

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN PRODUCTIVITÉ AQUATIQUE

PAR

CLARISSE CHESEAUX

Licence en Biologie

ANALYSES DES HUILES ESSENTIELLES DE L'ALGUE BRUNE
FUCUS VESICULOSUS DE LA COTE NORD DU SAINT-LAURENT

AOUT 1988



Mise en garde/Advice

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

RESUME

L'extraction de l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus*, algue brune commune sur les bords du Saint-Laurent, a été effectuée par une technique de distillation à la vapeur appelée hydrodiffusion. L'isolation des substances volatiles présentes dans cette huile a été faite par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire, et l'identification des composés majeurs a été obtenue principalement par une analyse complémentaire de spectrométrie de masse.

L'analyse qualitative de l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus* a permis d'identifier plusieurs composés dont :

-trois nor-caroténoïdes, le β -ionone, le β -cyclocitral et le dihydroactinidiolide déjà isolés de l'algue rouge *Porphyra tenera* .

-un hydrocarbure insaturé, l'hénécosaheptaène (C₂₁:6) déjà extrait par solvant organique de plusieurs algues brunes.

-des acides gras saturés C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₈ et C₁₉ avec une prépondérance des acides gras C₁₄ et C₁₆ respectivement l'acide myristique et l'acide palmitique qui représentent plus de la moitié des constituants révélés par l'analyse en chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus*.

La variation saisonnière des composés majeurs identifiés a été estimée sur une période de plus d'une année, d'octobre 1986 à mai 1988, en excluant les mois d'hiver. Les acides gras saturés semblent suivre une variation parallèle à celle de la croissance du thalle de l'algue, taux minimum au printemps pour augmenter jusqu'à l'été. L'hénécosaheptaène suit une variation inverse, taux maximum au printemps pour diminuer jusqu'à l'été. Le taux élevé de cet hydrocarbure semble associé au temps et à la partie où la division cellulaire est rapide. Cette hypothèse a été renforcée par la présence plus élevée de ce composé dans les jeunes pousses, plutôt que dans les autres parties de l'algue.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement le Dr. François X. Garneau pour tout le soutien logistique et financier qu'il m'a offert au cours de cette recherche, ainsi que pour ses précieux conseils et sa grande disponibilité. Je remercie également très sincèrement le Dr. Guy Collin pour ses nombreux conseils et son support financier qui m'a permis de mener à bien cette recherche.

J'offre également mes remerciements à Michel J. Gagnon de l'Université du Québec à Chicoutimi et à Michel Girard de Santé et Bien-être social Canada à Ottawa, pour leur grande collaboration dans les analyses en spectrométrie de masse. Les commentaires et les conseils de François X. Garneau et de Michel J. Gagnon m'ont grandement servi.

Plusieurs personnes m'ont aidé lors de la réalisation des activités de laboratoire en contribuant à certains travaux et/ou en me donnant de nombreux conseils. Ainsi, je remercie Daniel Marquis, Claude Grenon, France Ida Jean, Hélène DesLauriers et Alain Marcoux.

Ce travail de recherche fut réalisé grâce à l'appui cité plus haut, mais aussi grâce à mes parents qui m'ont donné cette chance d'entreprendre un tel travail hors de mon pays. Et je remercie encore grandement la Fondation de l'Université du Québec à Chicoutimi, pour m'avoir donné deux fois de suite, une bourse d'exemption des frais de scolarité pour étudiants étrangers.

TABLE DES MATIERES

	page
RÉSUME.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIERES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ANNEXES.....	viii
CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 Applications des algues brunes.....	2
1.2 Objectifs du travail.....	6
CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	10
2.1 <i>Fucus vesiculosus</i>	11
2.2 Site d'échantillonnage.....	11
2.3 Extractions.....	15
2.4 Techniques analytiques.....	20
2.4.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	20
2.4.2 Spectrométrie de masse (SM).....	23
CHAPITRE III : ANALYSE QUALITATIVE.....	26
3.1 Introduction.....	27
3.1.1 Remarques techniques.....	27
3.1.2 Premières découvertes.....	32
3.2 Résultats.....	37
3.2.1 Séparation des constituants des huiles es-	
sentielles par CPG.....	37
3.2.2 Identification des constituants majeurs	
des huiles essentielles par SM.....	42
3.3 Discussion.....	49

CHAPITRE IV : ANALYSES SEMI-QUANTITATIVES.....	58
4.1 Introduction.....	59
4.2 Résultats.....	62
4.2.1 Rendements en huile.....	62
4.2.2 Variation saisonnière des composés majeurs.....	62
4.2.3 Analyse des parties de l'algue.....	77
4.2.4 Quantification des acides gras majeurs.....	82
4.3 Discussion.....	84
CHAPITRE V : CONCLUSION.....	90
BIBLIOGRAPHIE.....	94
ANNEXES.....	98

LISTE DES TABLEAUX

	page
Tableau 1 : Conditions générales de chromatographie (CPG).....	22
Tableau 2 : Conditions de chromatographie couplée au spectromètre de masse.....	24
Tableau 3 : Comparaison de l'entraînement à la vapeur et de l'hydrodiffusion.....	28
Tableau 4 : Composés volatils identifiés dans l'huile essentielle de <i>Fucus vesi-</i> <i>culosus</i>	42
Tableau 5 : Banque de données des spectres de masse.....	46
Tableau 6 : Rendements en huile.....	63
Tableau 7 : Reproductibilité du pourcentage des aires des pics selon le mode d'in- jection "split".....	74
Tableau 8 : Reproductibilité de l'hydrodiffusion.....	75
Tableau 9 : Test de t (student) sur la variation saisonnière des composés majeurs.....	76
Tableau 10 : Variation des composés isolés dans les différentes parties de l'algue.....	80
Tableau 11 : Quantité d'acide myristique présente pour chaque mois.....	82
Tableau 12 : Quantité d'acide palmitique calculée pour chaque mois.....	83

LISTE DES FIGURES

	page
Figure 1 : <i>Fucus vesiculosus</i> , schéma et photo.....	12
Figure 2 : Situation de Port-au-Saumon par rapport à l'estuaire du St-Laurent, dans la Province du Québec.....	13
Figure 3 : Cartographie détaillée de Port-au-Saumon.....	14
Figure 4 : Photo de la technique de séchage des algues dans les serres.....	16
Figure 5 : Procédure d'expérimentation.....	17
Figure 6 : Schémas de l'entraînement à la vapeur et de l'hydrodiffusion.....	18
Figure 7 : Chromatogrammes des deux méthodes de distillation.....	38
Figure 8 : Chromatogramme de référence, à partir de l'extrait du mois d'octobre 1987...	39
Figure 9 : Chromatogrammes de l'extraction Likens-Nickerson.....	41
Figures 10 à 17 : Variations saisonnières des concentrations des composés majeurs....	64-71
Figure 18 : schéma des différentes parties de l'algue.....	79
Figure 19 : Histogrammes des variations de l'acide myristique, de l'hénicosahexaène et du β -ionone dans les différentes parties de l'algue.....	81

LISTE DES ANNEXES

	page
Annexe I : Courbe standard de l'étalonnage du nonadécane.....	98
Annexe II : Spectre de masse et structure du β -cyclocitral.....	99
Annexe III : Spectre de masse et structure du β -ionone.....	100
Annexe IV : Spectre de masse et structure du dihydroactinidiolide.....	101
Annexe V : Spectre de masse et structure de l'acide laurique.....	102
Annexe VI : Spectre de masse et structure de l'acide tridécanoïque.....	103
Annexe VII : Spectre de masse et structure de l'acide myristique.....	104
Annexe VIII : Spectre de masse et structure de l'acide pentadécanoïque.....	105
Annexe IX : Spectre de masse et structure de l'acide palmitoléïque.....	106
Annexe X : Spectre de masse et structure de l'acide palmitique.....	107
Annexe XI : Spectre de masse de l'acide stéarique silylé.....	108
Annexe XII : Spectre de masse de l'acide nonadécanoïque silylé.....	109
Annexe XIII : Spectre de masse par impact électronique de l'hénécosaheptaène.....	110
Annexe XIV : Spectre de masse par ionisation chimique de l'hénécosaheptaène.....	111
Annexe XV : Spectre de masse supposé pour le heptène-1 ol-3.....	112
Annexes XVI et XVII : Structure des composés dont l'identité est incertaine.....	113
Annexe XVIII : Courbe standard de l'étalonnage de l'acide myristique.....	115

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

1.1 APPLICATIONS DES ALGUES BRUNES

Les algues marines sont distribuées naturellement à travers le monde, elles croissent aussi bien dans les eaux froides de l'Arctique que dans les climats tempérés du Pacifique. Les algues sont constituées en majorité par des organismes unicellulaires, et en minorité par des individus macroscopiques; tous deux jouent un rôle primordial dans le maintien de l'équilibre chimique et biologique des océans.

Le terme "Seaweed" est souvent utilisé populairement pour décrire les algues marines benthiques (macroscopiques) que l'on retrouve dans les groupes des chlorophycées, rhodophycées et phaeophycées ou, respectivement, les algues vertes, rouges et brunes. Depuis des temps très anciens, les peuples côtiers ont appris comment utiliser ces "légumes de la mer". Actuellement c'est à nous de revaloriser ces richesses.

Les algues benthiques ont déjà une valeur commerciale reconnue dans des domaines variés, tels que : l'alimentation, la cosmétique, le textile, les papeteries, la pharmaceutique et la médecine. Elles sont une source importante de polysaccharides (agars, carraghénines, alginates) utilisés comme agents émulsifiants, épaississants et stabilisateurs dans les industries alimentaires. Leurs propriétés antibiotiques, antifongistiques et anti-inflammatoires leur confèrent une valeur appréciée en pharmacie et en médecine (Ehrhardt, 1973 ; Nisizawa, 1979).

Si l'on s'arrête sur les algues brunes, on remarque que leur intérêt dans la médecine existe déjà depuis longtemps, comme dans la médecine populaire. On peut dire que la première médecine, médecine préventive, touche le domaine de l'alimentation.

Depuis l'antiquité les algues sont consommées par de nombreuses populations côtières, principalement au nord-ouest de l'Europe, en Asie de l'est et dans les régions du Pacifique.

Leur valeur nutritive est reconnue comme une importante source de vitamines qui dans quelques cas est similaire à celle des légumes verts. La vitamine B₁₂ est une caractéristique des algues marines. Elles sont un apport intéressant en protéines et en acides aminés essentiels (20 % du poids sec). Malgré leur faible teneur en calories elles sont aussi depuis longtemps appréciées pour leur contenu en oligo-éléments (Nisizawa et al, 1987).

Actuellement on trouve trois genres d'algues brunes commercialisées au Japon pour le marché alimentaire:

- *Laminaria* (Kombu)
- *Hizikia* (Hiziki)
- *Undaria* (Wakame)

Si on se base sur la littérature chinoise ancienne, on peut voir qu'il y a plus de 2000 ans que le peuple chinois utilise les algues comme herbes médicinales (Chengkui, 1984). Ce terme s'applique à l'utilisation des algues généralement bouillies dans l'eau, où la décoction est servie comme drogue.

On y trouve deux espèces d'algues brunes:

- *Laminaria japonica*

- *Sargassum fusiforme*

utilisées dans plusieurs traitements du goître, des refroidissements (toux, bronchites), de l'asthme, des insulations, des problèmes urinaires (hydropisie), des hémorroïdes, des maux d'estomacs et comme vermifuges. Les laminaires et les fucus, dans les climats tempérés, étaient aussi recherchés pour soigner le goître et soulager les goutteux.

Les algues brunes se retrouvent maintenant dans plusieurs disciplines médicales. Dans la plupart de ces disciplines, on utilise plus volontiers les dérivés des algues brunes.

1) Dans la médecine générale, les fucacées riches en stérols, donc une source toute désignée de vitamine D, sont utilisées comme agents thérapeutiques contre le rachitisme, la mauvaise formation des dents, les cas de tétanies infantiles (contraction des muscles), d'allergie, d'engelures etc...(Ehrhardt, 1973; Qasim, 1978).

Les propriétés mucilagineuses des algues brunes leur donnent un rôle important dans la protection de la muqueuse intestinale. On les utilise dans les traitements de différentes inflammations (intestin, côlon), dans les cas de dysenteries et de constipations. *Sargassum bifolium* grâce à ses vertus diurétiques est utilisée aux Indes pour le traitement des troubles de la vessie (Ehrhardt, 1973; Doshi, 1980).

2) Les stipes de laminaires peuvent servir à élargir une ouverture (une plaie) lors d'opérations chirurgicales afin de faciliter l'introduction d'instruments opératoires. Ces stipes ont la propriété d'augmenter trois fois leur diamètre dès qu'on les trempe dans l'eau, et cette dilatation est régulière (Ehrhardt, 1973).

3) Depuis les années 1970 on réutilise les stipes de laminaires en obstétrique et en gynécologie, pour dilater mécaniquement le col utérin lors des accouchements difficiles ou en vue d'un curetage (Stein, 1984).

4) Les algues brunes jouent un rôle important dans le traitement des obésités et dans les cures d'amaigrissement. On peut tirer d'elles des aliments lests (alginates) non assimilables et ni métabolisables pour provoquer des sensations de satiété (Ehrhardt, 1973).

5) Enfin, il existe tout le domaine de l'algothérapie (médecine douce) qui prend de plus en plus d'ampleur depuis ces dernières années. En plus de son action relaxante, elle joue un rôle important sur la santé des jambes, indiquée contre les varices, les hémorroïdes. Les bains d'algues marines sont favorables aussi contre les eczémas et les ulcères variqueux.

Depuis ce siècle dernier on tente de prouver de façon plus rigoureuse les propriétés médicales des produits naturels d'origine marine. Pour cela on touche le domaine de la pharmaceutique. Ainsi de nombreux tests pharmaceutiques et microbiologiques ont permis de découvrir ou de prouver avec assurance plusieurs vertus médicales des dérivés des algues brunes.

Les recherches ont commencé par l'isolation des phycocolloïdes, caractéristique principale des algues brunes. On retrouve l'acide alginique, polyoside de haut poids moléculaire composé d'acide guluronique et d'acide mannuronique. Ses sels (les alginates) sont présents dans l'industrie pharmaceutique technique, pour la fabrication des pilules, comme agents désintégrant des poudres médicamenteuses, dans la fabrication de pansements.

Ils sont , grâce à leurs propriétés de se lier facilement aux métaux lourds, un bon décontaminant digestif lors de contamination alimentaire et ils jouent aussi un rôle dans la radio-décontamination (Ehrhardt, 1973; Nisizawa, 1979; Chapman, 1979; Hoppe, 1979; Bezanger, 1982).

Un autre polysaccharide a été isolé, le laminaran , composé principalement de glucose-1,3. Son sel de sodium a des propriétés possibles d'anticoagulant pour le sang. On cite d'ailleurs depuis longtemps son action comme hypocholestérolémiant (diminue le taux de cholestérol dans le sang), voir les travaux de Hoppe (1979) et Doshi (1980).

Présent dans toutes les algues brunes, le fucoïdan , polymère sulfaté de L-fucose, prévient la plante contre une déshydratation après une longue exposition hors de l'eau. Il est utilisé comme matériel de base pour la production de fucose. Il possède des propriétés d'anticoagulant et a un effet antithrombique aussi puissant que l'héparine (Hoppe, 1979).

La variété des structures chimiques et l'étendue des activités biologiques de sources marines sont absolument remarquables. En ce qui concerne les algues brunes, on peut dire qu'elles englobent une grande partie de ces activités, puisqu'on y trouve des substances bioactives comme des antibiotiques, des antiviraux, des anticancéreux, des antihypertenseurs, etc... (Michanek, 1979; Yamamoto, 1981).

1.2 OBJECTIFS DU TRAVAIL.

C'est dans l'optique d'une meilleure connaissance des substances naturelles extraites des algues marines benthiques, que ce travail a pris forme. Comme le domaine est

vaste, nous avons choisi d'étudier une espèce particulière d'algue brune, *Fucus vesiculosus*, commune sur les bords du St-Laurent.

Les travaux de M. Keser (1984) et E. Bourget (1985) ont présentés *Fucus vesiculosus* comme une espèce dite "opportuniste"; grâce à sa fixation hâtive et à sa croissance rapide, c'est elle qui recolonise fortement les zones accidentées. Les perturbations hivernales prononcées, que l'on rencontre souvent dans le climat subarctique de l'estuaire du St-Laurent, permettent une colonisation importante par *Fucus vesiculosus*. Seulement, dans les régions plus abritées, *Ascophyllum nodosum* à croissance plus lente, devient dominante. Les parties supérieures littorales du St-Laurent sont donc caractérisées en majorité par une coexistence de ces deux espèces, *Ascophyllum nodosum* et *Fucus vesiculosus*.

Fucus vesiculosus n'est pas considérée comme une algue comestible. Mais ceci n'enlève pas ses qualités, puisque déjà dans le passé, elle était appréciée comme fertilisant, dans l'utilisation du varech (poudre d'algues brunes riche en iode). Actuellement, elle est utilisée comme source de polysaccharides, surtout les alginates et le fucoïdan. On la retrouve aussi dans les produits cosmétiques, en particulier les crèmes amaigrissantes et régénératrices (Flachsmann, 1984). Mais un domaine de recherche encore inusité est celui de son huile essentielle.

Le parfum des plantes terrestres a attiré l'attention de l'homme depuis l'antiquité. La chimie organique associe maintenant l'odeur des arbres et des arbustes à des monoterpènes, l'odeur des épices à des phénols et à des éthers, l'odeur des fruits et des fleurs à des esters aliphatiques simples (Moore, 1977). Mais l'odeur des plantes marines est beaucoup moins familière.

C'est vers les années 1960 qu'un Japonais (Katayama) a étudié les constituants volatils de certaines algues marines. Etant donné les faibles rendements obtenus par la technique de distillation à la vapeur, ces recherches ont été supplantées rapidement par les techniques d'extractions par solvants organiques. C'est seulement à la fin des années 1970 que Moore et d'autres chercheurs se sont à nouveau penchés sur la question des produits volatils d'origine marine.

Pour Moore (1977), la seule substance volatile découverte avant 1966 est le sulfure de diméthyle. A partir d'une distillation à la vapeur de l'algue brune *Dictyopteris plagiogramma* d'Hawaii, Moore obtient des composés non-isoprénoïdes à onze carbones. En contraste avec les travaux plus anciens, mentionnés par I. Flament (1984), qui présentent de *Dictyopteris divaricata* du Japon, une mixture intéressante de sesquiterpènes du type cadinène.

Les odeurs "sulfurées" ne proviennent donc pas toutes du sulfure de diméthyle, mais aussi de certains composés comme des lipides soufrés, des substances halogénées, des sesquiterpènes non halogénés et autres...

Un point intéressant pour les biologistes, tels que Muller (1978, 1979) et Jaenicke (1982), a été de comprendre comment sont maintenues et distribuées les plantes marines. Ils sont venus ainsi à observer les cycles végétatifs et la reproduction sexuelle, où ils ont pu démontrer que les œufs diffusent une substance appelée phéromone, qui attire les spermatozoïdes. Ils ont pu isoler de *Fucus serratus* et *Fucus vesiculosus* le fucoserratène, hydrocarbure à huit atomes de carbone. De plus, les travaux récents de Gschwend (1984) ont démontré qu'une variété d'algues marines tempérées, comme *Ascophyllum nodosum* et *Fucus*

vesiculosus , contiennent des composés halogénés, qu'elles relâchent dans la mer. Pour isoler tous ces composés, très volatils, on utilise une technique particulièrement fine, le "closed-loop-stripping" (Boland,1984; Grob, 1976). Cette procédure est malheureusement difficile à adapter à une éventuelle production industrielle. C'est pourquoi, nous nous proposons dans ce travail d'étudier les substances volatiles de *Fucus vesiculosus* , obtenues à partir d'une technique simple , prouvée industriellement: la distillation à la vapeur ou l'hydrodiffusion.

On peut donc souligner le caractère inovateur de cette recherche; d'une part par la technique de distillation à la vapeur inédite pour *Fucus vesiculosus* , et d'autre part comme première étude du genre sur la côte nord du St-Laurent.

Les objectifs principaux peuvent être résumés ainsi:

- Analyse qualitative de l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus*.
- Variations saisonnières des composés majeurs présents dans cette huile

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

2.1 FUCUS VESICULOSUS

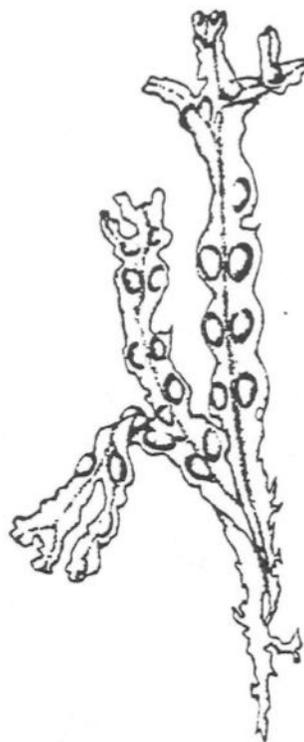
Fucus vesiculosus appartient à l'ordre des Fucales de l'embranchement des Phaeophycées (algues brunes). Les Fucales se divisent en deux familles; les Sargassacées présentes dans l'hémisphère sud avec un genre *Sargassum sp.* et les Fucacées présentes dans l'hémisphère nord avec plusieurs genres dont *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia sp.* et *Fucus sp.* *Fucus* est le genre représentatif de la famille des fucacées. On trouve plusieurs espèces de fucus dans l'estuaire du St-Laurent, *Fucus serratus*, *Fucus distichus s.e. evanescens* et *s.e. edentatus*, et *Fucus spiralis*. On trouvera à la figure 1 une représentation de *Fucus vesiculosus*, facilement reconnaissable avec ses vésicules aérifères disposées par paires sur les lames. Les lames sont divisées dichotomiquement et se terminent souvent en conceptacles (Bold, 1978).

2.2 SITE D'ECHANTILLONNAGE

Toutes les récoltes sont faites à Port-au-Saumon, sur la côte nord du St-Laurent. Port-au-Saumon se trouve dans la dépendance de Charlevoix -Est, il est à 47° 46' de latitude nord et à 69° 57' de longitude ouest, sa situation par rapport à l'estuaire du St-Laurent est présentée dans la figure 2. La figure 3 montre aussi une cartographie détaillée de cette station.

Port-au-Saumon peut être décrit comme une petite baie abritée, ancien emplacement d'un quai. Une rivière d'eau douce s'y déverse. Un immense champ d'algues brunes se découvre à marée basse entre deux petites îles, rendues accessibles à pied. Par la configuration abritée des lieux, *Ascophyllum nodosum* s'y trouve dominante, accompagnée par *Fucus vesiculosus*. Près des rochers, on observe une répartition en étage de différentes espèces. Au plus haut, dans les roches découvertes en premier par l'eau, on trouve *Fucus spiralis* présente

Figure 1 : *Fucus vesiculosus*, schéma et photo



Fucus vesiculosus. $\times 0.65$.



Figure 2 : Situation de Port-au-Saumon par rapport à l'estuaire du St-Laurent, dans la Province du Québec

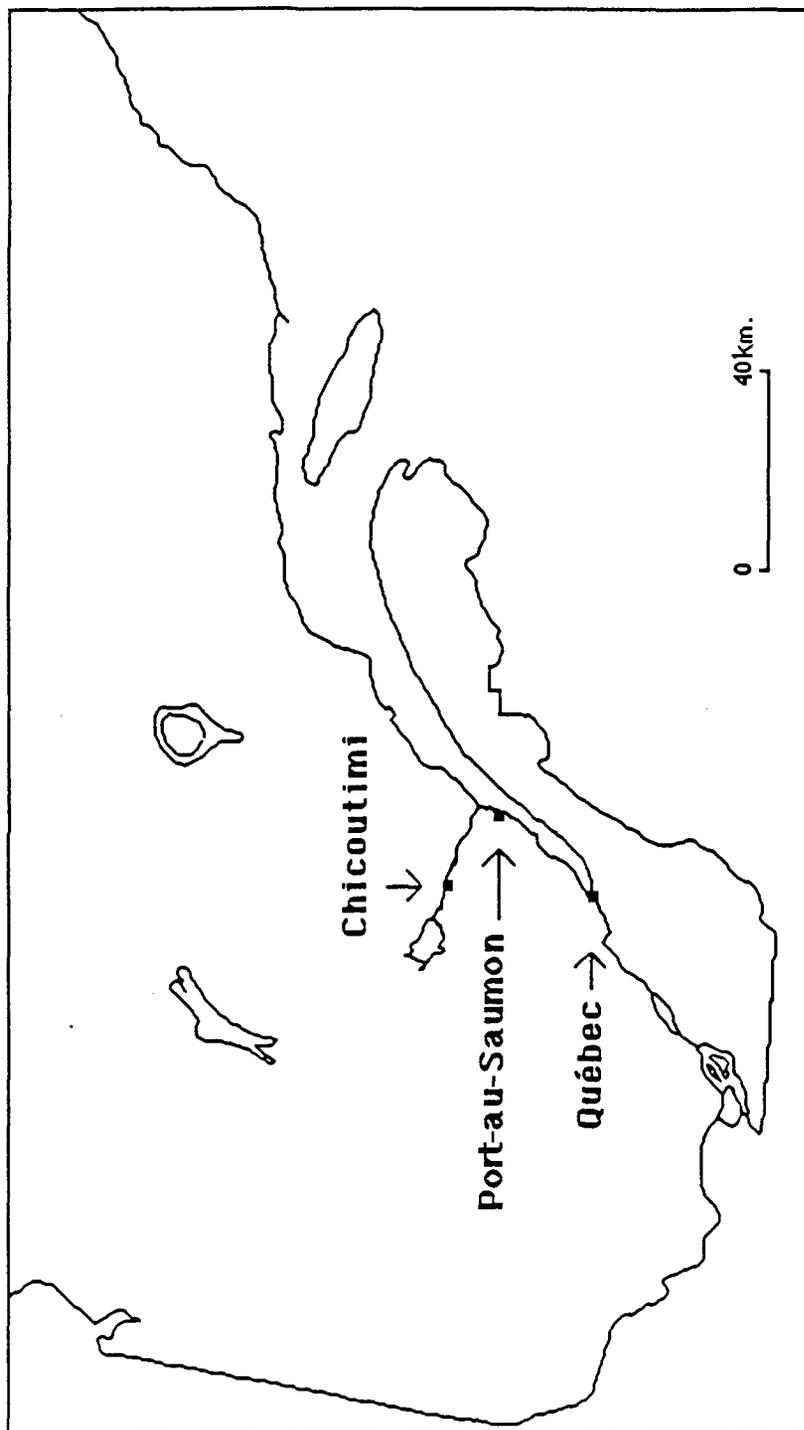
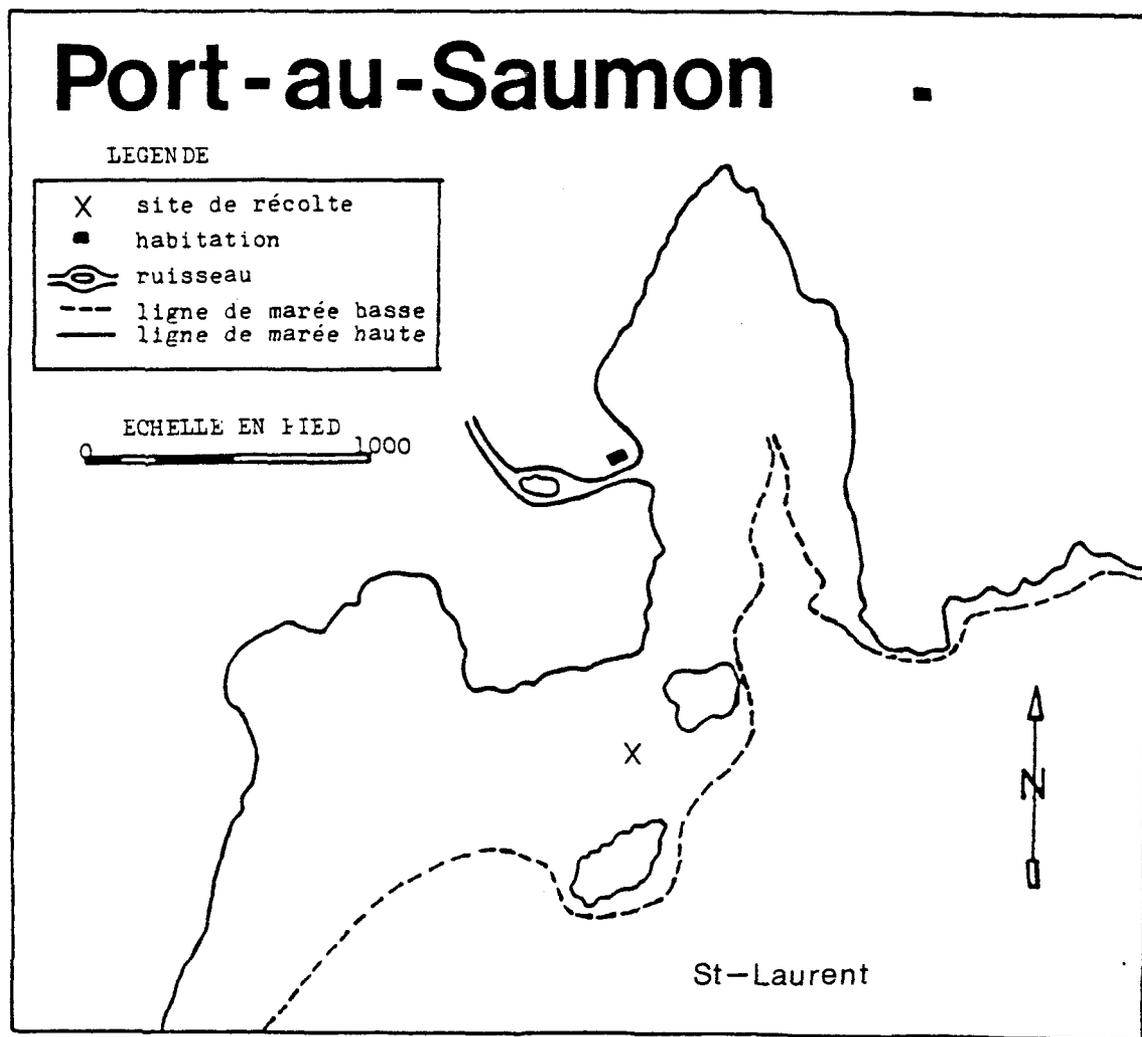


Figure 3 : Cartographie détaillée de Port-au-Saumon



surtout à l'abri des grands vents. Plus bas, le terrain est partagé par *Ascophyllum nodosum* et *Fucus vesiculosus* souvent retrouvés les thalles entremêlés. Plus bas encore, on trouve, mais plus rare, *Fucus distichus s.e. evanescens* et *s.e. edentatus*, puis quelques Laminaires flottant dans l'eau.

La récolte de *Fucus vesiculosus* se fait de façon "aléatoire", c'est-à-dire sans choisir forcément des plants de même âge et de même taille. Les récoltes ont lieu sur une période de plus d'une année, 11 octobre 1986, 16 avril, 16 mai, 13 juin, 12 juillet, 11 août, 11 septembre, 9 octobre 1987, 20 avril et 18 mai 1988. Aucun échantillonnage n'est fait pendant l'hiver.

2.3 EXTRACTIONS

Après la récolte, les algues sont rincées à grande eau, dans la rivière ou au laboratoire. Cette étape est nécessaire pour éliminer les épiphytes, constitués surtout de *Gamarrus sp.* et de *Littorina littorea*. Les algues sont alors séchées sur un treillis fin dans une serre que l'on chauffe la nuit si les températures sont trop basses (figure 4). Les algues sont sèches après trois ou quatre jours, ensuite elles sont entreposées dans des boîtes de carton, à température ambiante au laboratoire, jusqu'à utilisation.

Figure 4 : Photo de la technique de séchage des algues dans les serres



La procédure d'expérimentation est résumée à la [figure 5](#). La partie importante de l'expérimentation est la distillation à la vapeur, technique pour extraire l'huile essentielle de la plante.

Il existe plusieurs types de distillation, nous avons choisi d'en comparer deux; l'entraînement à la vapeur et l'hydrodiffusion ([figure 6](#)).

Figure 5 : Procédure d'expérimentation

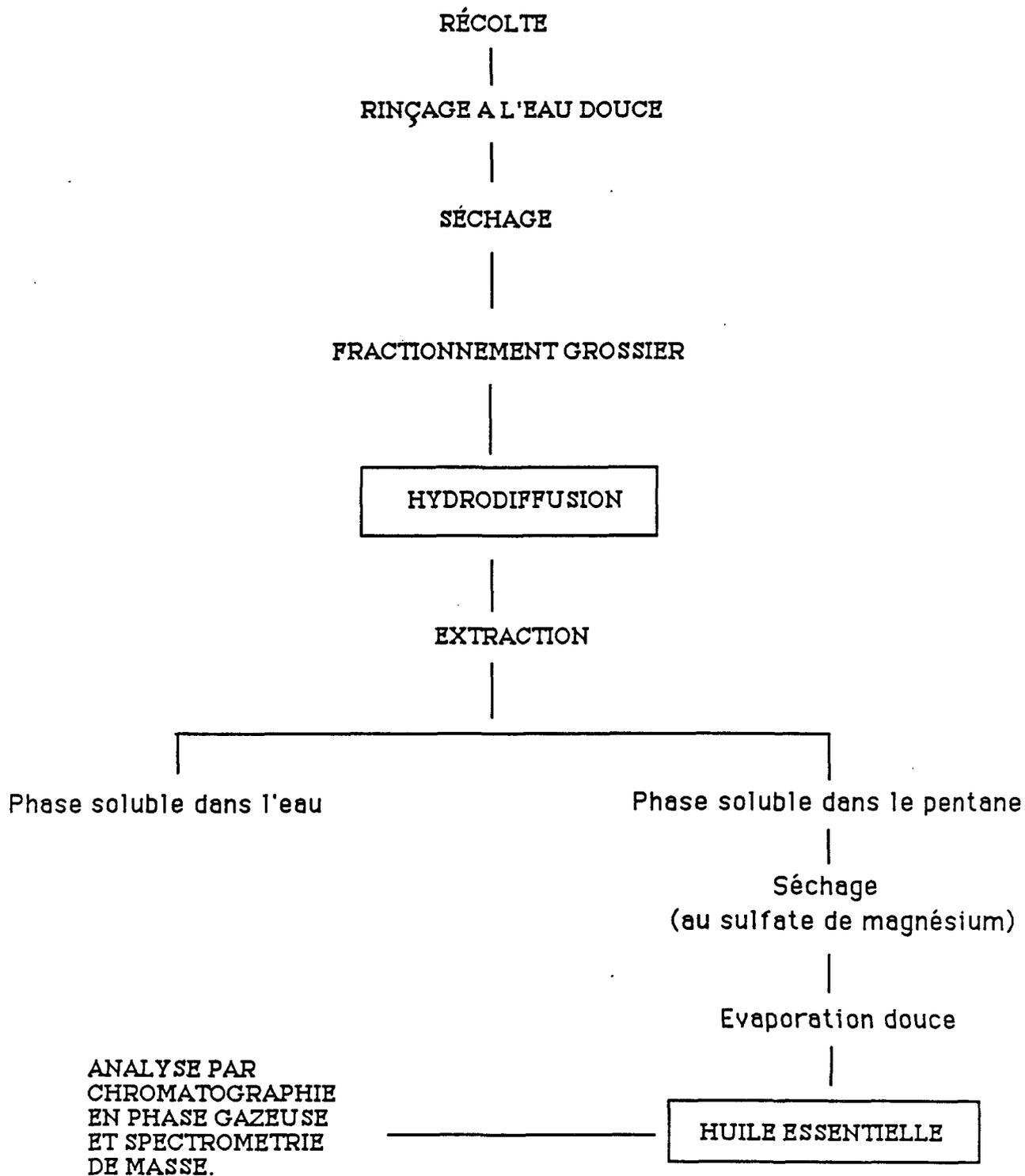
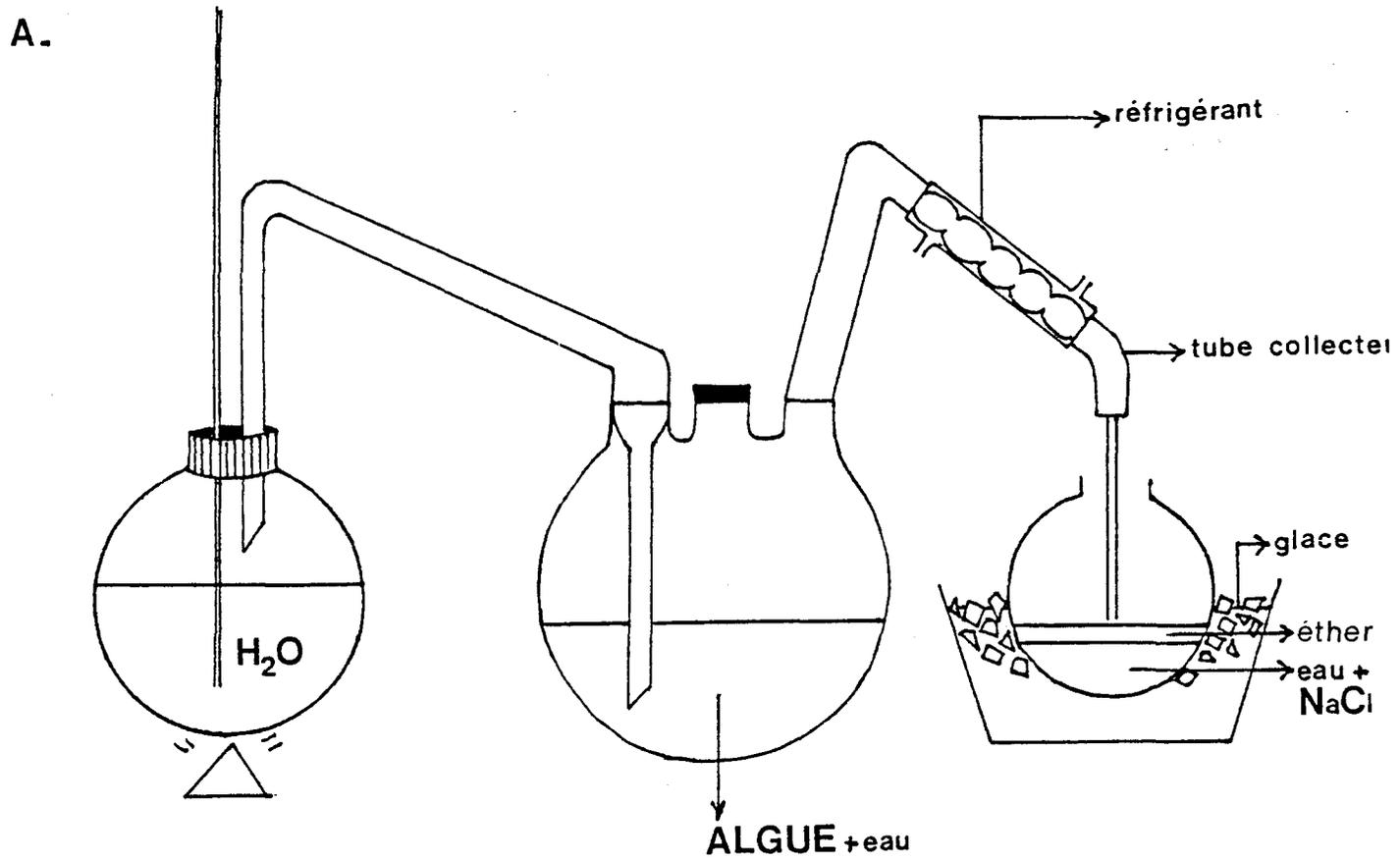
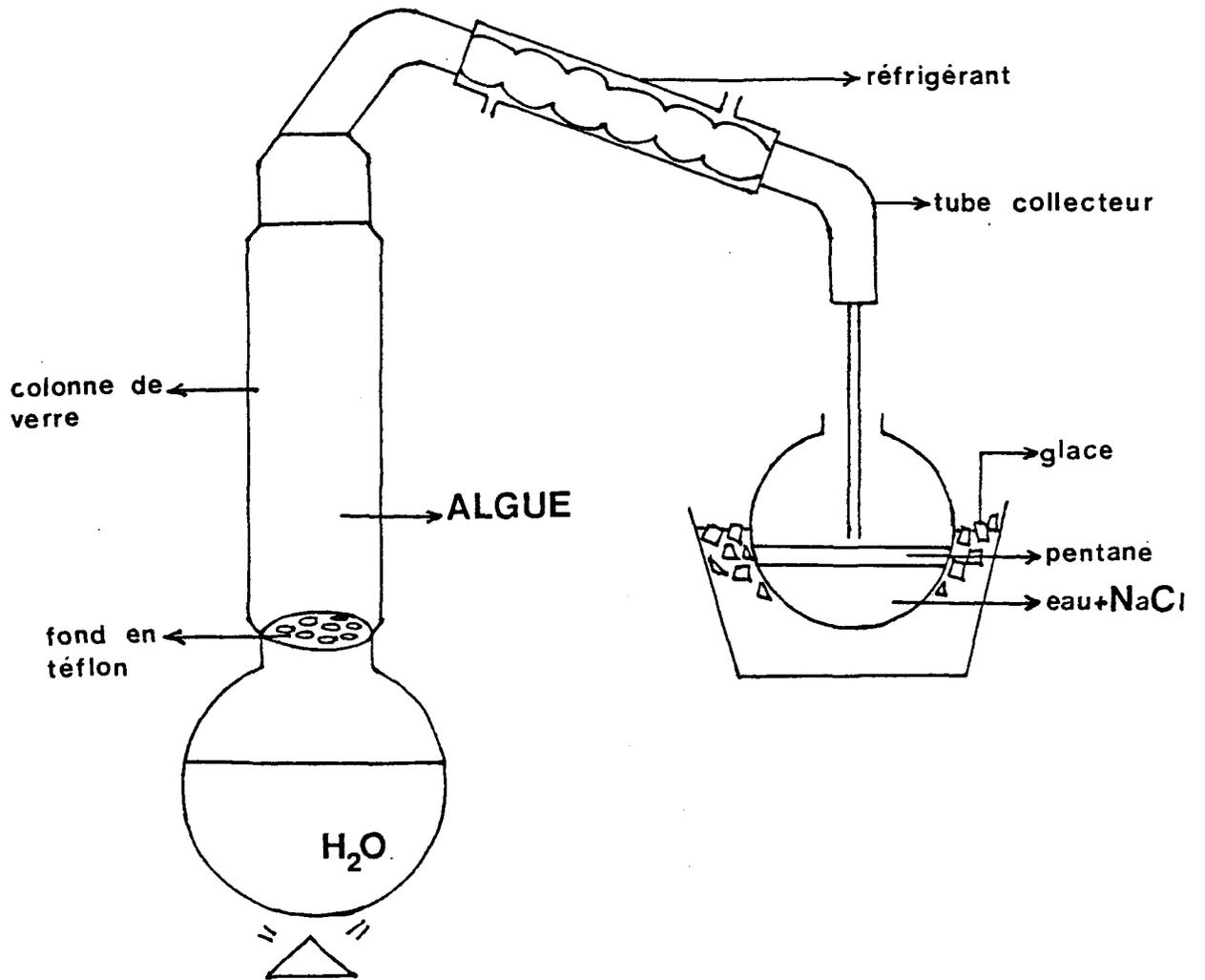


Figure 6 : Schémas A. de l'entraînement à la vapeur et B. de l'hydrodiffusion



B.



En ce qui concerne les tests d'entraînement à la vapeur, les conditions d'expérimentation ont été les suivantes:

- poids des algues sèches (broyées) dans le montage:	250 g
- volume d'eau (distillée) dans l'alambic:	1150 ml
- volume d'éther (distillée) dans le ballon receveur:	100 ml
- quantité de NaCl dans le ballon receveur:	50 g
- volume d'eau (distillée) dans le ballon receveur:	250 ml
- durée de la distillation:	90 min.

L'éther anhydre a été à chaque fois distillée. La solution de récupération (eau + éther + distillat) est séparée en trois fractions égales, placées l'une après l'autre dans une ampoule à décanter de 1000 ml pour séparer la phase aqueuse de la phase étherée. L'extraction est répétée trois fois pour chaque fraction, avec une même quantité d'éther, soit 25 ml. La phase hydrophobe (étherée) est séchée au sulfate de magnésium, filtrée avec du papier filtre et concentrée à l'aide d'un montage de distillation simple. Cette dernière étape a été remplacée par la suite par une évaporation plus douce, pour éviter les pertes possibles des composés les plus volatils.

Pour les tests d'hydrodiffusion, les conditions d'expérimentation sont quelque peu différentes. Tout d'abord les algues ne sont pas broyées mais fractionnées manuellement avant d'être placées dans la partie supérieure de l'alambic. Nous avons choisi aussi de remplacer l'éther par du pentane pour une meilleure pureté de solvant.

- poids des algues sèches dans le montage :	300 g
---	-------

- volume d'eau (distillée) dans l'alambic :	3000 ml
- volume de pentane dans le ballon receveur :	100 ml
- quantité de NaCl dans le ballon receveur :	50 g
- volume d'eau (distillée) dans le ballon receveur :	250 ml
- durée de la distillation :	120 min.

La solution de récupération (eau + pentane + distillat) est placée, en une seule fraction, dans une ampoule à décanter de 2000 ml. Avant l'extraction on sépare la phase pentane de celle de l'eau + distillat, puis l'extraction est répétée trois fois avec la même quantité de pentane, soit 75 ml. Après séchage et filtration, la phase hydrophobe est concentrée au rotavapeur, sous pression contrôlée (140 mm de Hg) dans un bain de glace maintenu en dessous de 0° C (avec du NaCl). Cette évaporation dure quatre heures, elle est beaucoup plus douce qu'une simple distillation. Pour éviter le plus possible les contaminants, avant et après chaque utilisation, la verrerie est lavée au détergent, rincée à grande eau, à l'eau distillée et pour terminer à l'acétone. Deux blancs ont été faits; un pour l'entraînement à la vapeur avec de l'éther distillé, et un autre pour l'hydrodiffusion avec du pentane.

2.4 TECHNIQUES ANALYTIQUES

2.4.1 La chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Après l'évaporation à sec, on obtient une quantité très faible d'une huile orangée. On prendra soin de peser à chaque fois la quantité d'huile, et ensuite de la diluer dans un

volume connu de pentane (1 ml). L'extrait est conservé ainsi, dans une chambre froide (4°C) jusqu'à l'analyse au chromatographe.

Le type de chromatographe utilisé est un Hewlett Packard n°5730A . La colonne est l'élément essentiel du système chromatographique. Nous avons choisit de travailler avec une Durabond (Fused silica columns), la DB1 qui remplace la SE30 (polyméthyl siloxane). Elle possède plusieurs avantages dont: sa flexibilité, son endurance, sa résistance à une large marge de températures (de -60°C à +350°C), sa tolérance pour des grands volumes d'échantillons sans danger pour sa phase stationnaire qui est liée. On observe une reproductibilité supérieure à 98,5 % entre les colonnes DB1 et DB5 (équivalente à la SE 54, nous l'avons aussi utilisée pour l'analyse en CPG-SM).

Les substances sont analysées à la sortie de la colonne par un détecteur à ionisation de flamme. Le gaz porteur, l'azote, est mélangé à sa sortie avec de l'hydrogène, puis il est envoyé dans un brûleur. Les composés organiques brûlent dans la flamme en produisant des électrons et des ions positifs. La différence de potentiel appliquée entre le brûleur et une grille entourant la flamme permet de récupérer les électrons. On peut ainsi recueillir un courant électrique qui est mesuré et amplifié. Le détecteur est sensible aux composés combustibles, donc à presque tous les composés organiques. L'hydrogène et l'oxygène sont nécessaires au brûleur.

C'est dans les conditions de chromatographie présentées au tableau 1 que l'analyse semi-quantitative de la variation saisonnière a été faite.

TABLEAU 1**CONDITIONS GENERALES DE CHROMATOGRAPHIE.**

Type de colonne	DB1 30m x 0,25mm D.I.
Epaisseur du film	0,25 μ
Type d'injection	10 μ l split mode
Programmation	50 ⁰ C pendant 4 min. 8 ⁰ C/min. jusqu'à 300 ⁰ C
Gaz porteur	azote
Atténuation	Att 2/2 = 2
T de l'injecteur	250 ⁰ C
T du détecteur	300 ⁰ C

Deux standards internes ont été choisis, le bromobenzène et le nonadécane. Le nonadécane est le standard le plus intéressant, car son temps de rétention (TR) est proche de ceux de plusieurs composés présents dans notre huile. Le standard est avant tout utilisé, ici, pour connaître la variation des différents temps de rétention des pics, il permet ainsi de mieux assurer la similarité des pics entre les échantillons. Nous n'avons pas utilisé le standard pour faire une quantification des produits naturels. Mais nous avons calculé sur trois extraits, octobre 87, avril et mai 88, le taux de récupération par rapport au standard lors de l'injection. Connaissant la quantité de nonadécane injectée avec l'extrait, soit 200 ppm, nous pouvons à l'aide d'une courbe standard du nonadécane (annexe I), connaître la quantité récupérée après l'injection, correspondant à l'aire du pic. Ce taux de récupération varie de 85 à 90 %, il y a donc une perte d'environ 10 % lors de l'injection au GC.

2.4.2 La spectrométrie de masse (SM).

Nous avons utilisés deux techniques de ionisation des molécules, le bombardement électronique (IE), et la ionisation chimique (IC). Le tableau 2 présente les conditions de CPG-SM.

Pour diminuer le bruit de fonds gênant dans notre interprétation des spectres de masses, nous avons silylé un extrait avec une solution de N,O-bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide (BSTFA). Cette substance est un donneur de groupes triméthylsilyles.

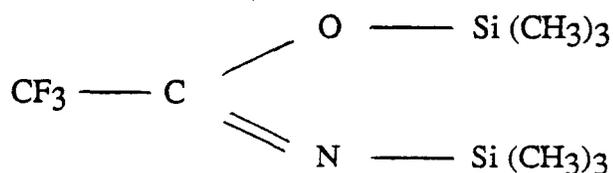


TABLEAU 2**CONDITIONS DE CHROMATOGRAPHIE COUPLEE
AU SPECTROMETRE DE MASSE.**

	<u>UQAC</u>	<u>Ottawa</u>
Type de colonne	DB1 ou DB5	DB5
Mode d'injection	splitless	split
Programmation	55 ⁰ C pendant 2 min. 8 ⁰ C/min. 160 ⁰ C	80 ⁰ C pendant 2 min. 6 ⁰ C/min. 280 ⁰ C
Gaz porteur	hélium	azote ou hélium
Mode ionisation	mode I.E. positif 70 eV	mode I.E. positif 70 eV

Lorsque l'identification d'un composé est certaine, nous cherchons à obtenir le corps pur, pour vérifier en chromatographie la similitude des pics.

- Analyses complémentaires

A titre de curiosité, mais aussi pour répondre à certaines questions, nous avons fait quelques tests complémentaires.

1) Extraction Likens-Nickerson : dans cet appareillage, les constituants volatils sont simultanément distillés à la vapeur et extraits au solvant organique, pour obtenir un concentré de produits volatils. Les substances désirées sont ainsi concentrées mille fois plus que dans l'extrait obtenu par distillation à la vapeur. Une petite quantité de solvant est nécessaire dans ce type d'extraction, nous avons utilisé le même, soit le pentane (Parliment, 1987).

2) Saponification et estérification d'un extrait obtenu par hydrodiffusion: l'hydrolyse ou la saponification des glycérides (esters du glycérol, matériel lipidique présent normalement dans les huiles végétales typiques) permet d'obtenir le glycérol et les acides gras libérés. Ces derniers après être estérifiés (remplacement de l'hydrogène de la fonction acide par un groupement méthyle) pourront être révélés par chromatographie en phase gazeuse. La saponification se fait à l'aide d'une solution d'hydroxyde de potassium, les acides gras sont récupérés par trois extractions successives avec l'éther éthylique. L'huile ainsi saponifiée et ensuite estérifiée avec une solution de $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$, les acides gras estérifiés sont extraits à l'hexane.

CHAPITRE III

ANALYSE QUALITATIVE

3.1 INTRODUCTION

3.1.1 Remarques techniques.

- Le principe de la distillation à la vapeur repose sur plusieurs mécanismes, dont le plus important est l'hydrodiffusion. L'huile volatile est presque imperméable aux membranes cellulaires. C'est à la température d'ébullition de l'eau, qu'une partie de cette huile se dissout dans l'eau présente dans les glandes aromatiques. Ainsi, mise en solution, l'huile diffuse par osmose à travers les membranes gonflées, pour finalement atteindre la surface externe de la plante, où elle est vaporisée par le passage de la vapeur. La vitesse de vaporisation n'est pas influencée par la volatilité des composés de l'huile, mais par leurs degrés de solubilité dans l'eau (Kulkarni, 1982).

Comme déjà mentionné précédemment, il existe plusieurs types de distillation, nous en avons comparé deux, l'entraînement à la vapeur et l'hydrodiffusion. Déjà, en 1972, E. Guenther a donné un tableau comparatif de ces deux techniques, résumé dans le tableau 3. En considérant ces remarques et notre propre expérience, nous avons opté de poursuivre les travaux avec la technique d'hydrodiffusion.

- L'analyse qualitative de notre huile essentielle commence par l'analyse au chromatogramme en phase gazeuse (CPG). En principe, la chromatographie en phase gazeuse est une technique de séparation pour les substances volatiles, réalisée sur une colonne spéciale. La séparation est basée sur les différences de coefficient de partage des produits à séparer entre un gaz et un liquide. Le gaz constitue la phase mobile.

TABLEAU 3

Comparaison de l'entraînement à la vapeur et de l'hydrodiffusion

	Entraînement à la vapeur. (eau)	Hydrodiffusion (eau + vapeur)
Type d'alambic	simple, facilement installé.	plus complexe.
Type de matériel et fractionnement	pétales de fleurs et aiguilles. Autres, en poudre fine.	Herbes, feuilles en fractions grossières uniformes.
Mode de disposition.	doit être recouvert complètement par l'eau.	doit être disposé également au dessus de l'alambic, source de chaleur.
conditions de diffusion	bonne, si le matériel peut se déplacer avec le mouvement de l'eau.	bonne.
pression de vapeur	pression atmosphérique.	pression atmosphérique.
température de l'alambic	100°C	100°C
Hydrolyse	peu être forte	faible
vitesse de distillation	relativement lente	bonne
rendement en huile	relativement faible, du à l'hydrolyse.	bon, s'il n'y a pas compaction trop forte du matériel.

Deux considérations instrumentales sont importantes; l'entrée de l'échantillon et sa sortie. Le mode d'injection que nous utilisons est le mode "split". Cette technique divise l'échantillon en deux parties inégales, la plus petite est envoyée dans la colonne. Cette réduction de l'échantillon dans la colonne prévient les dommages dus à des surcharges. La quantité injectée sur la colonne est difficile à déterminer par cette méthode. C'est pourquoi elle est utilisée surtout pour l'analyse des composés majeurs et pour une quantification indirecte (Freeman, 1981).

-Les applications de la chromatographie en phase gazeuse sont limitées pour l'analyse qualitative, on ne peut identifier avec certitude les composés sans utiliser une technique annexe ou disposer du corps pur. Actuellement la chromatographie en phase gazeuse connaît un important développement dans la domaine de l'analyse qualitative, lorsqu'elle est associée à un spectromètre de masse (CPG-SM). C'est cette méthode d'analyse que nous avons choisit.

Un spectromètre de masse bombarde la substance avec un champ d'électrons. Cette rencontre d'un e^- , doté d'une énergie de 50 à 100 électrons-volts (eV), avec une molécule, produit un ion moléculaire qui se trouvera, énergiquement, dans un état excité. Il y aura ensuite décomposition de cet ion moléculaire en plusieurs fragments positifs, quantifiés et séparés sur la base de leurs masses (masse/charge = m/z) pour présenter un spectre de masse de la substance.

Une illustration simple est celle du méthanol. Lorsque l'électron atteint la molécule, il lui arrache un e^- pour transformer cette molécule en un radical cationique.



Ce radical se désintègre en moins de 10^{-10} à 10^{-13} secondes, pour donner un fragment positif et un radical. De nombreux fragments ioniques sont ainsi formés.

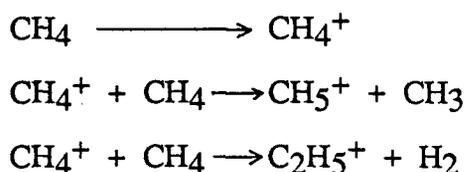


Si les fragments moléculaires ont un temps de vie supérieur à plus de 10^{-6} sec., ils peuvent atteindre le détecteur, qui les mesurera comme des pics. Il est important de reconnaître le pic du ion moléculaire, c'est lui qui possède la masse la plus élevée, représentative généralement de la masse moléculaire de la substance. Le pic de base d'un spectre de masse est le pic le plus intense, on lui assigne la valeur de 100 % d'intensité. L'intensité des autres pics est mesurée par rapport à celle du pic de base. Un spectre de masse est donc caractérisé par des pics correspondant aux différents fragments, leur intensité est placée en ordonnée et leur masse en abscisse (Sylverstein et al, 1981).

Dans la plupart des cas on peut reconnaître un spectre de masse grâce à une banque de données déjà introduite dans le système, et ainsi associer ce spectre à une substance connue. Dans le cas négatif, il s'agira de reconstruire la molécule inconnue, à partir des fragments obtenus et de la masse moléculaire. Cette interprétation des spectres est souvent

complexe, et demande une analyse annexe ou une prépurification de l'extrait pour diminuer le plus possible le bruit de fonds.

Il existe un autre mode de fractionnement des molécules, c'est celui fait par ionisation chimique (IC). Dans cette technique, la molécule n'est pas bombardée par des électrons (comme dans le IE) mais par un gaz réactif. L'énergie interne du gaz peut varier de 0 à 10 eV, beaucoup plus faible que celle apportée par le champ électronique. Ceci est intéressant, car l'énergie interne critique pour la fragmentation de la plupart des classes de composés est extrêmement faible, et une trop forte énergie augmente la vitesse de fragmentation, ce qui empêche parfois d'enregistrer l'ion moléculaire. Le gaz réactif communément employé est le méthane, lequel à haute pression produit des ions moléculaires où prédomine le CH_5^+ et le C_2H_5^+ par le procédé suivant :

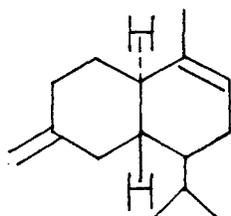


Lorsque le CH_5^+ rentre en collision avec une molécule autre que le méthane, il y aura transfert d'un ion hydronium à cette molécule et formation de l'ion $(M+1)^+$. La collision avec le C_2H_5^+ et une molécule, conduira à un autre complexe ionique, où un hydrogène sera soit enlevé de la molécule pour donner la forme $(M-1)^+$, soit ajouté à la molécule pour former l'ion $(M+1)^+$ (Harrison, 1983).

Dans notre cas, nous avons utilisé comme gaz réactif, l'isobutane C_4H_{10} .

composé résulte d'une décomposition enzymatique du diméthyl-B-propiothetin, un métabolite de la méthionine, assez répandue dans les algues marines benthiques et planctoniques.

I. Flament (1984) mentionne, que déjà en 1951 des Japonais (Takaoka et Ando) ont isolé de *Dictyopteris divaricata*, par distillation à la vapeur, une mixture intéressante de terpènes, réexaminé plus tard comme des sesquiterpènes du type cadinène.



γ_1 - Cadinène

Les travaux de T. Katayama (1962), distillation à la vapeur des algues *Laminaria sp.* et *Sargassum sp.*, ont permis d'isoler plusieurs substances:

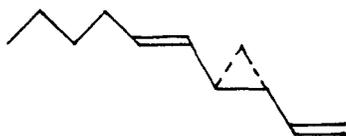
- des acides (formique, acétique, propionique, butyrique, isovalérique, n-caproïque, caprylique, myristique, palmitique et linoléique)
- des aldéhydes (furfurol, méthyl furfural, n-valéraldéhyde et benzaldéhyde)
- des terpènes (1,8-cinéol, p-cymène, linalool et géraniol)
- un alcool (furfuryl)
- un phénol (p-crésol)
- un hydrocarbure (hénéicosane).

Katayama fait une distinction entre l'odeur et l'arôme de l'huile essentielle d'algues marines. Pour lui, l'odeur est apparentée aux substances gazeuses qui ne sont même pas condensées après la distillation à la vapeur. On y trouve le méthanthiol, la triméthylamine et le sulfure de diméthyle, tous avec des odeurs plutôt déplaisantes. Nous avons aussi remarqué cette odeur peu agréable qui se dégage au début de la distillation. L'odeur est aussi représentée

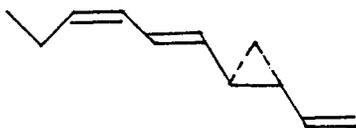
par la fraction amine et la fraction acides gras insaturés que Katayama a pu isoler de la distillation. Tandis que l'arôme provient des composés volatils tels que les terpènes, qui représentent en fait le "parfum" caché des algues marines !

Toujours avec la technique de distillation à la vapeur, on trouve les travaux de Moore(1977) qui a isolé de *Dictyopteris plagiogramma* et de *Dictyopteris australis* des hydrocarbures non-isoprénoïdes à onze atomes de carbone .

Deux dialcénylcyclopropanes :

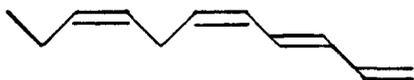


dictyopterène A



dictyopterène B

et des undécapolyènes acycliques C₁₁ comme le 1,3,5,8-undécatétraène.



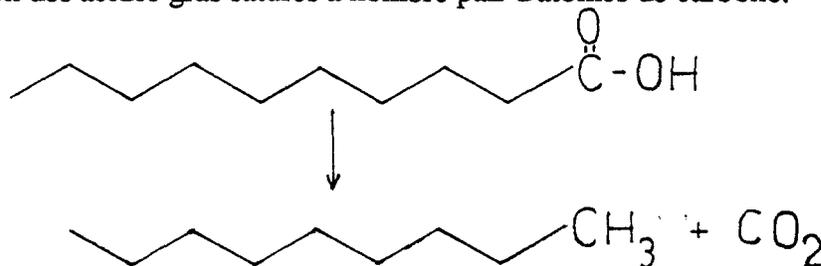
Ce dernier composé a aussi été découvert chez *Ascophyllum nodosum* où il joue le rôle de phéromone, c'est à dire de messenger, pour attirer les gamètes mâles. En outre, ce composé est présent dans l'huile essentielle de lavande. A Villefranche-sur-mer, près de Nice, *Dictyopteris membranacea* élabore aussi des hydrocarbures similaires en C₁₁ (Boland, 1987).

Les odeurs ou arômes, qui appartiennent donc à des composés volatils, peuvent être extrait, comme mentionné ci haut, par distillation à la vapeur pour obtenir les huiles

essentielles, mais aussi par solvants organiques pour obtenir les essences. Il faut donc tenir compte que beaucoup d'études ont été faites par extractions aux solvants organiques.

On peut mentionner les travaux intéressants de Halsall (1971) sur *Fucus vesiculosus* pour obtenir une huile à partir d'une extraction au pétrole. La fraction lipidique non saponifiable possède une partie hydrocarbure dont il a isolé deux polyoléfines, le cis-1,6,9,12,15,18-hénéicosahexaène et le cis-1,6,9,12,15 hénéicosapentaène, déjà identifiés chez le phytoplancton marin.

Les hydrocarbures sont peut-être des composés mineurs, mais ils sont importants dans les cycles biochimiques des organismes marins. De plus ils sont intéressants à utiliser comme indicateurs de pollution. Les hydrocarbures prédominant dans les algues benthiques sont aliphatiques (non aromatiques) comme les alcanes, les alcènes et les alcynes. Les aromatiques ne représentent que le 1/3 du poids des aliphatiques. La majorité des composés aliphatiques est constituée de n-alcanes de C₁₅ à C₂₃ (Lytle, 1979; Youngblood, 1971, 1973) avec prédominance du n-pentadécane chez les algues brunes. Le fait de trouver seulement des hydrocarbures à nombre impair de carbones prouve que ceux-ci sont d'origine naturelle (biosynthèse endogène). Ces hydrocarbures impairs C₁₅, C₁₇, C₁₉, C₂₁ résultent de la décarboxylation des acides gras saturés à nombre pair d'atomes de carbone.



De plus des hydrocarbures de C₁₃ à C₂₄, très présents dans les résidus pétrolières, ne sont pas détectés (Youngblood, 1973).

Youngblood a donc remarqué chez *Fucus vesiculosus* la présence du n-pentadécane et du n-heptadécane ainsi que les hydrocarbures en C₂₁ découverts par Halsall. Shaw (1979) a aussi étudié la composition en hydrocarbures de six phaeophycées, entre autres *Fucus distichus*, il a découvert lui aussi le pentadécane et l'hénicosahexaène. Il n'est donc pas négligeable de penser rencontrer des hydrocarbures dans l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus*, quoique ils pourront être en quantité moindre que ceux extraits par solvants organiques.

Les algues marines benthiques sont aussi riches en composés organiques halogénés. Des iodoalkanes et des halométhanés ont été fréquemment retrouvés dans l'eau d'incubation de certaines algues marines tempérées. Gschwend (1984) a réussi à isoler par "closed loop stripping" des composés très volatils à partir de *Fucus vesiculosus* :

le dibromochlorométhane	CH Br ₂ Cl
le bromoforme	CH Br ₃
le iodo-1 propane	C ₃ H ₇ I
le iodure d'isopropyle	CH ₃ CHICH ₃

Ces composés volatils halogénés peuvent avoir un rôle dans la protection contre les herbivores ou avoir une action anti-microbienne. Il est possible, selon cet auteur, que les macroalgues représentent une source majeure des volatils organo-bromique dans l'atmosphère. Nous ne pourrions pas, par notre technique d'extraction, détecter la présence de ces composés halogénés.

3.2 RESULTATS

3.2.1 Séparation des constituants des huiles essentielles par CPG.

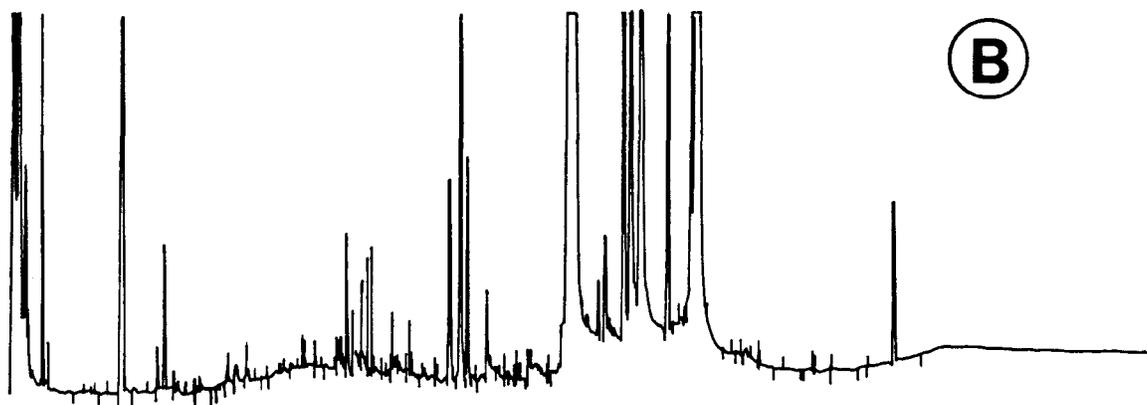
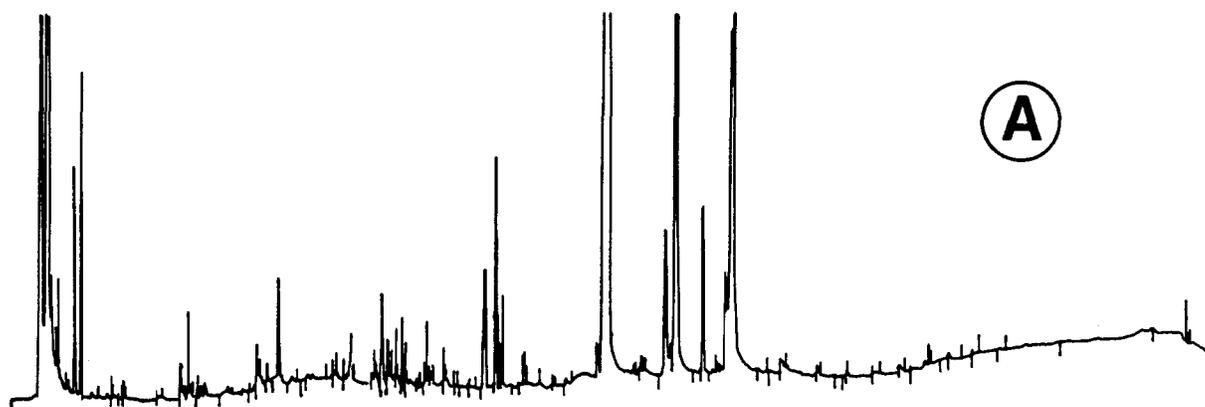
- Comparaison des analyses de l'entraînement à la vapeur et de l'hydrodiffusion.

La figure 7 présente deux chromatogrammes de la première récolte, celle du mois d'octobre 1986, qui a été étudiée avec les deux techniques de distillation. Les deux chromatogrammes sont assez similaires, on révèle pour l'extrait de l'entraînement à la vapeur (A) 28 pics alors que pour l'hydrodiffusion (B) il y a 33 pics séparés. L'aire relative des pics change, mais cette différence n'est pas significative. Il est donc difficile de dire, à partir de ces résultats, qu'une de ces techniques de distillation est meilleure que l'autre. Néanmoins, d'après les remarques de Guenther, nous avons opté de poursuivre les travaux avec la technique d'hydrodiffusion.

- Séparation du mélange de l'extrait d'hydrodiffusion.

Toutes les analyses chromatographiques des différentes récoltes sont assez similaires, nous avons choisi de présenter un chromatogramme, celui de l'extrait du mois d'octobre 1987 (figure 8). Pour obtenir une meilleure séparation nous avons changé la programmation de température à 4 °C par min. au lieu de 8 °C par min. De plus nous avons remplacé, pour cet extrait, les standards par le tétradécane. On peut constater que les pics nettement majeurs se trouvent surtout dans les produits moins volatils. Le pic majeur sort à environ 34 minutes, son aire relative est de 39 %, dans d'autres chromatogrammes, elle peut atteindre jusqu'à 50 %.

Figure 7 : Comparaison des chromatogrammes des deux méthodes de distillation



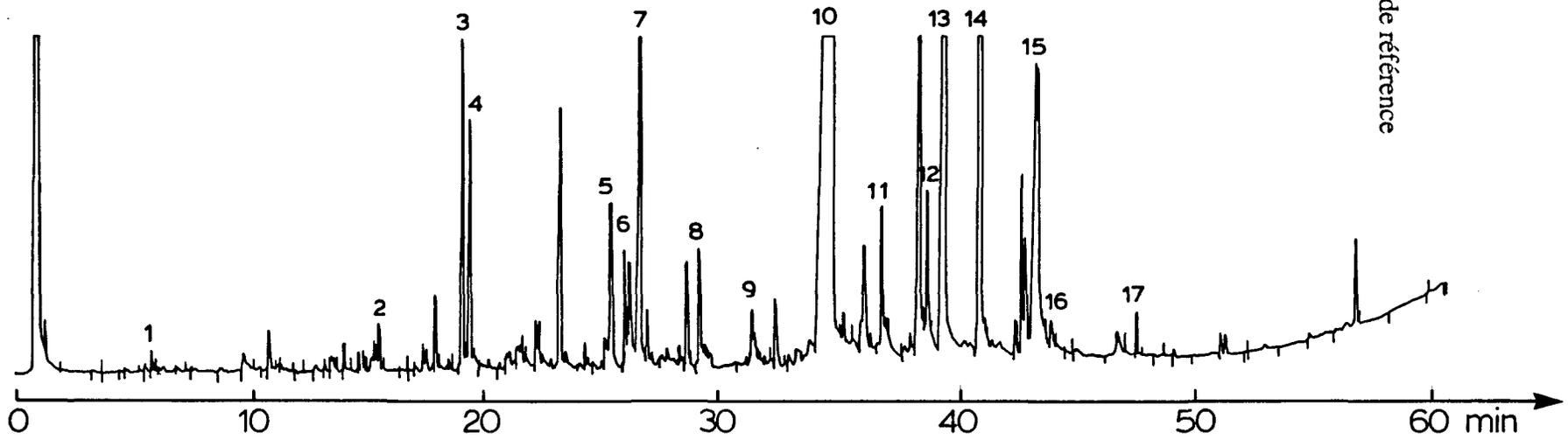


Figure 8 : Chromatogramme de référence

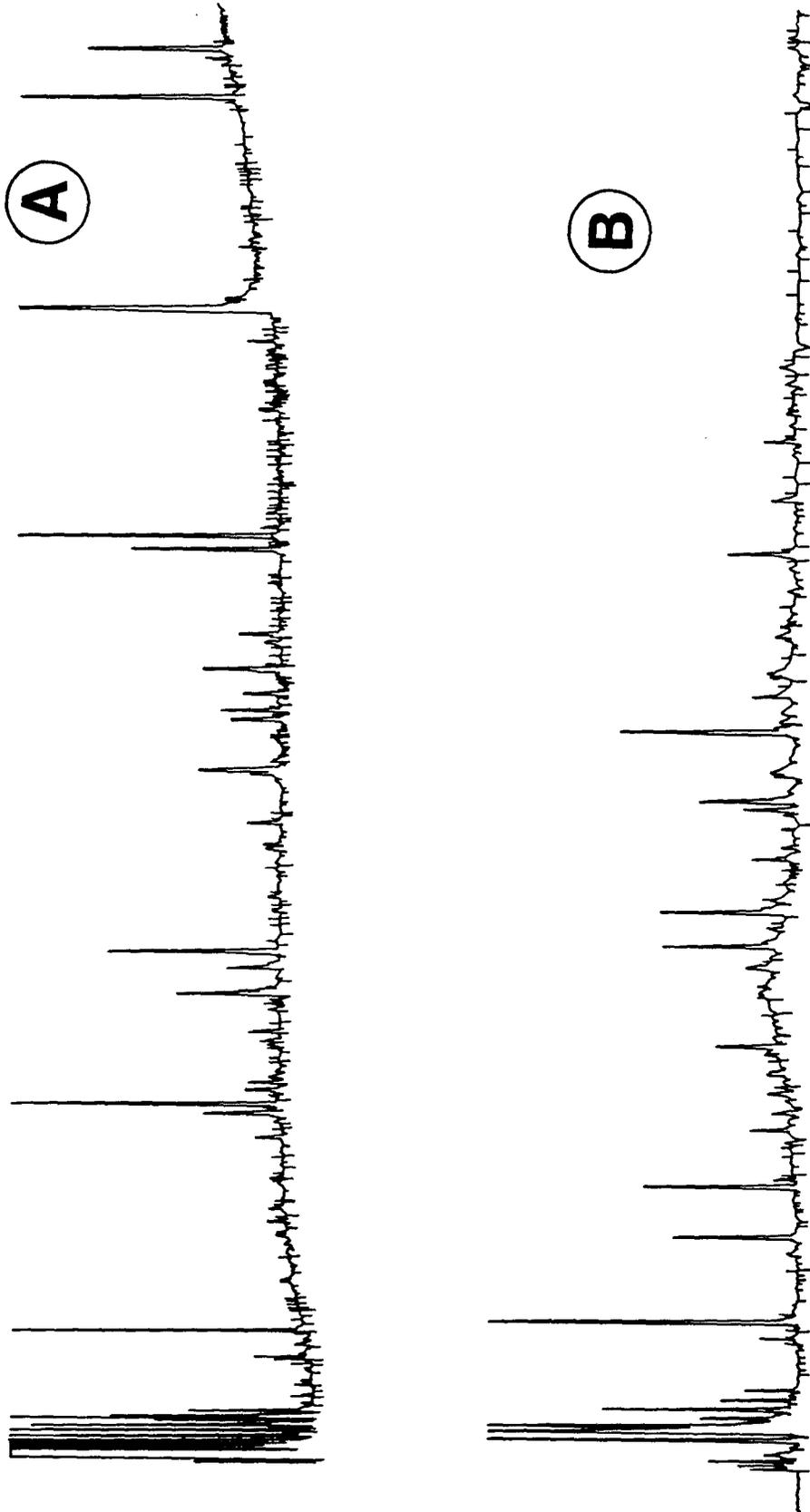
Nous avons très peu de produits qui sortent rapidement, soit qu'ils sont confondus avec le front du solvant ou qu'ils restent dans le bruit de fond et ne sont pas intégrés. Nous avons donc séparé au CPG environ 40 pics, avec seulement 4 pics majeurs qui sortent respectivement aux temps de rétention suivants: 26,51; 34,65; 39,33 et 40,80 minutes.

- Séparation d'un mélange extrait par Likens-Nickerson (L.N.)

La méthode couramment utilisée pour séparer les substances volatiles des plantes, est la distillation à la vapeur, fréquemment suivie d'extraction avec solvant organique. Nous avons par curiosité testé aussi une autre extraction, celle de Likens-Nickerson, qui commence à être de plus en plus utilisée (Parliment, 1987). Deux analyses au CPG ont été faites de cet extrait; la première en utilisant un détecteur à ionisation de flamme, l'autre avec un détecteur à capture d'électrons. Vous pouvez voir ces chromatogrammes à la figure 9. Il est important de noter que nous n'observons pas une même séparation avec cette technique d'extraction. On peut remarquer la correspondance entre quelques pics détectés par les deux différents détecteurs. Effectivement, un composé organique chloré est aussi analysé avec le détecteur par ionisation de flamme. Lorsque les conditions d'analyses sont identiques on doit voir les produits halogénés sur les deux chromatogrammes, alors que l'inverse n'est pas vrai. Les pics reliés sur la figure 9 peuvent être identiques. Cette analyse révèle une quantité non négligeable de composés halogénés. De plus on remarque un fort bruit de fond, signe de la présence de plusieurs composés traces.

La chromatographie en phase gazeuse est une séparation des composés présents dans l'huile essentielle. Il s'agit maintenant d'analyser ces substances, plus particulièrement celles représentées par les pics majeurs.

Figure 9 : Chromatogrammes de l'extraction Likens-Nickerson
A. avec détecteur par ionisation de flamme
B. avec détecteur par capture d'électrons



3.2.2 Identification des constituants majeurs des huiles essentielles.

La technique d'identification des composés repose principalement sur l'interprétation des spectres de masse. Certains composés sont vérifiés par CPG avec les produits authentiques obtenus sur le marché.

Pour clarifier les résultats, nous vous présentons les substances que nous avons identifiées dans l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus* (tableau 4).

Tableau 4

Composés volatils identifiés dans l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus*

n° du composé (voir figure 8)	nom du composé formule brute PM	TR (min.)	concentration % d'aire
1	heptène-1 ol-3 * $C_7H_{14}O$ 114	6,17	0,164
2	β-cyclocitral $C_{10}H_{16}O$ 152	15,71	0,263
3	ester d'éthényle de l'acide cyclohexane- carboxylique *	19,13	2,610

	$C_9H_{14}O_2$		
	254		
4	méthyl-3 (méthyl-1 éthyl)-6 cyclo- hexène-2 one-1 *	19,44	2,019
	$C_{10}H_{16}O$		
5	β -ionone	25,38	1,540
	$C_{13}H_{20}O$		
	192		
6	triméthyl-2,6,11 dodécane	26,17	0,921
	$C_{15}H_{32}$		
	212		
7	dihydroactini- diolide	26,51	6,480
	$C_{11}H_{16}O_2$		
	180		
8	acide laurique (dodécanoïque)	29,08	1,037
	$C_{12}H_{24}O_2$		
	200		
9	acide tridécanoïque	31,33	0,638
	$C_{13}H_{26}O_2$		

	214		
10	acide myristique (tétradécanoïque) $C_{14}H_{28}O_2$	34,65	38,846
	228		
11	acide pentadéca- noïque $C_{15}H_{30}O_2$	36,69	0,819
	242		
12	acide palmitoleique (cis-9-hexadécenoïque) $C_{16}H_{30}O_2$	38,60	1,380
	254		
13	acide palmitique (hexadécanoïque) $C_{16}H_{32}O_2$	39,33	9,759
	256		
14	hénéicosahexaène $C_{21}H_{32}$	40,80	10,07
	284		
15	ester de méthyle de l'acide eicosadiénoïque- 11,14 * $C_{21}H_{38}O_2$	43,11	4,041
	322		

16	Acide stéarique C ₁₈ H ₃₆ O ₂ 284	-	trace
17	Acide nonadéca- noïque C ₁₉ H ₃₈ O ₂ 298	47,36	0,330

* Composés dont l'identité n'est pas certaine.

- Spectres de masse par impact électronique (IE)

La première analyse au spectromètre de masse a été faite sur l'extrait du mois d'août 1987 à Santé et Bien-être Social, Ottawa. Grâce à une banque de données, nous avons pu identifier la plupart des substances (annexes II à X). Ces banques de données donnent à chaque spectre une liste de substances avec leur poids moléculaire, leur pic de base, leur pureté et leur "fit" (ajustement) pour le spectre. Nous choisissons les "fits" les plus élevés, révélateurs que la substance correspond le mieux au spectre de masse. Ainsi nous avons au tableau 5 un résumé des banques de données que nous avons choisit. La recherche se fait sur deux mode : le mode pureté et le mode mixture (ou fit), le Rfit représente l'ajustement apporté par la recherche (c'est-à-dire le "reporting fitting"= Rfit). Mais l'interprétation des spectres est souvent limitée, soit par la similarité qui existe entre certains spectres, soit par un trop fort bruit de fond, qui empêche de distinguer les spectres de masse des composés traces. Justement quelques-uns de ces composés traces se révèlent être intéressants, nous nous proposons donc de diminuer ce bruit de fond par une silylation de l'extrait.

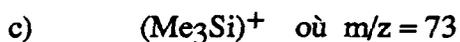
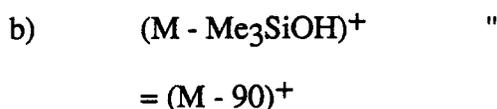
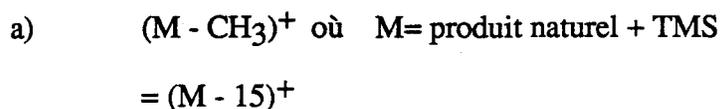
TABLEAU 5

Banque de données des spectres de masse

nom du composé	Masse PM	pic de base	pureté	fit	Rfit
Heptène-1 ol-3	114	57	776	883	863
β -cyclocitral	152	137	913	995	913
ester d'éthenyle de l'acide cyclohexanecarboxylique	154	83	802	875	806
méthyl-3 (méthyl-1 éthyl)-6 cyclohexène-2 one-1	152	137	695	807	702
β -ionone	192	43	758	891	764
triméthyl-2,6,11 dodécane	212	57	872	978	876
dihydroactinidiolide	180	111	856	995	856
ac. dodécanoïque	200	60	792	886	894
ac. tridécanoïque	214	60	670	775	857
ac. tétradécanoïque	228	73	829	984	839
ac. pentadécanoïque	242	43	790	959	822
ac. hexadécénoïque-9 cis	254	55	624	957	649
ac. hexadécanoïque	256	43	825	996	826

- Résultats de la silylation.

C'est le triméthylsilyl (Me_3Si) qui en remplaçant un atome d'hydrogène actif ($-\text{OH}$, NH_2 , $-\text{SH}$), se lie à la molécule du produit naturel. Lors du fractionnement, causé par le bombardement des électrons, nous pourrions observer différents ions.



Le cas le plus fréquemment rencontré est le a), on peut retrouver la masse moléculaire du produit naturel par le calcul suivant:

$$(\text{M} - \text{CH}_3)^+ + 15 - 72 = \text{masse moléculaire recherchée}$$

$m/z = 72$ représente la masse du produit de silylation $(\text{Me}_3\text{Si})^+$ moins un hydrogène. Avec cette analyse nous avons confirmé l'identité des spectres d'acides gras, et nous avons reconnu deux autres acides gras, le C_{18} et le C_{19} , c'est à dire l'acide stéarique et l'acide nonadécanoïque (annexes XI et XII).

- Spectres de masse par ionisation chimique (IC).

Un bon exemple de l'utilité de cette technique, en complément avec l'impact électronique, est celui de l'identification de l'hénécosaheptaène (P.M. = 284). Le spectre de masse par IC permet de mesurer la masse moléculaire de la substance, $(M - H)^+ = 283$, alors que le spectre de masse IE présente un $m/z = 256$ résultat d'une perte d'un groupe éthyle (annexes XIII et XIV).

- Vérification par les corps purs.

Nous avons pu vérifier nous même l'identité des composés suivants : l'acide palmitique, l'acide myristique et le β -ionone, à l'aide de l'analyse sur chromatographie en phase gazeuse des corps purs correspondants. Une solution pure d'un composé authentique est diluée dans du pentane, puis injectée au CPG. Le temps de rétention du pic de ce composé doit être identique à celui identifié dans nos extraits. Si c'est le cas, nous procédons ensuite à un mélange extrait + composé authentique, injecté lui aussi sur CPG. La vérification est positive si l'on retrouve sur le chromatogramme, un seul pic correspondant à ce composé et que l'aire de ce pic est significativement plus grande que celle observée avec l'extrait seul. Ceci a été le cas pour l'acide palmitique, l'acide myristique et le β -ionone. Malheureusement, en ce qui concerne le heptène-1 ol-3, nous n'avons pas fait une vérification positive. Le composé authentique sort beaucoup plus tôt sur le chromatogramme, et lors du mélange extrait + heptène-1 ol-3 les pics ne correspondent pas. Nous devons donc rejeter la possibilité que le spectre de masse soit celui du heptène-1 ol-3 (voir annexe XV). La banque de données offre d'autres possibilités, comme le nonène-1 ol-3 (PM 142) ou l'éthyl-2 propyl-3 de l'oxirane

(PM 114). On peut voir, de plus, dans les annexes XVI et XVII la structure des composés dont l'identité reste encore incertaine.

3.3 DISCUSSION.

- Les techniques

Les deux techniques de distillation, que se soit l'entraînement à la vapeur ou l'hydrodiffusion, donnent des résultats similaires. Nous avons donc choisis par intérêt personnel la technique d'hydrodiffusion, il faut d'ailleurs noter que Guenther la préfère à la technique de l'entraînement à la vapeur. Dans l'hydrodiffusion on évite plusieurs problèmes, dont l'hydrolyse des composés, voir même leurs pertes.

La technique de l'hydrodiffusion ou de l'entraînement à la vapeur ne semble pas si sélective aux composés volatils pour les plantes marines que pour les plantes terrestres. Effectivement lorsqu'on parle des huiles essentielles de plantes, on les associe directement à des substances volatiles qui font partie de la composante odeur ou parfum de la plante. Ainsi nous avons été surpris de trouver que plus de la moitié des composés, révélés par l'analyse en chromatographie en phase gazeuse, de l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus* sont non volatils, comme les acides gras. Déjà Katayama trouvait des acides gras dans les huiles essentielles d'algues brunes du Japon. Les acides gras sont les constituants caractéristiques des lipides. Les lipides ne sont pas solubles dans l'eau, mais dans la plupart des solvants organiques. On les extrait des tissus par l'alcool, le chloroforme, l'éther et le méthanol. Tout porte à croire que les algues possèdent des acides gras à l'état libre, c'est-à-dire non liés à la

composante lipidique des cellules. Et ces acides gras libres pourraient être extraits facilement par la vapeur d'eau lors de la distillation.

L'odeur très forte qui se libère au début de l'hydrodiffusion, prouve que nous perdons les composés les plus volatils de l'algue. C'est pourquoi différents chercheurs se sont penchés sur une autre technique d'extraction des composés volatils, pour récupérer les substances émises naturellement dans l'eau par les algues (closed-loop-stripping). Comme mentionné plus haut, nous n'avons pas choisit cette technique, non exploitée pour l'instant dans l'industrie des huiles essentielles.

Mais les résultats entrevus par la technique d'extraction Likens-Nickerson, analysés au CPG par capture d'électrons, apportent des informations supplémentaires importantes : il existe plusieurs composés halogénés dans l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus* . Nous encourageons donc fortement d'autres chercheurs sur cette voie, de l'analyse des composés halogénés des algues marines.

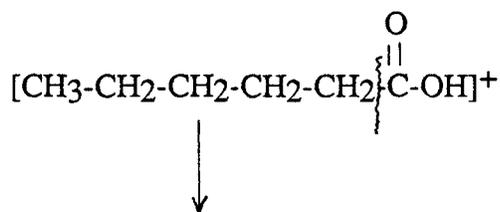
Comme nous travaillons avec des quantités très petites d'huile essentielle, toutes les sources de contaminants sont à éviter. Un de nos premiers soucis a été la possibilité d'une contamination avec l'utilisation des sacs plastiques pour l'échantillonnage. Nous avons fait une analyse comparative d'échantillons récoltés avec ou sans sac plastique. Les chromatogrammes n'ont pas montrés de différences. Cependant par prudence, nous avons évité l'utilisation des sacs de plastique. Deux phtalates ont tout de même été identifié dans nos extraits, probablement provenant de la verrerie de laboratoire.

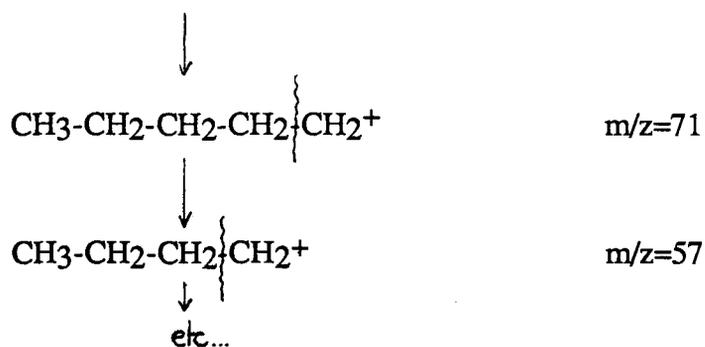
Notre extrait obtenu par hydrodiffusion, dilué dans du pentane, a été directement injecté dans le chromatographe en phase gazeuse, ceci comportait quelques risques. Effectivement, nous avons un extrait brut complexe, qui aurait pu, sans l'utilisation du mode d'injection "split", détruire la colonne. Une prépurification serait intéressante; nous avons nous-mêmes fait un essai sur colonne sepak (phase renversée), pour éliminer les acides gras, source du problème pour une bonne séparation sur CPG. Cette prépurification élimine hélas aussi quelques composés importants, dont l'hénécosaheptaène, nous l'avons donc abandonnée.

- L'interprétation des spectres de masse.

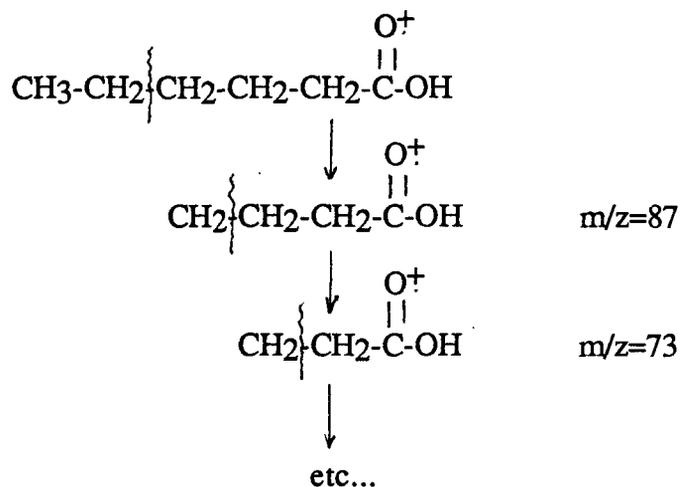
En ce qui concerne l'identification des composés présents dans l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus*, nous pouvons mentionner que c'est un travail de longue haleine. Sur environ quarante pics séparés par CPG, une quinzaine de composés ont été identifiés dans ce travail, et seulement dix de façon plus certaine. Quelques exemples de l'interprétation des spectres de masse pourront mieux illustrer cette analyse.

Les spectres de masse des acides gras à longue chaîne sont en général représentés par une série de "clusters" séparés par des unités de masse 14 (CH₂). Ceci résulte de la coupure de chaque liaison C-C, avec la charge qui se place soit sur le fragment qui porte l'oxygène (pour donner des m/z : 45, 59, 73, 87,...) soit sur le fragment alcyli (pour donner des m/z : 29, 43, 57, 71, 85, ...). Dans un exemple de l'acide hexanoïque, Silverstein et al (1981) présentent les fragmentations suivantes :

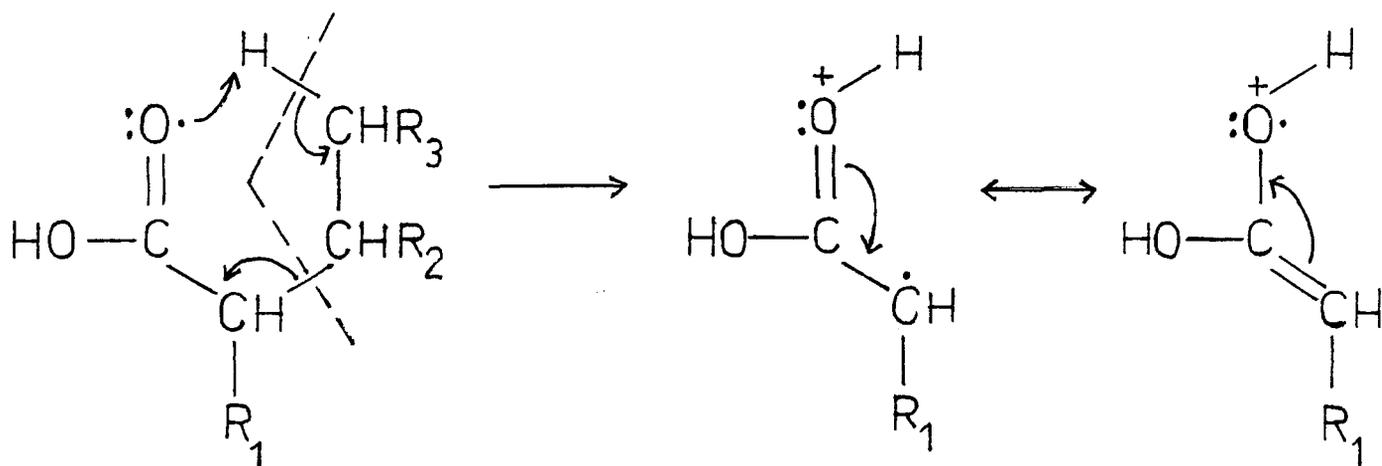




Si la charge se place sur le fragment qui porte l'oxygène on aura :



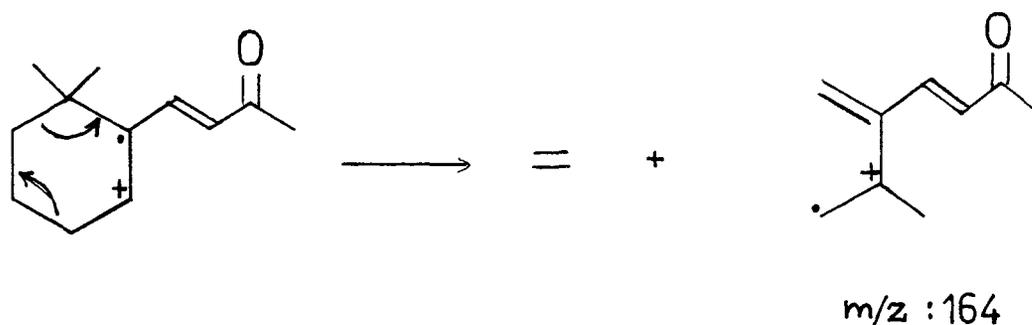
En plus un pic caractéristique de la fragmentation des acides gras, est celui apparaissant à $m/z : 60$, et provenant du réarrangement de McLafferty (Sylverstein, 1981).



Si l'on observe le spectre de masse de l'acide myristique (annexe VII), on retrouve toutes ces caractéristiques. Pic du ion moléculaire $m/z : 228 - 29$ (CH_3CH_2) = $m/z : 199$. A partir de ce pic on a coupure à chaque liaison C-C pour avoir la série $m/z : 43, 57, 71, 85, 97, 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199$. Les pics 57 et 71 sont moins forts. On retrouve le pic $m/z : 60$ du réarrangement McLafferty. On retrouve les mêmes types de fragmentation pour les acides pentadécanoïque et hexadécanoïque (voir annexes VIII et X).

Cette série de "clusters" est typique aussi dans les spectres de masse des hydrocarbures. Le spectre de masse de l'hénéicosahexaène (annexe XIII) le présente bien. L'hénéicosahexaène est un hydrocarbure insaturé (oléfine), la série de "clusters" sera caractérisée normalement par des intervalles d'unités 14. Les pics $\text{C}_n \text{H}_{2n-1}$ et $\text{C}_n \text{H}_{2n}$ seront plus intenses que les pics $\text{C}_n \text{H}_{2n+1}$ représentés lors de la fragmentation d'un hydrocarbure saturé. Le $m/z : 256$ résulte d'une perte d'un groupe éthyle (C_2H_5), et le $m/z : 213$ d'une perte d'un groupe C_3H_7 . Les pics $m/z : 41$ et 55 sont de type $\text{C}_n \text{H}_{2n-1}$. D'ailleurs Youngblood (1971) explique que toutes les oléfines qui ont une double liaison terminale en position 3 (19:5 21:5 et 21:6) sont caractérisées par un spectre de masse avec un pic fort à $m/z : 55$ ($\text{CH}_3 \text{CH}_2 \text{CH}=\text{CH}^+$) et par une perte d'un groupe éthyle ($M-29$). C'est exactement ce que l'on retrouve dans le spectre de masse de l'hénéicosahexaène.

La fragmentation des molécules cycliques insaturées peut représenter une caractéristique. La double liaison dans le cycle peut rendre possible un mode de décomposition qui s'apparente à une réaction de Diels et Alder inversée (= rétro-Diels-Alder). Ceci seulement en l'absence d'autres caractéristiques structurales qui provoquent des coupures plus faciles (McLafferty, 1969). En ce qui concerne le β -ionone, molécule cyclique insaturée, la réaction rétro-Diels-Alder serait la suivante :



Mais nous n'observons pas ce pic $m/z : 164$. Ceci est du à la compétition qu'il existe avec la perte facile d'un groupe CH_3 . Le pic $m/z : 177$ résulte de cette perte, elle peut être représentée comme $[\text{M}^+ - 15] = 177$. Pour les deux autres substances cycliques insaturées identifiées dans nos extraits, soit le β -cyclocitral et le dihydroactinidiolide, nous observons le même phénomène de la perte d'un CH_3 comme première fragmentation.

- Importance des composés identifiés

Etant donné que nos produits majeurs obtenus sont surtout des acides gras, on peut mentionner tout de même leur importance. Ces produits non volatils ont déjà été extraits de plusieurs algues brunes de la Colombie Britannique, avec différents solvants organiques (acétone, chloroforme, éther diéthylique, acétate d'éthyle et méthanol), voir les travaux de Rosell (1987). Cet auteur a montré que les acides gras saturés et insaturés des algues, peuvent avoir une activité antibactérienne. Les tests sont constitués par l'observation de l'inhibition de la croissance bactérienne, en utilisant une méthode par diffusion sur disque. Les organismes croissent sur un milieu de culture d'agar pendant une période de 18 heures, ensuite, on diffuse l'extrait d'algue sur les disques de Pétri. Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, on observe l'inhibition de croissance. Les cultures de micro-organismes incluent les gram-positifs comme *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus aureus* et les gram-négatifs comme *Escherichia coli*. Rosell observe que ses extraits ont une bonne efficacité antimicrobiale. Il

identifié par chromatographie liquide-gaz couplée à un spectromètre de masse des acides gras insaturés ou saturés de C₁₄ à C₂₂, avec une prépondérance de C₁₈ à C₂₀. Ils sont présents comme acides libres, et ils représentent 1 à 2 % du poids sec de l'algue.

Dans nos résultats, nous n'avons pas d'acides gras à plus de 19 carbones, et nous observons plutôt une prépondérance aux acides gras C₁₄ et C₁₆, ceci est certainement dû à la technique d'extraction. De plus vous pourrez constater dans le chapitre 4, que nous avons un rendement en acides gras bien plus inférieur à celui obtenu par extraction aux solvants organiques. Malgré cela, il faut noter que les études sur l'efficacité des acides gras comme antibiotiques viennent de commencer, et qu'elles sont loin de se terminer. Il pourra toujours être intéressant de savoir que dans l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus* les produits majeurs identifiés par CPG-SM sont des acides gras saturés. Il est effectivement intéressant de noter que nous avons surtout des acides gras saturés dans nos extraits. Alors que dans les végétaux nous retrouvons en général plus d'acides gras insaturés que saturés, comme l'huile de maïs, l'huile d'olives, etc...(Torssell, 1983). C'est surtout dans les graisses animales que l'on retrouve les acides gras saturés; sans doubles liaisons, ces acides peuvent prendre une forme plus solide, comme les graisses. L'acide stéarique (C₁₈) est isolé seulement des graisses animales, nous en avons extrait, mais une quantité très négligeable (max. 1,1% d'aire).

Nous avons identifiés aussi quelques substances mineures. Ainsi, nous avons remarqué la présence de trois terpènes, produits de la dégradation des caroténoïdes; le β -ionone, le β -cyclocitral et le dihydroactinidiolide. Ces trois substances sont une première découverte dans *Fucus vesiculosus*. Appelés nor-caroténoïdes cycliques, ils ont déjà été identifiés dans plusieurs micro-algues. Le β -cyclocitral (C₁₀) a été identifié chez : *Synura*

uvella, *Anabaena cylindrica*, *Cyanidium caldarium*, et les Cyanophycées *Mycrocystis aeruginosa* et *wesenbergii*. Le dihydroactinidiolide (C₁₁) a été identifié dans le genre *Synechococcus*. Le β-ionone a lui été identifié chez : *Synura uvella*, *Anabaena cylindrica*, *Synechococcus sp.* et *Cyanidium caldarium* (F. Jüttner 1976). Ces trois nor-caroténoïdes ainsi que plusieurs autres ont été découverts par I. Flament (1984) dans l'algue rouge *Porphyra tenera*, connu sous le nom populaire de Asakusa-nori.

Les caroténoïdes ont généralement des teintes jaune-rouge, ils sont isoprénoïdes (terpénoïdes). Largement distribués dans la nature, ils servent comme pigments auxiliaires dans la photosynthèse et aussi comme protection contre les dommages dus à la lumière. Les principaux caroténoïdes dans les algues brunes sont le β-carotène, la violaxanthine et la fucoxanthine (Goodwin, 1976). Le β-carotène est le carotène C₄₀ bicyclique, commun dans toutes les algues. Il s'accumule dans les gamètes mâles de *Fucus vesiculosus* et *Ascophyllum nodosum*. On a observé que la dégradation thermique du β-carotène produit différents polyènes de C₉, C₁₀, C₁₁ et C₁₃. Le β-ionone et le dihydroactinidiolide proviennent donc de la photo-oxygénation du β-carotène. On peut obtenir aussi le dihydroactinidiolide à partir du β-ionone, par divers mécanismes d'oxygénation.

L'intérêt du β-ionone est déjà bien connu par les chimistes spécialistes des huiles essentielles. On le retrouve dans l'huile de *Costus* (composée). Son odeur un peu sucrée qui a des réminiscences de violette ou de géranium est utilisée dans la parfumerie. Il est aussi identifié dans 28 systèmes alimentaires. Sa présence dans Nori, explique partiellement la note délicate et fleurie de l'algue, que l'on retrouve très faiblement chez *Fucus*. Le dihydroactinidiolide est surtout connus dans les constituants alimentaires. Le β-cyclocitral est très similaire au β-ionone. Il est aussi formé à partir du β-carotène par un processus de

dégradation oxydative, similaire à celui proposé pour la formation du géranyl-acétone, du β -ionone, du α -ionone, etc... dans la tomate. Le β -cyclocitral est reconnu responsable de l'odeur similaire à celle du tabac, qui se dégage lors de la floraison de certaines Cyanophycées dans les réservoirs d'eau douce (Juttner, 1976). Il a aussi été découvert dans les pois, le thé, la cannelle de Chine et le tabac (Flament, 1984). Il est difficile de juger si cette dégradation thermique du β -carotène est un résultat de l'hydrodiffusion ou si ces nor-caroténoïdes sont bien présents dans *Fucus vesiculosus*. C'est seulement par une autre technique d'extraction que l'on pourrait répondre à cette question.

- En ce qui concerne les autres constituants de l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus*, on peut mentionner avec intérêt la présence de l'hénéicosahexaène. C'est la première fois, à notre connaissance, que l'on extrait ce composé par une technique d'hydrodiffusion. Halsall (1971) identifiait l'hénéicosahexaène comme le constituant le plus abondant dans l'huile de *Fucus vesiculosus* obtenue par extraction au pétrole. Cette huile, incolore et inodore, peut facilement s'oxyder à l'air, pour donner une odeur caractéristique d'algues marines. D'ailleurs Broekhof (1986) a identifié certains produits d'oxydation de l'hénéicosahexaène et de l'hénéicosapentaène, comme des aldéhydes insaturées, responsables de l'odeur des algues brunes.

Notre huile essentielle de *Fucus vesiculosus* possède avant tout une odeur très forte, caractéristique des bords de mer, elle pourrait s'expliquer partiellement par la présence de l'hénéicosahexaène.

CHAPITRE IV

ANALYSES SEMI-QUANTITATIVES

4.1 INTRODUCTION

Si des plantes sont étudiées pour la présence de composés possédant un potentiel économique, il faut les examiner de façon systématique tout au long de l'année. L'analyse des fluctuations saisonnières de l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus* ouvre donc sur une perspective importante; la productivité aquatique de cette algue. Avec cette recherche on devra être en mesure de choisir le moment le plus favorable dans l'année pour la récolte de Fucus. Par la même occasion on pourra mieux connaître l'écologie de cette algue récoltée à Port-au-Saumon.

Bien sûr, il existe plusieurs facteurs qui influencent la variation des constituants chimiques présents dans les algues marines. Ces facteurs sont soit environnementaux, soit physiologiques. Les premiers incluent : la composition de l'eau, la lumière, la température, les pluies, les activités biologiques (ex: herbivores, épiphytes) etc... Nous engloberons tous ces facteurs environnementaux dans un seul, la variation des saisons; printemps, été et automne. En ce qui concerne les facteurs physiologiques, une recherche sera effectuée sur la variation des substances chimiques dans les différentes parties de l'algue. Quelques travaux ont déjà été faits sur la variation quantitative des constituants majeurs des algues brunes en fonction des saisons. Elles concernent avant tout les substances inorganiques, tels que les minéraux et les oligo-éléments comme l'iode, le phosphore et le potassium; mais aussi des substances organiques utilisées commercialement comme l'acide alginique et le mannitol.

La variation de ces constituants a souvent été comparée à la variation des facteurs environnementaux, comme la température de l'eau. G.V. Joshi (1975) a montré que le

mannitol atteint un maximum chez *Sargassum ilicifolium* lorsque les températures de l'eau sont élevées. Alors qu'il observe le contraire pour l'acide alginique. Zavodnik (1973,1987) donne une importance particulière aux facteurs environnementaux pour les variations saisonnières des constituants biochimiques des algues littorales communes en Adriatique du nord. Il analyse des échantillons de *Fucus virsoides* pour l'eau, la matière organique, les cendres (minéraux), les protéines, le mannitol, l'acide alginique, les substances solubles dans l'éther, le phosphore, le calcium, le chlore et les pigments. Sa recherche est assez complète, puisque dans un même temps il mesure l'activité photosynthétique pour des échantillons identiques dans les conditions de laboratoire. Des analyses complémentaires de l'eau de mer sont minutieusement faites (salinité, oxygène dissout, pH, phosphore réactif, alcalinité, température et intensité lumineuse de la surface de l'eau).

Pour la variation saisonnière des constituants volatils des algues nous avons très peu d'informations. Nous pouvons quand même mentionner les travaux de Gschwend (1982) qui montrent les composés organiques volatils présents dans l'eau de mer où *Fucus* croît. L'eau de mer a été analysée tous les 15 jours pendant 15 mois. Il a pu détecter par CPG-MS les composés suivants :

- des alcybenzènes, provenant essentiellement des gaz de bateaux.
- le naphthalène et le méthyl-naphthalène, provenant des fumées de chauffage en hiver.
- des alcanes, qui ne présentent pas de variations saisonnières marquées
- le fucoserratène qui suit les variations des alcybenzènes.

D'autres chercheurs font une correspondance entre la variation des constituants chimiques et le stade de développement des algues (facteurs physiologiques). D'après Ragan (1978), il semble y avoir une corrélation temporelle significative entre le contenu en polyphénols et le stade reproductif de l'algue *Fucus vesiculosus*. Le taux de polyphénols est au minimum juste avant la période de fertilité maximale, c'est à dire de mars à mai, et il atteint un maximum pendant la période de stérilité, de septembre à janvier. Dans la même année que les travaux de Zavodnik, nous avons les études de Youngblood (1973) sur les alcanes et les alcènes des algues benthiques marines. Cet auteur montre qu'il y a une corrélation entre le taux d'hydrocarbures et les différents stades de croissance de la plante. Déjà des études préliminaires ont prouvé que dans les cultures de phytoplanctons, les polyoléfines, comme l'hénéicosahexaène, sont plus abondants dans les périodes de division cellulaire que dans les phases stationnaires. Ainsi Youngblood a étudié le contenu en polyoléfines des différentes parties des algues benthiques, pour démontrer que ces constituants sont en plus grand nombre dans les réceptacles développés que dans les vieux thalles stérils. Il sera donc intéressant d'observer la variation de l'hénéicosahexaène obtenu par hydrodiffusion des différentes parties de l'algue.

Dans ce chapitre nous allons donc présenter la variation saisonnière des constituants majeurs de l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus*. Pour cela il est nécessaire de quantifier ces constituants, nous pouvons le faire de façon indirecte.

4.2 RESULTATS.

4.2.1 Rendement en huile.

Une première quantification à faire, est celle du rendement en huile essentielle obtenu par la technique d'hydrodiffusion. Il est calculé à partir du poids de l'huile par rapport au poids des algues sèches utilisées dans l'hydrodiffusion (300 g). Vous pouvez voir au tableau 6 les rendements obtenus pour chaque récolte. Tous les rendements sont inférieurs à 0,1% ! Le rendement moyen est très faible, 0,025 % du poids sec. Cette première constatation nous met en évidence la faible quantité de matériel extrait par hydrodiffusion.

4.2.2 Variations saisonnières des composés majeurs.

L'analyse de la variation saisonnière de quelques constituants de l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus* est faite sur une période de 10 mois; d'octobre 1986 à mai 1988, en excluant les longs mois d'hiver. A partir des résultats sur CPG nous pouvons quantifier les composés identifiés. Cette quantification est indirecte, elle est mesurée en pourcentage d'aire du pic par rapport à la somme des aires des pics enregistrés entre 6 min et 40 min (programmation de 8°C/min). Les figures 10 à 17 présentent les variations de certains constituants identifiés: comme l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide palmitoléique, l'hénéicosaeaxène, le β -ionone, le β -cyclocitral, le dihydroactinidiolide et le triméthyl-2,6,11 docécane. Une première observation générale, montre que d'une année à l'autre, le taux de ces substances présentes dans l'huile peut être bien différent. Sur trois mois, octobre, avril et mai, échantillonnés deux années successives, on ne trouve pas les mêmes résultats. Et l'on observe toujours une variation différente entre le passage des deux hivers.

TABLEAU 6**RENDEMENTS EN HUILE**

MOIS	POIDS DE L'HUILE (mg)	RENDEMENT EN % (100 % = 300 g)
octobre 86	118,0	0,039
avril 87	55,3	0,018
mai 87	216,8	0,072
juin 87	148,4	0,049
juillet 87	12,8	0,004
août 87	48,6	0,016
sept. 87	8,0	0,002
octobre 87	52,2	0,017
avril 88	45,7	0,015
mai 88	50,7	0,017

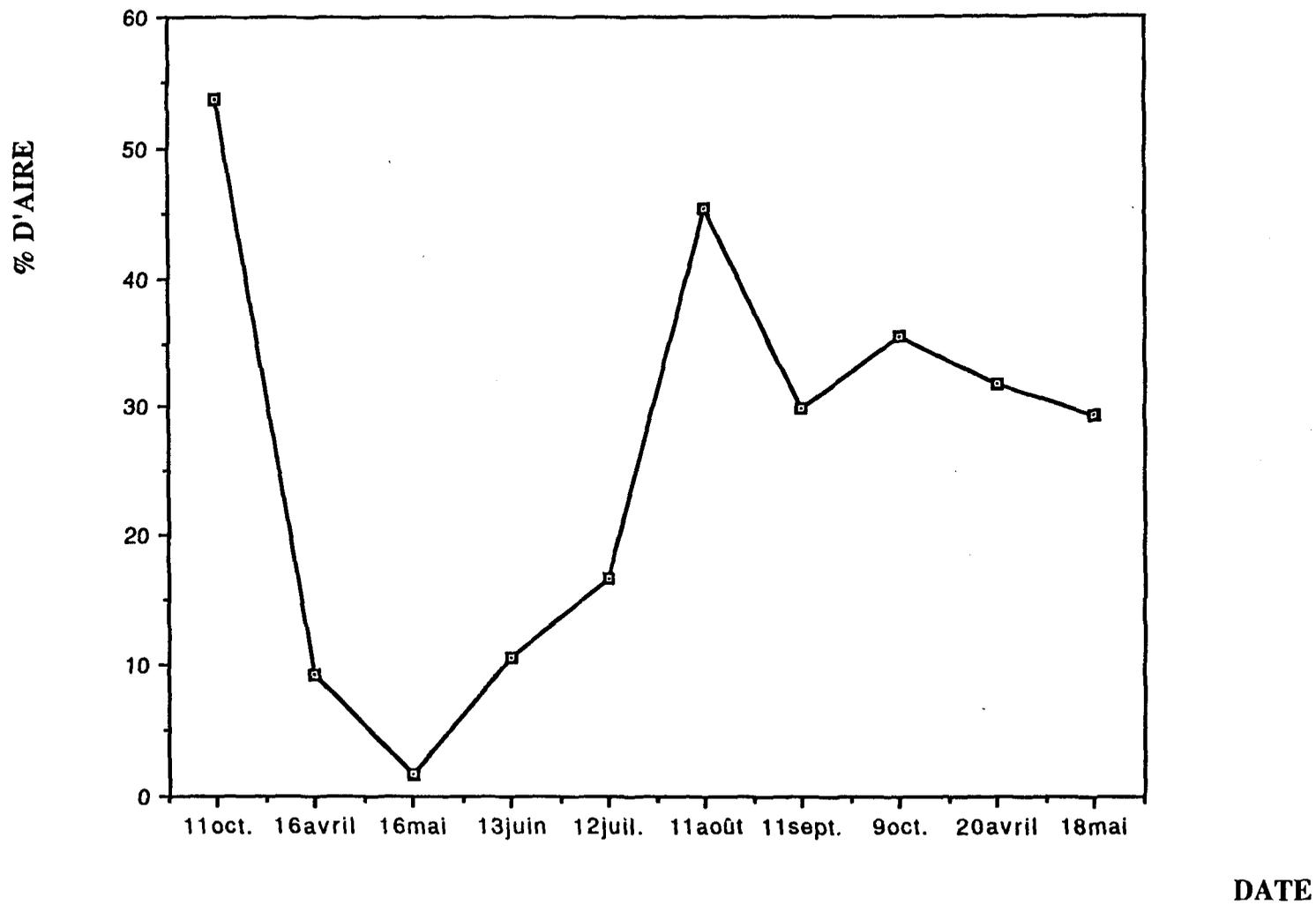


Figure 10 : Variation saisonnière de l'acide myristique

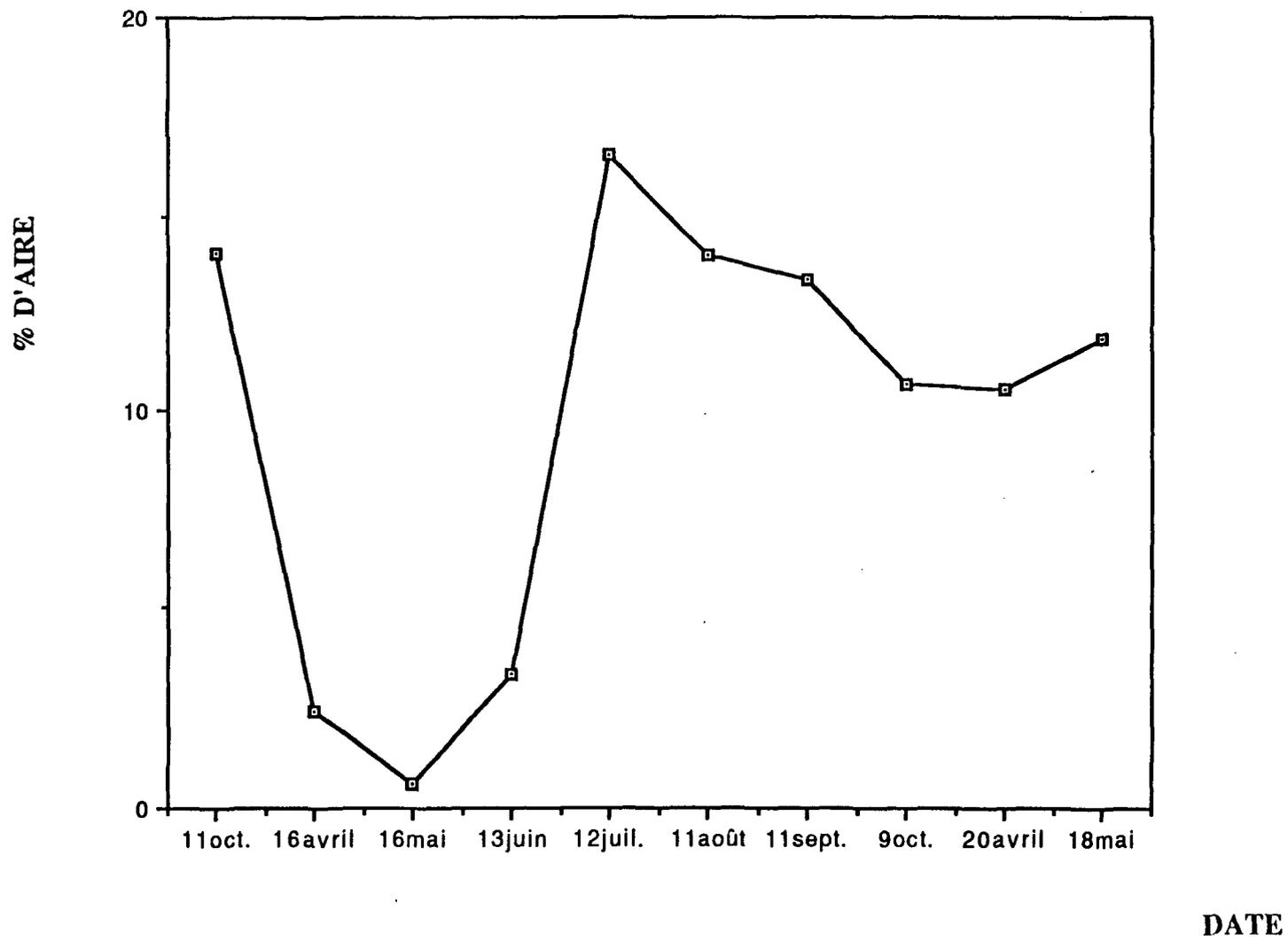


Figure 11 : Variation saisonnière de l'acide palmitique

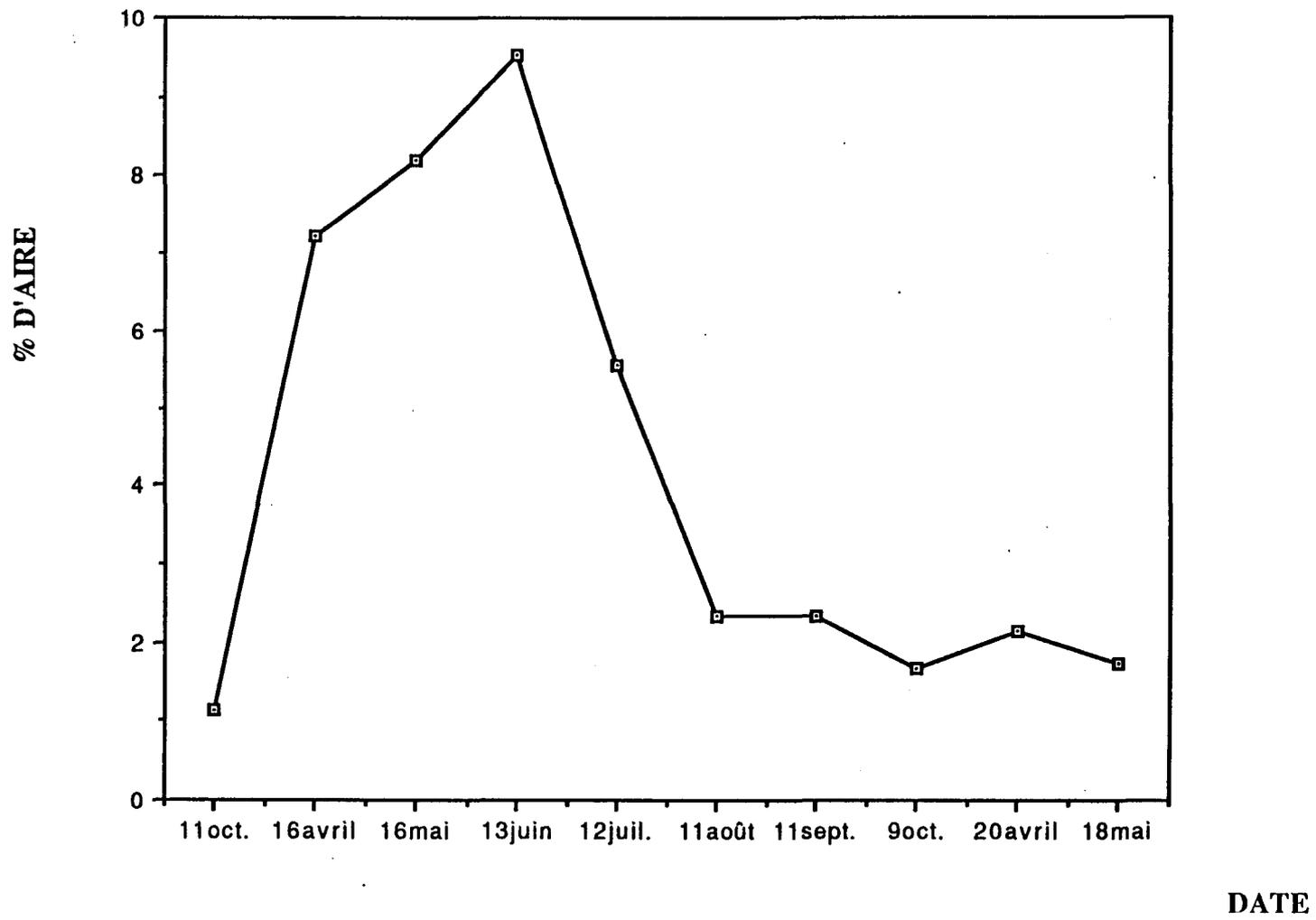


Figure 12 : Variation saisonnière de l'acide palmitoléique

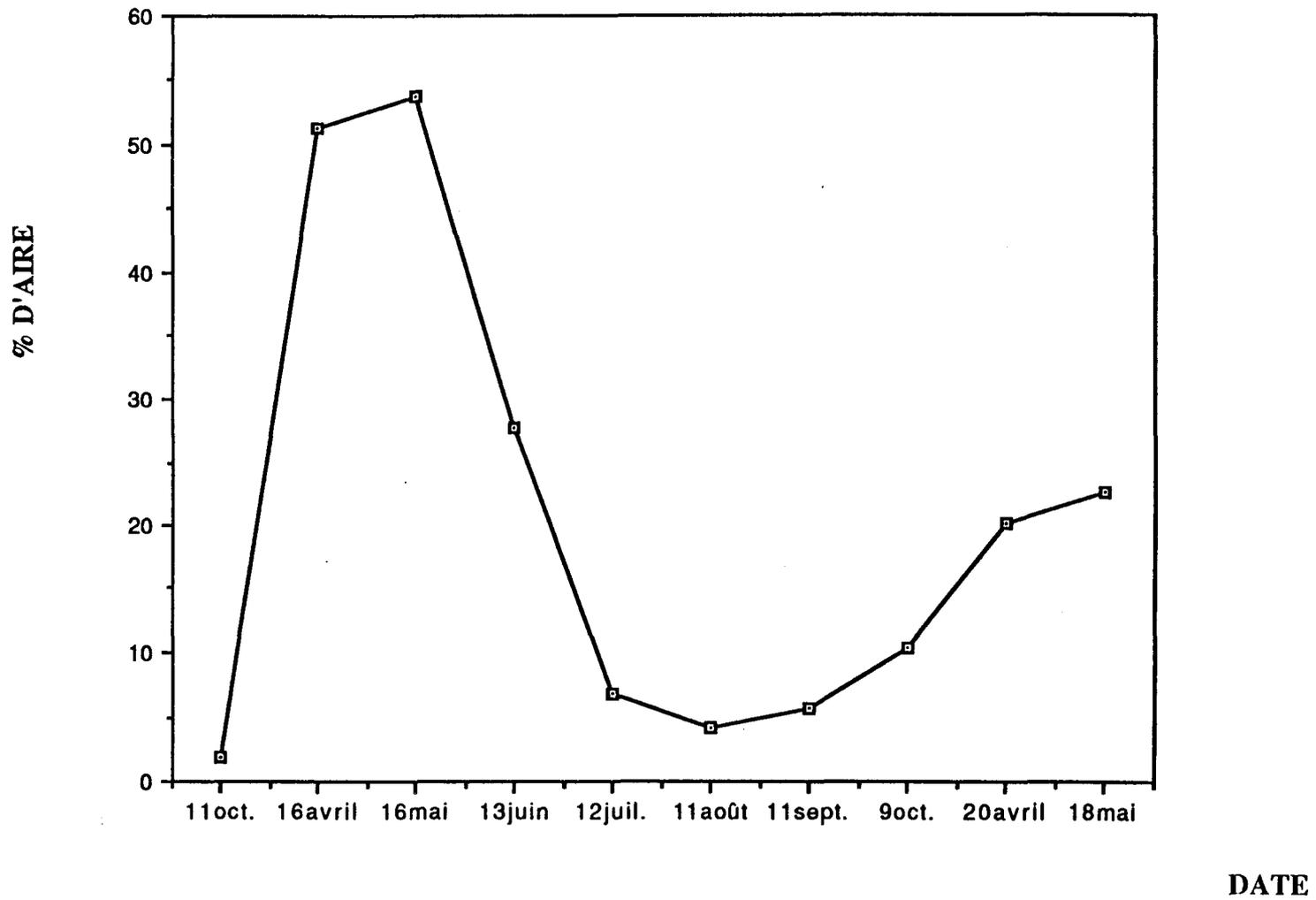


Figure 13 : Variation saisonnière de l'hénicosahexaène

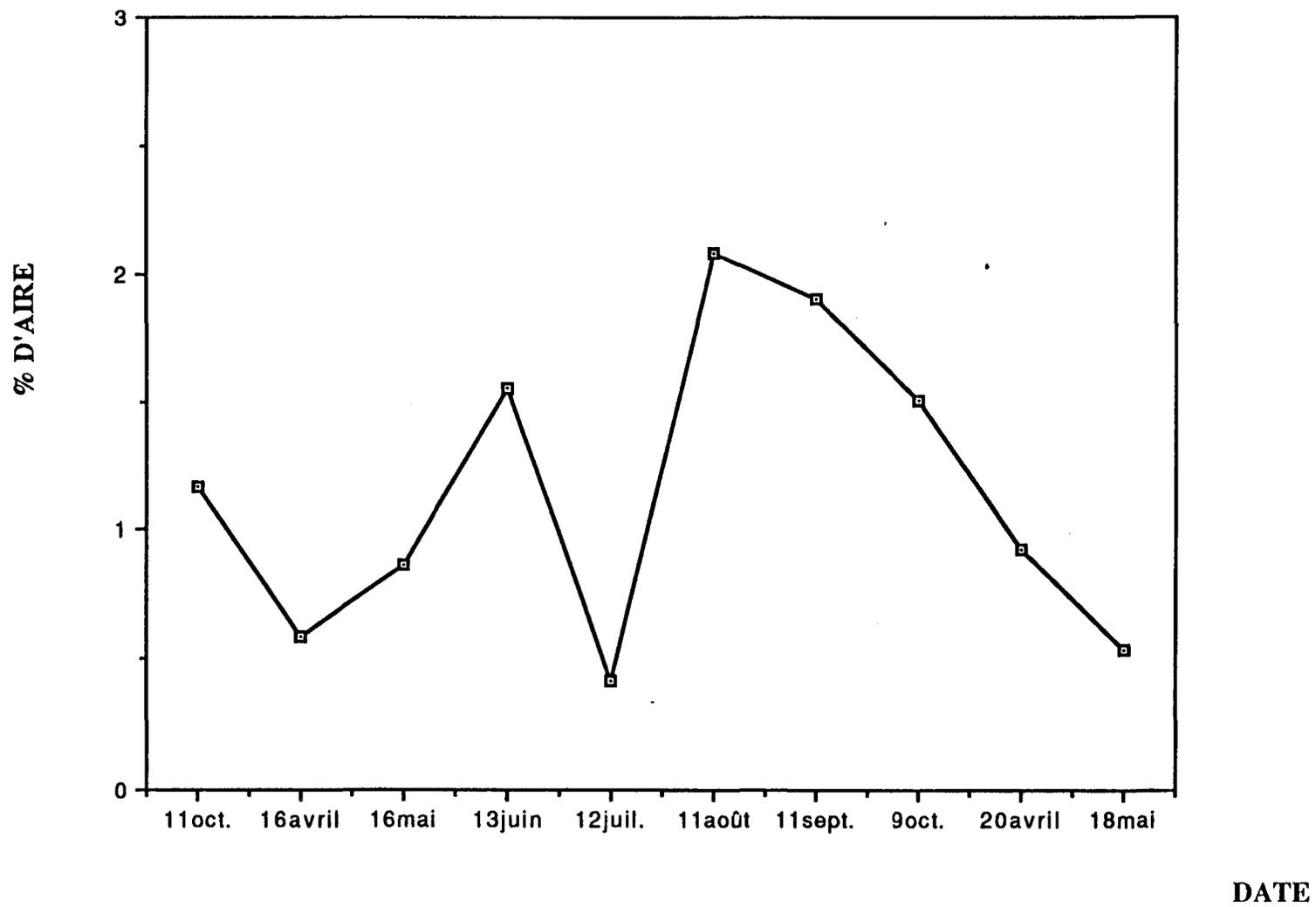


Figure 14 : Variation saisonnière du β -ionone

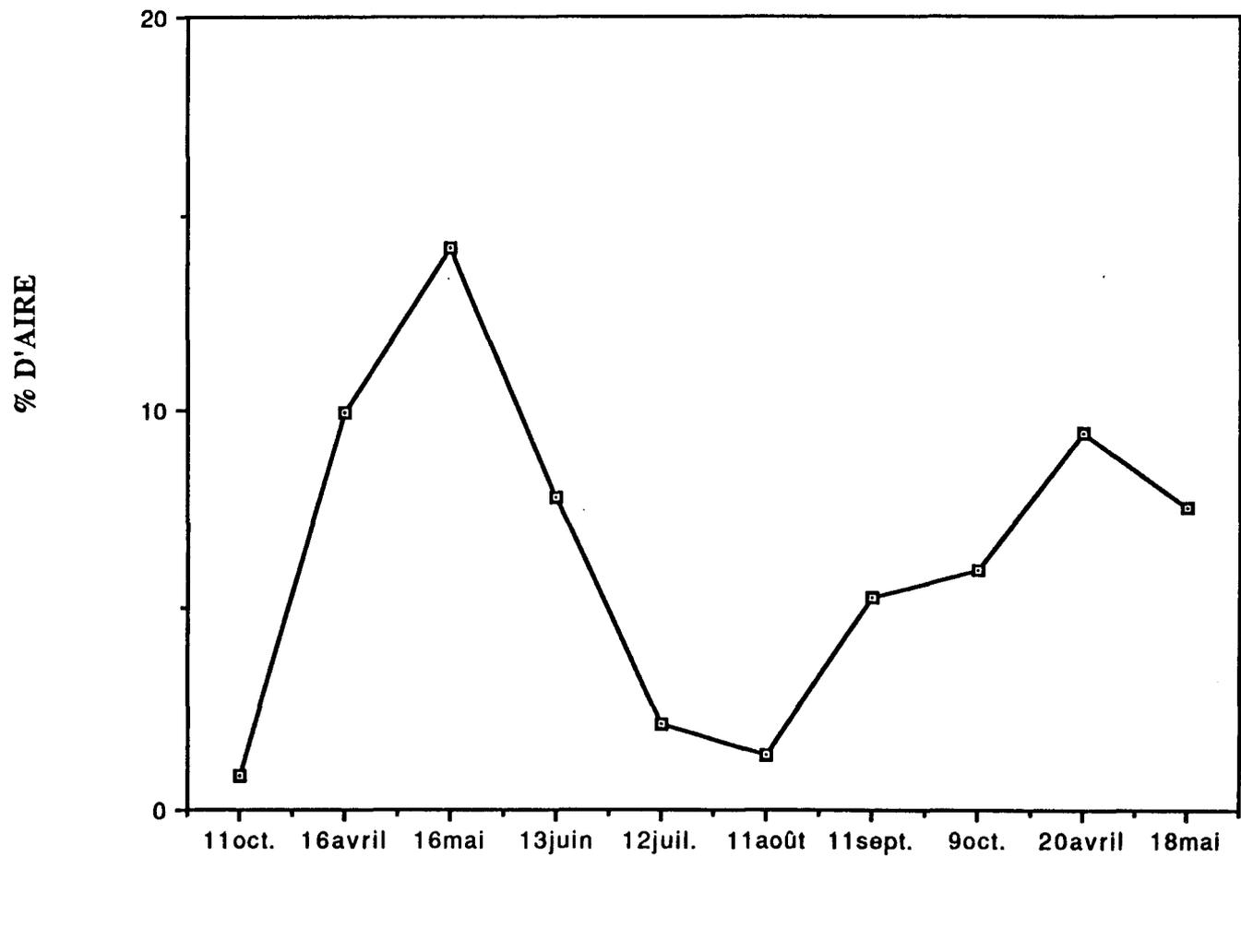


Figure 15 : Variation saisonnière du dihydroactinidiolide

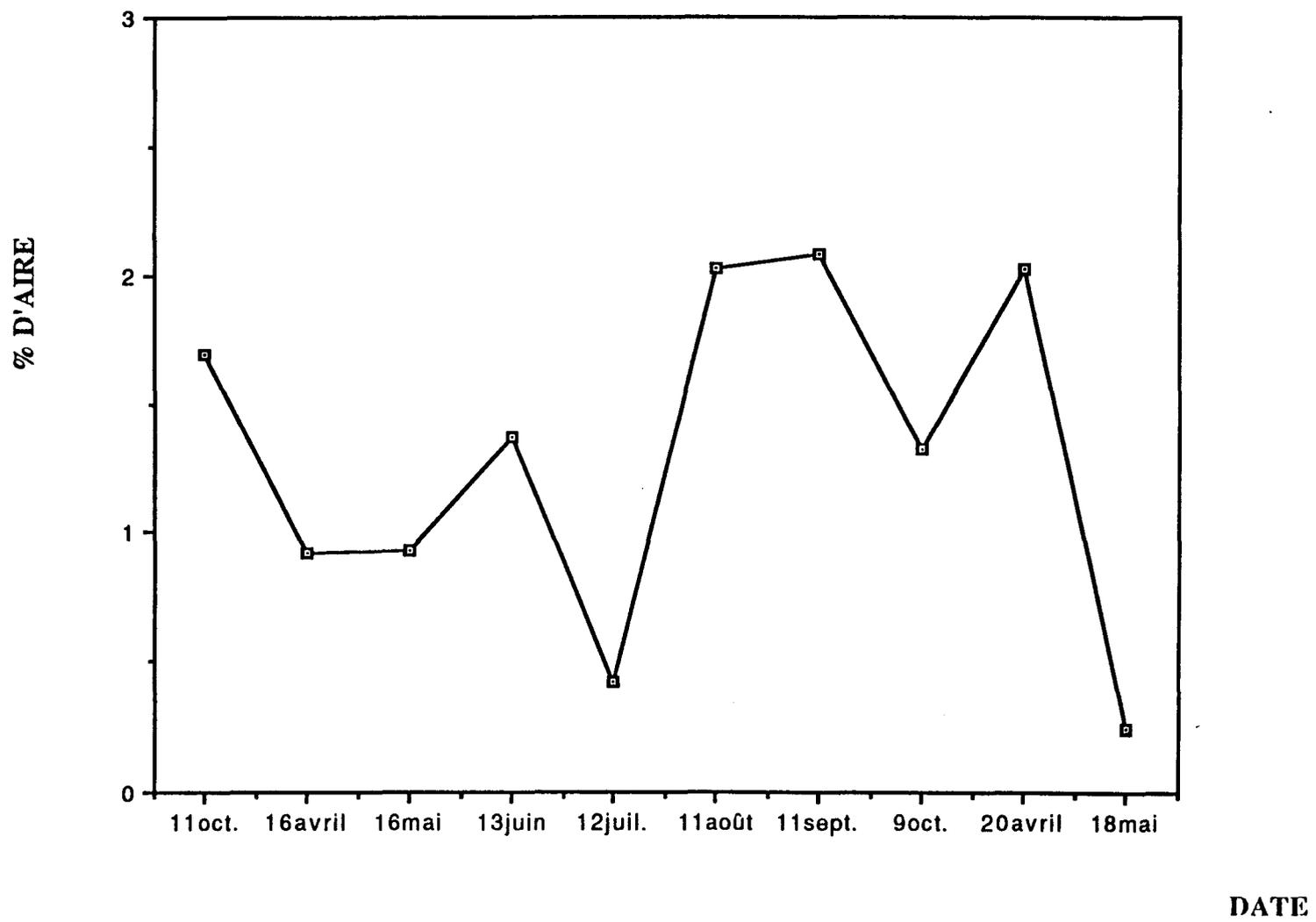


Figure 16 : Variation saisonnière du triméthyl-2,6,11 dodécane

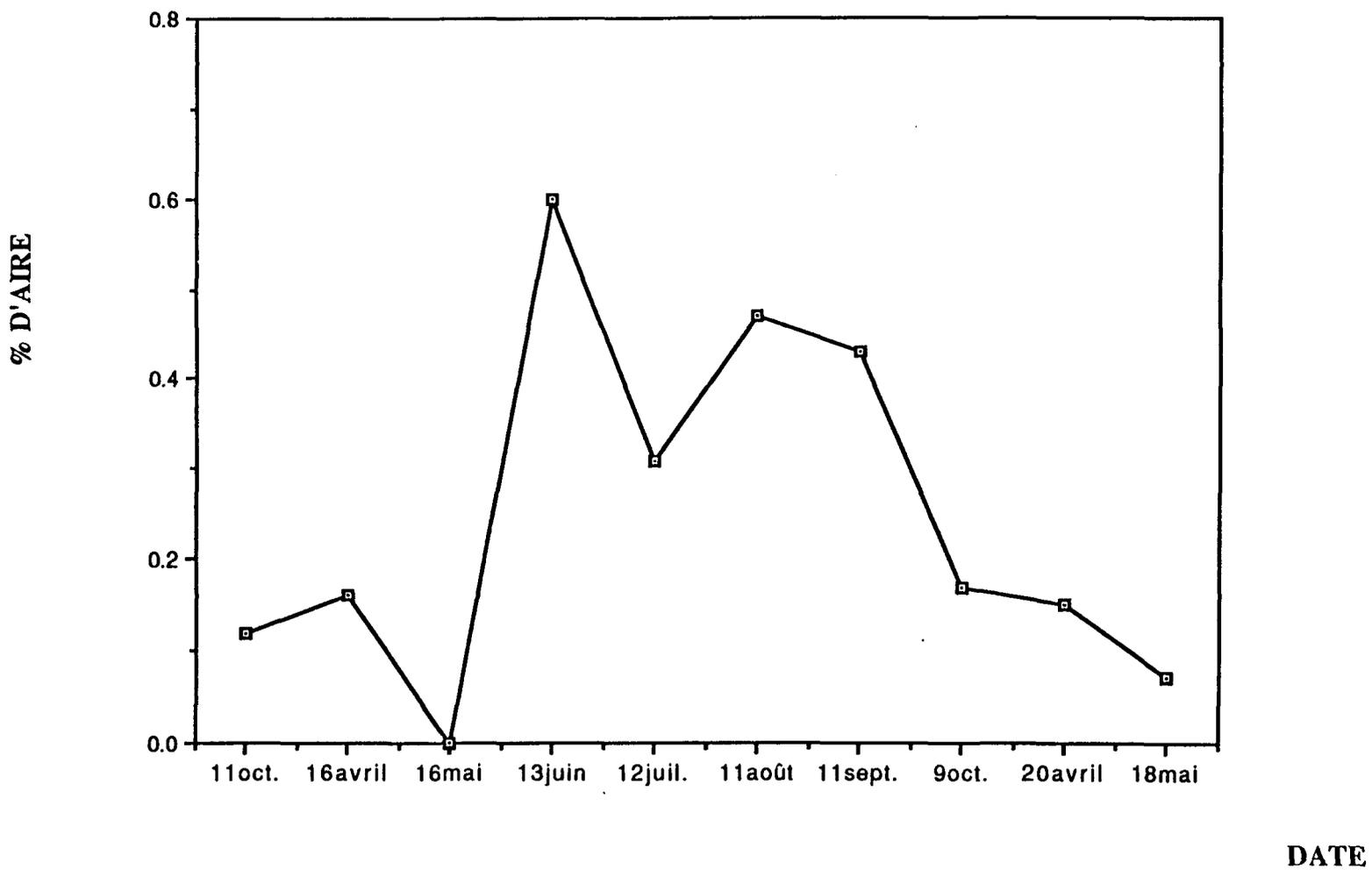


Figure 17 : Variation saisonnière du β -cyclocitral

- Les acides gras saturés C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₆ varient selon un même schéma.

Le taux minimum se trouve dans la période du printemps, soit au mois de mai, dans les débuts de la croissance des algues. Pour ensuite augmenter tout au long de l'été afin d'atteindre un maximum vers la fin de l'été suivit généralement d'une chute en automne. Pour tous ces acides gras, on observe entre les mois d'avril et mai une chute du taux, pour ensuite remonter rapidement. Le seul acide gras insaturé identifié dans nos extraits, l'acide palmitoléique (C₁₆), suit une variation inverse de celle des autres acides gras pour l'année 87. Le maximum est atteint en Juin, suivit d'une forte chute pour l'été et un minimum en octobre. Cet acide est probablement converti par hydrogénation en acide saturé correspondant, l'acide palmitique.

- L'hénicosahexaène, aussi composé majeur dans notre huile essentielle, suit une variation inverse de celle des acides gras saturés. On observe un minimum en automne (octobre) et un maximum au printemps, pendant la période de forte croissance.

- Pour les nor-caroténoïdes, les variations sont plus complexes, en dents de scie. On peut distinguer deux pics maximums pour le β -ionone et le β -cyclocitral, le premier est atteint en juin et le deuxième au mois d'août. En quantité relative, nous devons toujours être attentif aux changements d'échelles du % d'aire. Par exemple nous avons plus de dihydroactinidiolide (max.= 14,8%) que de β -cyclocitral (max. = 0,6%).

-Tests statistiques.

Pour répondre à la question: à savoir si ces variations saisonnières sont significatives, il est nécessaire d'entreprendre quelques tests statistiques. Une première analyse statistique permettra de connaître la reproductibilité du pourcentage des aires des pics dans le

mode d'injection "split" (Supelco, 1977). En d'autres termes elle nous dira si l'injection sur CPG peut être reproductible ou source possible de variations. Ainsi, l'extrait du mois de mai 88 a été injecté six fois de suite dans les mêmes conditions, et onze pics différents de A à K, choisis arbitrairement, ont été étudiés (tableau 7). Les résultats sont satisfaisants, puisque l'erreur (% déviation) est en général plus petite que 1,5 %. Nous pouvons donc avancer que l'injection sur le CPG est très reproductible, pour autant que l'on utilise les mêmes conditions. Une deuxième analyse statistique nous permettra d'estimer la reproductibilité de la procédure d'expérimentation, c'est à dire de la distillation à la vapeur et de l'extraction. Deux hydrodiffusions de la récolte du mois d'avril 88 ont été faites dans les mêmes conditions, et suivies de deux analyses chromatographiques. On peut voir au tableau 8 les pourcentages d'erreurs, sur les aires relatives, obtenus pour les pics majeurs. Nous observons cette fois une grande variation entre les quantités relatives des substances obtenues par les deux hydrodiffusions de la même récolte. Les techniques utilisées dans la distillation à la vapeur peuvent être une source de variations que l'on ne doit pas sous-estimer.

Une troisième analyse statistique touchera plus particulièrement les résultats obtenus de la variation saisonnière des produits. Comme nous avons une seule variable par mois, nous ne sommes pas en mesure de faire une analyse de variance. Nous pouvons néanmoins nous assurer s'il y a bien une variation significative entre le début et la fin de l'année. Ainsi un test de t (student) peut être fait sur les valeurs des mois d'avril, mai, juin, juillet, août, septembre et octobre de l'année 1987, que l'on regroupe dans deux parties distinctes. Cela revient à faire un test d'homogénéité entre deux moyennes. Exemple: [avril, mai, juin, juillet] X_1 et [août, septembre, octobre] X_2 . Peut-on regarder X_1 et X_2 comme étant significativement différentes ?

TABLEAU 7

Reproductibilité du pourcentage des aires des pics selon le mode d'injection "split".

n . injec- tion pics (TR)	1	2	3	4	5	6	% AIRE + écart-type	% D.S.
A (5,95)	0,389	0,532	0,470	0,489	0,454	0,448	0,4636 + 0,0022	0,47 %
B (18,42)	0,436	0,445	0,481	0,426	0,450	0,462	0,4500 + 0,0004	0,09 %
C (18,77)	0,230	0,254	0,251	0,262	0,236	0,267	0,2500 + 0,0002	0,08 %
D (24,72)	0,279	0,243	0,296	0,311	0,287	0,270	0,2810 + 0,0005	0,19 %
E (25,61)	0,380	0,336	0,408	0,370	0,392	0,368	0,3757 + 0,0006	0,16 %
F (25,89)	6,365	5,916	6,851	6,177	6,465	6,337	6,3518 + 0,0969	1,52 %
G (33,96)	28,606	28,719	28,329	28,165	28,414	28,525	28,4597 + 0,0398	0,14 %
H (37,77)	1,643	1,380	1,631	1,607	1,827	1,638	1,6210 + 0,0203	1,25 %
I (38,59)	11,925	12,195	11,860	12,067	11,857	12,162	12,0110 + 0,1137	0,95 %
J (39,92)	22,734	22,619	22,120	22,415	22,438	22,530	22,4760 + 0,0444	0,20 %
K (55,28)	2,399	2,506	2,446	2,495	2,405	2,451	2,4503 + 0,0018	0,07 %

TABLEAU 8

ANALYSE DE LA REPRODUCTIBILITE DE L'HYDRODIFFUSION

N ^o du composé *	% d'aire		% d'aire + écart-moyen type	% erreur
	Hydrodiffusion 1	Hydrodiffusion 2		
1	0,30	0,74	0,52 + 0,311	59,7
2	0,08	0,15	0,11 + 0,049	44,9
3	0,72	0,87	0,79 + 0,106	13,4
4	0,05	0,16	0,10 + 0,078	77,8
5	0,64	0,93	0,78 + 0,205	26,3
6	1,19	2,03	1,61 + 0,594	36,8
7	6,89	9,44	8,16 + 1,804	22,1
8	0,52	0,49	0,50 + 0,021	4,2
9	1,34	1,42	1,38 + 0,056	4,1
10	32,20	31,70	31,95 + 0,353	1,1
11	1,52	1,03	1,27 + 0,346	27,3
12	1,94	2,15	2,04 + 0,148	7,3
13	9,90	10,54	10,22 + 0,452	4,4
14	25,87	20,24	23,05 + 3,981	17,3

* Pour les N^o des composés voir la figure 8.

Les étapes du test sont:

- Hypothèse de base $\mu_1 = \mu_2$
- Egalité des variances testée par un test de F. $F_{exp} = S_1 / S_2$
- Estimation de σ^2 : $S^2 = [(n_1-1)^2 + (n_2-1)^2] / n_1 + n_2 - 2$
 $\sigma_D = S \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}$
- Rapport critique donné dans les tables : pour $\alpha = 0,05$ et $v = n_1 + n_2 - 2$
 $t(5\%, 5) = 2.571$
- Résultat observé $t_{calc.} = [X_1 - X_2] / \sigma_D$

Ce test est calculé sur l'ordinateur (programme Sacados, VAXCH). Vous pouvez voir les résultats résumés sur le tableau 9.

TABLEAU 9

Test de t (student) sur la variation des composés majeurs entre le début et la fin de l'année 1987.

Nom du composé	valeurs des t calculés
acide myristique	5,1686
acide palmitique	1,5801
acide palmitoleïque	5,4883
l'hénicosahexaène	2,1333
le β -ionone	2,9651
le dihydroactinidiolide	1,3381
le β -cyclocitral	0,5236

Lorsque les $t_{calc.}$ sont plus grands que le t donné par les tables, on rejette l'hypothèse de l'égalité des moyennes, c'est-à-dire qu'on accepte qu'elles sont significativement différentes. Ainsi on observe qu'il y a bien une variation saisonnière significative (avec probabilité de 95%) pour l'acide myristique, l'acide palmitoléique et le β -ionone. La variation est significative avec une probabilité de 90% pour l'hénécosahexaène. En ce qui concerne les autres substances, on ne peut pas dire que leurs variations saisonnières soient vraiment significatives.

4.2.3 Analyse des parties de l'algue.

Il est intéressant dans le cadre de ce projet de faire cette analyse sur la variation des produits, isolés dans les différentes parties de l'algue. On pourra faire ainsi une correspondance entre les constituants chimiques présents dans l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus* et les facteurs physiologiques de la plante.

Nous avons séparé l'algue en cinq parties, que vous pouvez voir dans la figure 18.

- **1: Tête** = jeune pousse identifiée par sa couleur plus pâle.
- **2: Vésicule** = partie enflée qui est utilisée par la plante pour se maintenir dans l'eau.
- **3: Réceptacle** = partie reproductrice de la plante.
- **4: Midrib** = tige sèche que l'on retrouve dans les plants plus âgés.
- **5: Corps** = partie qui comprend le midrib et le thallus.

Cette analyse est réalisée sur la récolte du mois de septembre 1987, chacune des parties sont séchées séparément avant l'extraction des produits naturels. Les résultats obtenus sont les suivants: nous observons le même genre de chromatogrammes où les produits majeurs se retrouvent dans toutes les parties de l'algue, avec une variation quantitative. C'est dans les parties jeunes (les têtes) que se retrouve le plus de composés et dans les parties vieilles et sèches (midribs) qu'il y en a le moins. Les acides gras sont présents dans toutes les parties, avec une légère prédominance dans les vésicules aérifères, où l'on retrouve une quantité relative importante d'acide myristique. Par contre le β -cyclocitral est présent en faible quantité dans les têtes et visible seulement en traces dans les autres parties. Ces résultats sont résumés dans le tableau 10.

La figure 19 présente la variation de l'acide myristique, de l'hénicosahexaène et du β -ionone dans les différentes parties de l'algue.

Figure 18 : Schéma des différentes parties de l'algue

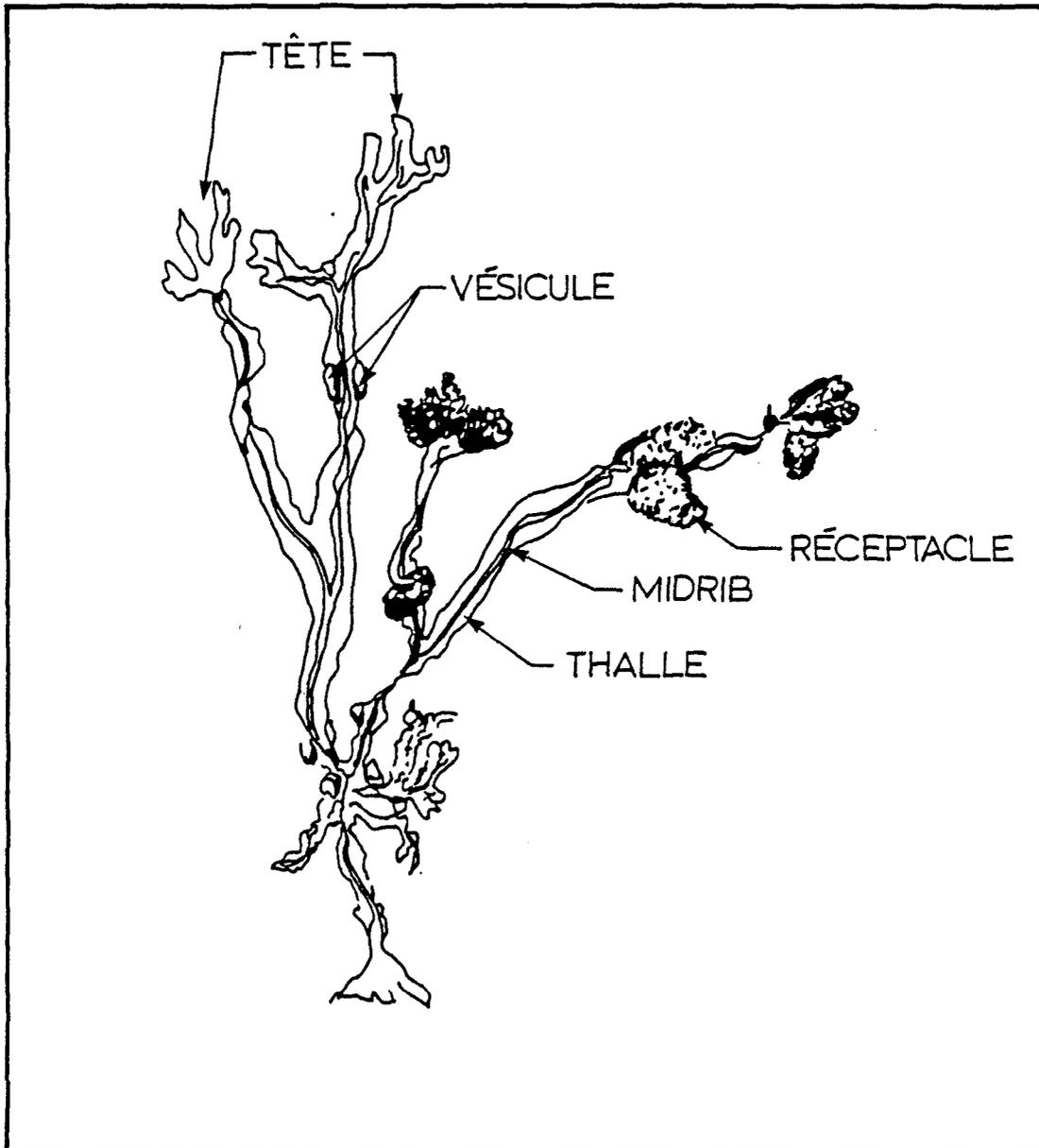


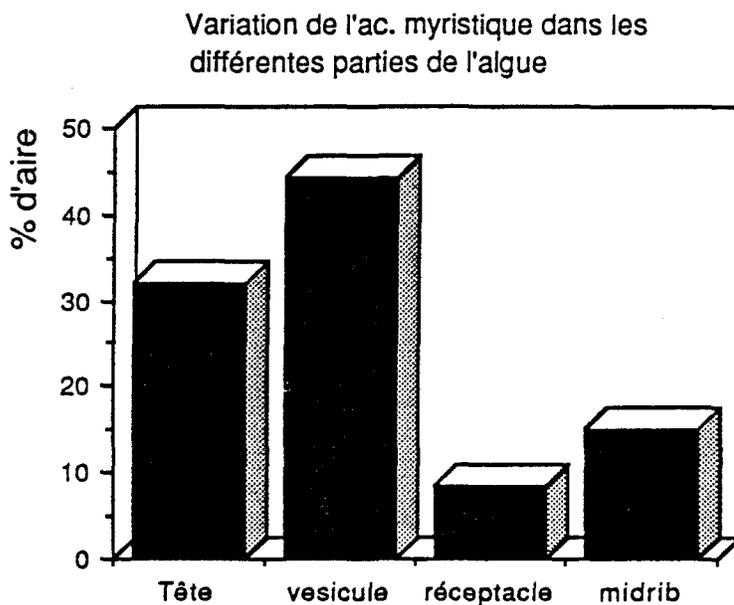
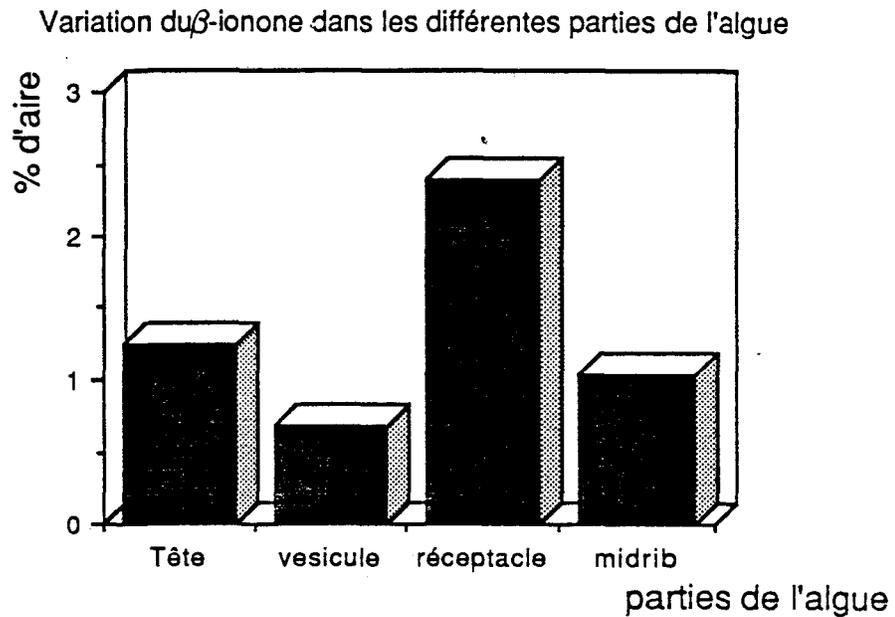
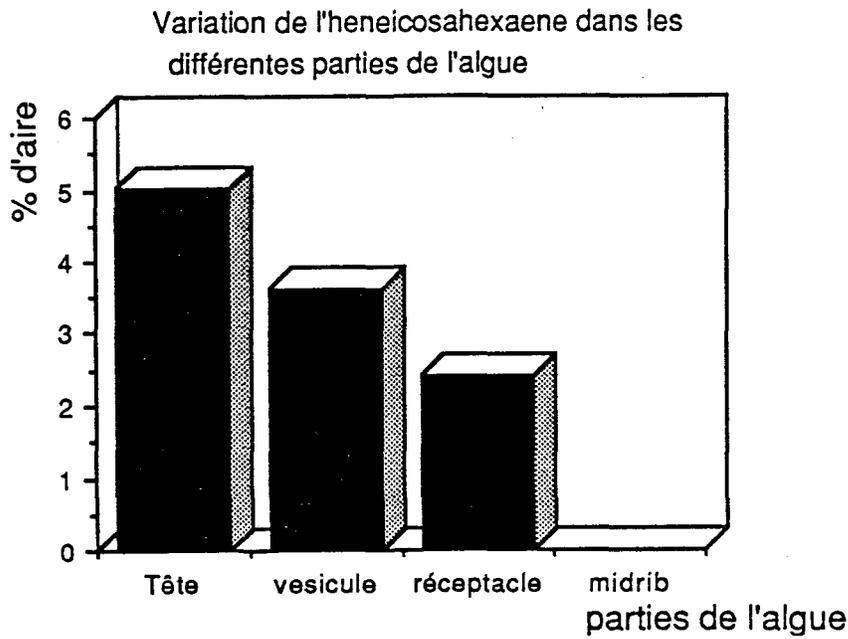
TABLEAU 10

Variation des composés isolés dans les différentes parties de l'algue

COMPOSES	(% d'aire)			
	TETE	VESICULE	RECEPTACLE	MIDRIB
β -cyclocitral	0,23	t.	t.	t.
ester d'éthényle de l'ac. cyclohexane-carboxylique	1,24	0,74	0,63	0,35
méthyl-3 (méthyl-1 éthyl)-6 cyclohexène-2 one-1	1,44	0,80	0,29	0,46
β -ionone	1,24	0,68	2,40	1,03
triméthyl-2,6,11 dodécane	1,30	0,46	1,29	1,01
dihydroactinidolide	2,89	2,66	2,34	1,05
acide laurique	5,52	0,99	5,16	0,92
acide myristique	32,09	44,26	8,59	15,04
acide palmitique	18,30	13,73	24,16	18,29
hénéicosahexaène	5,01	3,63	2,43	t.

t.(traces) = % d'aire < 0,1

Figure 19 : Histogrammes des variations de l'ac. myristique, de l'hénécosahexaène et du β -ionone dans les différentes parties de l'algue.



4.2.4 Quantification des acides gras majeurs.

A l'aide d'une courbe standard de l'acide myristique pur (annexe XX), nous pouvons quantifier les acides gras. Tout d'abord de façon directe, avec la courbe standard, nous pouvons connaître les quantités d'acide myristique présentent à chaque mois (tableau 11).

TABLEAU 11

Quantité d'acide myristique présente pour chaque mois

Mois	aire du pic	Quantité d'acide myristique	
		PPM	mg/100g de p.s.
octobre 86	3 269 000	2140	214,0
avril 87	610 060	400	40,0
mai 87	43 561	25	2,5
juin 87	967 070	590	59,0
juillet 87	1 863 400	1220	122,0
août 87	1 210 400	790	79,0
septembre 87	1 082 900	710	71,0
octobre 87	3 948 700	2600	260,0
avril 88	1 695 400	1105	110,5
mai 88	2 694 400	1765	176,5

Ensuite, grâce à la formule suivante qui tient compte du nombre de carbone, nous calculerons la quantité d'acide palmitique:

$$\% \text{ aire de l'acide myristique (14 C)} = X \%$$

$$\% \text{ aire de l'acide palmitique (16 C)} = Z \%$$

En connaissant la quantité du standard injectée, par exemple 500 ppm, on calcul la quantité de ppm de l'autre acide.

$$500 \text{ ppm} \quad X / 14$$

$$Y \text{ ppm} \quad Z / 16$$

Le tableau 12 résume les quantités d'acide palmitique présentes chaque mois.

TABLEAU 12

Quantité d'acide palmitique calculée pour chaque mois

Mois	aire du pic	Quantité d'acide palmitique	
		PPM	mg/100g de p.s.
octobre 86	843 950	483	48,3
avril 87	157 840	91	9,1
mai 87	16 100	8	0,8
juin 87	285 500	162	16,2
juillet 87	1 836 300	1052	105,2
août 87	374 170	214	21,4
septembre 87	483 720	278	27,8
octobre 87	1 190 800	686	68,6
avril 88	567 030	328	32,8
mai 88	1 088 600	624	62,4

On peut voir que ces quantités sont transformées en mg/100g de poids sec par la formule suivante (Harris, 1987):

$$\text{ppm} / 10^6 = \text{g de substance} / \text{g d'échantillon}$$

Comme vous pouvez le constater dans les tableaux 11 et 12, nous avons extrait des quantités très faibles d'acides gras. Pour l'acide myristique, produit majeur identifié au CPG-SM, on a en moyenne un rendement d'extraction de 0,1 %, et pour l'acide palmitique un rendement moyen de 0,04 % !

4.3 DISCUSSION.

- A comparer aux plantes terrestres où les rendements en huiles essentielles sont parfois voisins de 1%, nous obtenons un rendement moyen en huile de *Fucus vesiculosus* très dérisoire. Celui-ci est en moyenne de 0,025 % du poids sec, avec comme maximum atteint 0,072 % et comme minimum 0,002 %. Néanmoins nous pouvons dire que ces rendements se rapprochent de ceux obtenus par Katayama (1962) sur la distillation à la vapeur de différentes algues brunes comme :

- Laminaria 0,051 % du poids sec
- Hizikia 0,053 % "
- Undaria 0,054 % du poids sec
- Sargassum 0,062 % "

Il faut tout de même noter, que la variation des rendements en huile obtenus chaque mois, ne suit pas une variation saisonnière. Plusieurs facteurs incontrôlés, d'ordre technique, peuvent influencer la mesure du poids de l'huile.

- En ce qui concerne l'analyse de la variation saisonnière, nous pouvons avoir une bonne idée de la façon dont varient les constituants de l'huile, et cela malgré une quantification indirecte de ces composés. La variation annuelle pourraient s'expliquer par une différence des facteurs environnementaux; effectivement l'hiver 87-88 a été moins rigoureux

que l'hiver précédent, il y a eût beaucoup de neige pour permettre une certaine protection des algues non broyées par les glaces. Justement nous avons remarqué, sur le terrain, au début d'avril 88 une plus grande quantité d'algues âgées de plus de 2 ans, que l'année précédente. Le facteur variation annuelle existe donc, il faudrait pour mieux le distinguer poursuivre cette étude sur plusieurs années. Comme ce n'est pas notre but recherché, nous nous sommes arrêtés à la question de la variation saisonnière. Celle-ci est différente pour chaque composés, quoiqu'on remarque certains schémas de variations assez similaires entre eux.

Les analyses statistiques nous présentent bien l'ambiguïté de la quantification des constituants révélés par notre analyse au chromatographe en phase gazeuse . Nous devons rappeler que le mode d'injection "split" n'est pas souhaité pour une bonne quantification. On observe tout de même que l'injection est reproductible, lorsqu'on utilise les mêmes conditions d'expérimentation. De plus nous aurions tendance à annuler toute interprétation de variation saisonnière en regardant les résultats de l'absence de reproductibilité de l'hydrodiffusion. En fait, il faut savoir que chaque récolte a été menée de façon aléatoire, et qu'il peut exister un facteur de variation physiologique au sein d'un même échantillon. Si nous laissons de côté ces facteurs de variations d'origine physiologique et technique, nous pouvons ressortir de cette analyse globale de la variation saisonnière, quelques interprétations intéressantes.

a) Nous pouvons confirmer en partie les résultats obtenus pour la variation des acides gras, avec les travaux de Zavodnik (1973) sur *Fucus virsoides* . Il a observé une même variation saisonnière pour des substances solubles dans l'éther. Ces substances ne sont autres que des graisses. Cette variation est en parallèle avec la croissance du thalle, la quantité de ces substances augmente depuis le printemps pour atteindre un maximum en été. Les valeurs minimum sont en février, au début du développement végétal pour les algues de ce pays

(Yougoslavie). Ceci prouve que les acides gras ne sont pas seulement important pour la physiologie de la plante (membranes cellulaires), mais ils sont aussi une source d'énergie utilisée pour la croissance.

b) La variation saisonnière de l'hénécosahexaène confirme en partie les résultats mentionnés par Youngblood (1971). Il a émis deux hypothèses sur la variation quantitative de cet hydrocarbure insaturé. La première hypothèse associe le taux élevé de l'hénécosahexaène avec le temps ou la partie correspondant à une division rapide des cellules. La deuxième hypothèse associe la formation des hydrocarbures insaturés avec la structure reproductive ou le stade de développement sexuel. Youngblood n'a pas réussi à distinguer entre ces deux hypothèses. D'après nos résultats sur la variation saisonnière de cet hydrocarbure, nous pouvons suggérer que le temps joue un rôle important. Nous avons un taux maximum dans la période de forte croissance, et cette période ne correspond pas encore avec la maturité sexuelle de la plante.

c) L'interprétation de la variation saisonnière des nor-caroténoïdes est plus ardue. Les seuls travaux similaires sont ceux de Zavodnik (1973) sur les variations saisonnières des caroténoïdes. Ces composés suivent les mêmes variations que la chlorophylle. Les valeurs sont maximales de décembre à mars et sont faibles en été. Dans nos résultats, nous trouvons seulement le dihydroactinidiolide qui suit une telle variation, puisqu'il a un maximum au printemps, début de la croissance, et un minimum en été.

- Si nous voulons maintenant répondre à notre première question : quel est le meilleur moment de récolte pour *Fucus vesiculosus*, il faudra savoir ce que nous désirons isoler en plus grande quantité. Pour avoir des acides gras saturés, nous choisirons les mois de

septembre à octobre, c'est d'ailleurs dans cette période que nous observons des thalles bien développés, avec maturité sexuelle, où souvent il y a déjà eut relâchement des gamètes mâles dans la mer. Si nous désirons isoler plus d'hydrocarbure comme l'hénécosaheptaène, nous choisirons la récolte au début du printemps. Seulement dans cette période les algues sont, soit très petites, soit les vieux thalles commencent à bourgeonner, donc en général on trouvera beaucoup moins de composés dans cette huile.

- En ce qui concerne l'analyse des différentes parties de l'algue nous pouvons interpréter quelques résultats de façon intéressante. Nous pouvons renforcer notre première suggestion; que le taux élevé d'hénécosaheptaène est associé à la partie ou au temps correspondant à une division rapide des cellules, plutôt qu'à la structure reproductive, puisque nous trouvons une plus grande quantité (% d'aire) de cet hydrocarbure dans les tissus jeunes à forte croissance que dans les réceptacles correspondants aux structures reproductives. Un deuxième point intéressant touche le β -ionone, où nous constatons qu'il est plus abondant dans les réceptacles. Goodwin explique que le β -carotène s'accumule dans les gamètes mâles de *Fucus vesiculosus*, on pourrait donc comprendre facilement le taux plus élevé de β -ionone dans les réceptacles, puisque ce composé provient de la dégradation du β -carotène.

- Quant à la quantification des acides gras majeurs, nous nous attendions effectivement à obtenir un faible rendement (0,1%) en utilisant la technique d'hydrodiffusion. Là où est notre surprise, c'est que ces deux acides gras saturés représentent plus de la moitié des constituants, de notre huile, isolés par CPG. Il est donc possible que nous ayons analysé seulement une partie de l'huile essentielle de *Fucus*

vesiculosus. La question qu'il s'agit d'élucider est : quels sortes de composés restent non révélés par notre analyse ?

Nous proposons une alternative à deux possibilités :

a) l'existence d'un matériel lipidique qui reste collé sur la colonne. Mais ce n'est pas le cas, puisqu'après avoir saponifié et estérifié un extrait nous avons libéré les mêmes acides gras et dans les mêmes proportions.

b) l'existence d'un matériel très volatil qui sort avec le front du solvant. Cette possibilité est plausible, nous avons vu par l'extrait Likens-Nickerson, qui concentre les produits volatils, une quantité non négligeable de pics qui sortent au début, et plusieurs substances halogénées.

Tout ceci fait partie de la problématique inhérente, qui existe lors de l'isolation, de la concentration et de la quantification des substances volatiles. On peut à ce propos mentionner un point intéressant qui concerne la détection des composés organiques dans l'analyse par chromatographie en phase gazeuse. Effectivement, le courant électrique émis par le détecteur à ionisation de flamme est en général, et en première approximation, proportionnel au nombre d'atomes de carbone (non oxydés) présents dans le composé analysé. Cette observation rend relativement simple l'analyse relative de la composition de l'huile, tout au moins, en première approximation. Ainsi, on peut raisonnablement admettre que la réponse spécifique d'un acide hydrocarboné en C14 aura une réponse proportionnelle à 13 (13 atomes de C non-oxydés). Aucune correction de ce type n'a été apportée aux résultats exprimés précédemment. Nous avons seulement utilisé les surfaces relatives des aires des pics pour estimer le pourcentage de chaque constituant (pic). On a, de ce fait sous estimé le pourcentage réel des produits qui ont un nombre de carbone inférieur à 13, mais aussi surestimé celui des composés qui ont un nombre de carbone supérieur. Cela cependant ne

modifie en rien les discussions subséquentes puisqu'elles ont porté seulement sur les rendements relatifs et non absolus (Callen, 1962).

CHAPITRE V

CONCLUSION

L'analyse des huiles essentielles de l'algue brune *Fucus vesiculosus*, présentée dans ce travail, est avant tout une étude préliminaire. Effectivement, comme mentionné dans l'introduction générale, cette recherche possède un côté innovateur, comme première étude du genre faite sur une algue brune de la côte nord du St-Laurent.

La technique de distillation à la vapeur ou d'hydrodiffusion qui est peu utilisée pour extraire les produits naturels des algues marines, nous a tout de même donné satisfaction. Nous avons extrait de *Fucus vesiculosus* une huile essentielle jaune-orange, qui possède une odeur forte, caractéristique des bords de mer. Malgré la faible quantité de matériel extrait (rendement de l'ordre de 0,025 % du poids sec), nous avons pu isoler et identifier par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-SM), plusieurs composés volatils intéressants comme :

- les nor-caroténoïdes; le β -ionone, le β -cyclocitral et le dihydroactinidiolide, tous produits de la dégradation du β -carotène. Ces composés, déjà trouvés dans plusieurs micro-algues et dans l'algue rouge *Porphyra tenera*, semblent être pour la première fois isolés de *Fucus vesiculosus*.

- L'hénéicosahexaène, hydrocarbure à 21 carbones. Déjà extrait par solvants organiques de plusieurs algues brunes, dont *Fucus vesiculosus*, est pour la première fois isolé par une technique de distillation à la vapeur. Sa présence peut expliquer en partie l'odeur forte de l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus*.

- Les acides gras saturés C12, C13, C14, C15, C16, C18 et C19 présents à l'état libre dans l'algue. Avec prépondérance pour les acides gras C14 et C16

c'est-à-dire l'acide myristique et l'acide palmitique. Ces derniers composés représentent plus de la moitié des constituants révélés par l'analyse au chromatographe en phase gazeuse de l'huile de *Fucus vesiculosus*.

Plusieurs substances volatiles ont été encore identifiées dans ce travail, mais leur identité reste incertaine. On peut mentionner l'ester d'éthenyle de l'acide cyclohexanecarboxylique, le méthyl-3 (méthyl-1 éthyl)-6 cyclohexène-2 one-1 et le triméthyl-2,6,11 dodécane. On peut donc souligner que l'identification de tous les composés volatils de l'huile essentielle de *Fucus vesiculosus* est loin d'être terminée.

En ce qui concerne la deuxième partie des résultats (chap. IV), nous avons pu estimer la variation saisonnière des constituants majeurs identifiés. Nous avons constaté que les acides gras saturés majeurs suivent une variation parallèle à celle de la croissance du thalle; la quantité de ces composés augmente depuis le printemps pour atteindre un maximum en été. Alors que pour l'hénéicosahexaène la variation saisonnière est inverse à celle des acides gras saturés. Le taux élevé de cet hydrocarbure à lieu au printemps, pour diminuer ensuite pendant l'été. Nous pouvons répondre ainsi à une hypothèse émise par Youngblood en 1971; que le taux élevé d'hénéicosahexaène est associé au temps et à la partie correspondant à une division rapide des cellules. Cette hypothèse est aussi vérifiée dans le cas des résultats obtenus pour la présence de cet hydrocarbure dans les différentes parties de l'algue, puisque le taux élevé se trouve dans les jeunes pousses de l'algue, lieu où la division cellulaire est rapide. En ce qui concerne la variation saisonnière des nor-caroténoïdes, celle-ci est moins significative, seul le dihydroactinidiolide semble suivre la variation des caroténoïdes et de la chlorophylle observée pour différentes algues brunes de l'Adriatique du nord, soit un taux maximum au début du printemps et un taux minimum en été. Il faut

toutefois rappeler que ces résultats proviennent d'une quantification indirecte (pourcentage d'aire des pics) et que plusieurs facteurs non contrôlés (variation de l'âge, de la taille de l'algue, etc...) peuvent intervenir. Il serait souhaitable pour une analyse plus fine de la variation saisonnière, d'utiliser une quantification directe avec les standards authentiques de chaque constituants, et de contrôler les facteurs physiologiques.

Même si nous avons, tout au long de ce travail, abordé les difficultés qui résultent de l'isolation et de la concentration des produits volatils d'une algue marine, nous souhaitons avoir ouvert un nouvel horizon. Nous encourageons donc d'autres chercheurs à poursuivre cette étude, en particulier sur l'analyse des produits volatils halogénés des algues marines benthiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Bezanger-Beauquesne L., 1982. Intérêt pharmaceutique du monde marin. Plantes médicinales et phytothérapie. tome XVI 1: 73-95.
- Biemann K., 1972. Application of mass spectrometry. Chap. V. Elucidation of organic structures by physical and chemical methods part I. Techniques of chemistry vol.IV.Ed. Bentley and kirby 2^eed.
- Boland W. , P. Ney and L. Jaenicke, 1984. A "closed-loop-stripping" technique as a versatile tool for metabolic studies of volatils. Analysis of volatiles. Walter de Gruyter Co Berlin : 371-380.
- Boland W. and D.G. Muller, 1987. On the odor of the mediterranean seaweed *Dictyopteris membranacea* ; new C₁₁ hydrocarbons from marine brown algae-III. Tetrahedron letters, vol.28 (3) : 307-310.
- Bold H.C., M.J. Wynne, 1978. Introduction to the algae. Structure and reproduction. Prentice-hall biol. sc. series.Ed. W.D. McElroy and C.P. Swanson.
- Bourget E. , D. Archambault et P. Bergeron, 1985. Effet des propriétés hivernales sur les peuplements épibenthiques intertidaux dans un milieu subarctique, l'estuaire du St-Laurent. Naturaliste can. 112: 131-142.
- Broekhof L.J.M. Nico, J.G. Witteveen and A.J.A. Van der Weerd, 1986. Characteristic odoriferous compounds of brown algae: syntheses of possible oxidation products of (6z, 9z, 12z, 15z)-1, 6, 9, 12, 15-heneicosapentaene and (6z, 9z, 12z, 15z, 18z)-1, 6, 9, 12, 15, 18-heneicosahexaene. Journal of the Netherlands chemicals soc. 105 (10): 436-442.
- Callan J.E. and M.D. Weiss, 1962. Gas chromatography. Ed Nathaniel Brenner, Ac.P.
- Chapman V.J., 1979. Seaweeds in pharmaceuticals and medicine: a review. Marine algae in pharmaceutical science edited by H.A. Hoppe and all. Walter de Gruyter Berlin N.Y.
- Chengkui Z. and Z. Junfu, 1984. Chinese seaweeds in herbal medicine. Hydrobiologia 116/117: 152-154.
- Doshi Y.A. and A.V. Rae, 1980. Chemicals from Indian seaweeds. Journal of scientific and industrial research vol. 39: 364-371.
- Ehrhardt J.P., 1973. Contribution des algues à la médecine et à la biologie. Rev. intern. Océanogr. méd. tomes XXXI-XXXII: 192-219.
- Flachsmann E. , 1984 . revue A.G. Zwitzerland
- Flament I. and G. Ohloff, 1984. Volatile constituents of algae. Odoriferous constituents of seaweeds and structure of nor-terpenoids identified in Asakusa-Nori

flavour. Progress in flavour research ed. J. Adda. Procc. of the 4 th. Weurman Flavour research symposium.

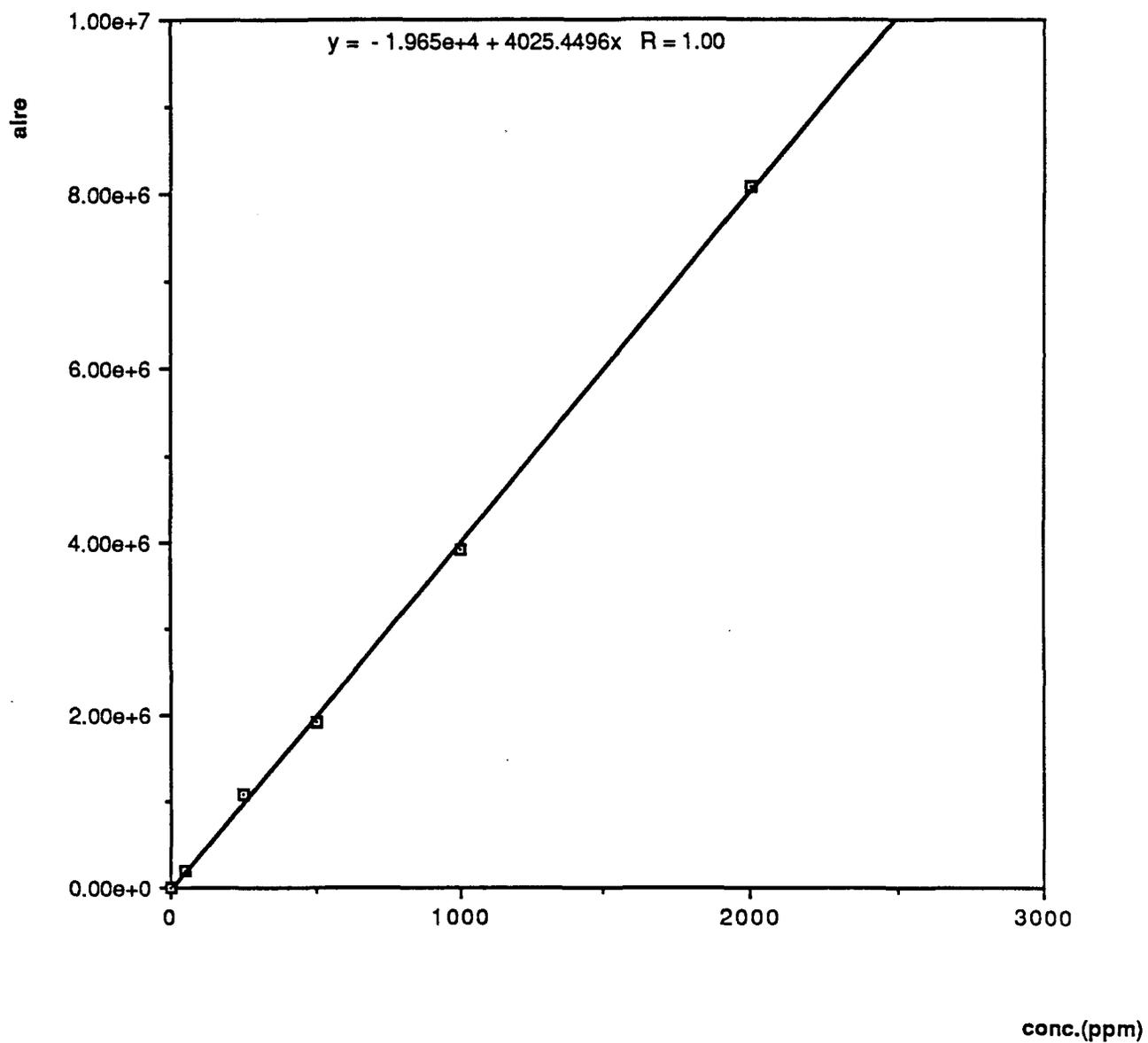
- Freeman R.R., 1981. High resolution gas chromatography. Hewlett-Packard company.
- Goodwin Trevor W., ed. 1976. Chemistry and biochemistry of plant pigments. 2^eed. London ; New-York: Academic Press.
- Grob K. and F. Zurcher, 1976. Stripping of trace organic substances from water equipment and procedure. Journal of chrom. 117: 285-294.
- Gschwend P.M., O.C. Zafiriou *et al.*, 1982. Volatile organic compounds at a coastal site 1. Seasonal variations. Environmental science technology 16: 31-38.
- Gschwend P.M., J.K. MacFarlane and K.A. Newman, 1984. Volatile halogenated organic compounds released to seawater from temperate marine macroalgae. Science vol 7.
- Guenther E., 1972. The essential oils. vol 1. Huntington N-Y: R.E. Krieger.
- Hachey J.M. *et al.*, 1987. Extraction and analysis of the essential oil of the needles and twigs of white spruce *Picea glauca*. Journal of wood chemistry and technology 7 (3) : 333-341.
- Halsall T.G. and I.R. Hills, 1971. Isolation of Heneicosa-1,6,9,12,15,18-hexaene and -1,6,9,12,15-pentaene from the Alga *Fucus vesiculosus*. Journal of the chem. soc. section D: chem. communications n^o 9: 448-449.
- Harris Daniel C., 1987. Quantitative chemical analysis. 2^eed. N-Y: W.H. Freeman.
- Harrison A.G., 1983. Chemical ionization mass spectrometry. CRC Press, Inc.
- Hoppe H.A., 1979. Marine algae and their products and constituents in pharmacy. Marine algae in pharmaceutical science. ed. H.A. Hoppe and Walter de Gruyter Berlin.
- Jaenicke L.J. and W. Boland, 1982. Signal substances and their reception in the sexual cycle of marine brown algae. Angewandte chemie 21 (9) : 643-710.
- Joshi G.V. and C.A. Gowda, 1975. Seasonal variations in chemical composition of *Sargassum ilicifolium* grun, sea water. Indian Journal of marine sciences vol 4 : 165-168.
- Juttner F., 1976. β -cyclocitral and alkanes in *Microcystis* (cyanophyceae). Zeitschrift fur Naturforschung vol 31(c) 9/10 : 491-495.
- Katayama T., 1962. Volatile constituents. Physiol. Biochem. Algae. Ed. R.A. Lewin. Academic: 467-473.
- Katayama T., 1955. Chemical studies on volatile constituents of seaweeds VI. On volatile constituents of *Sargassum sp.* Bull. Jap. soc. of scientific fish. 21(d) : 425-428. (résumé en anglais)

- Katayama T., 1958. Chemical studies on volatile constituents of seaweeds XIII. On volatile constituents of *Laminaria sp.* Bull. Jap. soc. sc. fish. vol 24(c) : 346-354.
- Keser M. and B.R. Larson, 1984. Colonization and growth dynamics of three species of *Fucus*. Marine ecology vol 15 (1-2) : 125-134.
- Kulkarni T.G., M.B. Narasimha, 1982. Essential oil production by distillation. In Cultivation and utilization of aromatic plants. Ed. C.K. Atal and B.M. Kapur. Regional research laboratory Jammu-Tawi (India).
- Lytle, T.F. Lytle, J.N. Gearing and P.J. Gearing, 1979. Hydrocarbons in benthic algae from the Eastern Gulf of Mexico. Marine biology 51 : 279-288.
- McLafferty Fred W., 1969. Spectrométrie de masse, introduction à l'interprétation des spectres de masse. Ed. française dirigée par Jacques Gore. Paris: Ediscience.
- Michanek G., 1979. Seaweed resources for pharmaceutical uses. Marine algae in pharmaceutical science. Walter de Gruyter Berlin.
- Moore R.E., 1976. Chemotaxis and the odor of seaweed. Lloydia vol 39 (4) : 181-191.
- Moore R.E., 1977. Volatile compounds from marine algae. Accts. chemistry research vol 10 : 40-47.
- Morrison R.T. and R.N. Boyd, 1973. Organic chemistry. 3^e ed.
- Muller D.G., 1978. Identification of the sex attractant in the marine brown alga *Fucus vesiculosus*. Die Naturwissenschaften vol 65 (7) : 389-390.
- Muller D.G., 1979. Olefinic hydrocarbons in sea-water: signal molecules for sexual reproduction in brown algae. Pure & Appl. chem. vol 51 : 1885-1891.
- Muller D.G., G. Gassmann, F.J. Marnier, W. Boland and L. Jaenicke, 1982. The sperm attractant of the marine brown alga. *Ascophyllum nodosum*. Science vol 18 : 1119-1120.
- Nisizawa K., 1979. Pharmaceutical studies on marine algae in Japan. Marine algae in pharmaceutical science, Walter de Gruyter Berlin.
- Nisizawa K., H. Noda, R. Kikuchi and T. Watanabe, 1987. The main seaweed foods in Japan. Hydrobiologia 151/152 : 5-29.
- Parliment T.H., 1987. Sample analysis in flavor and fragrance research. American laboratory : 51-56.
- Qasim R., Zain-Ul-Abedin and B. Zain, 1978. Economic importance of seaweeds : a review. Journal sci. univ. kar. vol 4 : 1-16.
- Ragan M.A. and A. Jensen, 1978. Quantitative studies on brown algal phenols. II Seasonal variation in polyphenol content of *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. J. exp. mar. biol. ecol. vol 34 : 245-258.

- Rosell K.G. and L.M. Srivastava, 1987. Fatty acids as antimicrobial substances in brown algae. *Hydrobiologia* 151/152 : 471-475.
- Shaw D.G. and J.N. Wiggs, 1979. Hydrocarbons in Alaskan marine intertidal algae. *Phytochemistry* 18 : 2025-2027.
- Silverstein Robert M., G.C. Bassler and T.C. Morrill, 1981. Spectrometric identification of organic compounds. 4^e ed. N-Y; Toronto: J. Wiley.
- Stein J.R. and C.A. Borden, 1984. Causative and beneficial algae in human disease conditions : a review. *Phycologia* vol 23 (4) : 485-501.
- Supelco, Inc., 1977. Quantitative gas chromatography.
- Torsell Kurt B.G., 1983. Natural product chemistry. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism. ed J.W. & sons.
- Yamamoto I, and al., 1981. Antitumor effect of seaweeds III : Antitumor effect of an extract from *Sargassum kjellmamanum*. *The Jap. Jour. exp. med.* vol 51 (3) : 187-190.
- Yoshiro Masada, 1976. Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry. ed John W. & sons, Inc N.Y.
- Youngblood W.W., M. Blumer, R.L. Guillard and F. Fiore, 1971. Saturated and unsaturated hydrocarbons in marine benthic algae. *Mar. biol.* vol 8 : 190-201.
- Youngblood W.W. and M. Blumer, 1973. Alkanes and alkenes in marine benthic algae. *Mar. biol.* vol 21 : 163-172.
- Zavodnik N., 1973. Seasonal variations in rate of photosynthetic activity and chemical composition of the littoral seaweeds common to north Adriatic. Part. I. *Fucus virsoides*. *Bot. mar.* vol 16 (3) : 155-165.
- Zavodnik N., 1987. Seasonal variations in the rate of photosynthetic activity and chemical composition of the littoral seaweeds *Ulva rigida* and *Porphyra leucosticta* from the north Adriatic. *Bot. mar.* vol 30 (1) : 71-82.
- Ministre des approvisionnements et services Canada 1987 et 1988. Tables des marées et courants du Canada. fleuve St-Laurent et rivière Saguenay. vol 3 ed. Pêches et Océans.

Annexe I :

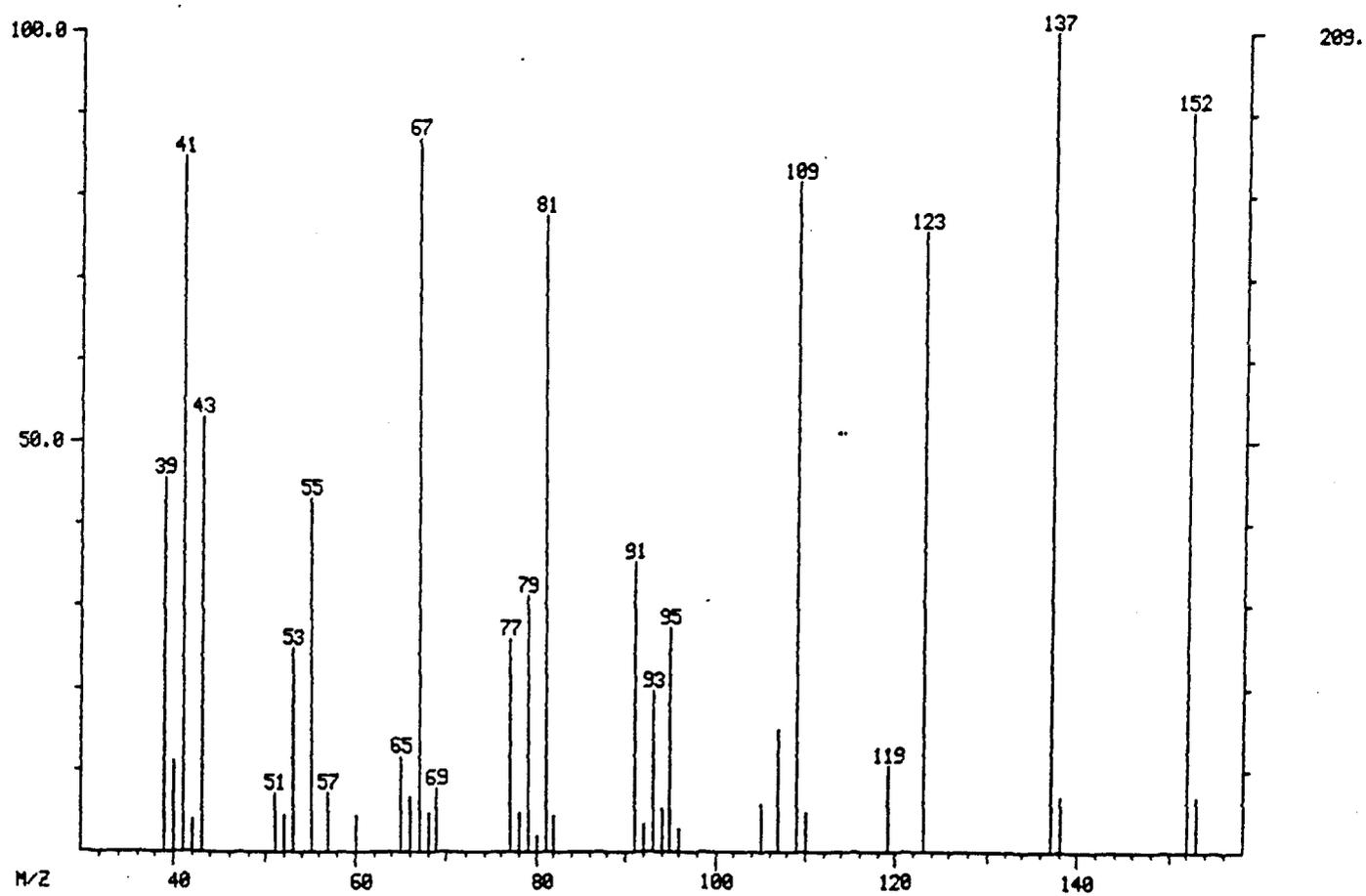
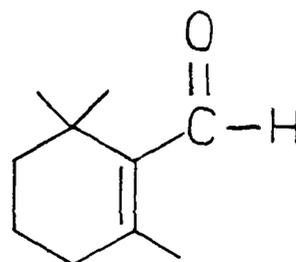
Courbe standard de l'étalonnage du nonadécane



Annexe II :

 β -CYCLOCITRAL

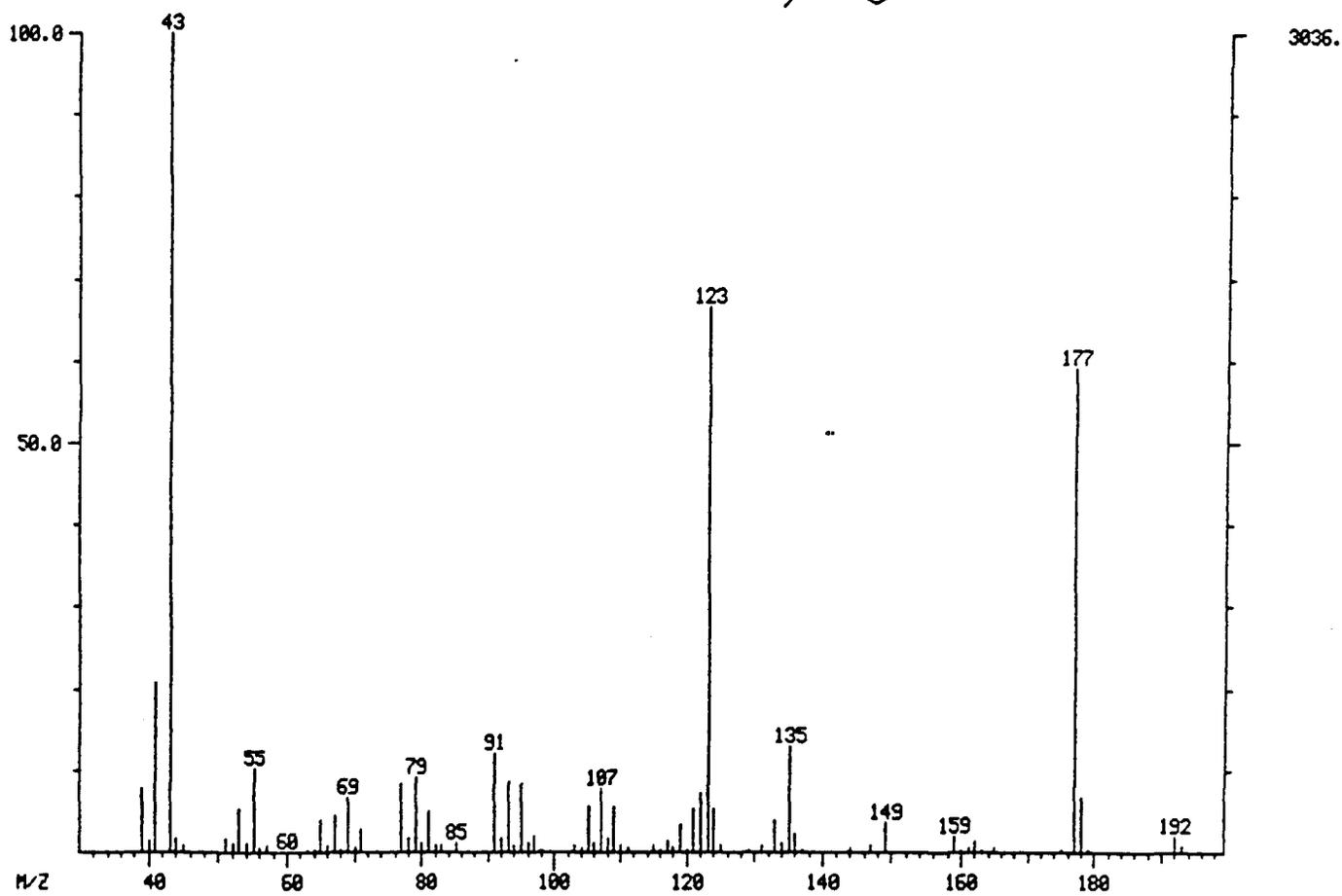
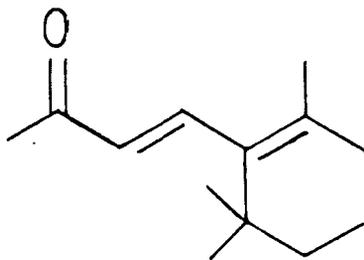
FM = 152



Annexe III :

 β -IONONE

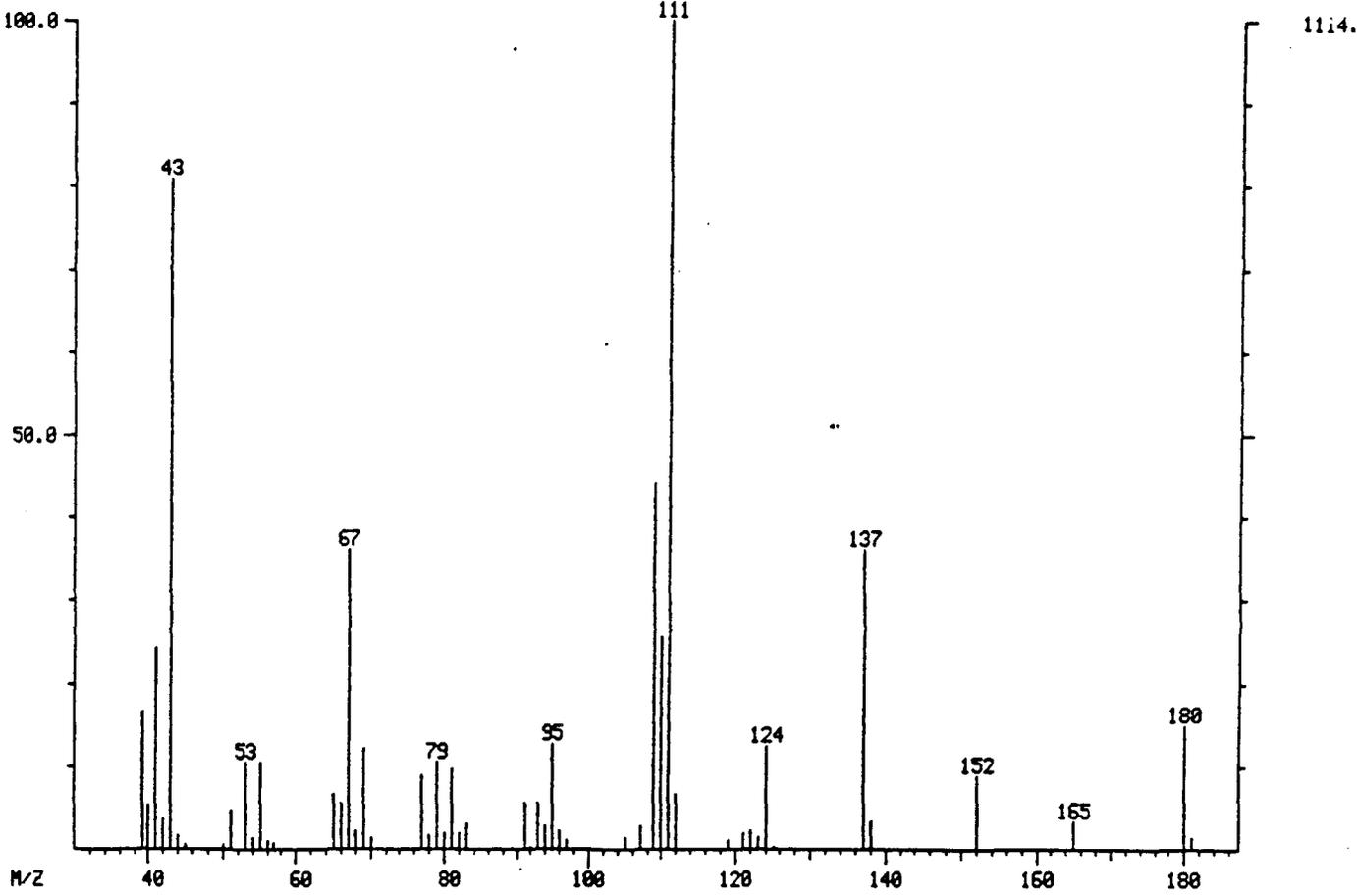
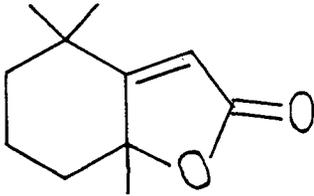
PM = 192



Annexe IV :

DIHYDROACTINIDIOLIDE

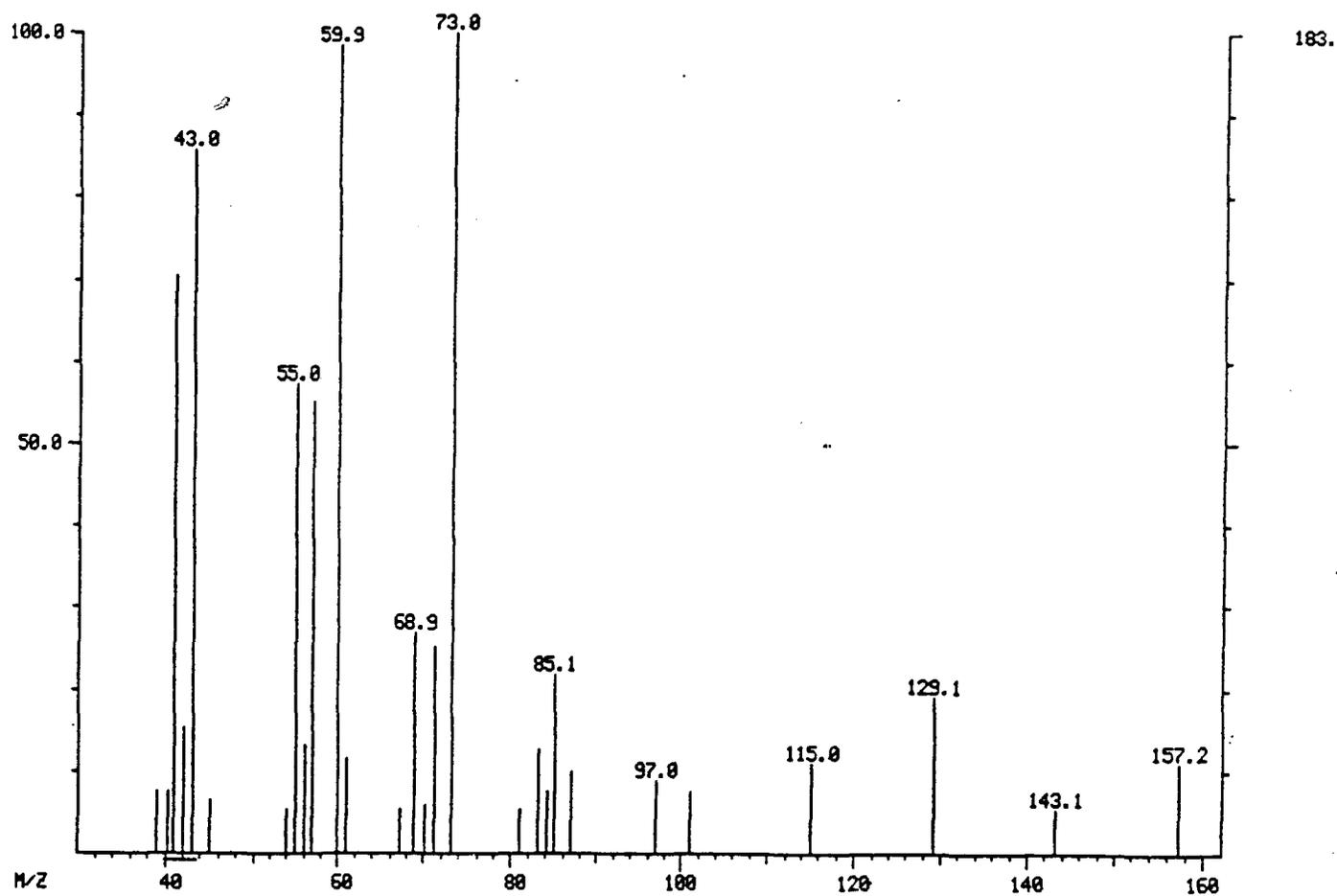
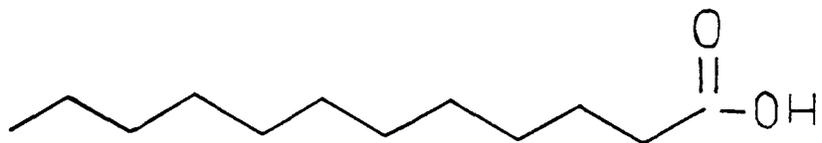
PM = 180



Annexe V :

ACIDE LAURIQUE

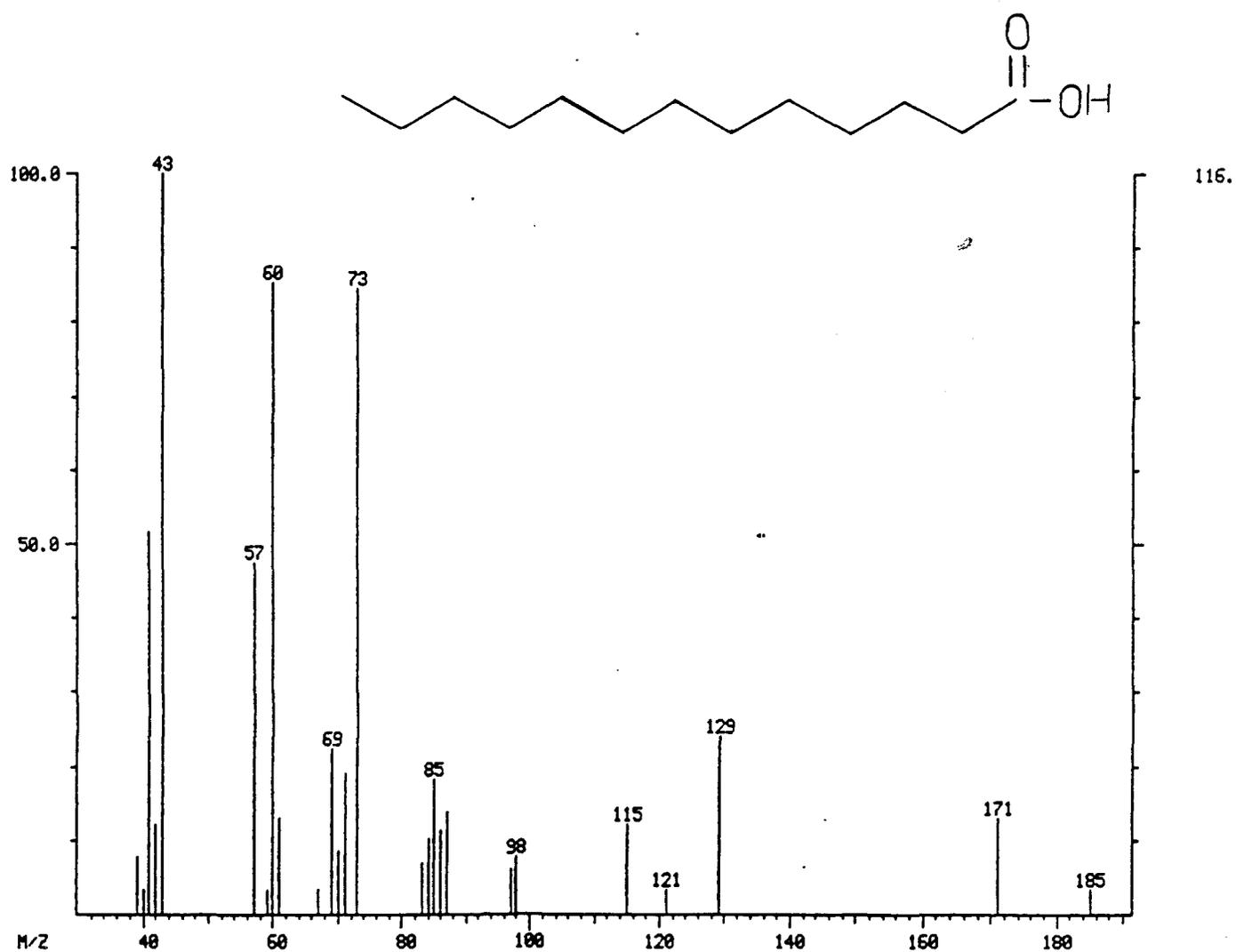
PM = 200



Annexe VI:

ACIDE TRIDÉCANOIQUE

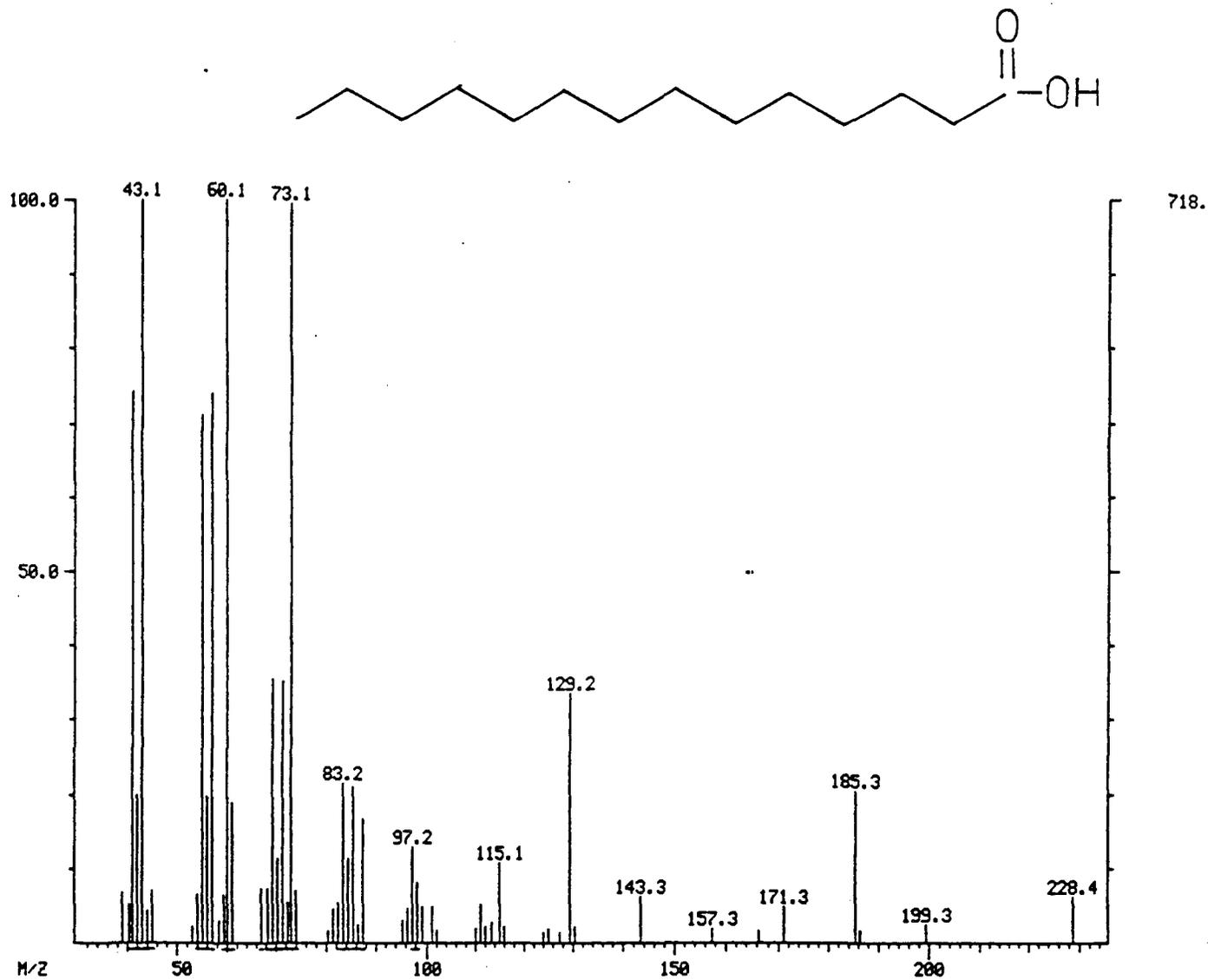
PM = 214



Annexe VII :

ACIDE MYRISTIQUE

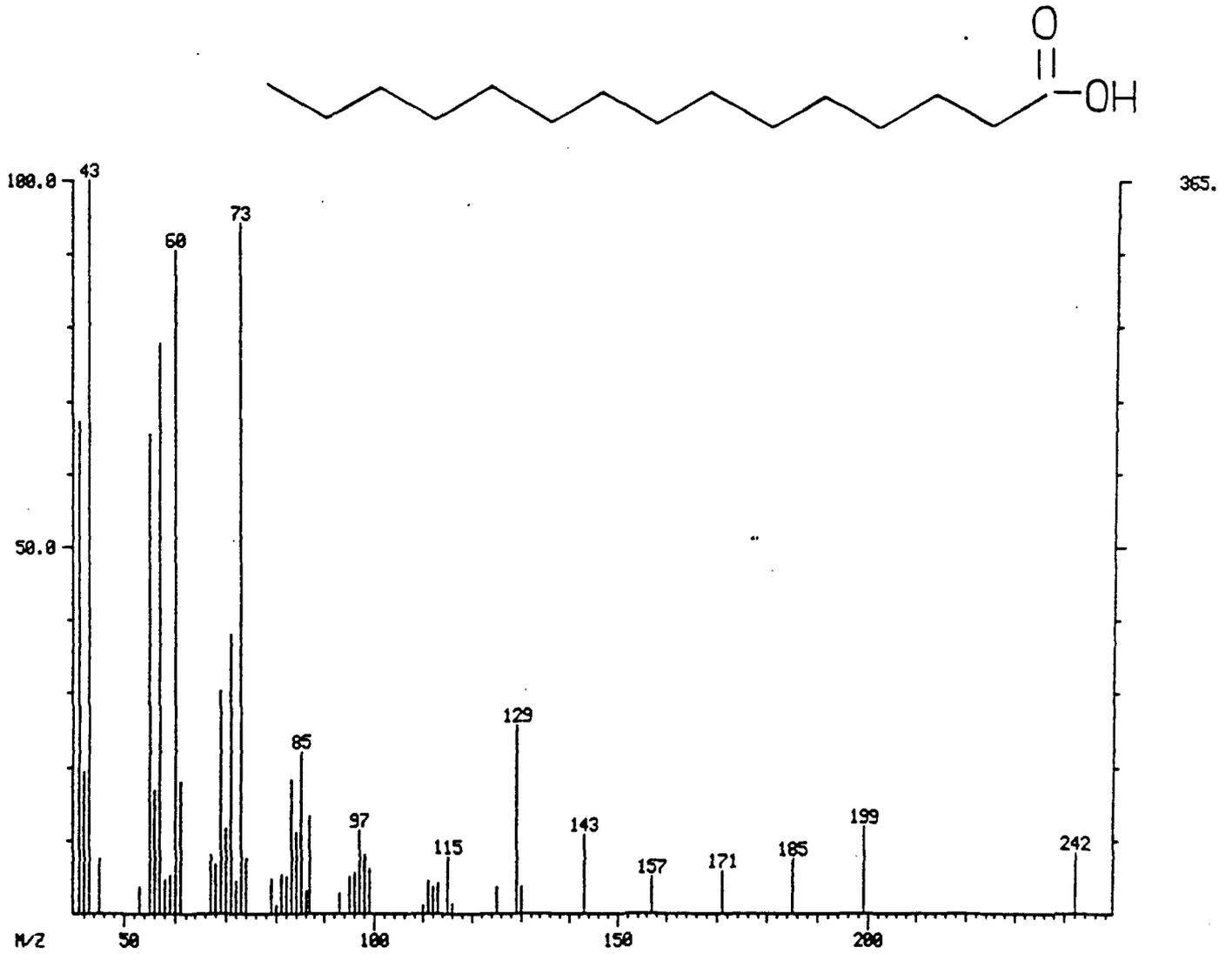
FM = 228



Annexe VIII :

ACIDE PENTADECANOIQUE

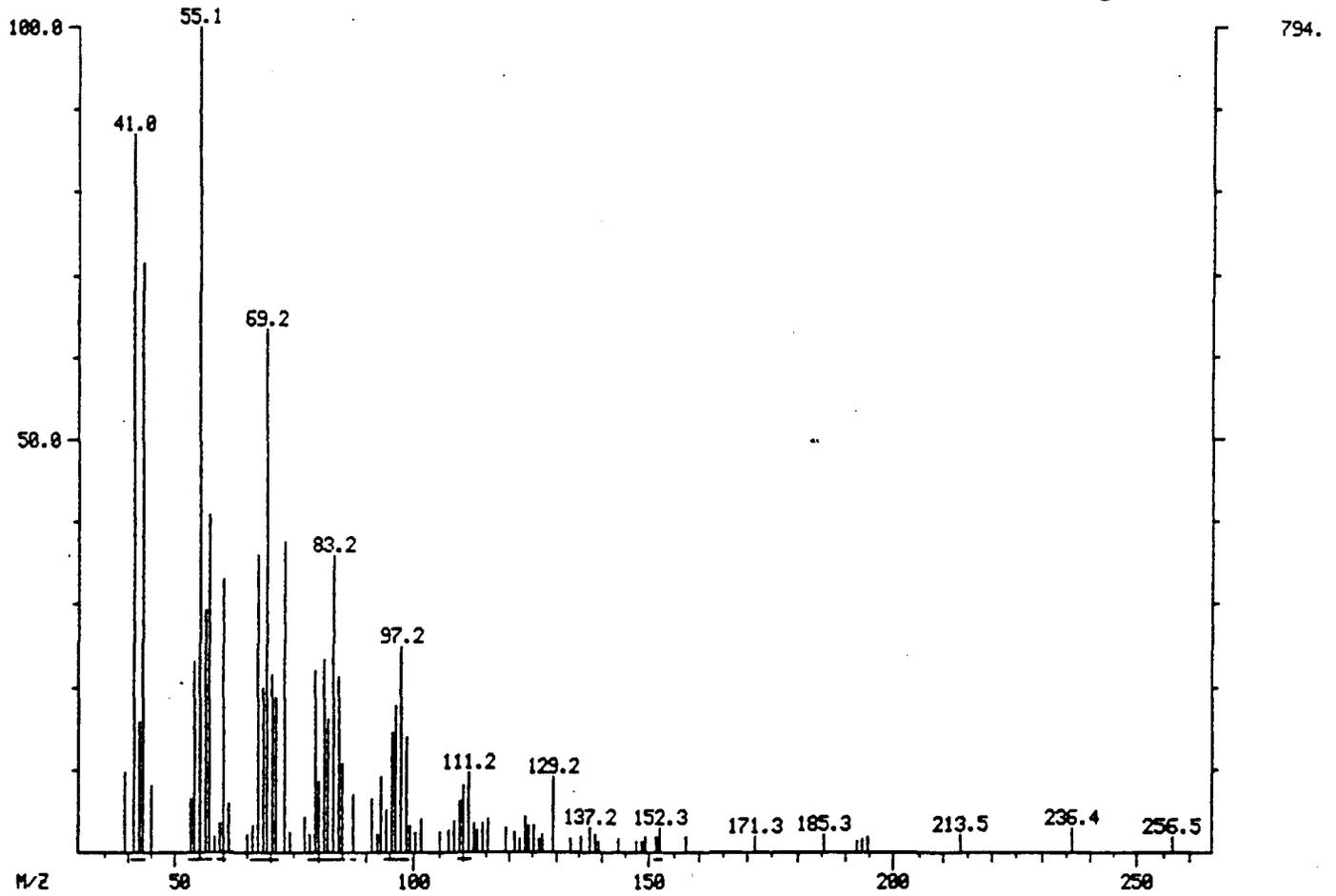
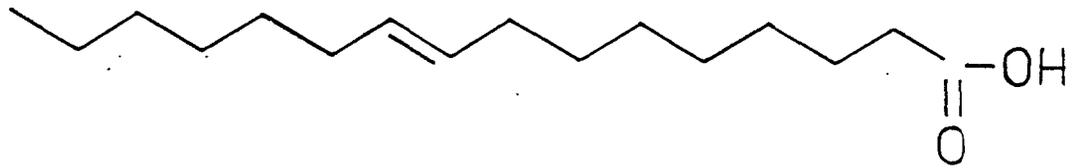
PM = 242



Annexe IX :

ACIDE PALMITOLEIQUE

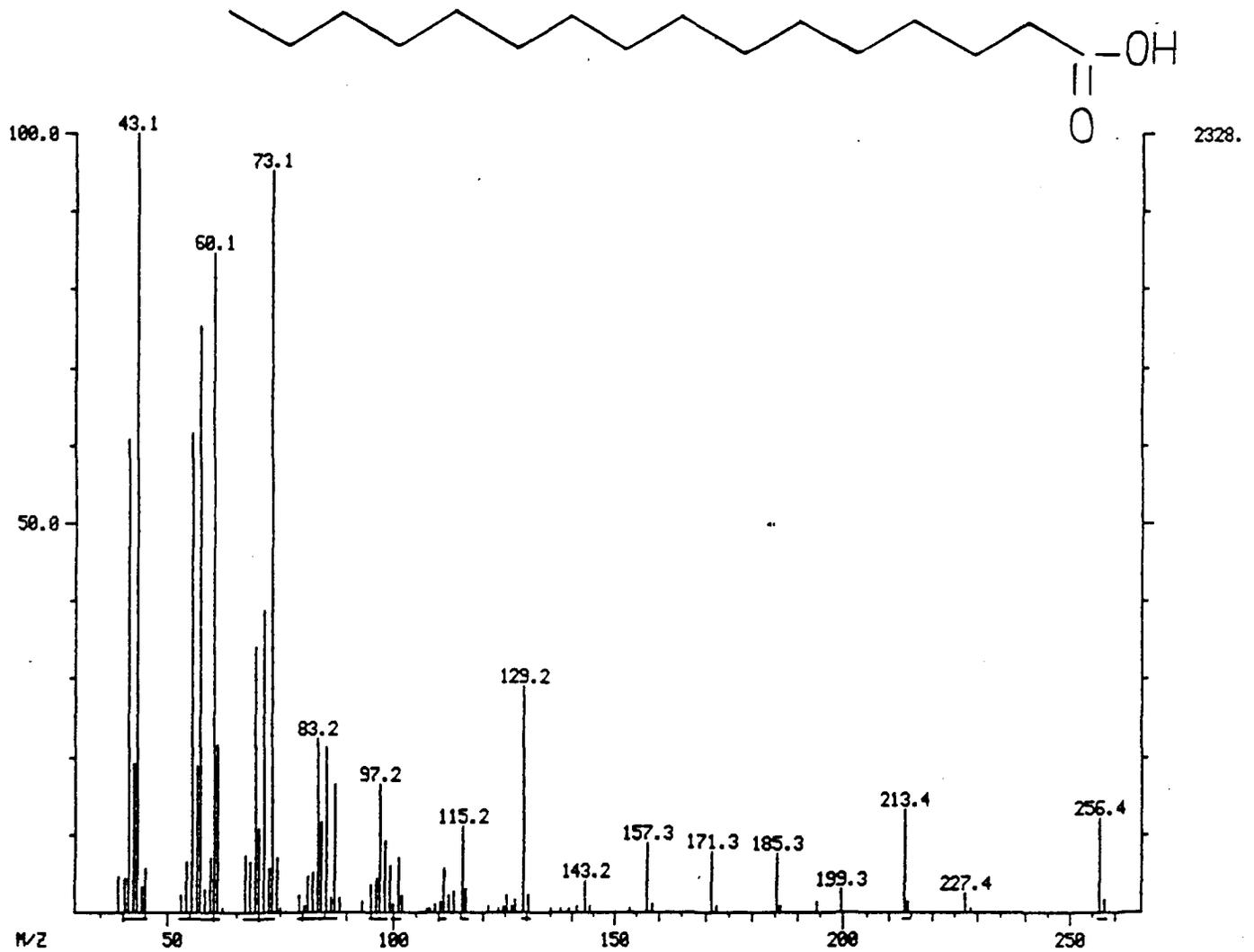
PM = 254



Annexe X :

ACIDE PALMITIQUE

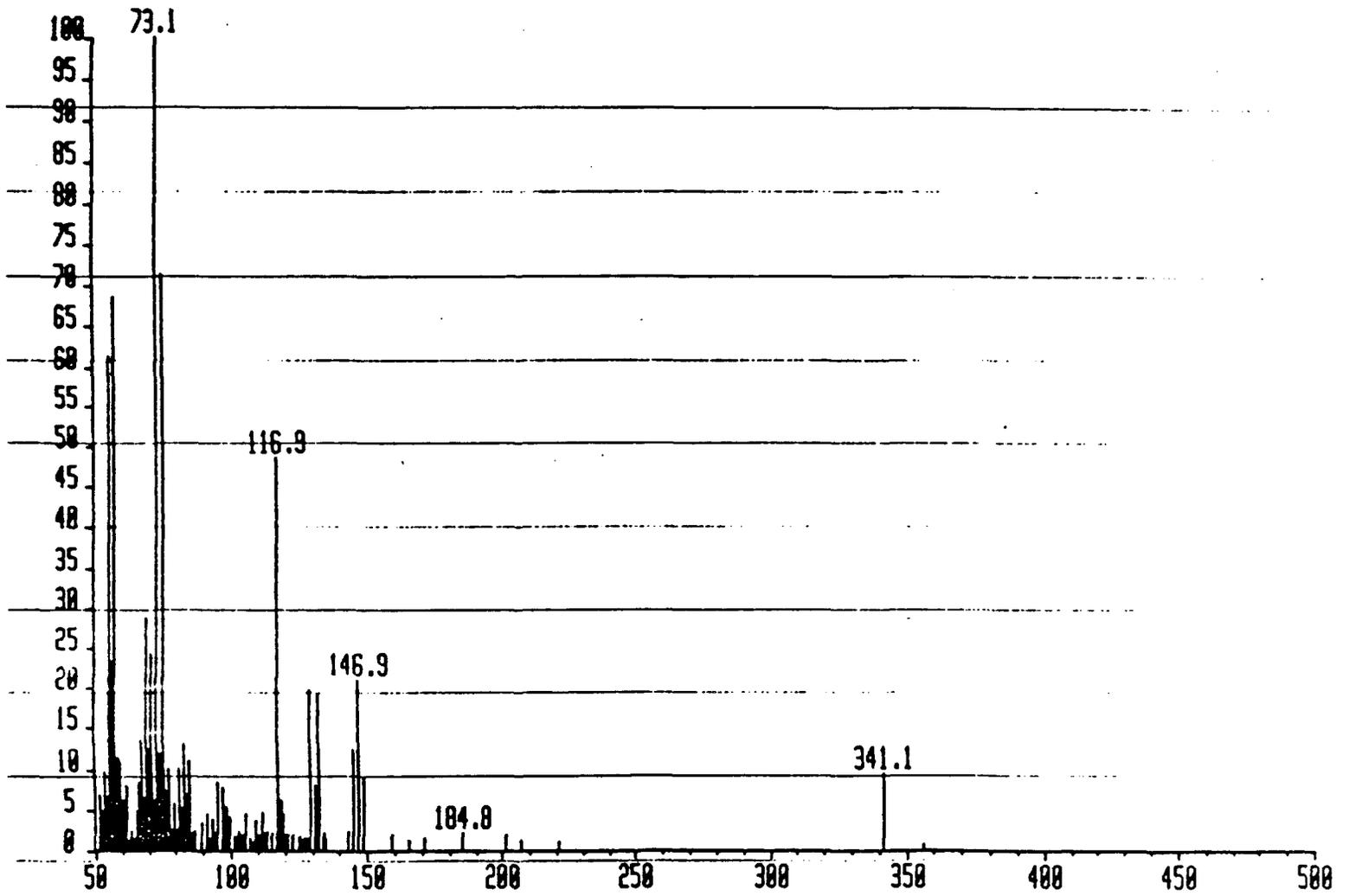
PM = 256



Annexe XI :

ACIDE STEARIQUE

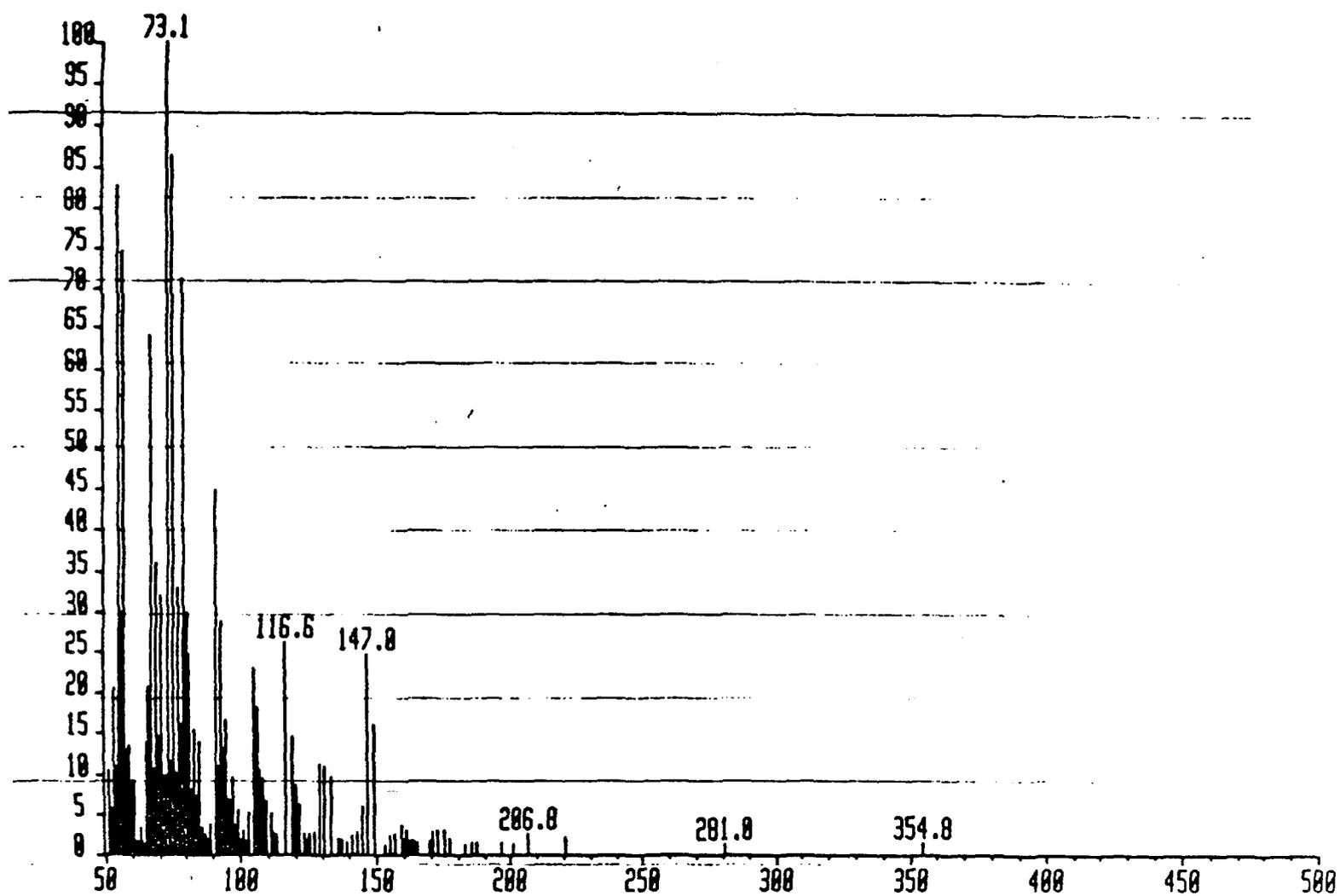
PM = 284



Annexe XII :

ACIDE NONADECANOIQUE

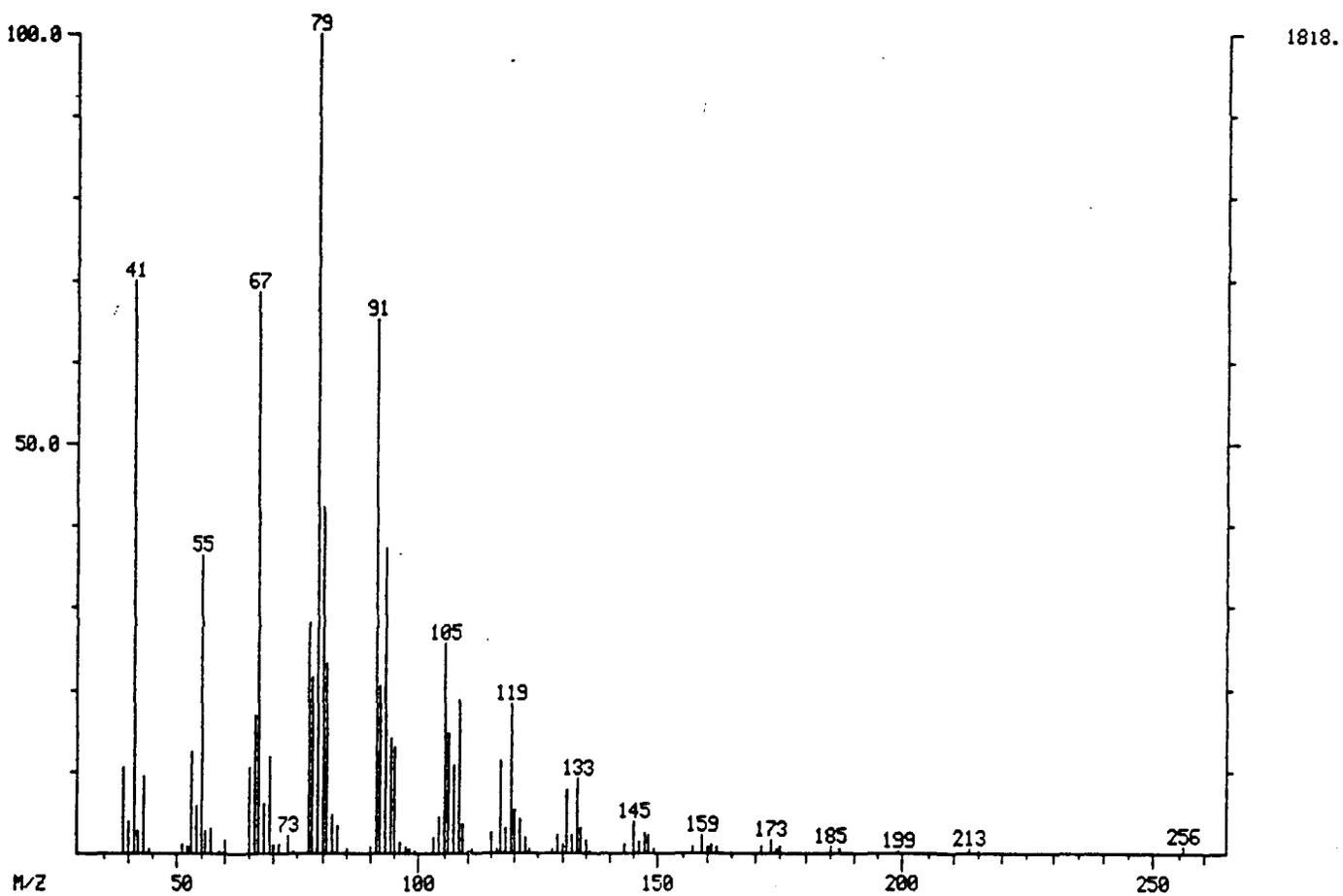
PM = 298



Annexe XIII :

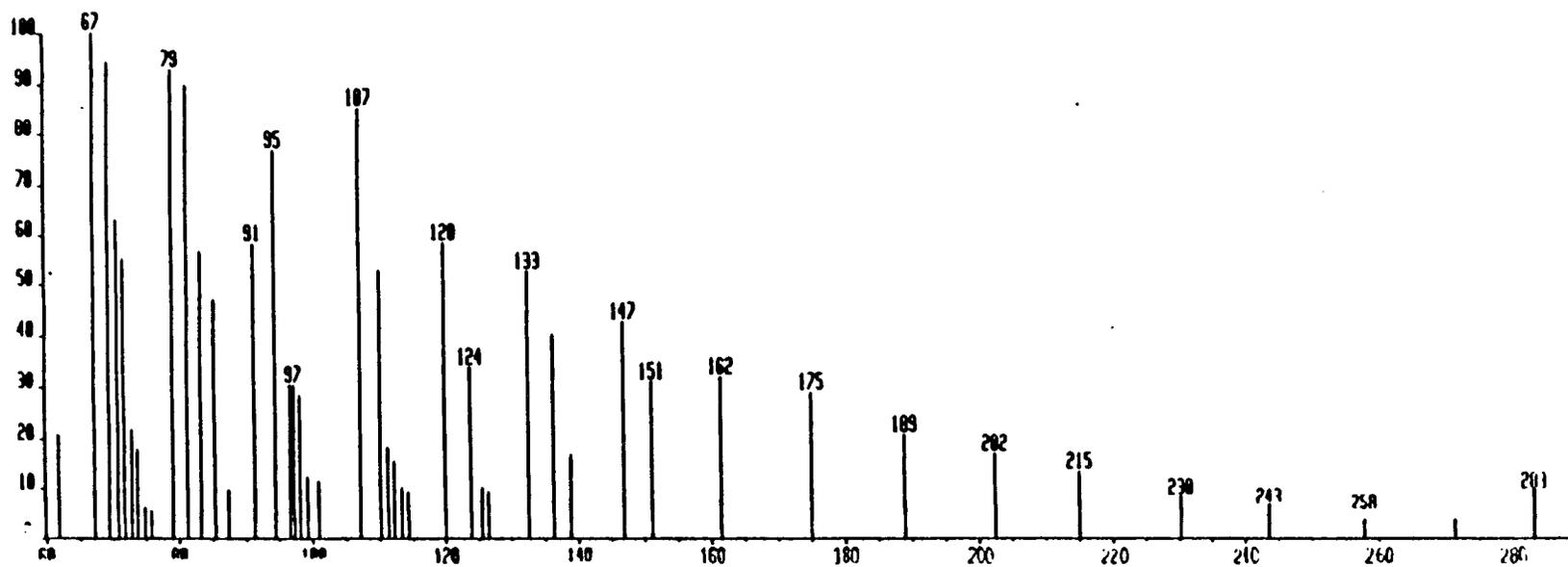
HENEICOSAHEXAENE

PM = 284



HENEICOSAHEXAENE

Spectre de masse par ionisation chimique.

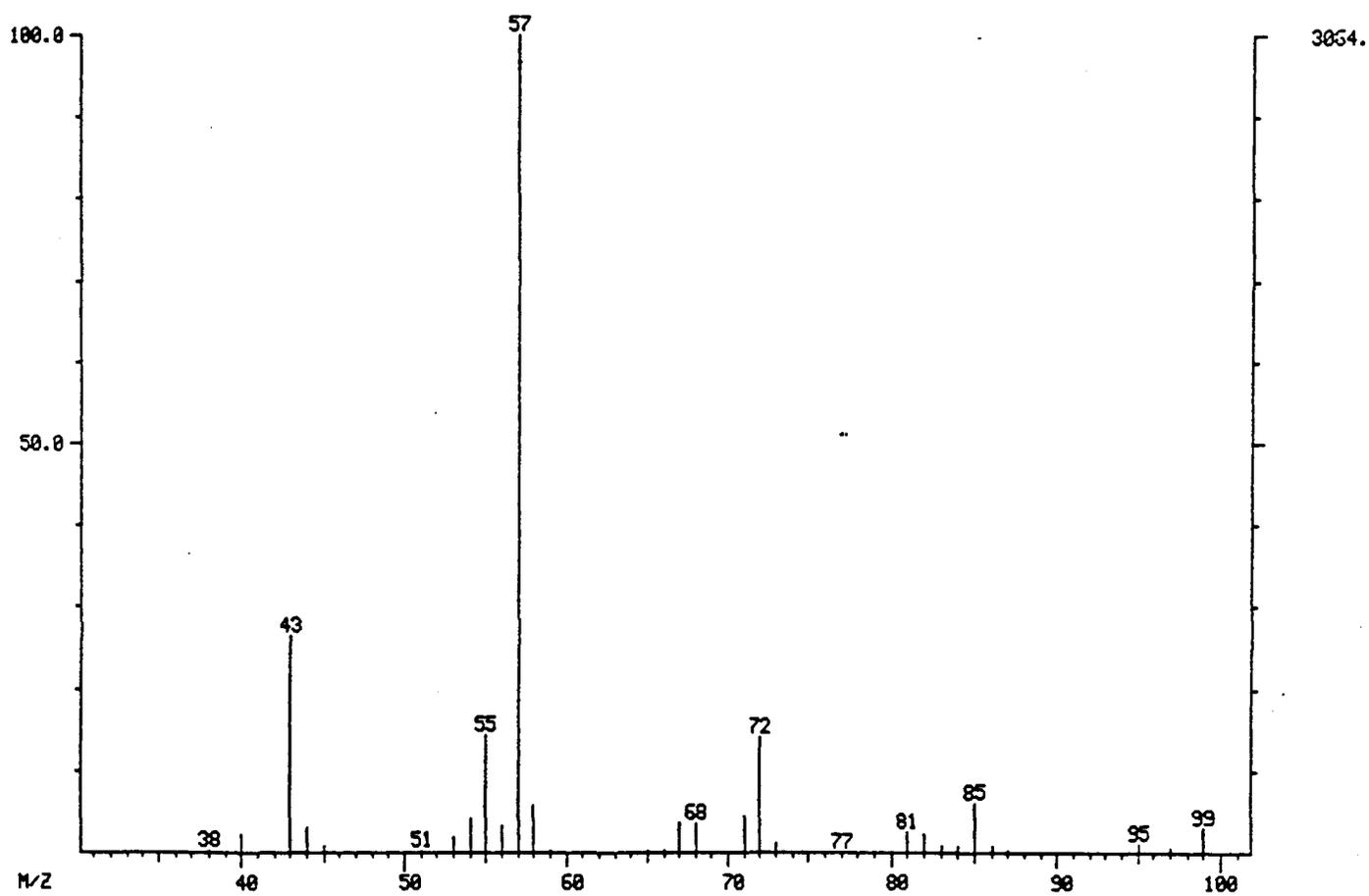
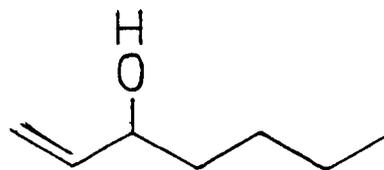


Annexe XIV :

Annexe XV :

HEPTENE-1 OL-3

PM = 114



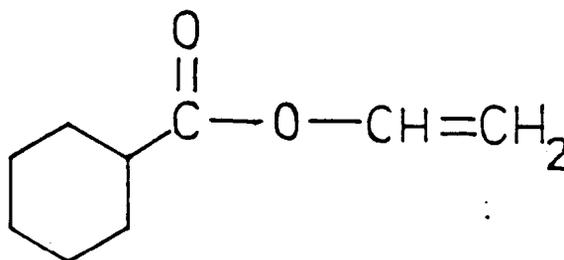
Annexe XVI :

COMPOSES DONT L'IDENTITE EST INCERTAINE.

- Ester d'éthényle de l'acide cyclohexane-carboxylique

$C_9 H_{14} O_2$

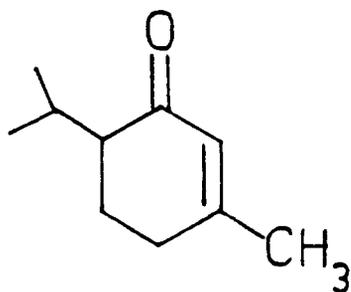
PM = 254



- Méthyl-3 (méthyl-1 éthyl)-6 cyclohexène-2 one-1

$C_{10} H_{16} O$

PM = 152

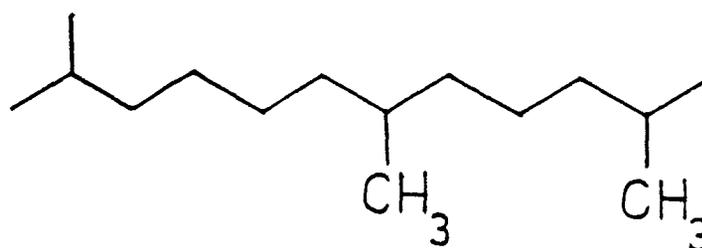


Annexe XVII :

- Triméthyl-2,6,11 dodécane

C₁₅ H₃₂

PM = 212

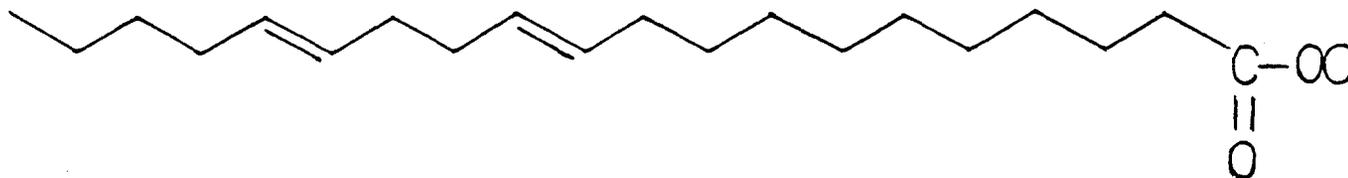


- Ester de méthyle de l'acide eicosadiénoïque -

11,14

C₂₁ H₃₈ O₂

PM = 322



Annexe XVIII :

Courbe standard de l'étalonnage de l'acide myristique

