



Analyse structurale des fractions polysaccharidiques extraites de la paroi cellulaire d'*Hypnea musciformis* (Rhodophyceae, Gigartinales)

Aziza MOURADI^{1,*}, Miriam CHIKHAOUI-KHAY¹, Souad AIT AKKI¹, Rachida AKALLAL¹,
Ikbal HRRIMLE¹ et Thierry GIVERNAUD²

¹Laboratoire de biochimie et biotechnologies marines, Faculté des sciences, B.P. 133,
14000 Kénitra, Maroc.

²SETEXAM, Usine El Assam, route de Tanger, B.P. 210, 14 000 Kénitra, Maroc.

(Reçu le 15 Janvier 2006, accepté le 20 Mai 2006)

* Correspondance, courriel : mouradi14@caramail.com

Résumé

Au Maroc, l'industrie des carraghénanes, polysaccharides gélifiants et épaississants, est très peu développée et l'activité est réduite à la récolte et à l'exportation à l'état brut de quelques espèces de *Gigartina*. Des fractions polysaccharidiques de la paroi du carraghénophyte *Hypnea musciformis* extraites selon leur degré de solubilité dans l'eau à différentes températures et dans l'éthanol à concentrations décroissantes ont été analysées quantitativement et qualitativement.

Les deux méthodes d'extraction montrent l'homogénéité des polymères de carraghénane au sein de la paroi cellulaire. La composition chimique du phycolloïde ne montre pas de variations importantes en ce qui concerne le galactose et le 3,6 anhydrogalactose qui sont les principaux constituants de la chaîne polysaccharidique. Par ailleurs, les sulfates sont liés aux fractions légères du carraghénane extrait en fonction de la température et n'apparaissent pas simultanément au cours de leur extraction en fonction de la concentration en éthanol.

Les analyses par spectroscopies IR et la RMN du ¹³C montrent que la structure du carraghénane ne varie pas dans les fractions obtenues à différentes températures ou concentrations en éthanol. Le carraghénane extrait de la paroi de *Hypnea musciformis* est homogène et de type kappa.

Mots-clés : *Hypnea musciformis*, carraghénane, polysaccharide, analyse chimique, structure.

Abstract

Structural analyze of polysaccharidic fractions extracted from the cellular wall of *Hypnea musciformis* (Rhodophyceae, Gigartinales)

In Morocco, the industry of carrageenans (gelling and thickening) polysaccharides is not yet developed and the activity is reduced to the harvest and to the export in the raw state of some species of *Gigartinales*.

Polysaccharides fractions of the cell wall of the carrageenophyte *Hypnea musciformis* extracted according to their degree of solubility in water at various temperatures and increasing of ethanol concentration were analyzed quantitatively and qualitatively.

Both methods of extraction show the homogeneity of the polymers extracted. The chemical composition of the phycocolloids does not show important variations as regards the galactose and 3,6 anhydrogalactose which are the main constituents of the polysaccharide chain.

Besides, sulfates are bound (connected) to the light fractions of carrageenans extracted according to the temperature and do not appear simultaneously during their synthesis according to the extraction to the ethanol.

The IR and RMN of ^{13}C spectroscopic analysis showed that the fractions extracted at different temperatures and concentrations of ethanol have de same structure. The carrageenans extracted from the wall of *Hypnea musciformis* is homogenize of kappa type.

Keywords: *Hypnea musciformis*, carrageenans, polysaccharides, chemical analysis, structure.

1. Introduction

L'ordre des Gigartinales inclus des espèces productrices d'agar et de carraghénanes qui possèdent une valeur commerciale importante [1,2]. Ces derniers sont utilisés dans plusieurs industries (alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques, ...) pour leurs propriétés gélifiantes, épaississantes ou émulsifiantes [2,3,4,5]. Les galactanes sulfatés ont une structure linéaire de base, formée de résidus de galactopyranose avec alternance de liaisons α (1 \rightarrow 3) et β (1 \rightarrow 4) [6]. La classification des carraghénanes est basée sur la modification de l'unité disaccharidique par addition d'esters de sulfates ou par la formation de pont 3,6 anhydro-D-galactose. Les travaux de [7,8] ont montré que le polysaccharide d'*Hypnea musciformis* était un carraghénane. Récemment, Mtolera et Buriyo [9] ont suivi la variation saisonnière de la qualité et de la quantité de kappa carraghénane de cette algue en Tanzanie, sans toutefois montrer l'homogénéité de ce carraghénane.

Des études préalables [10,11,12] ont montré que les différents états chimiques de la molécule reflètent les étapes de son métabolisme, en liaison avec le développement physiologique du thalle. Selon Lahaye et al. [13] et Christian et al. [14], il est possible d'isoler, par des extractions à différentes températures, des fractions originales enrichies en substituants méthylés ou sulfatés ; ceci, en profitant du fait que le degré et le type de substitution de la molécule modifie le caractère hydrophile de l'agar. Pour préciser la structure des galactanes caractéristiques des algues rouges, des enzymes spécifiques, carraghénases et agarases se sont avérés très efficaces [15,16].

Après le traitement enzymatique des galactanes, le matériel insoluble dans 50 à 75 % d'alcool est défini comme étant la fraction résistante à l'hydrolyse (ERF) [15,17]. Des fractionnements supplémentaires de la ERF ont été effectués [18] et les fractions restantes solubles dans l'éthanol ont été séparées par chromatographie d'exclusion ou par chromatographie échangeuse d'ions [16]. Selon Knutsen et al. [19], un simple fractionnement combiné à la spectroscopie R.M.N du ^{13}C peuvent être suffisants pour étudier la structure de tous les polysaccharides, lorsque l'enzyme appropriée est disponible.

L'utilisation des enzymes pour fractionner les polysaccharides, si elle donne un résultat très satisfaisant, reste onéreuse et ne peut être utilisée dans des tests de routine en industrie. Nous nous proposons de montrer que la structure des polymères de carraghénane d'*Hypnea musciformis*, par l'analyse chimique des fractions polysaccharidiques obtenues après extraction séquentielle dans des mélanges éthanol-eau et extraction fractionnée dans l'eau à différentes températures, est homogène et ne contient que du Kappa carraghénane.

Cette méthode, simple et peu onéreuse, peut trouver son application dans l'industrie pour définir les conditions d'extraction les plus favorables en fonction des propriétés recherchées pour le produit fini.

2. Matériel et méthodes

2-1. Préparation des échantillons

Hypnea musciformis a été récolté sur la station de Mehdiya (**Figure 1**) situé au nord-ouest du Maroc. Les thalles sont nettoyés manuellement à l'eau de mer filtrée afin d'éliminer les épiphytes, ensuite rincés rapidement à l'eau distillée et finalement essorés. Cinq cent grammes d'algues fraîches sont pesés et mis à sécher à l'étuve à 60°C pendant 48 heures, afin de déterminer le poids sec. Dix grammes d'algues séchées sont réduits en poudre, afin de faciliter l'extraction des carraghénanes.

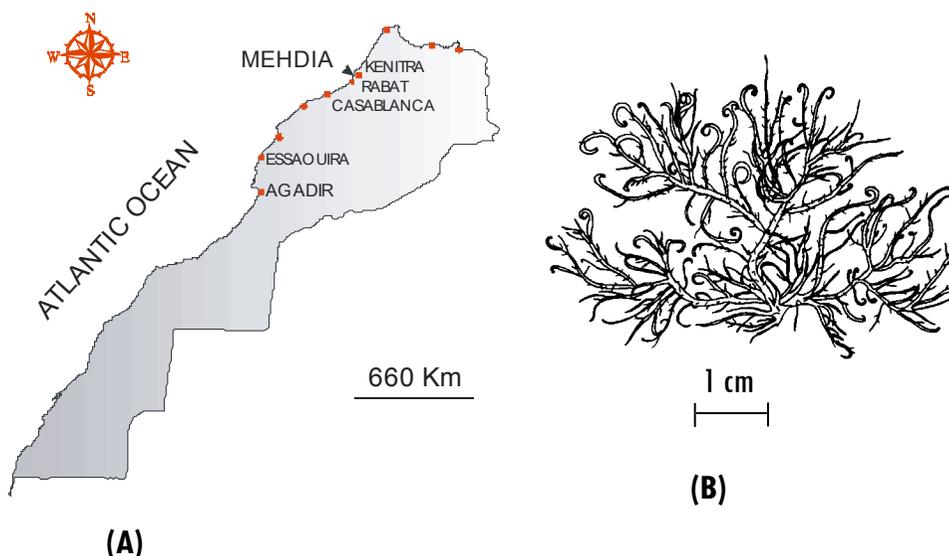


Figure 1 : Situation géographique de la station de récolte (A) et morphologie d'*Hypnea musciformis* (B).

2-2. Extractions fractionnées

L'extraction fractionnée des carraghénanes de *H. musciformis* est réalisée selon les méthodes de Lahaye et al. et de Christian et al. [13,14]. Elles sont basées sur la solubilité différentielle des galactanes sulfatés en fonction de leur taux et de leur type de substitution.

2-3. Extraction en fonction de la température

Le carraghénane est extrait par solubilisation dans 1 litre d'eau distillée, agitée mécaniquement, pendant une nuit à 20-25°C, puis successivement à 40, 60, 80 et 100°C pendant 3 h et enfin en autoclave à 121°C pendant 1 h.

Les extraits sont concentrés sous vide, ensuite précipités dans trois volumes d'isopropanol, lyophilisés, pesés et analysés. Les rendements relatifs sont calculés par rapport au poids de matière sèche ayant servi à l'extraction.

2-4. Extraction en fonction du gradient d'éthanol

Les algues sont traitées par 1 litre d'eau distillée à 20°C pendant 12 h. Le résidu algal, récupéré après filtration, est traité successivement pendant 3 h dans des mélanges éthanol-eau de concentrations décroissantes en alcool à la température d'ébullition des mélanges : 99,5 % (V/V) à 83°C, 80 % (V/V) à 82,5°C, 60 % (V/V) à 84,5°C (V/V), 40 %

(V/V) à 87°C et 20 % (V/V) à 92°C. Il subit ensuite une extraction dans 1 litre d'eau distillée à 100°C. Le résidu de cette série d'extractions est finalement extrait dans l'eau distillée à 121°C pendant 1 h. Les différentes décoctions recueillies sont filtrées, concentrées, précipitées, lyophilisées, pesées et analysées.

2-5. Dosage des oses neutres

Les oses neutres sont quantifiés par chromatographie en phase gazeuse sur un appareil Perkin Elmer Autosystem, après hydrolyse réductive du galactane et acétylation des monomères [20]. Ils sont séparés sur une colonne capillaire (DB 225, 25 m, 0,32 mm, J&W Scientific, USA) éluée par l'hydrogène. Les oses sont identifiés par rapport à leur temps de rétention relatif au myo-inositol hexaacétate utilisé comme étalon interne et par rapport à des oses standards (Sigma et Aldrich). Ils sont quantifiés en utilisant le facteur de réponse en poids d'oses standards par rapport à l'étalon inositol.

2-6. Dosage des sulfates polysaccharidiques

Le dosage des sulfates des polysaccharides est réalisé suivant la méthode de Quemener et al. [21]. Les sulfates libérés par hydrolyse à l'acide trifluoroacétique 2 M sont dosés par HPLC sur une colonne IonPac AS11 (4 x 250 mm) thermostatée à 25°C (système Dionex). L'éluant utilisé est le NaOH 9 mmol/L et le contre éluant est l'acide sulfurique (0,025 mN).

2-7. Dosage des acides uroniques

Dans le cas des produits solubles comme les polysaccharides, les acides uroniques sont simplement mis en solution dans l'eau et sont dosés sur un auto analyseur (Skalar). La méthode utilisée est celle de Knutson and Jeanes [22] utilisant l'acide galacturonique comme standard.

2-8. Analyse par spectroscopie infrarouge

Les spectres infrarouges ont été réalisés sur des films d'échantillons préparés par évaporation d'une solution aqueuse de 0,5 % (p/v). Les spectres ont été obtenus par un spectrophotomètre IRS 25 FT (Bruker).

2-9. Analyse par spectroscopie R.M.N. du ¹³C

Les extraits ont été dissous dans un mélange eau déionisée - oxyde de deutérium (1 v : 1 v, 50 mg / mL), une goutte de méthyle sulfoxyde a été ajoutée comme référence interne (39,6 ppm). Les spectres ¹³C découplés ¹H ont été enregistrés à 60°C par un appareil ARX 400 Bruker opérant à 100,61 MHz. De 1025 à 1155 interférogrammes ont été acquis sur

un temps total de recyclage (délai de relaxation + temps de pulse [90°] + temps d'acquisition) de 0,9 s. Une fonction exponentielle avec un élargissement de raie de 5 Hz a été appliqué sur les interférogrammes avant la transformée de Fourier.

3. Résultats

3-1. Extraction en fonction de la température

Le **Tableau 1** montre que l'extrait à 20°C est celui qui a le rendement massique maximum (30,69 %), à 40 et 60°C le rendement est stable aux alentours de 20 %. Il diminue pour les températures supérieures à 60°C. Cependant, la mesure des concentrations en oses totaux des différents extraits montre que l'extrait à 20°C ne contient qu'une très faible proportion de sucres (4,2 %). Cet extrait serait composé essentiellement de sels minéraux et de pigments hydrosolubles.

Tableau 1 : *Rendements massiques relatifs en carraghénanes et oses totaux des extraits en fonction de la température.*

Température	Rendement massique relatif (%)	Oses totaux en (pourcentage molaire)
20°C	30.69	4.19
40°C	19.05	41.45
60°C	20.06	49.66
80°C	14.55	42.08
100°C	7.33	37
121°C	8.30	17.95
Total	≈ 100 %	

Le pourcentage de sucres totaux dans les différents extraits n'approche les 50 % que dans l'extrait à 60°C. Pour mieux comparer les rendements en carraghénanes des différents extraits, les rendements en sucres totaux ont été exprimés par rapport à la masse totale de tous les extraits (**Figure 2**).

Dans ces conditions, il apparaît que le rendement maximal est atteint à 60°C et qu'à 80°C plus de 85 % des polysaccharides ont été extraits.

La composition chimique des extraits à 20, 40 et 60°C est caractérisée par un taux élevé en sulfates qui diminue pour les températures plus élevées. Le galactose et le 3,6 anhydro-D-galactose ne présentent pas de variation en fonction de l'augmentation de la température. Par ailleurs, le 3,6 anhydro-D-galactose diminue dans les extraits à 100 et 121°C (**Figure 3**).

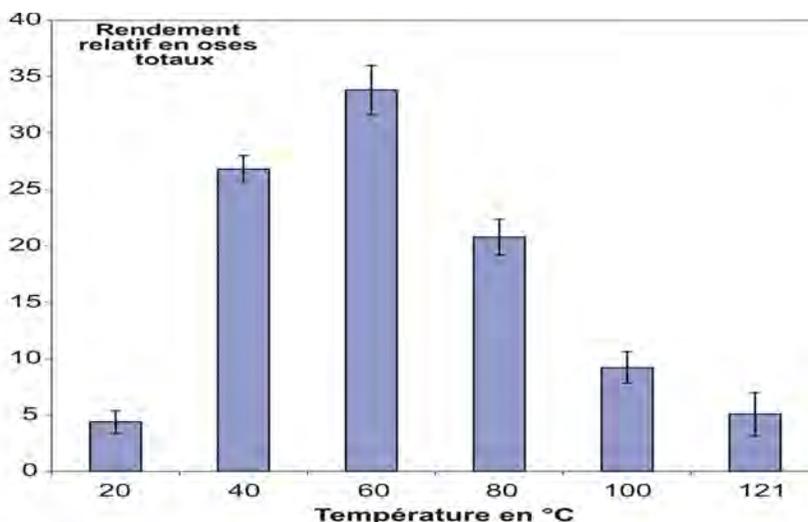


Figure 2 : Rendement des différents extraits exprimés par rapport à la somme des sucres totaux en fonction de la température (les barres verticales représentent \pm écartype $n=3$)

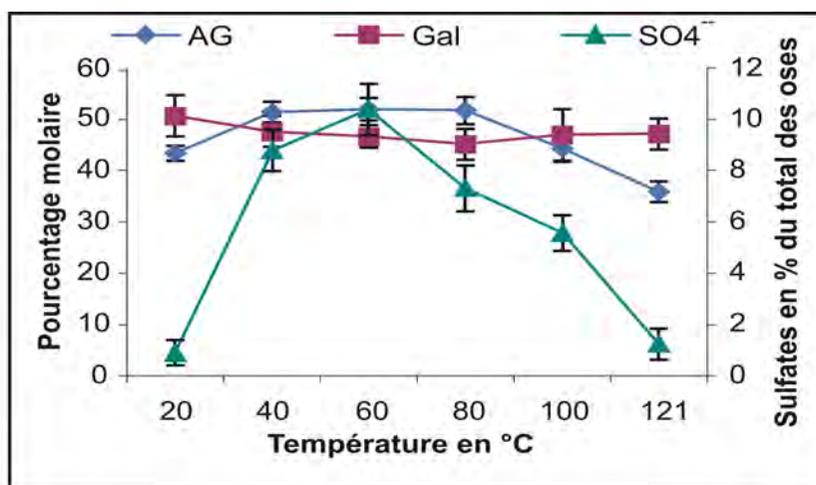


Figure 3 : Variation de la composition chimique du carraghénane extrait à différentes températures. (♦) 3,6 anhydrogalactose, (■) Galactose et (▲) sulfate, exprimés en % par rapport aux sucres totaux (les barres verticales représentent \pm écartype $n=3$).

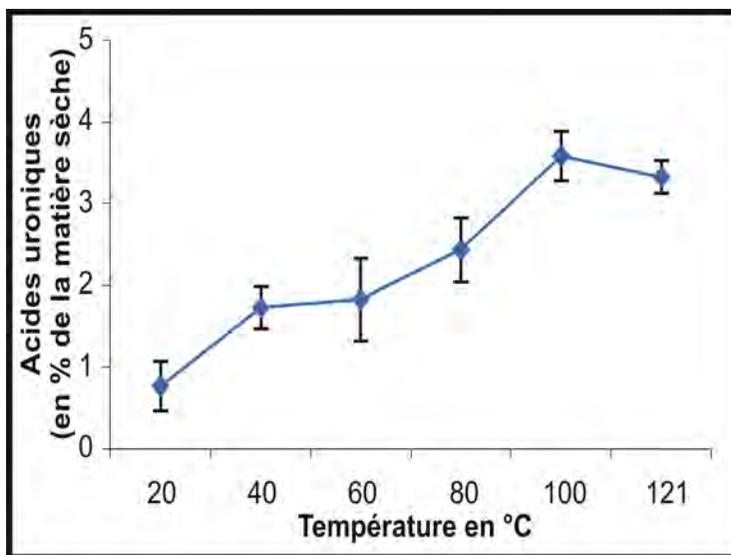


Figure 4 : *Variation du pourcentage d'acides uroniques dans les différentes fractions de carraghénane extraites à des températures croissantes (les barres verticales représentent \pm .écartype n=3).*

Le pourcentage d'acides uroniques est faible dans les fractions de carraghénanes extraites à basse température, mais augmente avec l'élévation de la température (**Figure 4**).

Les spectres I.R. des polysaccharides extraits à 40, 60, 80, 100 et 121 °C (**Figure 5**) sont superposables, indiquant que les produits sont chimiquement très proches. Ils montrent tous une vibration à 1240 cm^{-1} due aux esters sulfates ($\text{S}=\text{O}$), à 930 cm^{-1} caractéristique du pont 3,6 anhydrogalactose et à 840 cm^{-1} pour le sulfate en position axiale sur le C-4 du galactose. Les différents pics attribués aux éléments structuraux de cette fraction indiquent que le carraghénane étudié est de type Kappa.

Le spectre du ^{13}C RMN de l'extrait à 60 °C (**Figure 6**) montre un premier signal à 102,6 ppm caractéristique du déplacement chimique attribué au carbone 1 du galactose et à 95,3 ppm propre au carbone 1 de l'anhydrogalactose. Les autres pics sont attribués aux résonances pour les carbones de l'unité galactose (G) observées à G2 : 69,8 ppm, G3 : 79,08 ppm, G4 : 74,2 ppm, G5 : 74,9 ppm, G6 : 61,4 ppm et de l'unité anhydrogalactose (AD) à A2 : 69,8 ppm, A3 : 79,08 ppm, A4 : 78,4 ppm, A5 : 76,9 ppm, A6 : 69,8 ppm. Ce spectre confirme que le carraghénane extrait est de type kappa.

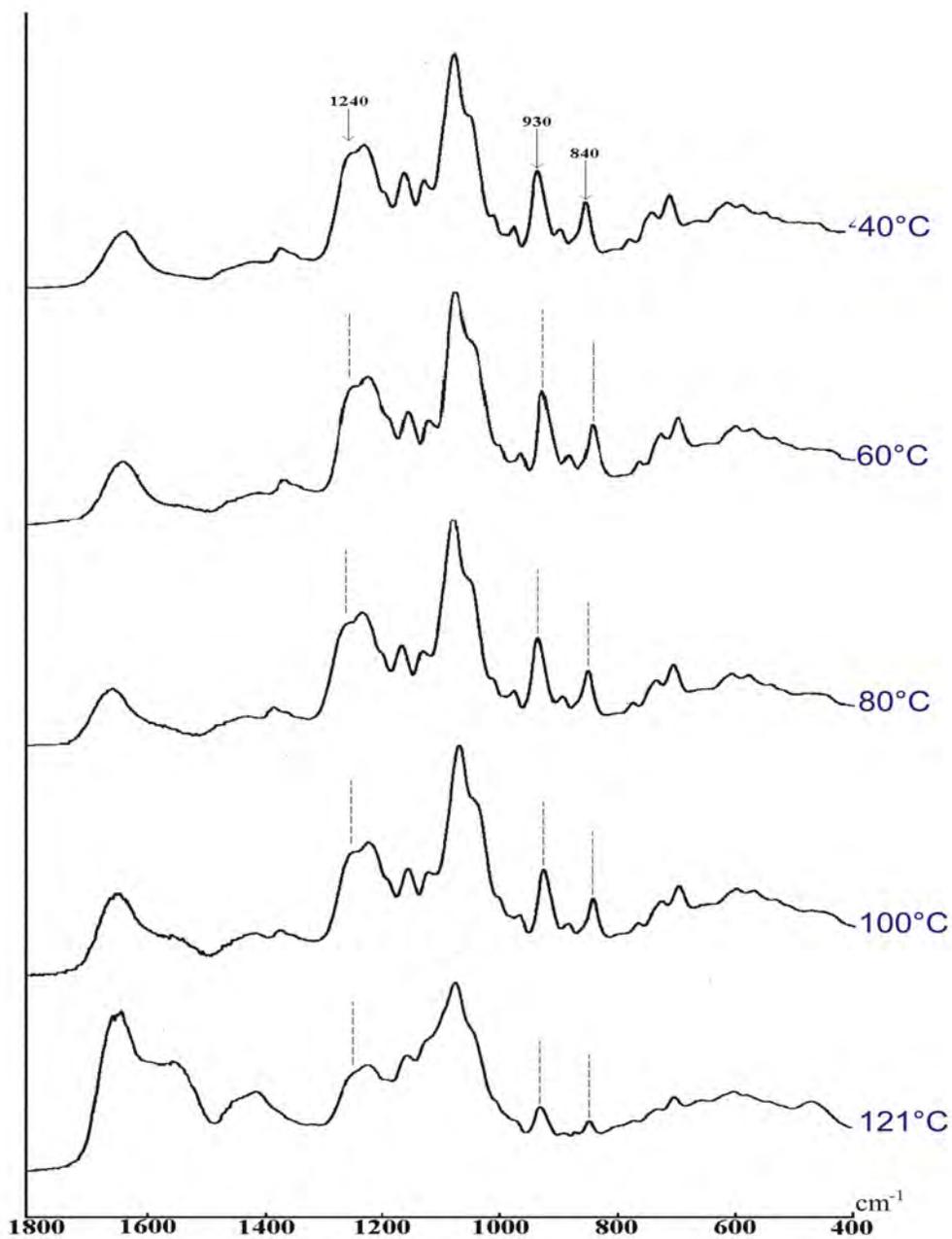


Figure 5 : *Spectres IR des fractions de carraghénanes extraites en fonction de la température*

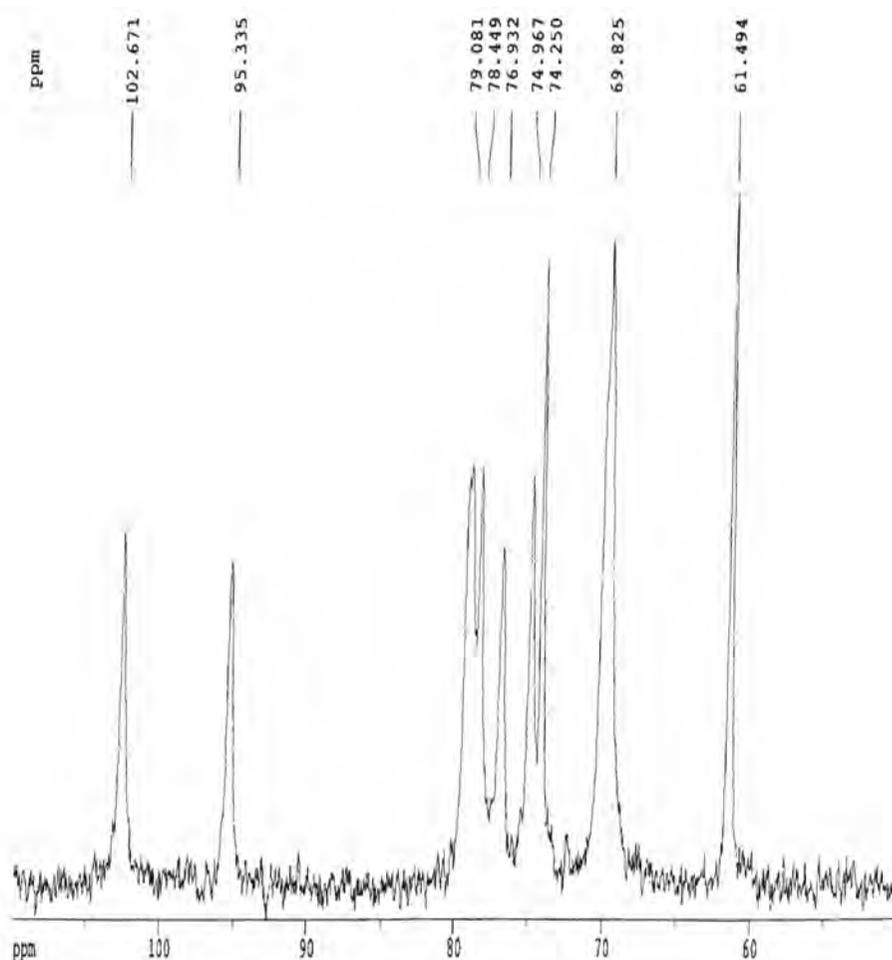


Figure 6 : Spectre RMN du ^{13}C du carraghénane extrait à 60°C .

3-2. Extractions en fonction de la concentration en éthanol

La teneur en sucres totaux de l'extrait obtenu à 20°C est faible. Par contre, les extraits à 40 et 20 % d'éthanol présentent des teneurs en sucres totaux de 74,4 et 64 % respectivement (**Tableau 2**). Le profil d'extraction à différentes concentrations en éthanol (**Figure 7**) montre que la plus grande partie des carraghénanes est extrait à 40 % d'éthanol (49,7 %). Les extraits à 60, 40 et 20 % d'éthanol totalisent plus de 79 % des carraghénanes extraits.

Tableau 2 : Rendements relatifs en carraghénanes et oses totaux des extraits en fonction de la concentration en éthanol.

Concentration en éthanol (%)	Rendement relatif (%)	Oses totaux (pourcentage molaire)
0 (20°C)	56.28	4.29
100	0.95	1.62
80	0.95	5.96
60	6.66	46.9
40	17.91	74.42
20	7.68	64.05
0 (100°C)	5.27	40.55
0 (121°C)	4.28	18.99
Total	≈ 100 %	

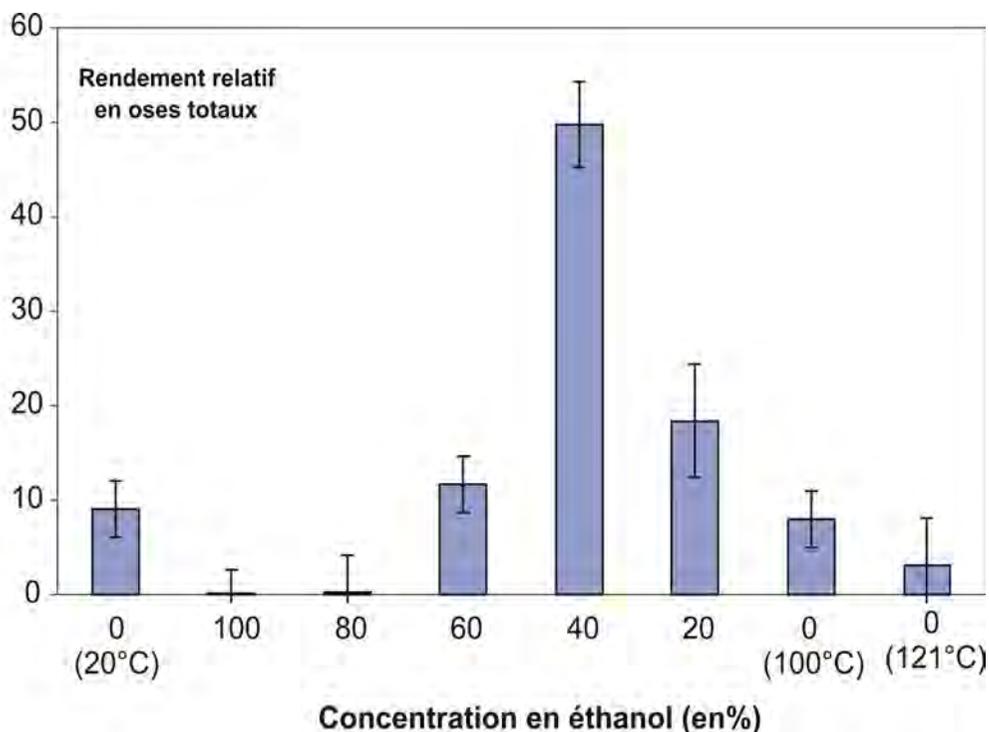


Figure 7 : Pourcentage en sucres totaux par extrait en fonction de la concentration en éthanol (les barres verticales représentent \pm .écartype n=3).

L'analyse des extraits séparés selon les concentrations en éthanol (**Figure 8**) montre que la teneur en 3,6 anhydro-D-galactose augmente avec la diminution de la concentration en alcool avec un maximum de 50 % pour une concentration d'éthanol de 60 %. Ce taux diminue ensuite pour 40 et 20 % d'éthanol et augmente de nouveau dans les extraits à l'eau à 100 et 121°C. La teneur en galactose ne varie pas de façon notable entre 100 et 80 %, elle augmente dans les extraits à 40 et 20 % d'alcool. Par ailleurs les sulfates qui sont faibles dans les extraits à 0 (20°C), 100 et 80 % d'éthanol passent par un maximum dans la fraction extraite à 40 % ; ils diminuent dans les derniers extraits.

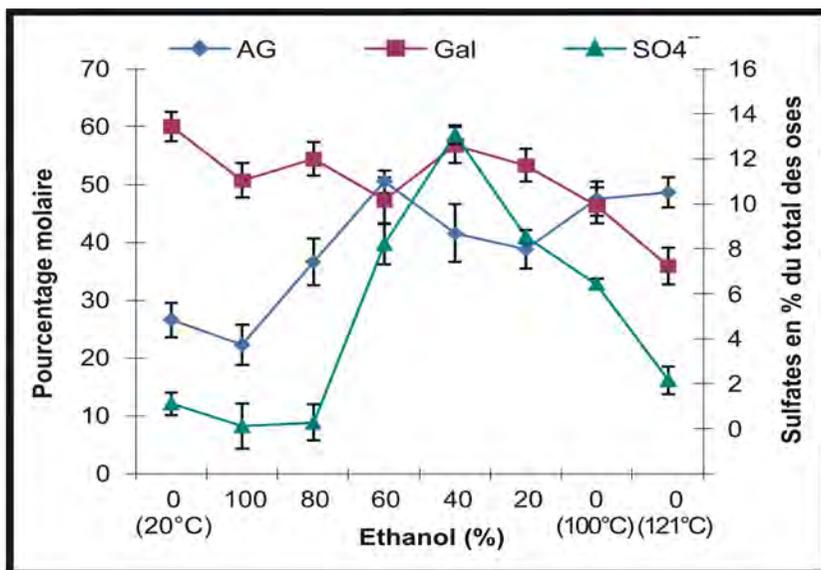


Figure 8 : Variation de la composition chimique du carraghénane extrait à différentes concentrations d'éthanol (les barres verticales représentent \pm .écartype $n=3$).

Le taux d'acide uronique (**Figure 9**) est plus élevé dans les fractions polysaccharidiques extraites dans les concentrations d'éthanol à 100 et 80 % puis se stabilise dans les fractions extraites à 60, 40 et 20 % et augmente à nouveau dans les fractions extraites dans l'eau à 100 et 121°C. A 20°C, le pourcentage d'acide uronique est faible.

Les spectres IR des extraits à 60, 40, 20 et 0 % (100 et 121°C) montrent tous (**Figure 10**), le même profil caractéristique d'un kappa carraghénane : vibration à 1240 cm^{-1} due aux esters sulfates (S=O), à 930 cm^{-1} caractéristique du pont 3,6 anhydrogalactose et à 840 cm^{-1} pour le sulfate en position axiale sur le C-4 du galactose.

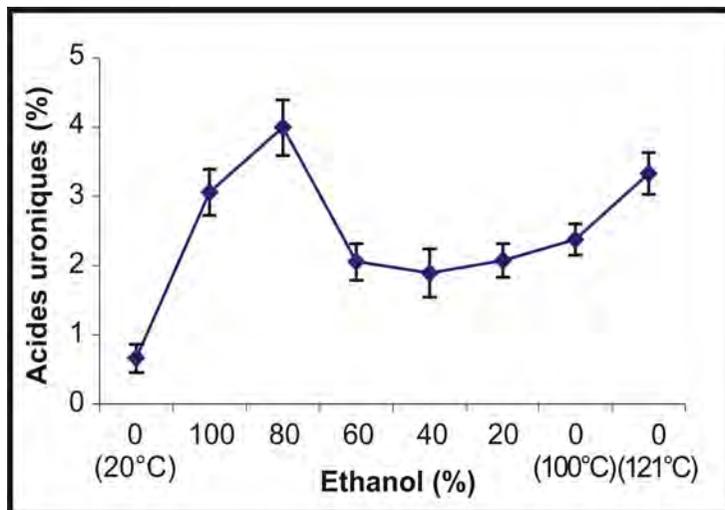


Figure 9 : Variation du pourcentage d'acide uronique dans les différentes fractions de carraghénanes extraites en fonction de la concentration en éthanol. (les barres verticales représentent \pm écartype $n=3$)

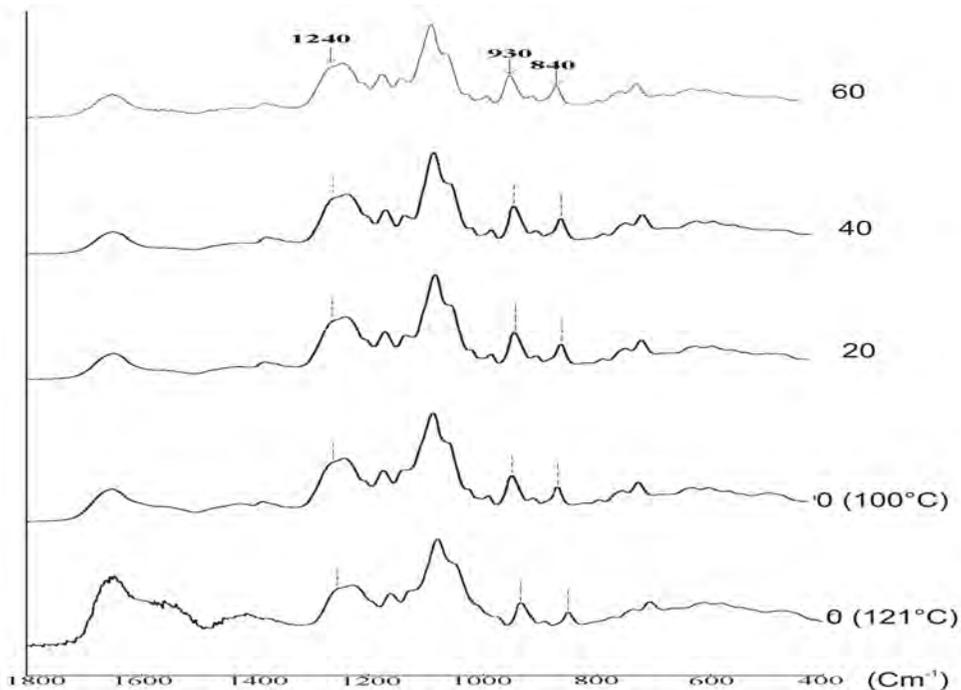


Figure 10 : Spectres IR des fractions de carraghénanes extraites à différentes concentrations d'éthanol.

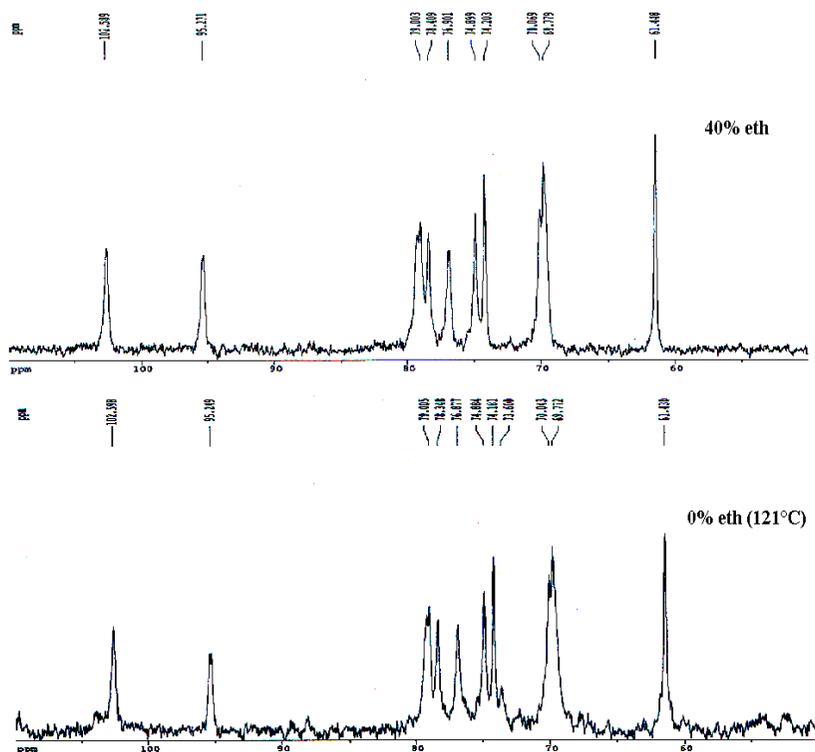


Figure 11 : Exemples de spectres RMN du ^{13}C enregistrés à 60°C pour les fractions de carraghénane extraites aux concentrations d'éthanol 40 % et 0 % (121°C).

L'analyse du spectre RMN du ^{13}C (**Figure 11**) des fractions polysaccharidiques extraites à différentes concentrations d'éthanol est en accord avec la structure d'un Kappa-carraghénane, avec les résonances pour les carbones de l'unité galactose (G) observées à G1 : 102.6 ppm, G2 : 69.8 ppm, G3 : 79.08 ppm, G4 : 74.2 ppm, G5 : 74.9 ppm, G6 : 61.4 ppm et de l'unité anhydrogalactose (AD) à A1 : 95.3 ppm, A2 : 69.8 ppm, A3 : 79.08 ppm, A4 : 78.4 ppm, A5 : 76.9 ppm, A6 : 69.8 ppm. Ces résultats confirment l'homogénéité du phycocolloïde natif d'*Hypnea musciformis*, qui est formé par la répétition de l'unité disaccharidique d'un kappa-carraghénane.

4. Discussion

Les rendements exprimés par rapport à la masse totale des carraghénanes extraits en fonction de la température et de la concentration en alcool sont variables. Selon Christiaen et al. [14] les variations de rendement d'extraction peuvent être liées à

l'évolution qualitative de certains polymères précurseurs de l'agarose dont la taille, la charge ou les substitutions les rendent plus ou moins faciles à extraire.

Les fractions polysaccharidiques de la paroi d'*Hypnea musciformis* extraites selon leur degré de solubilité dans l'eau à différentes températures ne montre pas de grandes variations de composition chimique surtout en ce qui concerne le galactose et le 3,6 anhydro-D-galactose. La diminution marquée du 3,6 anhydro-D-galactose à 100 et 121°C pourrait avoir pour origine sa dégradation par de fortes températures. Par ailleurs, les fortes teneurs en sulfates sont enregistrées à 20, 40 et 60°C. En effet, l'extraction douce à 20 et 40°C mobilise les fractions légères du carraghénane alors que les températures plus élevées ne libèrent que les fractions de poids moléculaires élevées. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par d'autres auteurs [13,14,23].

L'extraction séquentielle dans des mélanges eau-éthanol donne des informations sur la distribution des polymères de carraghénane enrichis en 3,6 anhydro-galactose, en galactose et en méthoxyl. Les variations de rendements doivent être liées au caractère polaire de certains substituants, en présence d'éthanol, et à la taille des polymères constituant le carraghénane. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Knutsen et al. [19] sur la même espèce et utilisant une autre méthode d'extraction.

Les teneurs en 3,6 anhydrogalactose augmentent dans les fractions riches en éthanol et atteignent leur maximum à 60 % d'éthanol. Les fractions les plus solubles en eau seraient enrichies en galactose. Le comportement des sulfates au cours du fractionnement à l'éthanol montre qu'ils sont indépendants et n'apparaissent pas simultanément : les fractions recueillies présentent toutes des spectres infra-rouge caractéristiques de kappa carraghénanes la seule différence entre les extraits est la teneur en sulfates.

Les deux méthodes d'extraction montrent l'homogénéité des polymères de carraghénane au sein de la paroi cellulaire d'*Hypnea musciformis*. Cette homogénéité du carraghénane ne peut, cependant, garantir les qualités rhéologiques du polymère, qui dépendent également de la longueur des chaînes polysaccharidiques comme l'ont signalé certains auteurs [24,25,26].

L'analyse par spectroscopie IR et RMN du ¹³C confirme que le carraghénane d'*Hypnea musciformis* est de type kappa [27] et ne montre pas de variation de la structure initiale du polysaccharide selon la méthode d'extraction. Par ailleurs elle confirme l'homogénéité chimique du polymère quelle que soit la méthode d'extraction, contrairement aux résultats obtenus par Amimi [28] sur *Gigartina pistillata*, avec un carraghénane hétérogène et complexe [29]. Cependant le rendement et la qualité du carraghénane de l'espèce varient en fonction des facteurs environnementaux [9].

L'analyse chimique des carraghénanes d'*Hypnea musciformis* par gel de filtration et ¹H-NMR utilisant la dégradation enzymatique [18] est coûteuse et ne présente pas d'intérêt

industriel spécifique dans la mesure où le polysaccharide est homogène de type Kappa. Le fractionnement du carraghénane d'*Hypnea musciformis* en fonction de la température ou de la concentration en éthanal est peu onéreuse et peut présenter un intérêt industriel incontestable pour séparer les fractions en fonction de leurs richesses en sulfates. Ainsi, il est possible d'obtenir des fractions pauvres en sulfates et présentant un fort pouvoir de gélification ou inversement, en fonction de l'application industrielle du polysaccharide.

5. Conclusion

Les deux méthodes d'extraction appliquées précédemment aux Gracilariacées, extraction fractionnée à l'eau [14], extraction fractionnée à l'alcool [13] sont applicables également dans le cas d'*Hypnea musciformis*. Ils montrent l'homogénéité chimique des polymères de carraghénanes au sein de la paroi cellulaire de cette algue quelle que soit le stade ou la méthode d'extraction. L'intérêt industriel de ce type de carraghénane en pharmacie ou agroalimentaire est connu. L'extraction fractionnée à l'alcool permet d'obtenir des extraits de carraghénanes nettement plus pures que les extractions à l'eau.

Ces deux méthodes d'extraction, par leur simplicité, peuvent présenter un intérêt industriel incontestable pour séparer le polysaccharide en fonction de sa richesse en sulfates et augmenter les applications des extraits dans les différentes industries agroalimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques.

Il serait souhaitable de réaliser des études d'écophysiologie et des essais d'aquaculture pour l'exploitation industrielle de l'espèce au Maroc.

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre de la coopération franco-marocaine (AI : 110/SVS/97) et de la coopération avec la société Setexam, que nous tenons à remercier vivement. Nous tenons particulièrement à remercier le Docteur Lahaye, chez qui, nous avons pu réaliser les spectres RMN et IR. Nos remerciements vont également au CNRTS et au Ministère de l'éducation, de l'enseignement, de la formation des cadres et de la recherche scientifique du Maroc pour leur soutien financier.

Références

- [1] - N. Stanley, "Production, properties and uses of carrageenans". In Mc Hugh D. J. (ed.), *Production and utilization of products from commercial seaweeds*. FAO Fisheries Technical Paper 288 (1987) 116-146
- [2] - L. Piculell, "Gelling carrageenans". In Stephen AM (ed.), *Food polysaccharides and their Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1995) 205-244
- [3] - J. Guay, K. Bateman, R. Gordon, J. Mancini and D. Riendeau. "Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1". *J. Biol. Chem.* 279 (23) (2004) 66-72
- [4] - R. Perez, "Ces algues qui nous entourent, conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture. aquaculture". IFREMER. Nantes. (1997) 272 p.
- [5] - R. A. Lopez-Martins, R. Albertini P. S. Martins, J.M. Bjordal and H.C. Faria-Neto. "Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carrageenan". *Photomed Laser Surg.* 23 (4) (2005) 377-381
- [6] - J. Cosson, E. Deslandes, M. Zinoun and A. Mouradi-Givernaud. "Carrageenans and agars, read algal polysaccharides". In *Progress in Phycological Research*. Eds Round F.F. & D.J. Chapman. Biopress Ltd. Vol 11 (1995) 269-325
- [7] - J. Mollion. "Etude préliminaire des Hypnea au Senegal comme source phycocolloides". *Bot. Mar.* 16 (1973) 221-223
- [8] - J. Mollion. "Seasonal variations in carrageenan from *Hypnea musciformis* (Florideophyceae) in Senegal". *Proc. 9th Int. Seaweed Symp.* (1978) 233-240
- [9] - M.S.P. Mtolera and A.S. Buriyo. "Studies on Tanzanian Hypneaceae: Seasonal Variation in Content and Quality of Kappa-Carrageenan from *Hypnea musciformis* (Gigartinales, Rhodophyta)". *Western Indian Ocean J. Mar. Sci.* Vol. 3, No. 1 (2004) 43-49
- [10] - R.K. Rao and V. Krishnamurthy. "Studies on Indian Hypneaceae 1: Seasonal variation on phycocolloid content in two species of *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta)". *Bot. Mar.* 21 (1978) 257-259
- [11] - M. Lahaye, and W. Yaphae. "Effects of seasons on the chemical structure and gel strength of *Gracilaria pseudoverrucosa* (Gracilariaceae, Rhodophyta)". *Carbohydr. Polymers.* 8 (1988) 285-301
- [12] - A.S. Buriyo, M.S.P. Mtolera and A.K. Semesi. "The effect of seasons on yield and quality of carrageenan from Tanzanian red alga *Euclima denticulatum* (Gigartinales, Rhodophyta)". *South African Journal of Botany.* Vol. 67, no. 3, (2001) 488-491

- [13] - M. Lahaye, C. Rochas and W. Yaphe. A new procedure for determining the heterogeneity of agar polymers in the cell walls of *Gracilaria* sp. (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Can. J. Bot.*, 64 (1986) 579-585
- [14] - D. Christiaen, Y. Karamanos, T. Staddler et H. Morvan. "Fractions polysaccharidiques extraites de la paroi de *Gracilaria verrucosa*". *Sciences de l'eau*, 6 (1987) 121-135
- [15] - C. Bellion, G. Brigant, J. C. Prome, D. Welti et S. Bociek. "Identification et caractérisation des précurseurs biologiques des carraghénanes par spectroscopie de RMN ¹³C". *Carbohydr. Res.* 119 (1983) 31-48
- [16] - A. M. Morris, W. McLean and W. F. B. Williamson. "Porphyran primary structure. An investigation using β -agarase I from *Pseudomonas atlantica* and ¹³C- NMR spectroscopy". *Eur. J. Biochem.* 133 (1983) 673-684
- [17] - C. W. Greer, I. Shomer, M. E. Goldsein and W. Yaphe. "Analysis for carrageenan from *Hypnea musciformis* by using k- and ¹³C NMR spectroscopy". *Carbohydr. Res.*, 129 (1984) 189-196
- [18] - S. H. Knutsen and H. Grasdalen. "Analysis of carrageenans by enzymic degradation, gel-filtration and ¹H-NMR spectroscopy". *Carbohydr. Polym.* 191 (1992) 199-210
- [19] - S. H. Knutsen, E. Murano, M. D'Amato, R. Toffanin, R. Rizzo and S. Paoletti. "Modified procedures for extraction and analysis of carrageenan applied to the red alga *Hypnea musciformis*". *J. Appl. Phycol.* 7 (1995) 565-576
- [20] - T. Stevensen, and R. H. Furneaux. "Chemical methods for the analysis of sulfated galactans from red algae". *Carbohydr. Res.* 210 (1991) 277-298
- [21] - B. Quemener, M. Lahaye and C. Bonin-Dubigeon. "Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography". *J. Appl. Phycol.* 9 (1997) 179-188
- [22] - C. A. Knutson and A. Jeanes. "A new modification of the analysis: application to heteropolysaccharides". *Anal. Chem.* 24 (1968) 470-481
- [23] - A. Mouradi. "Recherches biologiques et biochimiques pour la production d'agarose chez *Gelidium latifolium*". Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles. Université de Caen, France (1992) 315p
- [24] - C. Rochas, and M. Lahaye. "Average molecular weight and molecular weight distribution of agarose and agarose-type polysaccharides". *Carbohydr. polym.* 10 (1989) 289-298
- [25] - A. Mouradi-Givernaud, T. Givernaud, H. Morvan and J. Cosson. "Agar from *Gelidium latifolium* (Rhodophyceae, Gélidiales) : Biochemical composition and seasonal variations". *Bot. Mar.* 35 (1992) 153-159

- [26] - A. Mouradi-Givernaud, L. M. Hassani, T. Givernaud, Y. Lemoine and O. Benharbet. "Biology and agar composition of *Gelidium sesquipedale* harvested along the Atlantic coast of Morocco. *Hydrobiologia* 398/399 (1999) 391-395

- [27] - A. Amimi. "Etude biochimique de l'algue carraghénophyte *Gigartina pistillata* (Gmelin) Stackhouse de la côte atlantique marocaine". Thèse de doctorat en Sciences. Fac. Sci. Kénitra, Maroc. 2002. 130p

- [28] - Amimi A., M. Lahaye, T. Givernaud, N. Chiadmi and A. Mouradi. "Structural analysis of *Gigartina pistillata* carrageenans". *Carbohydr. Res.* 333 (2001) 271-279

- [29] - C. Rochas, M. Rinaudo and M. Vincendon. "Spectroscopy characterization and conformation of oligo kappa carrageenans". *Int. J. Macromol.* 5 (1983) 111-115