Carbohydr. Res.* 7 : 468-473.
4. ANDERSON N.S., T.C.S. DOLAN et D.A. REES, 1968b. - *J. Chem. Soc. C* : 596-601.
5. ANDERSON N.S., T.C.S. DOLAN, A. PENMAN, D.A. REES, G.P. MULLER, D.F. STANCIOFF et N.F. STANLEY, 1968c. - *Ibid. C* : 602-606.
6. ARAKI C., 1937. - *J. Chem. Soc. Jap.* 58 : 1338.
7. ARAKI C., 1944a. - *Ibid.* 65 : 533-627.
8. ARAKI C., 1944b. - *Ibid.* 65 : 725-730.
9. ARAKI C. et S. HIRASE, 1953. - *Bull. Chem. Soc. Jap.* 26 : 463.
10. ARAKI C. et S. HIRASE, 1954. - *Ibid.* 27 : 109.
11. ARAKI C. et K. ARAI, 1956. - *Ibid.* 29 : 339.
12. ARAKI C., 1956. - *Ibid.* 29 : 543-544.
13. ARAKI C. et K. ARAI, 1957. - *Ibid.* 30 (3) : 287-293.
14. ARAKI C., 1958. - *Proc. 4th Intern. Congr. Biochem., Vienna*, 1 : 15.
15. ARAKI C., S. HIRASE et T. ITO, 1958. - *Abstr. 3rd Intern. Seaw. Symp. Galway, Ireland*, p. 81-82.
16. ARAKI C., 1966. - *Proc. 5th Int. Seaw. Symp.*, p. 3-19.
17. ARAKI C., K. ARAI et S. HIRASE, 1967. - *Bull. Chem. Soc. Jap.* 40 : 959-962.
18. ARAKI C., 1969. - *Mémoires of Shijonawatgakwem Womens'S College* 3 : 1.
19. ASARE S.O., 1980. - *Bot. Mar.* 23 (9) : 595-598.
20. BAUER , 1884. - *J. Prakt. Chem. N.F.* 30 : 367.
21. BERTOLACINI R.J. et J.E. BARNEY, 1957. - *Anal. Chem.* 29 (2) : 281-283.
22. BLACK W.A.P., W.R. BLAKEMORE, J.A. COLQUHOUN et E.T. DEWAR, 1965. - *J. Sci. Foos Agric.* 16 : 573-585.
23. BODARD M. et D. CHRISTIAEN, 1978a. - *Bull. Soc. Phyc. Fr.* 23 : 11-17.



24. BODARD M. et D. CHRISTIAEN, 1978b. - *Rapport D.G.R.S.T. n°76 7 0274*, p. 1-48.
25. CLINGMAN A.L., J.R. NUNN et A.M. STEPHEN, 1957. - *Can. J. Chem.* 35 : 297-301.
26. CRAIGIE J.S. et K.F. WONG, 1978. - *Proc. Int. Seaweed Symp.* 9 : 369-379.
27. CROSS A.D., 1964. - *London Butterworths*.
28. DEBOER J.A., 1978. - *Proc. Int. Seaweed Symp.* 9 : 263-273.
29. DICKSON A.D., H. OTTERSON et K.P. LINK, 1930. - *J. Amer. Chem. Soc.* 52 : 775.
30. DISCHE Z., 1947. - *J. Biol. Chem.* 167 : 189.
31. DOLAN T.C.S. et D.A. REES, 1965. - *J. Chem. Soc.* : 3534-3539.
32. DUCKWORTH M. et W. YAPHE, 1971. - *Carbohydr. Res.* 16 : 189-197.
33. DUCKWORTH M., K.C. HONG et W. YAPHE, 1971. *Ibid.* 18 : 1-9.
34. ELLIOTT J.H. et A.J. GANZ, 1975. - *J. Food Sci.* 40 (2) : 394-398.
35. ELSON L.A. et W.T.J. MORGAN, 1933. - *Biochem. J.* 27 : 1824.
36. FOUCHET T., 1980. - *D.E.A., Université de Lille I*, p. 1-63.
37. FULLER S.W., 1971. - *Ph. D. Thesis Univ. of New Hampshire N.H., U.S.A.*
38. GORDON K.H., S. BHATTACHARJEE et W. YAPHE, 1977. - *Carbohydr. Res.* 54 : C7-C10.
39. GUISELEY K.B., 1970. - *Ibid.* 13 : 247.
40. GRAN H.H., 1902. - *Bergens Museums Aarbors* 2 : 1-16.
41. HANDS S. et S. PEAT, 1938. - *Nature* 142 : 797.
42. HIRASE S. et C. ARAKI, 1954. - *Bull. Chem. Soc. Jap.* 27 : 105.
43. HIRASE S., 1957. - *J. Chem. Soc. Jap.* 63 : 68-78.
44. HIRASE S., C. ARAKI et T. ITO, 1958. - *Bull. Chem. Soc. Jap.* 31 : 428-431.
45. HONG K.C. et W. YAPHE, 1968. - *6th Int. Symp., Abstract n°54*.
46. HONG K.C., M.E. GOLDSTEIN et W. YAPHE, 1969. - *Proc. 6th Int. Seaweed Symp., Madrid*, p. 473-482.

47. HUDSON G.W., 1762. - *Flora anglica* 1 : 470-474.
48. IZUMI K., 1970. - *Agr. Biol. Chem.* 34 : 1739-1740.
49. IZUMI K., 1972. - *J. Biochem.* 72 (1) : 135-140.
50. JONES A.S. et D.S. LETHAM, 1954. - *Chem. and Ind.* : 662-663.
51. KIM D.H., 1970. - *Bot. Mar.* XIII (2) : 140-162.
52. KIM D.H. et N.P. HENRIQUEZ, 1978. - *Proc. IXth Int. Seaweed Symp.*  
9 : 257-262.
- 52bis. KLING R., 1978(1979). - *Bull. Soc. Bot. N. Fr.* 31 (3-4) : 59-60.
53. LESTANG G. (de) et M. QUILLET, 1974. - *Physiol. Vég.* 12 (2) : 199-227.
54. LESTANG G. (de) et M. QUILLET, 1976. - *Ibid.* 14 (2) : 259-269.
55. LOWRY O.H., N.J. ROSENBOURG, A.L. FARR et R.J. RANDALL, 1951. - *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
56. LÜDTKE M., 1929. - *Biochem. Z.* 212 : 419.
57. LLOYD A.G., K.S. DOGSON, R.G. PRICE et F.A. ROSE, 1961. - *Bioch. Biopl. Acta* 46 : 116-120.
58. MAHER G.G., 1949. - *Anal. Chem.* 21 : 1142.
59. McCANDLESS E.L. et S.M. RICHER, 1972. - *Proc. Int. Seaweed Symp.* 7 :  
491-498.
60. McCANDLESS E.L., 1973. - *Planta* 112 : 201-212.
61. McCANDLESS E.L., 1975. - *Can. J. Bot.* 53 : 2315-18.
62. McCANDLESS E.L. et J.S. CRAIGIE, 1979. - *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30 :  
41-55
63. MARSHALL S.M., L. NEWTON et A.P. ORR, 1949. - *London H.M.S.O.*
64. MOLLION J., 1977. - *Thèse de 3ème Cycle, Université de Lille I*, p. 1-70.
65. MONTREUIL J. et G. SPIK, 1963. - *Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux, Université de Lille I*, p. 1-131.
66. NEISH A.C. et P.F. SHACKLOCK, 1971. - *National Research Council of Canada, Atlantic Regional Laboratory, Technical Report, Series n°14* : 2511.
67. NEUBERG et OHLE, 1921. - *Biochem. Z.* 125 : 311.
68. OZA R.M., 1978. - *Bot. Mar.* 21 (3) : 165-167.
69. PAPPENFUSS G.F., 1950. - *Hydrobiol., Acta Hydrobiol. Limn. et Protist.*  
2 (3) : 195 et 203.

70. PAULY H. et E. LUDWIG, 1922. - *Z. Physiol. Chem.* 121-170.
71. PAYEN M., 1859. - *C. R. Acad. Sci.* 49 : 521-530.
72. PENNIMAN C.A., 1977. - *J. Phycol.*, Supl., 13 : 53.
73. PERCIVAL E.G.V., J.C. SOMMERVILLE et I.A. FORBES, 1938. - *Nature* 142 : 728-797.
74. PERCIVAL E.G.V., 1944. - *Ibid.* 154 : 673-674.
75. PICKMERE S.E., P.S. PARSONS et R.W. BAILEY, 1973. - *Phytochemistry* 12 : 2441-2444.
76. PIRIE N.W., 1936. - *Biochem. J.* 30 : 369-373.
77. QUILLET M. et LESTANG G. (de), 1972. - *Bull. Soc. Et Sci. Anjou*, NS, VIII : 55-66.
78. REES D.A., 1961. - *Biochem. J.* 81 : 347-352.
79. REES D.A., 1963. - *J. Chem. Soc.* : 1821-1832.
80. REES D.A., 1965. - *Ann. Rep. Prog. Chem. (Chem. Soc. London)* 62 : 469-487.
81. RIGNEY J.A., 1971. - *Prog. Rep. 39, Indust. Dev. Branch, Dept. Fish and Forestry, Ottawa (Canada)*.
82. RIMINGTON C., 1931. - *Biochem. J.* 25 : 1062.
83. SAVARD J., J. NICOLLE et S. MORIZE, 1957. - *Bull. Ass. Tech. Ind. papetière* 3 : 79.
84. SEAMAN J.S., W.E. MOORE, Rh. MITCHELL et M.A. MILLER, 1954. - *Tappi* 37 : 336.
85. SMITH D.B., W.H. COOK et J.L. NEAL, 1954. - *Arch. Biochem. Biophys.* 53 : 192-204.
86. STANCIOFF D.J. et N.F. STANLEY, 1969. - *Proc. 6th. Int. Seaweed Symp., Madrid*, p. 595-609.
87. STANLEY N.F., 1963. - *US. Patent n°3 094* : 517.
88. TAGAWA S., Y. KOJIMA et T. OGATA, 1963. - *J. Shimonoseki Univ. Fish* 13 (1) : 13-21.
89. TERHO T. et K. HARTIALA, 1971. - *Analytical Biochemistry* 41 : 471-476.

90. TILLSMANS J. et K. PHILIPPI, 1929. - *Biochem. Z.* 215 : 36-60.
91. TOLLENS B. et K. LEFEBVRE, 1892. - *Chem. Ber.* 25 : 2569.
92. TORRES POMBO J., 1972. - *Acta Cientifica Compostelana IX* (1-2) : 53-64.
93. TRACEY M.V., 1948. - *Biochem J.* 42 : 693.
94. TSUCHIYA Y. et K.C. HONG, 1966. - *Tohoku J. of Agric. Res.* 16 : 141.
95. VAN DER MEER J.P., 1977. - *Phycologia* 16 (4) : 367.
96. VAN DER MEER J.P., 1979. - *Ibid.* 18 (1) : 47-54.
97. WHYTE J.N.C. et J.R. ENGLAR, 1976. - *Fisheries and Marine Service, Canada, Technical Report n°623.*
98. WONG K.F. et J.S. CRAIGIE, 1978. - *Plant Physiol.* 61 (4) : 663-666.
99. YANAGAWA T., 1952. - *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 17 (10) : 305-308.
100. YAPHE W., 1957. - *Can. J. Microbiol.* 3 : 987.
101. YAPHE W., 1960. - *Anal. Chem.* 32 : 1327.
102. YAPHE W., et M. DUCKWORTH, 1971. - *Proc. Int. Seaweed Symp., 7th.,*  
p. 15-22.
103. YING KIM N.M.K. et W. YAPHE, 1972. - *Carbohydr. Res.* 25 : 379-385.
104. YOUNG K., M. DUCKWORTH et W. YAPHE, 1971. - *Ibid.* 16 : 446-448.
105. ZANETTA J.P., W.C. BRECKEMBRIDGE et G. VINCENDON, 1972. - *J. Chromato*  
69 : 291.

