



HAL
open science

Analyse structurale des carraghénanes par hydrolyse enzymatique

Marion Guibet

► **To cite this version:**

Marion Guibet. Analyse structurale des carraghénanes par hydrolyse enzymatique. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bretagne Occidentale, 2007. Français. NNT : . tel-01115975

HAL Id: tel-01115975

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01115975>

Submitted on 12 Feb 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

**Université de Bretagne Occidentale
Ecole Doctorale des Sciences de l'Information et de la Santé**

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bretagne Occidentale

Discipline : Chimie

**Analyse structurale des carraghénanes
par hydrolyse enzymatique**

Présentée et soutenue publiquement par

Marion GUIBET

Le 12 janvier 2007

Composition du jury

**Pr. Marc LAHAYE
Pr. Alphons VORAGEN
Pr. Pierre LE CORRE
Dr. Roger PICHON
Dr. Patrick BOULENGUER
Dr. William HELBERT**

**Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de
Thèse**

Thèse préparée au sein de l'UMR7139 - Végétaux Marins et Biomolécules
Station Biologique de Roscoff

Analyse structurale des carraghénanes par hydrolyse enzymatique

RESUME

Les carraghénanes sont des polysaccharides linéaires sulfatés qui composent la paroi cellulaire des algues rouges et qui sont utilisés comme agents texturants dans l'industrie alimentaire. Leur squelette est composé de D-galactopyranoses reliés alternativement par des liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\beta(1\rightarrow4)$. La structure des motifs disaccharidiques de répétition des carraghénanes varie par la position et le nombre des groupements sulfates. Des unités 3,6-anhydro- α -D-galactopyranoses peuvent aussi remplacer les unités $\alpha(1\rightarrow3)$ -D-galactopyranoses.

L'étude structurale des carraghénanes a été entreprise en utilisant des carraghénases, glycosides hydrolases produites par des bactéries marines, qui dégradent spécifiquement les carraghénanes en coupant leurs liaisons $\beta(1\rightarrow4)$. Les oligo-carraghénanes formés ont été analysés par chromatographie liquide et caractérisés par spectrométrie de masse et RMN. La nature et la proportion des oligo-carraghénanes obtenus sont représentatives de la structure du polymère. Ces études ont été menées sur des structures hétérogènes λ -, κ/ι - et κ/μ -carraghénanes à l'aide des λ -, κ - et ι -carraghénases. La caractérisation d'oligosaccharides hybrides parmi les produits d'hydrolyse a confirmé l'hétérogénéité de ces structures et des modèles d'organisation (bloc, aléatoire) des motifs de répétition de ces chaînes hétérogènes ont été proposés. Les carraghénases devraient permettre d'analyser d'autres structures plus complexes de carraghénanes et peuvent aussi être utilisées directement sur la paroi de l'algue.

Mots clés : λ -carraghénane, κ/ι -carraghénane, κ/μ -carraghénane, κ -carraghénase, ι -carraghénase, λ -carraghénase, oligo-carraghénanes, hydrolyse enzymatique, HPSEC-MALLS, HPAEC, caractérisation RMN.

Structural analysis of carrageenans by enzymatic hydrolysis

ABSTRACT

Carrageenans are linear sulphated polysaccharides occurring as cell wall constituents in red algae and are used as texturing agents in the food industry. The backbone of the polymer is composed of alternating $\alpha(1\rightarrow3)$ and $\beta(1\rightarrow4)$ -linked D-galactopyranose units. The structure of the repeating units differs in the degree and position of sulphate esterification. 3,6-anhydro- α -D-galactopyranose units can also replace the $\alpha(1\rightarrow3)$ -D-galactopyranose units.

Structural studies of carrageenan have been conducted using carrageenases which are glycoside hydrolases produced by marine bacteria. They degrade specifically carrageenans by cleaving their $\beta(1\rightarrow4)$ bounds. The oligo-carrageenans obtained have been analysed by liquid chromatography and characterised by mass spectrometry and NMR. The structure and the proportion of oligo-carrageenans formed are representative of the polymer structure. These studies were performed on the heterogeneous structure of λ -, κ/ι - and κ/μ -carrageenans with λ -, κ - and ι -carrageenases. Characterisation of hybrid oligosaccharides within the hydrolytic products has confirmed the heterogeneity of these structures. Different organisation models (block, random) of the repetitive units within these heterogeneous chains have been proposed. Carrageenases should also be useful in the analysis of other more complex carrageenan structures and can be used directly on the algal cell wall.

Keywords : λ -carrageenan, κ/ι -carrageenan, κ/μ -carrageenan, κ -carrageenase, ι -carrageenase, λ -carrageenase, oligo-carrageenans, enzymatic hydrolysis, HPSEC-MALLS, HPAEC, NMR characterisation.

Remerciements

Je tiens à remercier Messieurs Marc Lahaye, Alphons Voragen, Pierre le Corre, Roger Pichon et Patrick Boulenguer d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je voudrais remercier William Helbert de m'avoir confié ce projet et de m'avoir encadrée durant ces quatre années passées au sein de son équipe. Je tiens particulièrement à le remercier pour sa disponibilité et pour son esprit critique, notamment lors de la rédaction de cette thèse. Merci de m'avoir initiée à l'univers des carraghénanes, aux structures particulièrement complexes.

Je remercie Cargill Texturizing Solutions d'avoir co-financé cette thèse. Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers Jacques Mazoyer, Patrick Boulenguer et Alan Critchey pour leur sympathie et pour les discussions fructueuses lors de nos réunions qui ont permis d'orienter ce travail de thèse. Je tiens à remercier les différentes personnes que j'ai pu rencontrer lors de mes séjours à Bapte pour leur accueil chaleureux, et notamment Annie Guillomet et Véronique Picot.

Je remercie Bernard Kloareg et Catherine Boyen de m'avoir accueillie dans l'UMR 7139 où j'ai pu découvrir l'univers des algues et de la biologie marine, univers bien éloigné des domaines d'une chimiste formée loin de la mer.

Je tiens à remercier Aristotelis Antonopoulos et Michel Lafosse de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de l'ICOA d'Orléans et de m'avoir initiée à la spectrométrie de masse des oligo-carraghénanes.

Je souhaiterais remercier Roger Pichon et Nelly Kervarec du service RMN de Brest pour leur accueil toujours sympathique. Merci à Roger de m'avoir enseigné certains aspects de la théorie de la RMN qui me manquaient pour mener à bien cette thèse. Merci Nelly pour avoir toujours été disponible lors de mes nombreux envois d'échantillons et appels téléphoniques. Merci beaucoup pour ta bonne humeur permanente et pour ne pas t'être moquée de mes stylos de couleurs, indispensables à la résolution de ces spectres RMN complexes. Tu auras été la seule !

Je souhaiterais remercier particulièrement Gurvan Michel et Myriam Czjzek pour m'avoir invitée dans leur monde de cristaux de protéines. Nos discussions m'ont permis de mieux comprendre les sites actifs de nos chères carraghénases.

Je voudrais chaleureusement remercier Sabine Genicot-Joncour pour son amitié et sa disponibilité lors de ces années passées dans la même équipe. Merci de m'avoir initiée à la purification des protéines et aux bonnes techniques de laboratoire. Mais merci surtout pour son soutien sans faille qui peut juste parfois se traduire par une petite part de tiramisu symbolique pleine de réconfort.

Merci à Maud (sans e) Lemoine, qui va maintenant être la doyenne des thésardES de l'équipe et qui va donc reprendre le flambeau de la sagesse (...). Merci pour sa bonne humeur, son franc-parler inégalable et son esprit zen très utile surtout dans les moments critiques aux sommets brumeux de pistes !

Je voudrais remercier Audrey Cosse pour son amitié qui date de notre premier jour de DEA. Nous nous serons suivies d'un coin de paillasse à un coin de bureau et à des bureaux voisins, et cela toujours dans une bonne entente. Merci pour nos longues discussions, pour tes conseils en cuisine et en Window color et promis je te léguerai une frise de COSY pour ta décoration intérieure. Je te souhaite plein de bonnes choses.

Merci à Estelle Deniaud pour son amitié, pour son aide dans la compréhension du monde des polysaccharides et pour ces deux années passées ensemble au laboratoire. Bonne chance dans ton nouvel avenir scientifique.

Je voudrais remercier Audrey, Thierry, Gurvan, Estelle, Jérôme, Pi et Carole pour avoir partagé mes bureaux successifs, pour la bonne humeur qu'il y a toujours régné et même pour les échanges de virus grippaux (...).

Je tiens à remercier toutes les personnes de l'UMR 7139 pour m'avoir apporté leur sympathie et leur aide durant ces quatre années. Je tiens particulièrement à remercier Jérôme (et sa peau de bête, la personne sur qui on peut toujours compter !), Yann (pour m'avoir encadrée lors de mon DEA), Cécile (pour m'avoir fait découvrir ce qu'était la « fan attitude » et vive les marmottes !), Murielle (pour m'avoir fait connaître pas mal de bons groupes, garde cette pêche !), Alex (pour son dynamisme permanent !), Pi (ahh, la complexité de la grammaire française !), Tristan (et ses bactéries !), François (dit le Bizut, notre nouveau masseur officiel des thésards de l'UMR), P.O. (première personne à m'avoir accueillie il y a 4 ans, eh oui il était déjà là !), Vincent (pour ses photos et stp détruis-les), Jérôme (mon ancien co-DEA pour ses délires laborantins) et Ludovic (pour les nombreuses soirées sympathiques dans son garage).

Merci à toutes les autres personnes travaillant à la Station Biologique pour leur aide ponctuelle à différents moments de ma thèse. Merci aussi aux étudiants de la station pour les bonnes ambiances qui règnent toujours aux soirées. Je souhaiterais surtout remercier Manon pour son amitié, bonne chance pour la fin de ta thèse et courage avec ton défi Rhodophycées. Merci aussi à Jacques (pour les soirées rollers), Matthieu (NB : Maud attend toujours son gâteau), Constance, Thomas, Morgane et Sophie de m'avoir accueillie dans leur unité, d'avoir partagé leurs réserves de friandises, et de m'avoir aidée dans le fonctionnement du fameux MALLS. Et j'allais oublier de remercier Yoann et Olivier de m'avoir laissé utiliser leur précieuse balance malgré des tentatives de marchandage.

Je tenais aussi à remercier mes « vieux » amis qui me suivent depuis quelques années et particulièrement Maude (ma binôme de toujours), Julien, Nadia, Agnès, Cédric, Cécilia, Céline, Raphaël, Nathalie et les futures doctresses Vanessa et Flore.

Merci bien sûr à mes parents, à Hélène et Cédric, et à toute ma famille pour m'avoir toujours soutenue depuis que je me suis lancée dans les Sciences et d'avoir toujours été là pour moi.

J'espère n'avoir oublié personne mais je dois me limiter en nombre de pages, sinon on va encore dire que je suis bavarde. Merci encore pour les très bons souvenirs que je garderai de ces quatre années roscovites.

Table des matières

Introduction générale.....	2
I. Les carraghénanes.....	4
A. Organisation de la paroi des algues rouges.....	4
B. Diversité des algues rouges carraghénophytes.....	6
C. Structure des carraghénanes.....	8
1. Nomenclature des carraghénanes.....	8
2. Classification des carraghénanes.....	8
D. Origines de la diversité structurale des carraghénanes.....	12
1. Variation de la structure des carraghénanes au cours du cycle de reproduction des algues.....	12
2. Localisation des différents carraghénanes dans le thalle.....	14
3. Biosynthèse des carraghénanes.....	16
E. Propriétés fonctionnelles des carraghénanes.....	18
1. Propriétés physico-chimiques.....	18
2. Activités biologiques des carraghénanes.....	20
II. Analyse structurale des carraghénanes.....	22
A. Détermination du poids moléculaire et de la polydispersité.....	22
B. Détermination des unités de répétition des carraghénanes.....	24
1. Méthodes chimiques.....	24
2. Méthodes spectroscopiques.....	28
a. Spectroscopie Infra-Rouge.....	28
b. Spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire).....	28
3. Analyse par spectrométrie de masse des oligo-carraghénanes.....	34
a. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry (ESI-MS).....	34
b. MALDI-TOF (Matrice Assisted Laser Desorption/Ionisation / Time Of Flight).....	36
c. Couplage LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry).....	36
III. Les carraghénases.....	40
A. Généralités.....	40
B. La κ -carraghénase.....	42
1. De la κ -carraghénase native à la κ -carraghénase recombinante.....	42
2. Mécanisme de coupure des κ -carraghénases.....	44
3. Mode d'action des κ -carraghénases.....	46
4. Site actif de la κ -carraghénase de <i>P. carrageenovora</i>	48
C. La ι -carraghénase.....	48
1. De la ι -carraghénase native à la ι -carraghénase recombinante.....	48
2. Mécanisme de la ι -carraghénase.....	50
3. Mode d'action des ι -carraghénases.....	52
4. Site actif de la ι -carraghénase d' <i>A. fortis</i>	54
Présentation du travail.....	58

Chapitre I : Analyse structurale du λ -carraghénane par la λ -carraghénase 66

INTRODUCTION..... 66

RESULTATS 70

I. Production et purification de la λ -carraghénase. 70

II. Choix du substrat d'étude. 70

III. Propriétés de la λ -carraghénase..... 72

A. *Mesure de l'activité enzymatique.* 72

B. *Evolution du poids moléculaire du λ -carraghénane au cours de l'hydrolyse.* 74

C. *Formation des produits limites de l'hydrolyse*..... 76

D. *Purification et caractérisation des produits d'hydrolyse.*..... 80

1. Purification des oligo- λ -carraghénanes..... 80

2. Caractérisation des oligo- λ -carraghénanes par spectrométrie de masse..... 80

3. Caractérisation des oligo- λ -carraghénanes par RMN. 82

E. *Analyse de la fraction résistante à l'enzyme* 92

F. *Etude du mode d'action de l'enzyme* 92

G. *Etude du site actif.*..... 94

DISCUSSION 96

I. Mode d'action de la λ -carraghénase de *P. carrageenovora* 96

II. Spécificité du site actif de la λ -carraghénase. 98

III. Analyse RMN du λ -carraghénane et des oligo- λ -carraghénanes..... 100

IV. Structure hybride du λ -carraghénane de *G. skottsbergii*..... 102

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... 106

Chapitre II : Analyse structurale des κ/ι -carraghénanes 110

INTRODUCTION..... 110

RESULTATS 114

I. Analyse ^1H -RMN des κ/ι -carraghénanes..... 114

II. Structure hétérogène du κ/ι -carraghénane de *G. skottsbergii* 116

III. Caractérisation des oligo- κ/ι -carraghénanes..... 118

A. *Purification des oligo- κ/ι -carraghénanes par SEC.*..... 118

B. *Caractérisation des oligo- κ/ι -carraghénanes par RMN.* 118

C. *Détermination de la séquence des motifs dans les oligosaccharides κ -[κ/ι]- κ et κ -[κ/ι]- κ .*..... 126

IV. Comparaison des profils d'hydrolyse enzymatique de différents κ/ι -carraghénanes. 126

V. Caractérisation des fractions résistantes aux carraghénases..... 132

DISCUSSION	136
I. Données sur la spécificité du site actif des carraghénases	136
A. Spécificité de la κ -carraghénase	136
B. Spécificité de la ι -carraghénase	138
II. Proposition de schéma d'organisation des κ/ι -carraghénanes	142
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	146

Chapitre III : Analyse structurale des κ/μ -carraghénanes.. 150

INTRODUCTION.....	150
RESULTATS	152
I. Analyse ^1H -RMN des κ -carraghénanes extraits de <i>K. alvarezii</i>	152
II. Hydrolyse des κ -carraghénanes transformés et non-transformés par la κ -carraghénase.	152
III. Caractérisation des oligo- κ/μ -carraghénanes.	156
A. Purification des oligo- κ/μ -carraghénanes	156
B. Caractérisation par RMN des oligo- κ/μ -carraghénanes.	160
C. Caractérisation des oligo- κ/μ -carraghénanes par LC-MS.	166
DISCUSSION	168
I. Données sur la spécificité du site actif de la κ -carraghénase.....	168
II. Les motifs précurseurs μ sont dispersés aléatoirement dans la chaîne de κ -carraghénane.....	170
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	172

Chapitre IV : Conclusions et perspectives 176

I. Les carraghénases	176
II. Hydrolyse enzymatique de carraghénanes de structures complexes	180
III. Hydrolyse directe sur les algues.....	184

Conditions expérimentales..... 186

I. Purification des carraghénases.....	186
A. Purification de la λ -carraghénase.....	186
B. Purification des κ - et ι -carraghénases	187
II. Sources des carraghénanes étudiés.	188
III. Conditions des hydrolyses enzymatiques.....	188
A. Hydrolyse enzymatique des λ -carraghénanes.	188
B. Hydrolyse enzymatique des κ -carraghénane et ι -carraghénane.....	189
C. Hydrolyse enzymatique des κ/ι -carraghénanes.	190

D. Hydrolyse enzymatique des κ -carraghénanes extraits de <i>K. alvarezii</i>	190
E. Hydrolyse enzymatique du carraghénane extrait de <i>I. crispata</i>	191
F. Hydrolyse enzymatique des algues	191
G. Hydrolyse enzymatique des oligo-carraghénanes	192
IV. Purification des oligo-carraghénanes par chromatographie	192
A. Purification des oligo-carraghénanes par chromatographie d'exclusion de taille (SEC)	192
B. Purification des oligo-carraghénanes par chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC)	193
V. Purification des fractions résistantes	194
VI. Techniques d'analyse des hydrolysats	194
A. Dosage colorimétrique des extrémités réductrices formées au cours de l'hydrolyse	194
B. Analyse des oligo-carraghénanes par électrophorèse	195
1. Analyse des oligo- λ -carraghénanes par « Carbohydrate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis » (C-PAGE)	195
2. Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE)	196
C. Analyse des hydrolysats par chromatographie	197
1. High Performance Size Exclusion Chromatography - Multi-Angle-Laser-Light-Scattering (HPSEC – MALLS)	197
2. Chromatographie d'exclusion de taille (SEC)	198
3. High Performance Anion Exchange Chromatography (HPAEC)	198
D. Analyse par spectrométrie de masse des oligo-carraghénanes	199
1. Couplage LC-ESI/MS (Liquid Chromatography - Electrospray Ionisation - Mass Spectroscopy)	199
2. Analyse par infusion directe	200
E. Analyse RMN	200
1. Suivi cinétique de l'hydrolyse du λ -carraghénane	200
2. Analyse ^1H -RMN des polysaccharides	201
3. Analyses RMN 1D (^{13}C , ^1H) et 2D des oligosaccharides	201

Références bibliographiques 204

Liste des figures 216

Liste des tableaux 220

Publications 220

Liste des Abréviations

C-PAGE	Carbohydrate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
CID	Collision Induced Dissociation
COSY	COrelated SpectroscopY
d	Doublet
DO	Densité Optique
DP	Degré de Polymérisation (DP2 = disaccharide = carrabiose)
Eau mQ	Eau ultrapure (Millipore)
EC	Enzyme Classification
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	ElectroSpray Ionisation
FACE	Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis
FR	Fraction Résistante
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPAEC	High Performance Anion Exchange Chromatography
HPSEC	High Performance Size Exclusion Chromatography
IR	Indice de Réfraction
LC	Liquid Chromatography
MALLS	Multi-Angle-Laser-Light-Scattering
Milieu W-Y	Milieu Weigl - Yaphe
MS	Mass Spectrometry
Néo-carrabioses	Oligo-carraghénanes issus de coupures en β -1,4 du polymère
NT	Non Transformé
RMN 1D	Résonance Magnétique Nucléaire dans une dimension
rpm	Rotation par minute
SM	Spectrométrie de Masse
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

Lettres grecques utilisées

α : alpha	μ : mu
β : beta	ν : nu
δ : delta	π : pi
ϕ : phi	θ : theta
γ : gamma	ω : oméga
ι : iota	ξ : ksi
κ : kappa	ψ :psi
λ : lambda	

Introduction générale

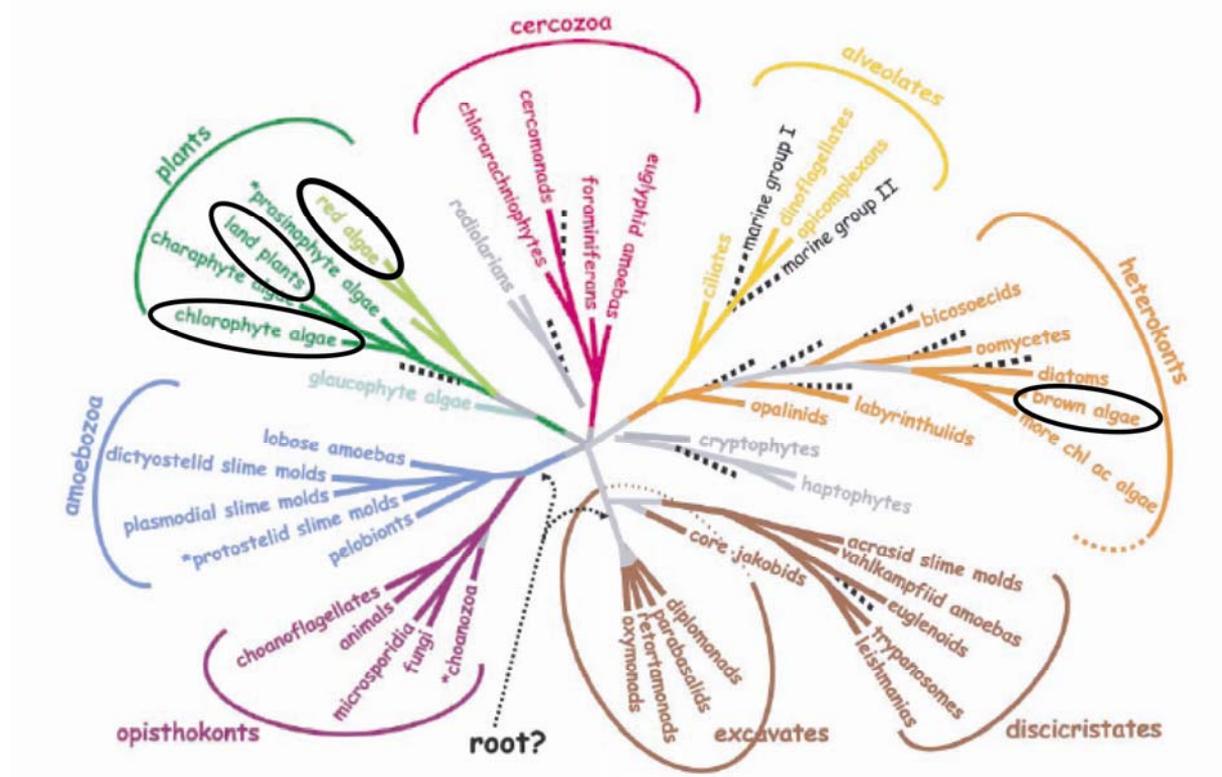


Figure 1 : Position des macro-algues et des plantes supérieures dans l'arbre phylogénétique des eucaryotes (Baldauf, 2003)

Introduction générale

Les algues sont des organismes eucaryotes photosynthétiques qui appartiennent à des lignées phylogénétiques différentes. Les algues rouges (Rhodophyta) font partie, comme les algues vertes (Chlorophyta) et les plantes supérieures (Streptophyta) de la lignée des plantes, alors que les algues brunes (Phaeophyta) appartiennent à la lignée des hétérokontes (**Figure 1**). Les cellules des algues et des plantes supérieures ont en commun la particularité de posséder une paroi autour de leur membrane plasmique. La paroi de certaines algues rouges est principalement composée de polysaccharides sulfatés : les carraghénanes.

La première algue carraghénophyte découverte fut *Chondrus crispus* (Irish Moss) en 1862 par Stanford, qui donna le nom « carrageenin » au matériel gélatineux qu'il avait extrait de l'algue. Les propriétés gélifiantes et viscosifiantes des carraghénanes ont été utilisées dès le 19^{ème} siècle en Europe dans la confection de flans. L'expansion industrielle de la production de carraghénanes s'est effectuée après la seconde guerre mondiale et leur gamme d'applications s'est étendue. La limitation des algues sauvages a entraîné des recherches sur leur cycle de vie et une industrie de culture des algues, principalement des espèces *Eucheuma*, a été mise en place en Asie. L'industrie des carraghénanes est estimée aujourd'hui à 35 000 tonnes/an (Source Cargill).

Les carraghénanes ont des structures qui varient suivant les espèces d'algues dont ils sont extraits. Afin de corréler les structures et les propriétés texturantes des carraghénanes, des méthodes d'analyses structurales chimiques et spectroscopiques ont été développées ces 80 dernières années. Le développement récent des biotechnologies, notamment de la glycobiologie, a généralisé de plus en plus l'utilisation des enzymes, glycoside hydrolases et polysaccharide lyases, dans l'analyse des polysaccharides. La caractérisation des κ -, ι - et λ -carraghénases, les glycoside hydrolases spécifiques des carraghénanes, ainsi que leur utilisation comme outils d'analyse structurale a fait l'objet de cette thèse.

Introduction générale

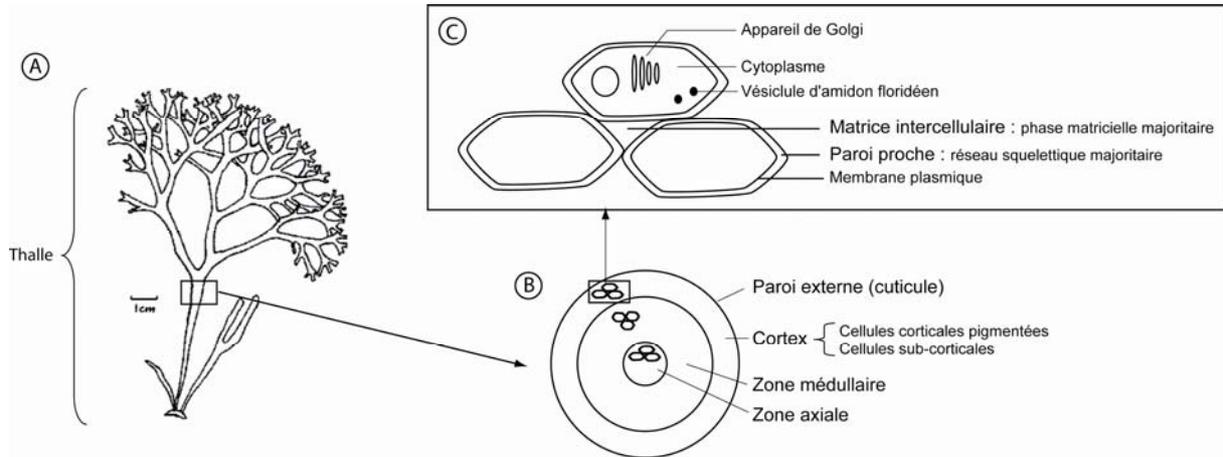


Figure 2 : Organisation de la paroi des algues rouges.

(A) Thalasse de l'algue rouge *Chondrus crispus*, (B) Coupe transversale de thalasse, (C) Organisation des cellules de la paroi des algues.

	Algues rouges (Rhodophycées)	Algues brunes (Phéophycées)	Algues vertes (Chlorophycées)	Plantes supérieures
Phase squelettique	Cellulose (1→4)β-D -glucose Xylane (1→4)β-D-xylopyranose (1→3)β-D-xylopyranose Mannane (1→4)β-D-mannopyranose	Cellulose (1→4)β-D -glucose	Cellulose (1→4)β-D -glucose Xylane (1→4)β-D-xylopyranose (1→3)β-D-xylopyranose Mannane (1→4)β-D-mannopyranose	Cellulose (1→4)β-D -glucose Hémicellulose Xyloglucanes Mannanes Glucuronarabinoxylanes (1→3)(1→4)β-D-glucanes
Phase matricielle	Agar Alternance (1→3)β-D-galactopyranose et (1→4)α-L-galactopyranose ou (1→4)3,6-anhydro-α-L-galactopyranose Carraghénane Alternance (1→3)β-D-galactopyranose et (1→4)α-D-galactopyranose ou (1→4)3,6-anhydro-α-D-galactopyranose	Alginate Acide α-L-gulonique Acide β-D-mannuronique Fucane (1→2)α-L-fucose-4-sulfate branchement ou sulfatation en 3	Ulvane Xylorhammoglycuronanes sulfatés Xylogalactoarabinane	Pectine (dicotylédones) Homogalacturonane Rhamnogalacturonane Arabinoxylane (Monocotylédones)
Sucres de réserve	Amidon floridéen (1→4)α-D-glucose branchement (1→6)α-D-glucose	Laminarine (1→3)β-D -glucose branchement (1→6)β-D-glucose	Amidon (1→4)α-D -glucose	Amidon (1→4)α-D -glucose

Tableau 1 : Principaux polysaccharides rencontrés dans la paroi des macro-algues et des plantes supérieures.

I. Les carraghénanes

A. Organisation de la paroi des algues rouges.

La paroi des algues est un lieu d'échanges intercellulaires et d'échanges avec le milieu extérieur. La paroi donne aux cellules leur forme et leur permet de croître. Elle est aussi une barrière contre les agressions extérieures. L'organisation générale de la paroi des algues rouges est similaire à celles des autres algues (brunes, vertes) et des plantes supérieures. Chaque cellule possède, en plus de sa membrane plasmique, une paroi polysaccharidique, et les cellules sont reliées entre elles par une matrice intercellulaire (**Figure 2**). La paroi et la matrice intercellulaire sont constituées d'une phase squelettique cristalline de polysaccharides insolubles, et d'une phase matricielle amorphe de polysaccharides plus hydrosolubles.

La phase squelettique des algues rouges, et des végétaux en général, est constituée de polysaccharides linéaires neutres, majoritairement des microfibrilles cristallines de cellulose, et parfois de xyloxyanes ou de mannanes (**Tableau 1**). La cellulose est une chaîne linéaire de $(1\rightarrow4)\beta$ -D-glucoses en conformation chaise 4C_1 qui donne à la cellulose une disposition en ruban. Des liaisons hydrogène intra et intermoléculaires stabilisent la cellulose sous forme de microfibrilles cristallines. La cellulose ne représente que 1 à 8% du poids sec chez les Rhodophyta et les Phaeophyta (Ross, 1953), alors qu'elle constitue 30% du poids sec des plantes supérieures. Certaines Chlorophyta peuvent même contenir jusqu'à 70% de cellulose cristalline (Frei *et al.*, 1961). Bien qu'en faible quantité chez les algues rouges, la cellulose joue un rôle structural important en permettant à l'algue de résister à l'hydrodynamisme du milieu.

Les phases matricielles des algues rouges et brunes représentent la majeure partie du poids sec des algues. Elles sont composées de polysaccharides anioniques, portant des groupements sulfates (carraghénanes, agars, fucanes) ou des groupements carboxylés (alginates) (**Tableau 1**). Les deux polysaccharides principaux de la phase matricielle des algues rouges sont les carraghénanes et les agars, galactanes linéaires sulfatés de masse moléculaire élevée (400 à 600 kDa). Ils sont composés alternativement d'unités $(1\rightarrow3)\beta$ -D-galactopyranose et d'unités $(1\rightarrow4)\alpha$ -galactopyranose de configuration absolue D chez les

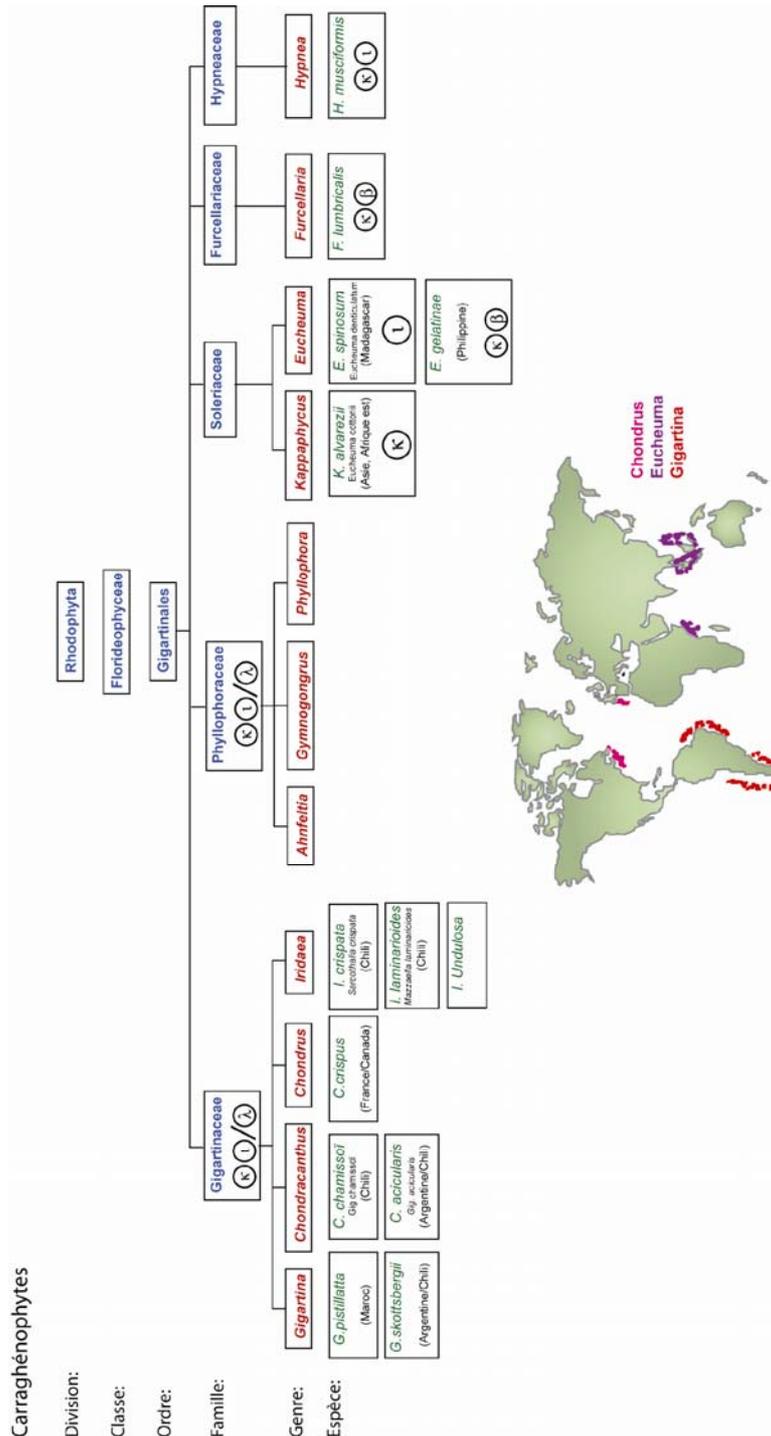


Figure 3: Exemples d'espèces de carraghénophytes (Gigartinales)

Adapté de (Therkelsen, 1993). La composition des carraghénanes extraits de ces algues est indiquée ainsi que les lieux de culture de certaines espèces. La composition des carraghénanes extraits des algues des familles Gigartinaceae et Phylloporaceae varie suivant les formes gamétophytes/tétraspores (κ, λ/λ).

carraghénanes et L chez les agars. Des structures branchées (xylose, acide glucuronique) plus complexes ont aussi été observées comme des xylomannanes sulfatés (Usov, 1984; Kolender *et al.*, 1997), des xylogalactanes sulfatés branchés (Usov *et al.*, 1997; Duarte *et al.*, 2002) et des galactoglucuronoxylanes non sulfatés (Watt *et al.*, 2002).

L'importance de la phase matricielle dans la paroi des algues rouges ainsi que sa composition polyanionique particulière, reflètent des propriétés spécifiques du milieu marin (résistance au courant, pression osmotique, échanges ioniques, rétention de l'eau à marée basse) (Kloareg *et al.*, 1988).

La différenciation entre la paroi et la matrice intercellulaire est peu distincte et elle se base essentiellement sur des différences de distribution des polysaccharides squelettiques et matriciels. Les polysaccharides squelettiques sont abondants dans la paroi proche de la cellule et presque absents de la matrice intercellulaire. La paroi des algues rouges contient aussi des protéines pariétales, mais en quantité relativement faible, et qui sont concentrées notamment dans la paroi externe (Craigie, 1990). Ces protéines jouent un rôle important, entre autres, pour l'adhésion cellulaire, le transport ionique et la biosynthèse.

B. Diversité des algues rouges carraghénophytes.

Les espèces carraghénophytes sauvages sont nombreuses, faisant partie notamment des genres *Chondrus*, *Gigartina*, *Iridaea* et *Chondracanthus* de la famille Gigartinaceae (**Figure 3**). La culture de carraghénophytes de la famille Soleriaceae, notamment des espèces *Kappaphycus alvarezii* (*Eucheuma cottonii*) et *Eucheuma denticulatum* (*Eucheuma spinosum*), a été développée aux Philippines puis en Indonésie et Tanzanie (**Figure 3**).

L'extraction des carraghénanes de la paroi de ces algues est réalisée dans l'eau à chaud et en milieu alcalin. Le carraghénane est ensuite filtré à chaud afin d'éliminer les résidus insolubles, notamment la cellulose de la phase squelettique. Le carraghénane peut ensuite être récupéré de la solution par précipitation à l'alcool ou au chlorure de potassium dans certains cas (**Figure 4**). Environ 80 000 tonnes d'algues rouges sèches sont nécessaires pour produire 20 000 tonnes de carraghénanes (Bixler, 1996).

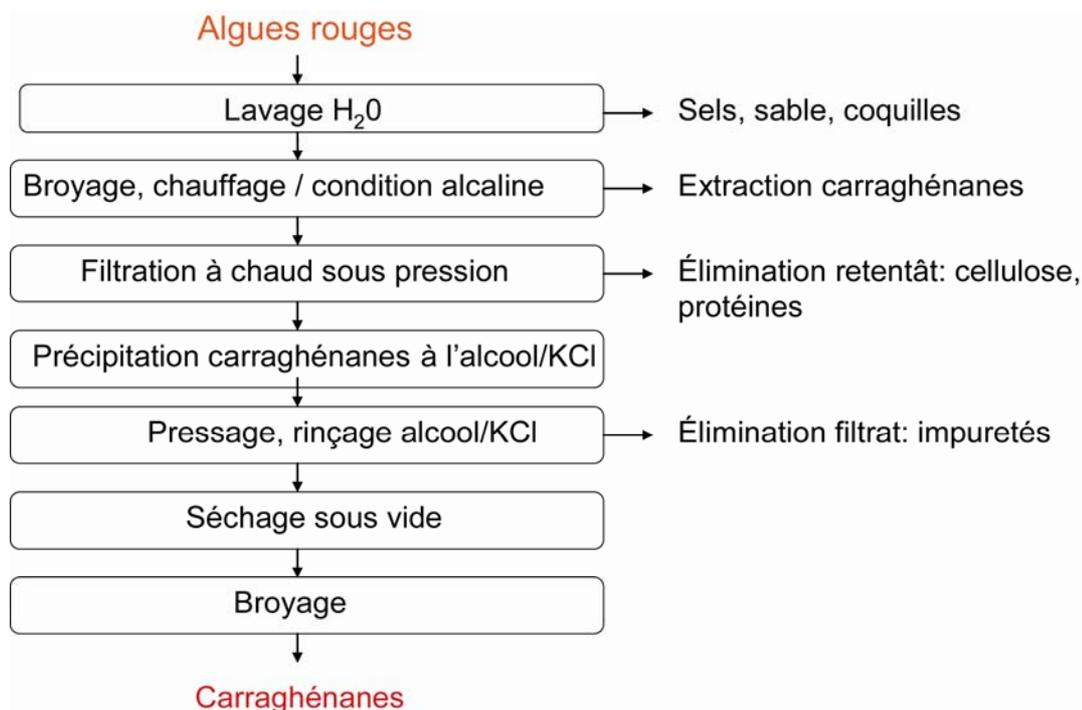


Figure 4 : Procédé d'extraction industriel des carraghénanes à partir des algues rouges.

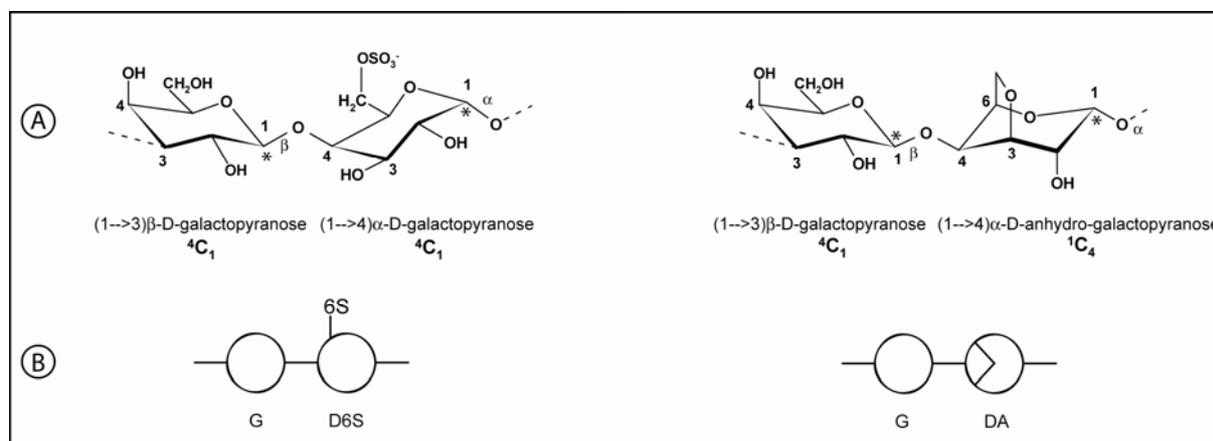


Figure 5 : Motifs disaccharidiques de répétition G-D / G-DA des carraghénanes.

(A) La configuration anomérique des galactopyranoses est de type β , si le stéréocentre C1* est de configuration R (unités G) et de type α s'il est S (unités D). Une conformation chaise 1C_4 indique que les carbones 1 et 4 sont respectivement au dessus et en dessous du plan moyen de la molécule et inversement pour la conformation chaise 4C_1 . (B) Schématisation des motifs disaccharidiques de ces structures de carraghénanes.

C. Structure des carraghénanes.

1. Nomenclature des carraghénanes

Les carraghénanes sont composés alternativement d'unités (1→3)β-D-galactopyranoses (unités **G**) et (1→4)α-D-galactopyranoses (unités **D**) (**Figure 5**). Les (1→4)α-D-galactopyranoses peuvent aussi exister sous la forme 3,6-anhydro-galactopyranoses (unités **DA**). Ces unités G et/ou D peuvent être substituées à différentes positions par des sulfates (**S**), des O-méthyles (**M**) ou des groupements d'acide pyruvique sous la forme de kétal cyclique (**P**), créant ainsi une grande diversité de structures de carraghénanes. La position des substituants est indiquée par le numéro des carbones auxquels ils sont attachés sauf pour le groupement P toujours positionné sur les mêmes carbones 4 et 6 de l'unité D. Les unités galactopyranoses G et D des carraghénanes adoptent la conformation chaise qui permet de placer en position équatoriale le groupement CH₂OH relativement volumineux, ainsi que la plupart des autres groupements hydroxyles potentiellement substituables (**Figure 5**). Les unités D et G ont une conformation chaise ⁴C₁ et les unités DA ont une conformation chaise ¹C₄.

La désignation des différentes unités s'effectue par un code alphabétique (Knutsen *et al.*, 1994) pour pallier les limites rencontrées avec le code des lettres grecques (Rees, 1969). Une lettre grecque était attribuée à chaque nouveau motif disaccharidique identifié et leur nombre augmentait rapidement. Le code alphabétique permet de décrire n'importe quel motif et il est surtout utile dans la description de chaînes complexes de carraghénanes contenant plusieurs motifs disaccharidiques différents. Le code des lettres grecques est toujours communément utilisé pour les carraghénanes commerciaux constitués majoritairement d'un seul motif de répétition, comme, par exemple, le κ-carraghénane (G4S-DA) extrait de *K. alvarezii*.

2. Classification des carraghénanes.

La première classification des carraghénanes a été basée sur leurs propriétés de gélification. Le carraghénane extrait de *C. crispus* se divisant en deux fractions dans le KCl,

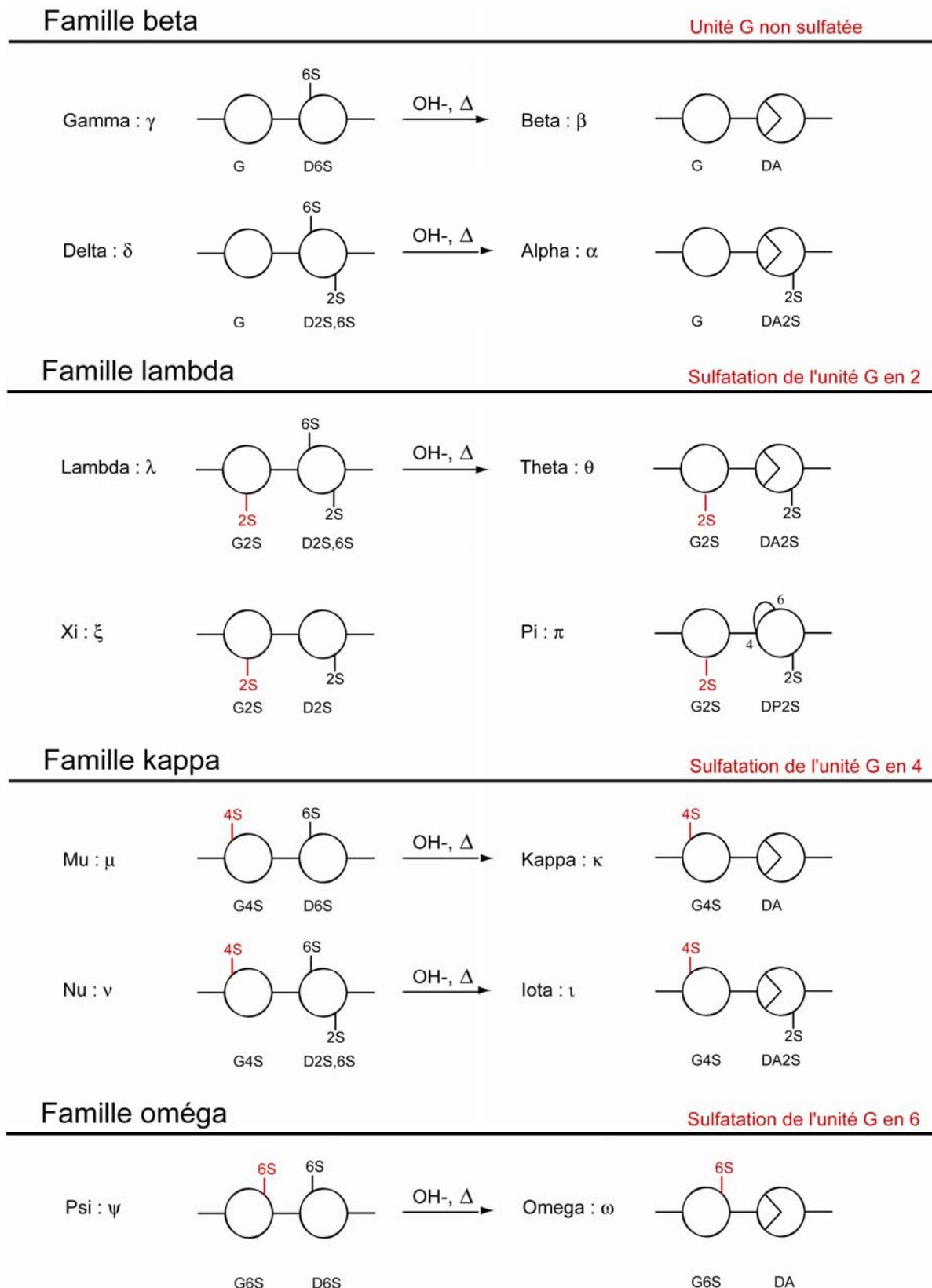


Figure 6 : Classification des carraghénanes en familles.

La classification est basée sur la position des groupements sulfates sur l'unité G.

la dénomination lambda carraghénane a été donnée aux carraghénanes de l'extrait soluble, et la dénomination kappa carraghénane à la fraction insoluble (Smith *et al.*, 1953).

Avec les avancées de l'analyse structurale, les carraghénanes ont ensuite été classés dans différentes familles, en se basant sur la position des sulfates sur les unités G. Deux familles, kappa et lambda, ont tout d'abord été distinguées (McCandless *et al.*, 1979), auxquelles se sont ajoutées la famille beta (Greer *et al.*, 1984a) et la famille oméga (Mollion *et al.*, 1986) (**Figure 6**).

La famille kappa (G4S)

Elle se caractérise par une sulfatation en position 4 de l'unité G. Elle se compose des carraghénanes kappa (**G4S-DA**) et iota (**G4S-DA2S**) et de leurs précurseurs biosynthétiques respectifs mu (**G4S-D6S**) et nu (**G4S-D2S,6S**) (Anderson *et al.*, 1973). Les motifs précurseurs μ - et ν -carraghénanes peuvent être convertis en motifs κ - et ι -carraghénanes, lors de la biosynthèse sous l'action de galactose-6-sulfurylases, ou industriellement par un traitement alcalin (Bellion *et al.*, 1983). Cette transformation s'effectue par la fermeture du pont 3,6-anhydro, concomitante au départ du groupement sulfate en C6. Ces carraghénanes de la famille kappa se rencontrent chez de nombreuses espèces d'algues rouges, avec des compositions en motifs kappa et iota, s'échelonnant d'une dominante kappa comme chez les *K. alvarezii* (Bellion *et al.*, 1981) vers une dominante iota comme chez *E. denticulatum* (Bellion *et al.*, 1981) (**Figure 7**).

La famille lambda (G2S)

La famille lambda se compose des carraghénanes possédant une sulfatation en position 2 sur l'unité G du motif. Ces carraghénanes se rencontrent dans les parois des tétrasporophytes de certaines espèces de Gigartinaceae et Phylloporaceae. La structure majoritairement rencontrée est de type lambda (**G2S-D2S,6S**) (Matulewicz *et al.*, 1990; Nosedá *et al.*, 1993; Falshaw *et al.*, 1994; Stortz *et al.*, 1994; Falshaw *et al.*, 1998). La structure θ -carraghénane (**G2S-DA2S**) peut être obtenue par la lente transformation alcaline du λ -carraghénane (Ciancia *et al.*, 1993b). Cette structure θ -carraghénane est aussi naturellement présente chez certaines algues comme *C. hombroniana* (Miller, 2003; Falshaw *et al.*, 2005). Des structures désulfatées comme le ξ -carraghénane (**G2S-D2S**) (Penman *et al.*, 1973) et pyruvatées comme le π -carraghénane (**G2S-DP2S**) (DiNinno *et al.*, 1979) ont aussi

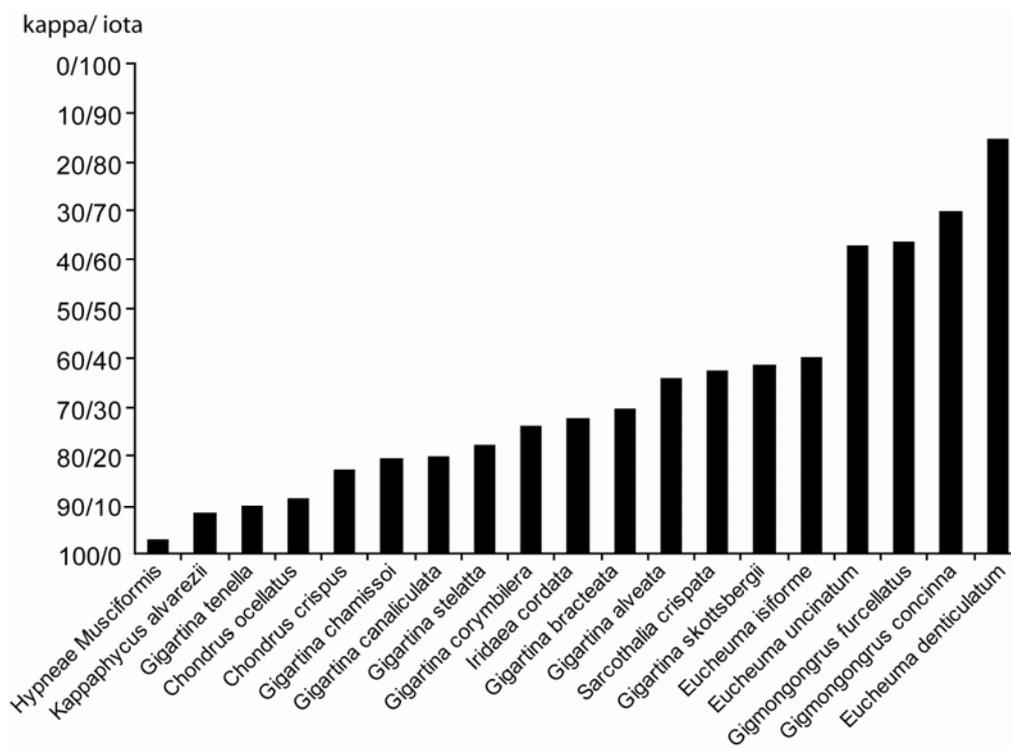


Figure 7 : Diagramme de Stancioff.

Ce diagramme rassemble des espèces d'algues rouges dont sont extraits des carraghénanes de motifs disaccharidiques kappa et iota (Bixler *et al.*, 2001)

été observées en proportion plus ou moins importante chez les tétrasporophytes de différentes espèces de Gigartinaceae (McCandless *et al.*, 1983; Falshaw *et al.*, 1995; Falshaw *et al.*, 1998).

La famille beta (G)

Elle regroupe les carraghénanes qui ne possèdent pas de groupement sulfate sur leur unité G comme le β -carraghénane (**G-DA**) et son précurseur le γ -carraghénane (**G-D6S**), isolés chez *Eucheuma gelatinae* (Greer *et al.*, 1984a) et *Furcellaria lumbricalis* (Knutsen *et al.*, 1987). L' α -carraghénane (**G-DA2S**) et son précurseur biologique le δ -carraghénane (**G-D2S,6S**) font aussi partie de cette famille et ont été isolés chez *Catenella nipea* (Zabackis *et al.*, 1986; Falshaw *et al.*, 1996)

La famille omega (G6S)

La dernière famille de carraghénanes se caractérise par une sulfatation en position 6 de l'unité G. Elle a été découverte chez *Rissoella verruculosa* (Gigartinales) et regroupe l' ω -carraghénane (**G6S-DA**) et son présumé précurseur le ψ -carraghénane (**G6S-D6S**) (Mollion *et al.*, 1986). L' ω -carraghénane (**G6S-DA**) avait déjà été identifié dans des structures kappa chez *F. lumbricalis* et *Phyllophora nervosa* (Usov *et al.*, 1981).

D. Origines de la diversité structurale des carraghénanes.

1. Variation de la structure des carraghénanes au cours du cycle de reproduction des algues.

Les algues rouges ont un cycle de reproduction de type haplodiplophasique trigénétique (Chen *et al.*, 1972) (**Figure 8**). Les gamètes (n) libérés par les algues gamétophytes haploïdes mâles et femelles fusionnent lors de la fécondation pour former des carposporophytes qui vont libérer des carpospores (2n), évoluant en algues tétrasporophytes diploïdes (2n). Ces tétrasporophytes vont ensuite libérer des téraspores (n) qui fermeront le cycle en évoluant en algues gamétophytes mâles ou femelles.

Des différences de structure de la phase matricielle ont été observées aux différentes étapes du cycle de reproduction chez certaines espèces de Gigartinaceae et de

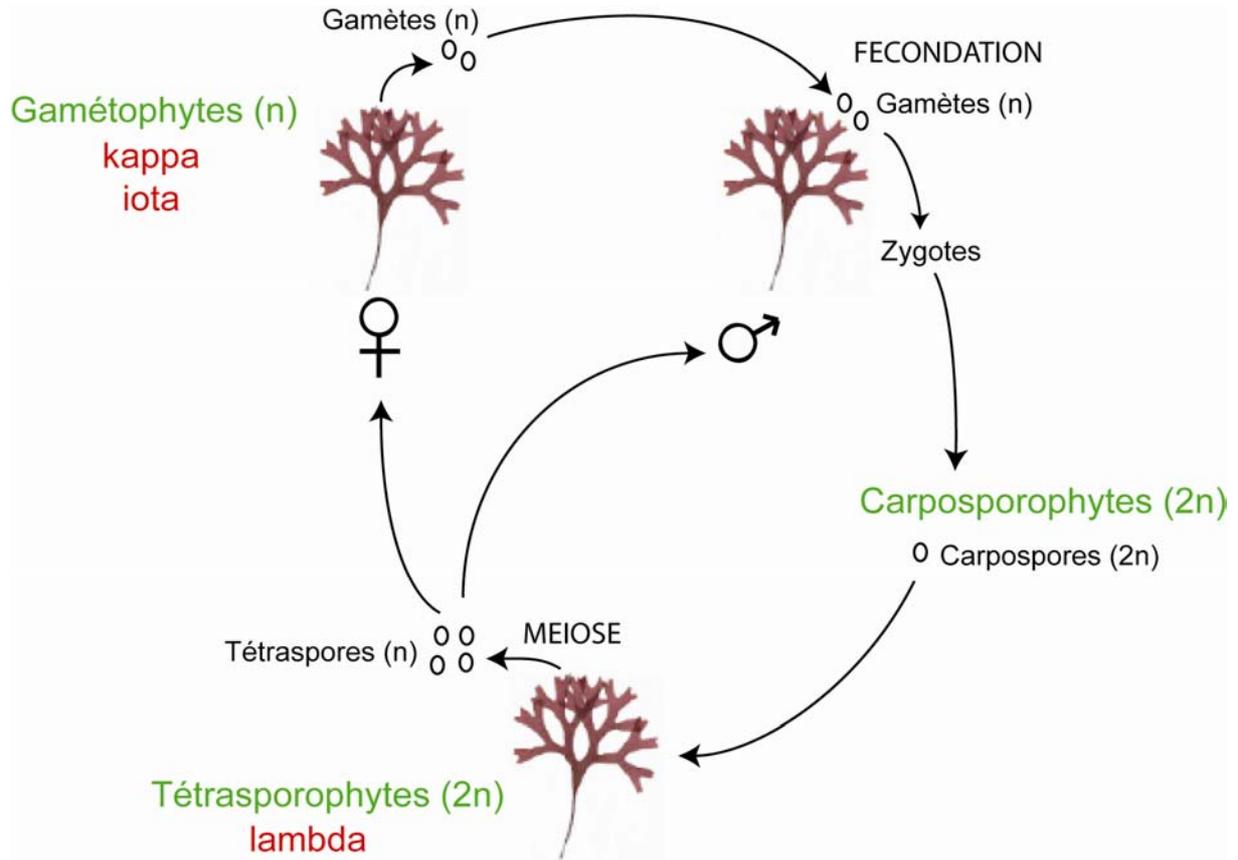


Figure 8 : Cycle de reproduction de l'algue rouge *C. crispus* (Gigartinaceae).

La structure des carraghénanes varie dans la paroi des algues au cours du cycle.

Phylloporaceae, notamment chez les Gigartinales *Chondrus*, *Iridaea* et *Gigartina* (McCandless *et al.*, 1973; Craigie, 1990; Stortz *et al.*, 1993; Falshaw *et al.*, 1994; Stortz *et al.*, 1994). La forme gamétophyte synthétiserait des carraghénanes de la famille kappa (κ , ι , μ , ν), alors que les tétrasporophytes produiraient des carraghénanes de la famille lambda (λ -, θ -, τ -, ξ). Les formes gamétophytes et tétrasporophytes de la plupart de ces espèces sont macroscopiques et semblables sur le plan morphologique. Les carraghénanes extraits industriellement de ces algues sont donc souvent un mélange de carraghénanes des familles kappa et lambda, dont la proportion relative varie avec la fluctuation de la biomasse gamétophyte ou tétrasporophyte de la population.

Cette variabilité de structure en fonction du cycle biologique de l'algue n'a pas été observée chez les algues de la famille Soleriacae. Certaines espèces d'*Eucheuma*, possèdent d'ailleurs des parois constituées majoritairement d'un seul type de carraghénanes (Dawes *et al.*, 1977; Doty *et al.*, 1978). Les carraghénanes extraits de *K. alvarezii* ont une structure majoritairement composée de motifs kappa carrabioses et minoritairement de motifs iota carrabioses. Les carraghénanes extraits de *E. spinosum* contiennent inversement essentiellement des motifs iota carrabioses (Bellion *et al.*, 1981). Les carraghénanes extraits des algues *E. gelatinae* (Greer *et al.*, 1984a), *F. lumbricalis* (Knutsen *et al.*, 1987) et des espèces de Dicranemataceae (Liao *et al.*, 1993) ont montré des structures composées à la fois de motifs kappa et beta carrabioses.

2. Localisation des différents carraghénanes dans le thalle

La localisation des carraghénanes dans la paroi d'une algue a été réalisée par immunofluorescence avec des anticorps monoclonaux, couplés à des fluorochromes, reconnaissant spécifiquement les κ -, ι - et λ -carraghénanes (Vreeland *et al.*, 1992). Des sondes d'hybridisation spécifiques constituées d'oligo- κ -carraghénanes et d'oligo- ι -carraghénanes fluorescents ont aussi été utilisées (Zablackis *et al.*, 1991). Ces expériences ont montré que la composition en carraghénanes variait suivant leur localisation dans la paroi de l'algue. La sulfatation des carraghénanes augmenterait de la zone axiale du thalle vers sa surface et de la paroi de la cellule vers la matrice intercellulaire (Kloareg *et al.*, 1988) (**Figure 2, p.3**). Le κ -carraghénane a été détecté chez *K. alvarezii* dans toutes les cellules excepté celles de la paroi externe, alors que les ι - et λ -carraghénanes, minoritaires chez cette espèce d'algue, ont été détectés dans le cortex et la paroi externe (Zablackis *et al.*, 1991; Vreeland *et al.*, 1992).

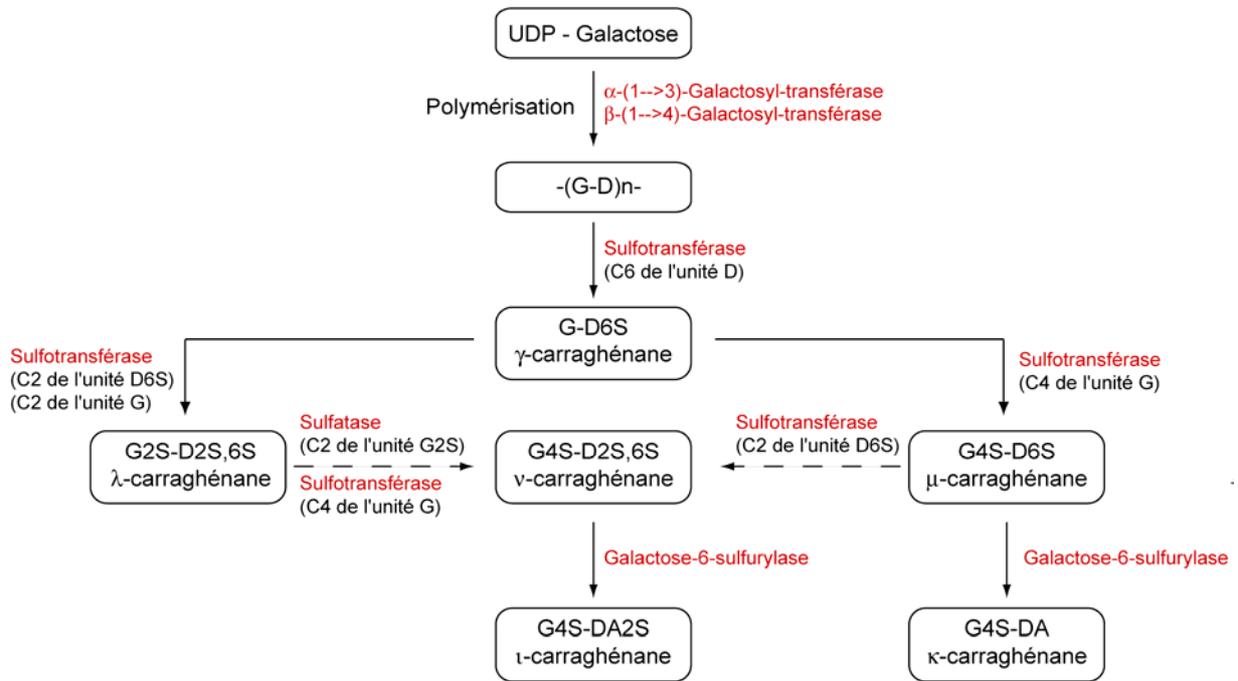


Figure 9 : Voie de biosynthèse hypothétique des carraghénanes (Craigie *et al.*, 1979).

Au sein des parois médullaires de *K. alvarezii*, le κ -carraghénane a été détecté en plus grande quantité dans la paroi proche de la cellule que dans les matrices intercellulaires, où le ι -carraghénane a été détecté (La Claire *et al.*, 1976; Zablackis *et al.*, 1991; Vreeland *et al.*, 1992).

3. Biosynthèse des carraghénanes

La voie complexe de biosynthèse des carraghénanes est à l'origine des différentes structures observées. Elle a été encore peu étudiée et il existe uniquement un schéma de biosynthèse hypothétique qui se base sur la caractérisation de certaines enzymes du processus (Craigie *et al.*, 1979) (**Figure 9**).

La première étape de la biosynthèse interviendrait dans l'appareil de Golgi, comme chez les plantes supérieures, par la formation d'un polysaccharide de galactanes, à partir d'UDP-galactose produit par photosynthèse. Le polymère neutre serait ensuite sulfaté spécifiquement sur certaines positions hydroxyles de sa chaîne, par plusieurs sulfotransférases dont l'ordre d'action est pour l'instant inconnu. L'incorporation du sulfate chez les algues a été suivie par marquage du $^{35}\text{SO}_4^-$ et montrerait que cette sulfatation se ferait dans l'appareil de Golgi (Tveter-Gallagher *et al.*, 1981; Millard *et al.*, 1982) et non au sein de la paroi (La Claire *et al.*, 1976). Les autres substitutions (méthylation, pyruvatisation) interviendraient probablement aussi à cette étape mais aucun mécanisme n'a été caractérisé à ce jour.

Les polysaccharides seraient ensuite transportés par le réticulum endoplasmique et intégrés à la paroi, où s'effectuerait, par action de galactose-6-sulfurylases (sulfohydrolases), la transformation des précurseurs μ - et ν -carraghénanes respectivement en κ - et ι -carraghénanes. Cette étape, induisant une gélification importante des chaînes, se produirait probablement après que les polysaccharides soient positionnés dans la paroi. L'existence de galactoses-6-sulfurylases agissant sur le μ -carraghénane a été démontrée chez *Gigartina stelatta* (Lawson *et al.*, 1970), et chez les formes haploïde et diploïde de *C. crispus* (Wong *et al.*, 1978). Une galactose-6-sulfurylase transformant le ν -carraghénane en ι -carraghénane a aussi été caractérisée chez *C. crispus* (Genicot *et al.*, 2004). Aucune galactoses-6-sulfurylase permettant la conversion du λ -carraghénane en θ -carraghénane n'a été à ce jour isolée. La galactose-6-sulfurylase isolée du tétrasporophyte de *C. crispus* (Wong *et al.*, 1978) est même inhibée par ce substrat lambda.

La grande variété de structures de carraghénanes existantes ne dépendrait donc que de l'expression ou non de quelques sulfotransférases et sulfurylases.

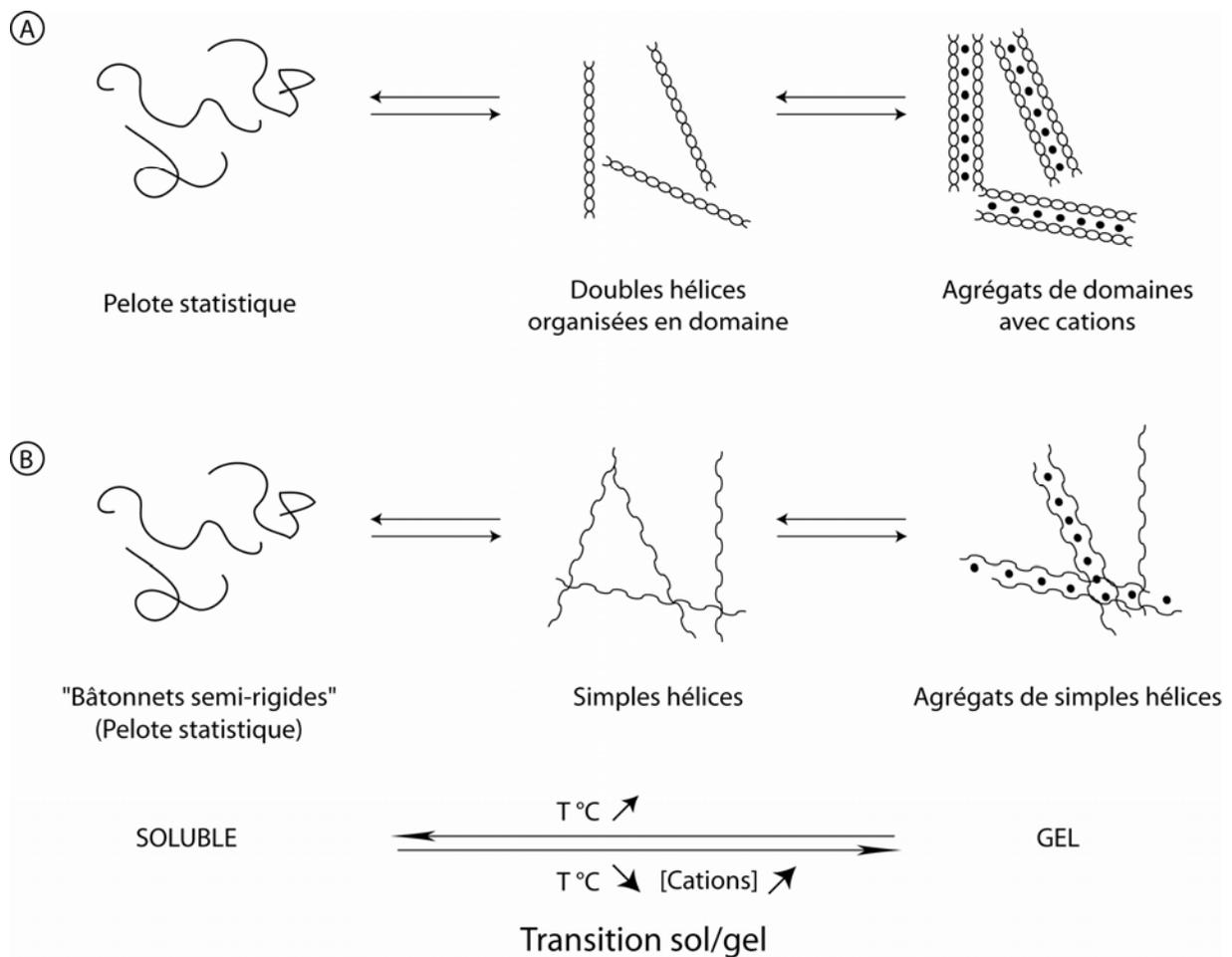


Figure 10 : Théories de la transition sol/gel du κ -carraghénane en présence d'ions K^+ .

(A) Théorie du « Model domain » (Morris *et al.*, 1980), (B) Théorie « Nested helices model » (Smidsrød *et al.*, 1982). Les ions K^+ sont représentés par (●)

E. Propriétés fonctionnelles des carraghénanes.

1. Propriétés physico-chimiques

A température élevée et en solution, les chaînes de κ - et ι -carraghénanes sont dans un état désordonné sous la forme de bâtonnets semi-rigides. Cet état désordonné est dû à l'agitation thermique. Lorsque la température est abaissée, la transition sol/gel se produit et les carraghénanes passent à un état ordonné sous forme d'hélices (**Figure 10**). Le gel se forme en présence de cations « gel-promoteur » qui neutralisent les charges négatives des groupements sulfates sur l'hélice et permettent leur association en agrégat (Morris *et al.*, 1980; Rees *et al.*, 1982). Les ι -carraghénanes forment un gel très élastique en présence de calcium et les κ -carraghénanes un gel dur et cassant en présence de potassium (**Tableau 2, p19**).

Le mécanisme de gélification des κ - et ι -carraghénanes est toujours sujet de débat et oppose deux théories (**Figure 10**). La première théorie supporte la formation de doubles hélices qui s'associent ensuite en domaines de doubles hélices en présence de cations (Anderson *et al.*, 1969; Morris *et al.*, 1980; Rees *et al.*, 1982; Viebke *et al.*, 1994). La seconde implique la formation d'hélices simples puis une association, induite en présence de cations, en agrégats d'hélices simples (Smidsrød *et al.*, 1982; Paoletti *et al.*, 1984; Rochas *et al.*, 1984; Bongaerts *et al.*, 1999; Cuppo *et al.*, 2002). Ces deux théories s'appuient sur diverses méthodes de caractérisation telles que la diffraction des rayons X, la rotation optique, la ^{13}C -RMN, la diffusion de la lumière, la rhéologie et la calorimétrie.

La formation des doubles hélices nécessiterait une structure régulière de chaînes, impliquant une alternance des unités G4S et DA ou DA2S, de conformations $^4\text{C}_1$ et $^1\text{C}_4$ respectivement. La présence, dans les chaînes de κ - et ι -carraghénanes, d'unités D6S (motifs μ) et D2S,6S (motifs ν) de conformation $^4\text{C}_1$ et avec une sulfatation supplémentaire en C6, empêcherait la formation d'hélices et donc la gélification (Anderson *et al.*, 1969; van de Velde *et al.*, 2002). La transformation alcaline industrielle de tous les motifs précurseurs mu et nu en motifs kappa et iota est donc nécessaire afin d'obtenir la propriété gélifiante voulue.

Contrairement aux κ - et ι -carraghénanes, le λ -carraghénane ne forme pas de gel en solution. Mais le λ -carraghénane possède des propriétés viscosifiantes et épaississantes élevées. La viscosité des solutions augmente avec la concentration en λ -carraghénane, et décroît en présence de sels et par élévation de la température. Ces différences de propriétés

	κ-carraghénane	ι-carraghénane	λ-carraghénane
Solubilité dans l'eau	A chaud 60°C	A chaud 60°C	A froid
Formation du gel	En refroidissant Thermoreversible Ionoreversible En présence K^+ Gel rigide, élastique En présence Ca^{2+} Gel ferme, cassant	En refroidissant Thermoreversible Ionoreversible En présence Ca^{2+} Gel mou, élastique	-
Synérèse	oui	non	non
Thixotropie	non	oui	non
Stabilité congélation-décongelation	Non	oui	oui
Interaction protéines lait	Gel cassant	Gel élastique	Gel mou

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques des carraghénanes.

Gel thermoreversible : gel qui se liquéfie et se reforme en fonction de la température.

Gel ionoreversible : gel qui se liquéfie et se reforme en fonction de la concentration en sels.

Synérèse : phénomène observé lorsque le solvant présent entre les chaînes polysaccharidiques est expulsé et que le gel devient alors de plus en plus rigide.

Thixotropie : le gel peut être cisailé, devenir liquide et reformer un gel après une période de repos.

Interaction avec la caséine du lait : Le κ -carraghénane forme un gel avec les charges positives de la caséine du lait (Stanley, 1990) ($pH < 4,4$).

rhéologiques s'expliqueraient par des structures tridimensionnelles différentes, conséquence d'un taux de sulfatation élevée des chaînes de λ -carraghénane et de la conformation 4C_1 des unités D2S,6S des motifs lambda. La structure du λ -carraghénane a été peu étudiée mais serait une structure en forme de long ruban plat avec un motif G2S-D2S,6S par tour (Rees, 1969).

Les propriétés physico-chimiques particulières des carraghénanes sont exploitées industriellement. Les carraghénanes (E407) représentaient, en 1996, 15% du marché des hydrocolloïdes alimentaires, soit 200 millions US\$ (Bixler, 1996). Leurs propriétés gélifiantes, texturantes et épaississantes sont utilisées dans les produits laitiers (flan, crème dessert, glace). Ce sont aussi des agents de suspension dans le lait cacaoté, les vinaigrettes et les jus de fruits avec pulpe. Ils peuvent servir de liants dans les produits carnés et pour contrôler la rétention de l'eau lors de la cuisson. Les carraghénanes sont aussi employés comme liants et texturants dans des produits cosmétiques (dentifrice, shampoing).

2. Activités biologiques des carraghénanes

Les activités biologiques des carraghénanes chez les mammifères sont interprétées par une ressemblance structurale avec les polysaccharides sulfatés animaux impliqués dans des mécanismes biologiques, les glycosaminoglycanes (GAGs), dont fait partie, par exemple, l'héparane sulfate (héparine) de structure D-glucuronate-2-sulfate / N-sulfo-D-glucosamine-6 (ou 2) sulfate.

Les principales activités biologiques des carraghénanes sont des propriétés anticoagulantes (Sen *et al.*, 1994; Farias *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2004), antitumorales (Parish *et al.*, 1987; Hoffman, 1993; Hoffman *et al.*, 1995) et antivirales. Les propriétés antivirales des carraghénanes s'expliqueraient par un blocage de l'adsorption des virus (HIV, Herpes simplex, Hépatite A) à la surface des cellules (Carlucci *et al.*, 1997; Carlucci *et al.*, 2002; Carlucci *et al.*, 2004). Le ι -carraghénane est le plus prometteur vis-à-vis du HIV pour une protection des muqueuses et est passé en test clinique (Elias *et al.*, 1997). L'activité antivirale des carraghénanes contre l'herpès augmenterait avec le poids moléculaire et le taux de sulfatation. Les λ -, μ - et ν -carraghénanes seraient donc les plus performants (Witvrouw *et al.*, 1994; Carlucci *et al.*, 1997; Kolender *et al.*, 1997).

	Mw kDa				Mn kDa	
	LALLS	LS	Sed-diff	GPC-LALLS	GPC-LALLS	Osm
kappa	353±25	331±26	332±25	323	165±25	142
lambda	614±17	600±25	500±45	664	123±9	131

Tableau 3 : Comparaison des différentes méthodes de mesure de diffusion de la lumière (Slootmaekers *et al.*, 1991).

Mw: Poids moléculaire moyen en poids ($M_w = \frac{\sum(c_i M_i^2)}{\sum c_i}$)

Mn: Poids moléculaire moyen en nombre ($M_n = \frac{\sum(c_i M_i)}{\sum c_i}$)

avec c_i : concentration massique, M_i : masse molaire

Polydispersité : M_w/M_n

LALLS: Low-Angle Laser Light Scattering, LS: Static light scattering, Sed-diff : Sedimentation, GPC-LALLS : Gel Permeation Chromatography - Low-Angle Laser Light Scattering, Osm: Pression osmotique

II. Analyse structurale des carraghénanes

Les premières publications traitant de l'analyse structurale des carraghénanes datent des années 1930. L'augmentation de l'utilisation des carraghénanes, notamment dans l'industrie alimentaire, a nécessité la mise en place de techniques d'analyse rapides et fiables pour relier les différentes structures de carraghénanes existantes à leurs propriétés physico-chimiques. Des recherches plus fondamentales ont aussi été menées sur la structure fine de carraghénanes extraits de différentes espèces d'algues pour mieux comprendre les voies de biosynthèse de la paroi, ou étudier l'influence sur la structure de la paroi, de l'espèce, de l'environnement ou du stade d'évolution de l'algue.

La conjugaison de différentes méthodes d'analyses permet d'obtenir la caractérisation des carraghénanes, ce qui implique la détermination de la conformation macromoléculaire, du poids moléculaire moyen, de la polydispersité et de la structure primaire des chaînes de carraghénanes. L'analyse d'une structure primaire réside en la détermination de la configuration (L/D) et de la conformation anomérique (α/β) des galactopyranoses, mais aussi de la position de leurs liaisons et de leurs substituants (méthyle, sulfate). Il s'agit ensuite de quantifier les différents galactopyranoses et de déterminer leurs enchaînements (liaisons 1 \rightarrow 4, 1 \rightarrow 3).

A. Détermination du poids moléculaire et de la polydispersité.

Le poids moléculaire et la polydispersité d'un carraghénane peuvent être mesurés, avec des résultats comparables, par des expériences de pression osmotique, de sédimentation ou de diffusion de la lumière (Slootmaekers *et al.*, 1991) (**Tableau 3**). Les poids moléculaires moyens M_w obtenus pour les carraghénanes, dans un état désorganisé, sont dans une gamme de 300-400 kDa pour les κ - et ι -carraghénanes (Slootmaekers *et al.*, 1991; Viebke *et al.*, 1995; Wittgren *et al.*, 1998), et de 600 kDa pour le λ -carraghénane (Slootmaekers *et al.*, 1991).

La détermination du poids moléculaire des carraghénanes est le plus souvent réalisée par l'analyse de la diffusion de la lumière par ces macromolécules. Le carraghénane extrait des algues étant le plus souvent polydisperse, une séparation préalable des différentes chaînes est réalisée par chromatographie d'exclusion de taille (SEC) ou plus récemment par FFF

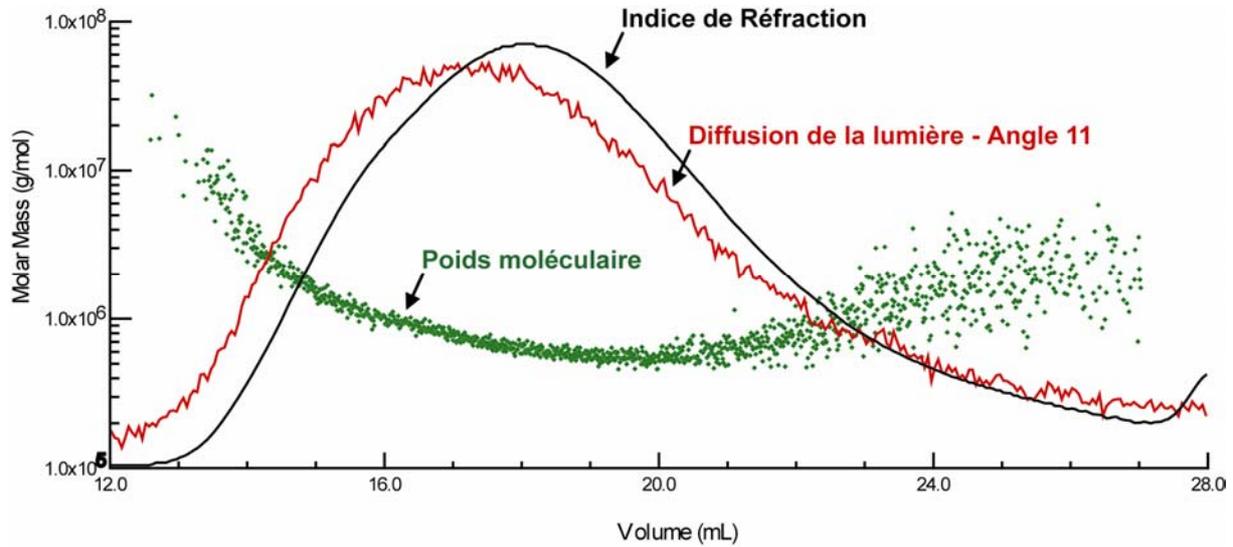


Figure 11 : Analyse des carraghénanes par HPSEC-MALLS.

La séparation des différentes chaînes de carraghénanes est effectuée selon leur taille par exclusion de taille (les chaînes de poids moléculaires les plus élevés étant éluées en premier). Au cours de l'élution, les indices de réfraction et la diffusion de la lumière des chaînes sont mesurés, permettant le calcul des poids moléculaires en nombre M_n et en poids M_w .

(Flow Field-Flow Fractionation). La SEC permet de séparer les chaînes de carraghénanes selon leur volume hydrodynamique. Il est possible de déterminer approximativement par cette méthode le poids moléculaire moyen des macromolécules par rapport à des standards. Mais des interactions entre la matrice du gel et les chaînes de carraghénanes peuvent conduire à la rétention des macromolécules ou même à leur dégradation, et être à l'origine de résultats erronés (Viebke *et al.*, 2000). Ces problèmes n'existent pas avec la FFF, qui permet de séparer, dans un capillaire, sans présence de matrice, les macromolécules de différentes tailles et formes, selon leur différence de coefficient de diffusion. La gamme de tailles de chaînes analysables par FFF (10^4 - 10^9 g/mol) est plus large que celle de la SEC (10^3 - 10^6 g/mol).

A la sortie de la SEC ou de la FFF, les concentrations des chaînes de différentes tailles sont déterminées par la mesure de leurs indices de réfraction (**Figure 11**). La diffusion de la lumière par les chaînes peut ensuite être mesurée par LALLS (Low-Angle Laser Light Scattering) (Vanneste *et al.*, 1996), WALLS (Wide-Angle)(Cuppo *et al.*, 2002; Reynaers, 2003) ou MALLS (Multi-Angles). La mesure de diffusion de la lumière permet d'accéder au calcul des poids moléculaires M_n et M_w et donc de la polydispersité du carraghénane. Les méthodes d'analyse HPSEC-MALLS (Viebke *et al.*, 1995) ou FFF-MALLS (Wittgren *et al.*, 1998; Viebke *et al.*, 2000) ont montré que le poids moléculaire des κ - et ι -carraghénanes doublait entre l'état de conformation désordonnée et l'état ordonné en hélices, traduisant des associations de chaînes.

B. Détermination des unités de répétition des carraghénanes.

1. Méthodes chimiques

Les méthodes chimiques ont été les premières méthodes utilisées pour caractériser les carraghénanes. Elles impliquent le plus souvent une première étape de dépolymérisation par hydrolyse acide.

Le dosage des oses totaux est généralement effectué par colorimétrie par la méthode acide sulfurique/phénol (Dubois *et al.*, 1956). Le dosage est corrigé, pour la présence des 3,6-anhydro-galactoses, par un dosage indépendant par la méthode au résorcinol (Yaphe *et al.*, 1965).

Le taux de sulfate des carraghénanes est déterminé par un dosage des sulfates libérés lors d'une hydrolyse acide. Le dosage est effectué par une précipitation des sulfates avec du chlorure de barium (Wong *et al.*, 1978) ou par un dosage par chromatographie d'échange

Introduction générale

	Sulphate % fraction poids sec	Sucres totaux % fraction poids sec	Composition monosaccharidique mol%			
			Gal	AG	Glc	Xyl
Kappa	20 %		50	50		
Iota	33 %		50	50		
Lambda	41 %		100	0		
<i>G. pistillata</i> gamétophyte	22,8	50,5	54,3	44,6	0,6	0,5
<i>G. pistillata</i> tétrasporophyte	31,9	34,7	93,8	0,6	4,8	0,8

Gal : Galactose, AG :3,6-anhydrogalactose, Glc : glucose, Xyl : xylose

Tableau 4 : Analyses chimiques de la composition des carraghénanes.

Composition théorique des κ -, ι et λ -carraghénanes et résultats expérimentaux obtenus pour le carraghénane extrait des formes gamétophytes et tétrasporophytes de *G. pistillata* (Amimi *et al.*, 2001).

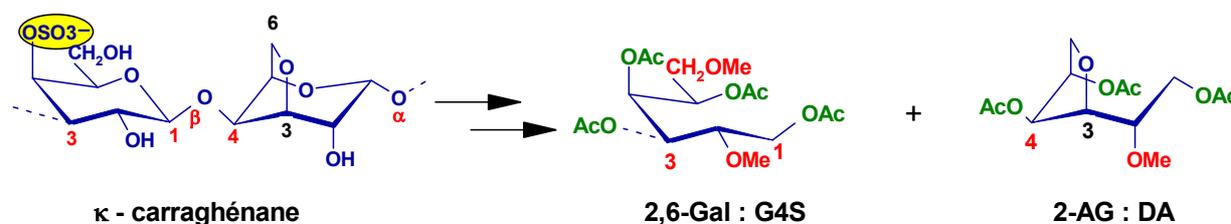


Figure 12 : Réaction de perméthylation du κ -carraghénane.

Le polymère a été méthylié, hydrolysé, réduit et acétylé en PMAA (Partially Methylated Alditol Acetate) qui sont ensuite analysés en chromatographie en phase gazeuse (Stevenson *et al.*, 1991).

	Liaison en 3					Liaison en 4			
	2,6-Gal	6-Gal	4,6-Gal	3/4-Gal	Gal	AG	2-AG	3/4-Gal	3,6-Gal
PMAA									
Structure	G4S	G2S,4S	G2S	G2S,6S *	GP,2S	DA2S	DA	D2S,6S*	D2S
kappa	50						50		
Iota	50					50			
lambda			50					50	
<i>G. pistillata</i> gamétophyte	52,4	0,7				16,8	23,5	6,6	
<i>G. pistillata</i> tétrasporophyte		6,4	10,4	39,5 *	11,0	6,5	0,0	39,5 *	24,3

2,6 Gal : 1,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-2,6-methyl-galactitol; **2-AG** : 1,5-di-*O*-acetyl-2-*O*-methyl-3,6-anhydrogalactitol

L'attribution des PMAA 3/4-Gal est ambiguë (indiquée par un astérisque).

Tableau 5 : Produits de perméthylation de différentes structures de carraghénanes.

PMAA (Partially Methylated Alditol Acetate) obtenus par perméthylation des κ -, ι et λ -carraghénanes et des carraghénanes extraits des formes gamétophytes et tétrasporophytes de *G. pistillata* (Amimi *et al.*, 2001).

d'anions (HPAEC) (colonne AS12), équipée d'une détection par conductimétrie (De Ruiter *et al.*, 1997). Les κ -, ι - et λ -carraghénanes présentent respectivement un, deux, et trois sulfates par motif disaccharidique, ce qui correspond à des taux de 20%, 33% et 41% (p/p) (De Ruiter *et al.*, 1997) (**Tableau 4**).

L'identification et la quantification des différents oses dosés peuvent être réalisées par deux méthodes, l'hydrolyse par double réduction ou l'hydrolyse réductrice (Stevenson *et al.*, 1991). Ces méthodes ont l'avantage de stabiliser les unités DA lors de l'hydrolyse acide, le pont 3,6-anhydro étant en effet facilement hydrolysable. Les oses réduits peuvent ensuite être directement analysés par chromatographie liquide (HPLC) sur colonne C₁₈ (Quemener *et al.*, 1998), ou être acétylés pour former des alditols acétates volatils et être analysables par chromatographie en phase gazeuse (CPG). L'identification des monosaccharides galactose (Gal : unités D et G) et anhydrogalactose (AG : unités DA) est effectuée par comparaison à des standards (**Tableau 4**). Cette analyse ne permet pas d'identifier la position des substituants sur les galactopyranoses car ils sont clivés lors de l'hydrolyse acide.

Afin de connaître la position des liaisons et des sites de substitution, une réaction de perméthylation est généralement effectuée (Stevenson *et al.*, 1991). Les hydroxyles libres des carraghénanes sont méthylés avant d'effectuer l'hydrolyse réductrice et l'acétylation. Les dérivés alditols acétylés partiellement méthylés obtenus sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse par impact d'électron (GC-EIMS). Les différentes structures correspondant au PMAA (Partially Methylated Alditol Acetate) les plus souvent rencontrées sont présentées **Tableau 5**. Les positions méthylées représentent les hydroxyles non substitués sur la chaîne de carraghénanes, et les positions acétylés, les hydroxyles substitués ou engagés dans les liaisons glycosidiques.

Les méthodes chimiques permettent donc d'identifier et de quantifier les différentes unités constituant les carraghénanes ainsi que les positions substituées et les sites de liaisons de ces unités. Mais elles n'apportent pas d'information sur l'enchaînement de ces différentes unités.

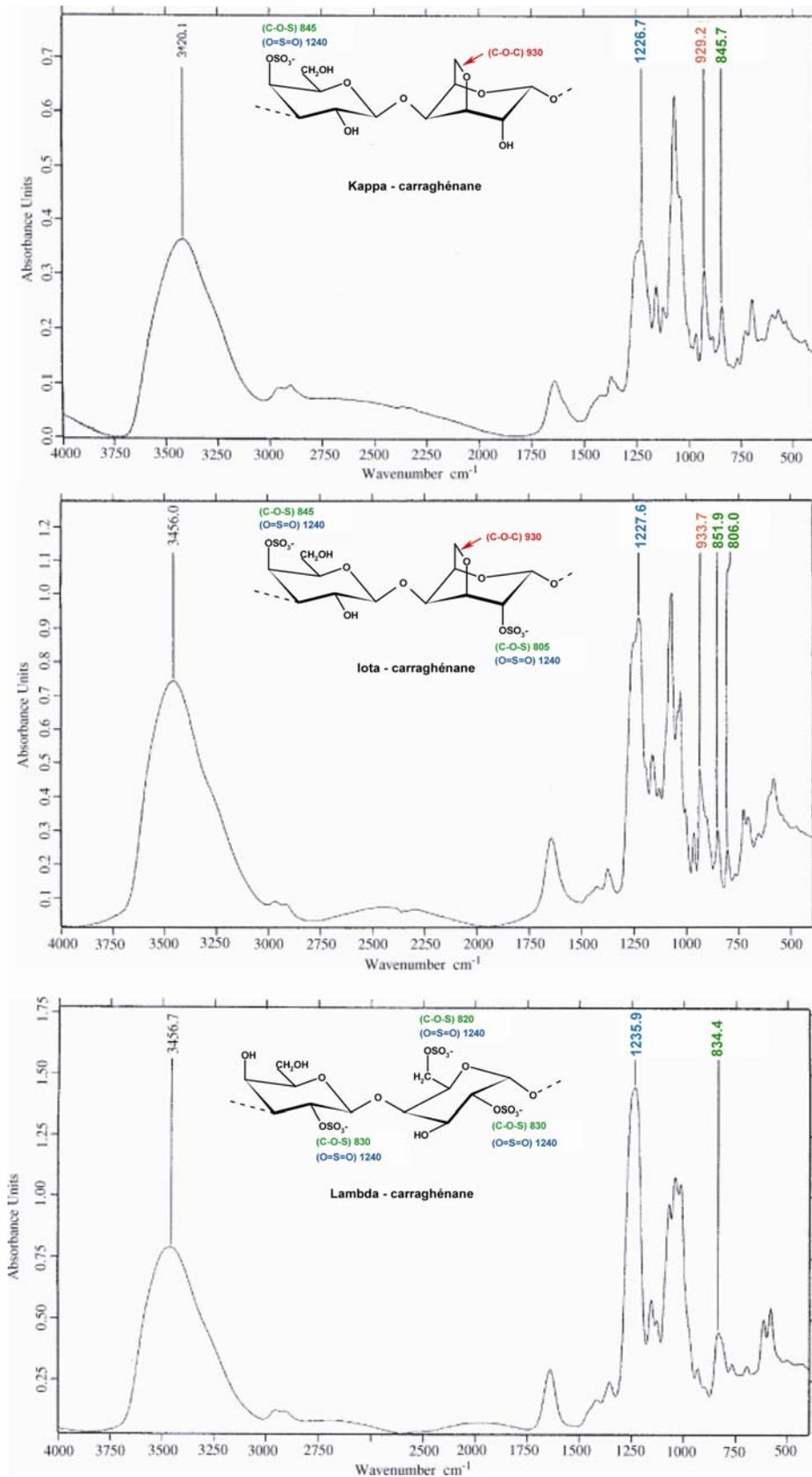


Figure 13 : Analyse Infra-Rouge des trois principales structures de carraghénanes.

Les bandes d'absorption caractéristiques sont indiquées (Prado-Fernandez *et al.*, 2003).

2. Méthodes spectroscopiques

a. Spectroscopie Infra-Rouge

L'analyse par Infra-Rouge ($400-4000\text{ cm}^{-1}$) des carraghénanes est une méthode communément utilisée pour identifier la nature des différentes unités de répétition constituant le carraghénane (Rochas *et al.*, 1986; Chopin *et al.*, 1993; Sekkal *et al.*, 1993; Turquois *et al.*, 1996; Prado-Fernandez *et al.*, 2003). Les bandes caractéristiques des vibrations des liaisons des groupements sulfates et du pont 3,6-anhydro sont présentes dans les régions $800-850$ et $930-1240\text{ cm}^{-1}$ (**Figure 13**).

Les spectres de κ - et ι -carraghénanes se distinguent par la bande d'absorption à 930 cm^{-1} caractéristique de la présence du pont 3,6-anhydro, ainsi qu'une bande à 845 cm^{-1} causée par la présence du groupement sulfate en position 4 sur l'unité G. Le ι -carraghénane présente en plus une bande d'absorption à 805 cm^{-1} causée par le groupement sulfate en position 2 de l'unité DA. Le spectre du λ -carraghénane est caractérisé par une bande intense à 830 cm^{-1} engendrée par les groupements sulfates en position 2 des unités G et D. La seconde sulfatation en 6 de l'unité D est représentée par une bande à 820 cm^{-1} .

L'intensité de l'absorption est proportionnelle à la concentration des espèces absorbantes. Il est ainsi possible de déterminer le taux des différents carraghénanes (κ , ι , λ) contenus dans un extrait, par les intensités relatives de la bande d'absorption de la liaison 3,6-anhydro, et des bandes d'absorption des différents groupements sulfates.

b. Spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)

L'utilisation de la ^{13}C -RMN pour l'élucidation des structures des agars et des carraghénanes a été introduite par Bhattacharjee *et al* en 1978. La ^1H -RMN a depuis été développée et nécessite un temps d'analyse beaucoup plus court et une quantité moins importante de substrat. L'analyse RMN est devenue l'outil de caractérisation des carraghénanes le plus communément utilisé. Elle est en effet non destructrice, rapide et permet d'obtenir une caractérisation des motifs disaccharidiques de répétition majoritaires des carraghénanes. L'inconvénient de cette méthode, dans le cas des carraghénanes, est la grande viscosité de ceux-ci en solution, ce qui cause un élargissement important des signaux, notamment dans le cas du λ -carraghénane (Falshaw *et al.*, 1994; Stortz *et al.*, 1994).

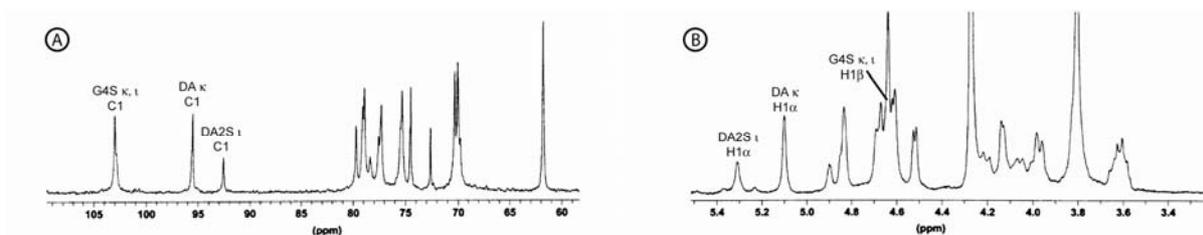


Figure 14 : Spectres (A) ^{13}C -RMN et (B) ^1H -RMN d'un κ/λ -carraghénane.

Les déplacements chimiques des carbones et protons anomériques sont indiqués (van de Velde *et al.*, 2001).

		C1	C2	C3	C4	C5	C6		C1	C2	C3	C4	C5	C6
μ^1	G4S	107.0	72.69	80.54	76.25	77.10	63.48	D6S	100.26	70.70	72.80	81.40	70.50	69.89
ν^1	G4S	106.7	72.40	82.42	73.36	77.15	63.58	D2S,6S	100.53	78.58	70.37	82.13	70.37	70.02
κ^1	G4S	104.7	71.72	80.98	76.25	77.00	63.49	DA	97.34	72.11	81.41	80.54	79.07	71.72
ι^1	G4S	104.43	71.53	79.06	74.34	77.04	63.52	DA2S	94.29	77.15	80.04	80.55	79.29	72.02
λ^1	G2S	105.61	79.61	77.99	66.35	76.51	63.45	D2S,6S	93.85	77.04	71.76	82.61	70.89	70.25
θ^1	G2S	102.57	79.8	79.4	69.97	77.05	63.38	DA2S	97.81	77.05	79.6	81.75	79.2	72.35
ξ^1	G2S	105.44			66.92			D2S	94.94					
ζ^1	G2S	106.9	72.7	81.1	67.8	77.5	63.3	D	98.3	71.3	73.0	80.6	72.6	63.6
γ^2	G	106.4			67.4			D6S	98.4					70.4
β^1	G	104.81	71.72	82.58	68.56	77.55	63.49	DA	96.81	72.40	81.64	80.33	79.26	71.72
α^3	G	104.8	71.7	84.0	69.0	77.4	63.7	DA2S	96.8	77.5	80.2	80.4	79.2	72.1
ω^4	G6S	104.8	71.5	82.4	68.1	75.0	69.3	DA	96.8	72.3	81.6	80.6	79.0	71.5
ψ^6	G6S	107.4	73.0	80.9	75.5	77.2	63.9	D6S	100.3	71.1	73.0	81.4	70.9	70.4
ς^5	GP	104.1	71.3	78.8	69.6	68.8	67.7	DA2S	93.5	77.3	80.0	80.5	79.2	72.1

Tableau 6 : Déplacements chimiques carbones (ppm) des carraghénanes.

Les déplacements sont exprimés en référence au DSS (diméthyl-silapentane-sulfonate) dans du D_2O . Les valeurs issues des références 2,3,4,5,6,7 ont été corrigées de 2,1 ppm pour être exprimées en référence au DSS au lieu du TMS (tétraméthylsilane). (1) (van de Velde *et al.*, 2004) 65 °C, (2) (Greer *et al.*, 1984a) 80 °C, (3) (Falshaw *et al.*, 1996) 50 °C, (4) (Usov *et al.*, 1985), (5) (Chiovitti *et al.*, 1998), 80 °C (6) (Ciancia *et al.*, 1993a), 65 °C, (7) (Usov *et al.*, 1980), 80 °C.

		H1	H2	H3	H4	H5	H6a	H6b		H1	H2	H3	H4	H5	H6a	H6b
ι^1	G4S	4.638	3.619	3.987	4.896	3.765	3.827	3.810	DA2S	5.302	4.673	4.836	4.691	4.666	4.248	4.095
κ^1	G4S	4.611	3.595	3.952	4.814	3.769	3.805	3.785	DA	5.091	4.125	4.505	4.625	4.605	4.187	4.045
α^2	G	4.61	3.62	3.82	4.10	3.65	-	-	D2S	5.22	4.61	4.73	4.65	4.67	4.21	4.09
λ^3	G2S								D2S,6S	5.548						
β^3	G								DA	5.074						
μ^3	G4S								D6S	5.238						
ν^3	G4S								D2S,6S	5.501						

Tableau 7 : Déplacements chimiques protons (ppm) des carraghénanes dans du D_2O .

(1) 80 °C (Welti, 1977), (2) 50 °C (Falshaw *et al.*, 1996), (3) 65 °C (van de Velde *et al.*, 2004).

La viscosité des solutions peut être néanmoins diminuée par dépolymérisation (sonication, hydrolyse acide) et par acquisition des données RMN à haute température.

La spectroscopie RMN permet de déterminer à la fois les structures des différents galactopyranoses composant le carraghénane, mais aussi celles des galactopyranoses voisins. Par exemple, les déplacements chimiques des différents protons et carbones d'une unité G4S ne seront pas les mêmes si l'unité G4S est entourée de deux unités DA ou de deux unités D6S, comme dans des structures κ - ou μ -carraghénanes respectivement (**Tableaux 6 et 7**).

La caractérisation s'effectue principalement par la mesure des valeurs des déplacements chimiques des carbones et protons anomériques (C1/H1) des différents motifs (**Figures 14**). Les C1/H1 sont en effet déblindés du fait des deux atomes d'oxygène électro-attracteurs liés au C1. Les C1 des unités G et D sont donc isolés dans la zone de déplacements chimiques 90-110 ppm et les H1 α des unités D dans la zone 5,0-5,7 ppm (Agrawal, 1992). Les valeurs obtenues sont comparées à celles des déplacements chimiques des motifs déjà caractérisés. Le calcul du pourcentage molaire des différents motifs présents est ensuite réalisé par l'intégration de ces signaux C1 ou H1 α .

Une synthèse des données ^{13}C -RMN et ^1H -RMN a été effectuée récemment par van de Velde (van de Velde *et al.*, 2004). En ^{13}C -RMN, les valeurs des déplacements chimiques des carbones des motifs disaccharidiques les plus souvent identifiés, sont désormais disponibles par référence au DSS (diméthyl-silapentane-sulfonate) (**Tableau 6**). En ^1H -RMN, une tentative d'attribution complète des protons a été réalisée uniquement pour les κ -, ι - et α -carraghénanes (Welti, 1977; Falshaw *et al.*, 1996) (**Tableau 7**). Pour les λ -, μ -, ν - et β -carraghénanes, seule la valeur du déplacement chimique du proton anomérique H1 α est connue (**Tableau 7**). Cette analyse incomplète des spectres ^1H -RMN s'explique dans le cas du λ -carraghénane par une importante viscosité en solution qui engendre un spectre ^1H -RMN peu résolu (Ciancia *et al.*, 1993b; Stortz *et al.*, 1994). Les motifs, autres que κ , ι et λ , sont souvent présents en quantité minoritaire dans l'une de ces structures, et leurs signaux sur les spectres ^1H -RMN ne sont pas assez intenses pour être totalement attribués. De plus, les signaux des protons, autres que H1 α , se superposent sous forme de doublet (ou dd) dans la zone restreinte de 3,5-5,5 ppm et sont difficilement interprétables (**Figure 14B**).

L'analyse par RMN des oligo-carraghénanes obtenus par hydrolyse enzymatique, a permis d'obtenir des spectres mieux résolus mais plus complexes (**Figure 15**). Cette complexité est causée par une variation des déplacements chimiques des motifs suivant leur position dans l'oligosaccharide : extrémité non réductrice (nr), interne et réductrice (r)

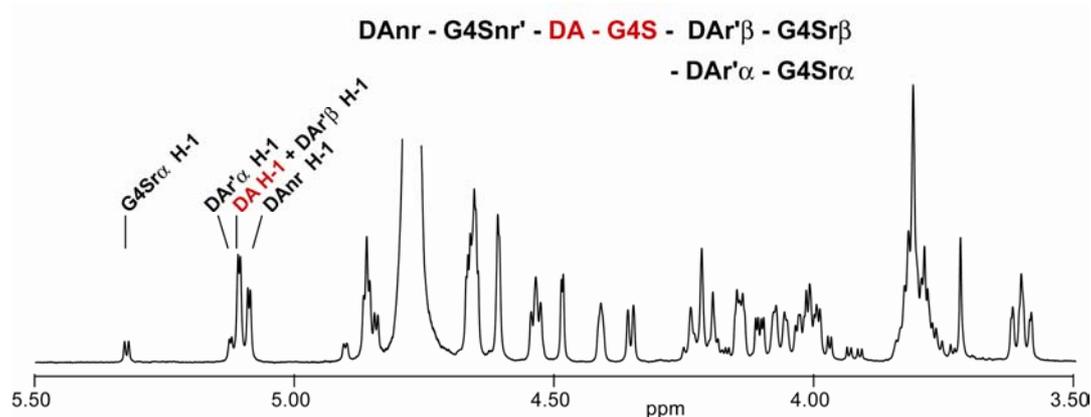


Figure 15 : Spectre ¹H-RMN du néo-κ-carrageaose (Knutsen *et al.*, 1992b).

Les déplacements chimiques des protons anomériques de configuration α sont indiqués.

		C1	C2	C3	C4	C5	C6		C1	C2	C3	C4	C5	C6
κ	G4S	104.1	71.1	80.1	75.5	76.4	62.9	DA	96.4	71.3	80.9	79.9	78.4	71.1
	G4Snr'	104.1	71.1	80.1	75.5	76.4	62.9	DAAnr	96.4	71.3	80.9	79.9	78.4	71.1
	G4Srα	94.1	69.0	77.0	76.65	71.3	63.2	Dar'α	96.4	71.1	82.6	71.75	79.1	70.75
	G4Srβ	98.3	72.35	80.1	75.6	76.3	63.1	Dar'β	96.4	71.1	82.6	71.75	79.1	70.75
ι	G4S	104.66	71.59	79.42	74.42	77.23	63.72	DA2S	94.43	77.31	80.15	80.85	79.20	72.21
	G4Snr'	104.58	71.59	79.42	74.42	77.23	63.72	DA2Snr	94.30	77.31	80.15	72.84	81.99	71.84
	G4Srα	94.59	69.49	76.04	75.40	72.86	63.94	DA2Srα	94.22	77.31	80.15	80.72	79.09	72.21
	G4Srβ	98.99	72.86	79.29	74.50	77.09	63.94	DA2Srβ	94.22	77.31	80.15	80.72	79.09	72.21

Tableau 8 : Déplacements chimiques carbones (ppm) des oligo-carraghénanes.

Déplacements chimiques à 30 °C dans le D₂O du néo-κ-carrageaose (Rochas *et al.*, 1983) et du néo-ι-carrageaose (Greer *et al.*, 1985) corrigés de 2,1 ppm pour être exprimés en référence au DSS, au lieu du TMS .

		H1	H2	H3	H4	H5	H6a	H6b		H1	H2	H3	H4	H5	H6a	H6b
hexa κ	G4S	4.660	3.599	4.013	4.855	4.817	3.800	3.800	DA	5.103	4.138	4.529	4.607	4.650	4.061	4.203
	G4Snr'	4.658	3.596	4.003	4.855	4.817	3.800	3.800	DAAnr	5.084	4.102	4.352	4.479	4.409	4.020	4.203
	G4Srα	5.320	3.917	4.165	4.901	4.186	3.790	3.731	Dar'α	5.120	4.142	4.535	4.607	4.650	4.061	4.234
	G4Srβ	4.654	3.593	3.983	4.835	3.774	3.783	3.783	Dar'β	5.103	4.142	4.535	4.607	4.650	4.061	4.234

Tableau 9 : Déplacements chimiques protons (ppm) dans D₂O du néo-κ-carrageaose à 30 °C (Knutsen *et al.*, 1992b).

		¹³ C-RMN	¹ H-RMN	CH ₃	Acétal	Carboxyle
Pyruvate	<chem>CC(=O)C(=O)[O-]</chem>			27.61	103.55	177.96
- OCH ₃				61.14		
				3.40-3.65		

Tableau 10 : Déplacements chimiques des principaux substituants des carraghénanes

Déplacements protons et carbones (ppm) caractéristiques des groupements pyruvates et méthyles dans D₂O à 65 °C par référence au DSS (Usov, 1984; van de Velde *et al.*, 2004).

(encart **Figure 15**). De plus il s'établit à l'extrémité réductrice, un équilibre entre les anomères α et β , qui peuvent s'interconvertir lors d'ouvertures et fermetures spontanées du cycle. Cette anomérie influence les déplacements chimiques de l'unité Gr de l'extrémité réductrice, mais aussi parfois les déplacements chimiques de l'unité Dr' voisine (Knutsen *et al.*, 1992b).

Les premiers spectres ^{13}C -RMN des oligo-carraghénanes ont été réalisés sur la série néo- κ -carrabiose (McLean *et al.*, 1979a; Bellion *et al.*, 1982), mais l'attribution complète des spectres ^1H -NMR et ^{13}C -RMN n'a été effectuée que quelques années plus tard (Knutsen *et al.*, 1992b) (**Tableaux 8 et 9**). Les néo- ι -carrabioses ont aussi été purifiés puis analysés par ^{13}C -RMN, mais les données ^1H -RMN ne sont que partielles (Bellion *et al.*, 1982; Rochas *et al.*, 1983; Greer *et al.*, 1985) (**Tableaux 8**). L'analyse des spectres de haute résolution d'oligo-carraghénanes a permis de confirmer les attributions des signaux des polymères. Les déplacements chimiques des motifs internes des oligosaccharides de $\text{DP} \geq 6$ (encart **Figure 15**) sont en effet similaires aux signaux analysés sur le spectre du polymère correspondant.

La position des différents substituants (sulfate, méthyle) des galactanes est déterminée par comparaison avec le galactane non substitué correspondant (Usov, 1984). Les déplacements ^{13}C -RMN du κ -carraghénane désulfaté (β : G-DA) et du λ -carraghénane désulfaté (G2S-D) ont pu servir de référence (Usov *et al.*, 1980). La méthylation ou la sulfatation, comme la glycosylation, d'un groupement hydroxyle cause un déblindage (8-11 ppm) du carbone auquel il est lié (effet α du substituant) alors que les 2 carbones voisins sont blindés (2-4 ppm) (effet β) (Usov, 1984). L'effet de la sulfatation peut être observé en comparant par exemple les β - et κ -carraghénanes (G-DA et G4S-DA) ou les κ - et ι -carraghénanes (G4S-DA et G4S-DA2S) (**Tableau 6**). La sulfatation cause aussi un déblindage du proton géminale de 0,6 ppm et son effet sur les protons vicinaux dépend de l'orientation axiale/équatoriale des deux groupements (Harris *et al.*, 1970) (**Tableau 7**). La présence de groupements méthylés est principalement identifiable par le signal singulet du CH_3 , vers 61 ppm en ^{13}C -RMN et dans la région 3,40-3,65 ppm en ^1H -RMN. La présence de groupements pyruvates est aussi détectée par des signaux caractéristiques (**Tableau 10**).

En mesurant le couplage scalaire (3J) des protons anomériques H1, il est possible de déterminer la configuration α ou β de la liaison. La valeur de ce couplage dépend de l'angle dièdre H1-C1-C2-H2, formé entre les H1 et H2 éloignés de 3 liaisons (courbe de Karplus).

	ι-carraghénane		κ-carraghénane		κ-κ-κ		
	G4Sβ	DA2Sα	G4Sβ	DAα	G4Sβ	G4Srα	DAα
$^3J_{H1-H2}$	9.5	1.5	7.8	2.0	7.9	3.9	2.4
$^3J_{H2-H3}$	8.5	6.0	9.5	5.1	9.9	10.3	5.4
$^3J_{H3-H4}$	3.0	1.0	3.0	0.4	3.3	3.1	TS
$^3J_{H4-H5}$	1.0	3.0	1.25	2.1	0.95	TS	1.9
$^3J_{H5-H6a}$	8.0	2.0	8.0	3.0	8.2	4.4	3.1
$^3J_{H5-H6b}$	4.25	3.0	4.3	3.0	4.3	8.1	TS
$^2J_{H6a-H6b}$	-12.0	-10.5	-12.0	-9.5	-12.0	-11.9	-10.6

TS : constante trop petite pour être mesurée.

Tableau 11 : Constantes de couplages spin-spin des spectres ^1H -RMN des carraghénanes.

Constantes de couplages caractéristiques des polymères κ- et ι-carraghénanes (Welti, 1977). Les constantes de couplages observées pour les oligo-κ-carraghénanes (Knutsen *et al.*, 1992b) sont comparables à celles du polymère κ-carraghénane, excepté pour l'extrémité réductrice G4Srα particulière.

Les unités D ou DA de conformation anomérique α , ont un angle dièdre H1-C1-C2-H2 d'environ 60° , ce qui correspond à un couplage scalaire $^3J_{\text{H1-H2}}$ relativement faible de 2-4 Hz (**Tableau 11**). Les unités G de conformation anomérique β ont un angle dièdre de 180° et le doublet du H1 sera observé vers 4,4-4,8 ppm avec un $^3J_{\text{H1-H2}}$ de 7-9 Hz (Agrawal, 1992). Les couplages ($^2J - ^3J$) mesurés entre les autres protons des unités des κ - et ι -carraghénanes sont présentés **Tableau 11**.

Les analyses RMN 2D HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) permettent aussi d'établir l'enchaînement des différentes unités par les liaisons α -(1 \rightarrow 3) et β -(1 \rightarrow 4). Dans le cas de la liaison β -(1 \rightarrow 4) des carraghénanes, il est possible de voir les taches de corrélations entre le C1 (H1) de l'unité G et le H4 (C4) de l'unité D confirmant ainsi la nature de la liaison.

La spectrométrie RMN permet donc une identification et une quantification des différents motifs disaccharidiques de carraghénanes présents majoritairement dans un mélange. Mais l'identification des constituants mineurs (<5%) du polysaccharide, pouvant influencer ses propriétés physico-chimiques, est par contre difficile. Leurs signaux sont, en effet, masqués par le bruit de fond du spectre RMN. De plus, on ne peut savoir si les différents motifs observés par RMN sont présents sur des chaînes différentes de carraghénanes, ou s'ils sont liés par des liaisons glycosidiques dans une même chaîne.

3. Analyse par spectrométrie de masse des oligo-carraghénanes.

La caractérisation des oligo-carraghénanes issus de dépolymérisation acide douce ou enzymatique permet d'obtenir des informations sur les différentes unités composant la structure du polymère. Le caractère multi-sulfaté des oligo-carraghénanes a nécessité le développement de techniques de spectrométrie de masse spécifiques.

a. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry (ESI-MS)

Les premières analyses de spectrométrie de masse sur des oligo-carraghénanes ont été effectuées sur des oligo- κ -carraghénanes purifiés (Ekeberg *et al.*, 2001). Les oligosaccharides, solubilisés dans la phase mobile volatile, sont ionisés par electrospray en ions de charges variables. Ils sont ensuite séparés, suivant leur rapport m/z, dans un système dispersif

	MS m/z
$[\text{DA-G4S}]^-$	403
$[(\text{DA-G4S})_2]^{2-}$	394
$[(\text{DA-G4S})_3]^{3-}$	391
$[(\text{DA-G4S})_4]^{4-}$	390
$[(\text{DA-G4S})_2(\text{DA-G4S})]^{4-}$	313
$[(\text{DA-G4S})_5]^{5-}$	389
$[(\text{DA-G4S})_3(\text{DA-G4S})]^{5-}$	328
$[(\text{DA-G4S})_6]^{6-}$	388
$[(\text{DA-G4S})_4(\text{DA-G4S})]^{6-}$	337

Tableau 12 : Ions majoritaires des oligo-carraghénanes obtenus par spectrométrie de masse par ESI en mode d'ionisation négative (Ekeberg *et al.*, 2001).

triple-quadripôle et analysés par le spectromètre en mode négatif, en raison des groupements sulfates. Le signal majoritaire est celui de l'ion avec tous les sulfates déprotonés (**Tableau 12**).

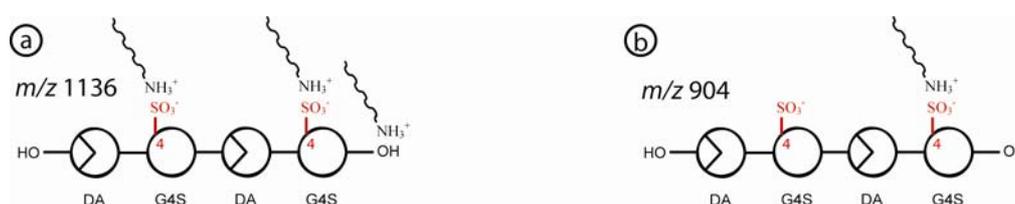
Le taux de sulfatation élevé des carraghénanes entraîne des problèmes d'analyse. Des réactions de désulfatation peuvent avoir lieu dans le spectromètre en raison du voltage élevé du cône et/ou des réactions chimiques peuvent intervenir avec la phase mobile. La proportion des molécules désulfatées augmente avec la taille de l'oligosaccharide.

b. MALDI-TOF (Matrice Assisted Laser Desorption/Ionisation / Time Of Flight)

Les meilleurs résultats de MALDI-TOF ont été obtenus en mode négatif en mélangeant les oligo-carraghénanes avec une matrice nor-harmane (Fukuyama *et al.*, 2002; Antonopoulos *et al.*, 2005b). Le principal inconvénient du MALDI pour l'analyse des oligo-carraghénanes est de fournir uniquement des ions monochargés $[M-Na]^+$, par collision des oligo-carraghénanes avec la matrice excitée, après leur évaporation en phase gazeuse sous l'effet du laser. Ces ions monochargés $[M-Na]^+$ possèdent majoritairement des groupements sulfates non déprotonés, SO_3H , qui se fragmentent facilement, laissant une structure comportant un unique sulfate déprotoné, SO_3^- . Cette méthode ne permet donc pas de distinguer des structures se différenciant par la position ou le taux de leurs sulfates comme les structures kappa (DA-G4S) et iota (DA2S-G4S). Mais des structures iota (DA2S-G4S) et nu (D2S,6S-G4S) peuvent être distinguées car elles ne possèdent pas le même squelette.

c. Couplage LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)

La séparation et la caractérisation des oligo-carraghénanes par un couplage LC-MS sont désormais réalisables (Antonopoulos *et al.*, 2004a; Antonopoulos *et al.*, 2005a). Il a fallu mettre au point une méthode de couplage spécifique, le taux de sulfatation élevé des oligo-carraghénanes écartant les méthodes habituellement utilisées (échangeuse d'anions, colonne graphite poreuse). Bien qu'effectuant une séparation correcte des différents oligo-carraghénanes, ces méthodes nécessitaient, entre autres, une phase mobile trop concentrée en sels pour être couplée à la spectrométrie de masse (Antonopoulos *et al.*, 2004a; Antonopoulos *et al.*, 2004b).



	Mode d'ionisation positif LC-ESI-MS		Mode d'ionisation négative LC-ESI-MS	
		m/z		m/z
κ DP2	$[\text{DA-G4S}+(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3^+)_2]^+$	635	$[\text{DA-G4S}]^-$	403
κ DP4	$[(\text{DA-G4S})_2+(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3^+)_3]^+$	1136	$[(\text{DA-G4S})_2+\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3^+]^-$	904
κ DP6	$[(\text{DA-G4S})_3+(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3^+)_4]^+$	1637	$[(\text{DA-G4S})_3+(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3^+)_2]^-$	1405
ι DP4	$[(\text{DA2S-G4S})_2+(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3^+)_5]^+$	1526	$[(\text{DA2S-G4S})_2+(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3^+)_3]^-$	1294
ι DP6	$[(\text{DA2S-G4S})_3+(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3^+)_7]^+$	2224	$[(\text{DA2S-G4S})_3+(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}_3^+)_5]^-$	1991

Tableau 13 : Ions identifiés pour les oligo- κ -carraghénanes et oligo- ι -carraghénanes en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (colonne Alltima C₁₈) en modes d'ionisation négative et positive.

Les m/z indiquées sont celles des oligo- κ -carraghénanes associés à des molécules d'heptilamide (Antonopoulos *et al.*, 2004a; Antonopoulos *et al.*, 2005a).

C'est la technique LC/ESI-MS par paires d'ions sur phase C₁₈ qui a été retenue pour la séparation et la caractérisation des oligo-carraghénanes. La phase inverse apolaire C₁₈ est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 18 atomes de carbone (C₁₈). Pour que les carraghénanes soient retenus par cette colonne, il faut utiliser un agent d'appariement d'ions de charge positive pour les rendre plus hydrophobes et augmenter leur rétention. Le choix s'est porté sur l'heptilamine qui augmente fortement la rétention des oligo-carraghénanes et possède une chaîne alkyle assez courte pour être encore volatile. L'élution est réalisée par un gradient du modificateur organique polaire, le MeOH pour les oligo- κ - et ι -carraghénanes et le MeCN, plus éluant, pour les oligo- λ -carraghénanes.

En mode d'ionisation négative, le nombre de molécules d'heptilamine fixées à l'oligosaccharide est inférieur au nombre de groupements sulfates, la charge négative est donnée par les sulfates n'ayant pas fixée d'heptilamine (**Tableau 13**). En mode positif, tous les groupements sulfates sont neutralisés par les molécules d'heptilamine et les charges positives sont portées par les molécules d'heptilamine supplémentaires, la charge maximale observée étant de 2 (**Tableau 13**). Les oligo- κ -carraghénanes ont pu être détectés jusqu'au DP18 en mode négatif et jusqu'au DP9 en mode positif.

Une des formes ioniques des oligo-carraghénanes peut ensuite être sélectionnée et fractionnée par CID-MS/MS (Collision Induced Dissociation) en mode négatif (Antonopoulos *et al.*, 2005a). Ce fractionnement permet de confirmer la structure de l'oligosaccharide déduite de l'analyse ESI-MS.

Bactéries	Taille (kDa)	Produits terminaux	Mode d'action	Références	Séquençage	Surexpression	Identification Famille, structure
κ-carraghénase							
Souche 2,3,4,6	nd	κ DP2, DP4	β(1,4)	(Bellion <i>et al.</i> , 1982)	-	-	-
Souche 7	nd	κ DP4, DP6	β(1,4)	(Bellion <i>et al.</i> , 1982)	-	-	-
Souche 5	36,5	κ DP2, DP4	β(1,4)	(Bellion <i>et al.</i> , 1982) Greer, 1984	-	-	-
<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i> (souche 9, Bellion 82)	32,6*	κ DP2, DP4	β(1,4) Rétention Endo-processive	(Weigl <i>et al.</i> , 1966) (McLean <i>et al.</i> , 1979) (Potin <i>et al.</i> , 1995)	(Barbeyron <i>et al.</i> , 1994)	(Michel <i>et al.</i> , 1999)	GH16 – GH B Sandwich β (Michel <i>et al.</i> , 2001)
<i>Zobellia galactanivorans</i> (<i>Cytophaga drobachiensis</i> souche Dfi)	31,7*	κ DP4, DP6	β(1,4) Rétention Endo-processive	(Potin <i>et al.</i> , 1991)	(Barbeyron <i>et al.</i> , 1998)	-	GH16
ι-carraghénase							
Souche 2,3,4	nd	ι DP2, DP4	β(1,4)	(Bellion <i>et al.</i> , 1982)	-	-	-
Souche 5	59	ι DP2, DP4	β(1,4)	(Bellion <i>et al.</i> , 1982) Greer, 1984	-	-	-
<i>Alteromonas fortis</i> (souche 1, Bellion 82)	51,9*	ι DP4, DP6	β(1,4) Inversion Endo-processive	(Bellion <i>et al.</i> , 1982) Greer, 1984	(Barbeyron, 1993; Barbeyron <i>et al.</i> , 2000)	(Michel <i>et al.</i> , 2000)	GH82 Hélice β (Michel <i>et al.</i> , 2001)
<i>Zobellia galactanivorans</i>	51,3*	ι DP4, DP6	β(1,4) Inversion Endo-processive	(Potin <i>et al.</i> , 1991) (Barbeyron <i>et al.</i> , 2000)	(Barbeyron, 1993; Barbeyron <i>et al.</i> , 2000)	-	GH82
λ-carraghénase							
<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i> (souche 9, Bellion 82)	98	Non identifiés	-	(Weigl <i>et al.</i> , 1966; McLean <i>et al.</i> , 1979) (Johnston <i>et al.</i> , 1973)	(Colin, 2005)	Faible surexpression (Colin, 2005)	-

Tableau 14 : Etat actuel des connaissances sur les carraghénases natives et surexprimées
 Lorsque les carraghénases ont été séquencées, la taille indiquée est celle de leur forme mature (astérisque)

III. Les carraghénases

A. Généralités

Les enzymes qui dégradent spécifiquement les carraghénanes sont appelées carraghénases. Elles catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques entre les deux unités galactopyranoses ; ce sont des glycosides hydrolases (GH). Chaque carraghénase caractérisée est identifiée par un numéro EC dans la classification IUB-MB, basée sur le mécanisme et sur la spécificité de substrat. La κ -carraghénase a pour code EC 3.2.1.83 et la ι -carraghénase EC 3.2.1.157. Le premier numéro correspond au type de réaction (Hydrolyse), le second numéro indique la nature de la liaison hydrolysée (glycosyl), le troisième spécifie la nature du substrat (O-glycosyl) et le dernier numéro est celui du substrat (κ -carraghénane, ι -carraghénane).

La première activité carraghénolytique a été détectée dans l'appareil digestif d'invertébrés marins qui puisaient leur ressource en carbone de la dégradation des parois des algues rouges (Mori, 1939; Mori, 1943). Jusqu'à ce jour aucune carraghénase n'a été identifiée chez les algues rouges elles-mêmes, bien que leur existence soit probable. Par contre, le rôle prédominant de plusieurs bactéries marines, dans la dégradation naturelle des algues, a été établi (**Tableau 14**). *Pseudoalteromonas carrageenovora* a été la première bactérie carraghénolytique isolée en 1955 (Yaphe *et al.*, 1955). Elle produit deux carraghénases avec des activités différentes, la κ -carraghénase (Weigl *et al.*, 1966b; McLean *et al.*, 1979a) et la λ -carraghénase (Weigl *et al.*, 1966b; Johnston *et al.*, 1973). La première activité ι -carraghénase a été trouvée chez la bactérie marine *Alteromonas fortis* (ancienne Souche 1, selon Bellion) isolée de la surface de l'algue *E. spinosum*. Cette bactérie montre à la fois des activités κ - et ι -carraghénases (Bellion *et al.*, 1982; Greer *et al.*, 1984c), de même qu'une autre bactérie plus récemment découverte, *Zobellia galactanivorans* (Potin *et al.*, 1991; Barbeyron *et al.*, 1998; Barbeyron *et al.*, 2000).

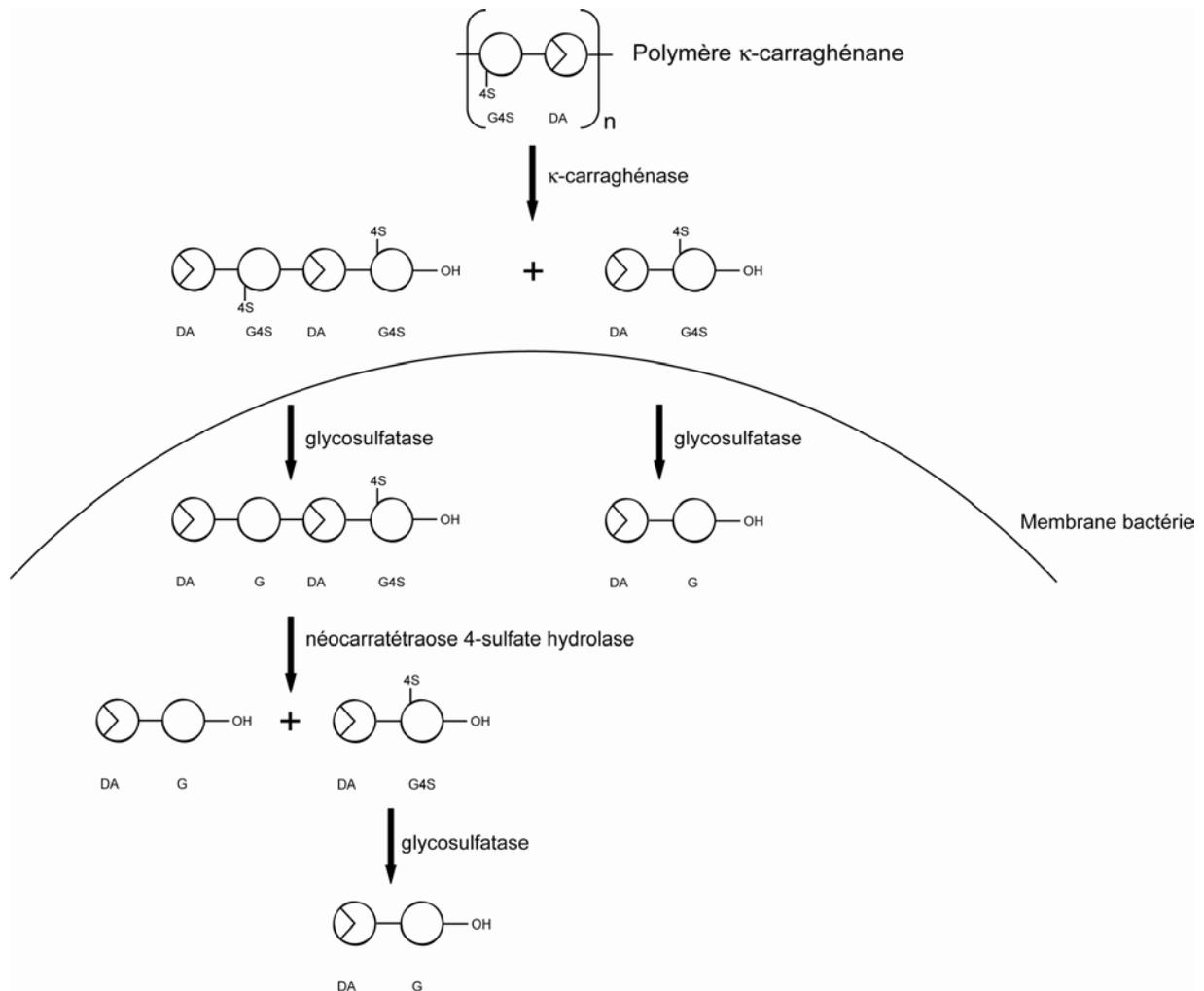


Figure 16 : Voie de dégradation du κ -carraghénane.

La dégradation est effectuée par les enzymes de la bactérie *P. carrageenovora* (McLean *et al.*, 1979a; McLean *et al.*, 1979b; McLean *et al.*, 1981)

L'hydrolyse des carraghénanes par les carraghénases serait la première étape de la voie de dégradation des carraghénanes par les bactéries. Les enzymes participant à la dégradation du κ -carraghénane ont été isolées chez *P. carrageenovora* (McLean *et al.*, 1979a; McLean *et al.*, 1979b; McLean *et al.*, 1981) (**Figure 16**). Les κ -carraghénases couperaient d'abord les liaisons β -(1 \rightarrow 4) des chaînes polymériques de κ -carraghénanes en disaccharide DA-G4S et tétrasaccharide DA-G4S-DA-G4S. Ces oligosaccharides diffuseraient ensuite à travers la membrane extérieure des bactéries carraghénolytiques. Les oligosaccharides seraient désulfatés par une glycosulfatase, localisée dans le périplaste, en DA-G et DA-G-DA-G4S. Ce tétrasaccharide serait ensuite hydrolysé par une néocarratétrase-4-sulfate hydrolase en disaccharides DA-G et DA-G4S, ce dernier étant ensuite désulfaté par une glycosulfatase. Le produit limite de la dégradation identifié est donc le DA-G dont le processus de dégradation n'est pas élucidé, mais qui impliquerait probablement une ouverture du pont 3,6-anhydro et l'action d'une galactosidase. Les voies de dégradation des autres carraghénanes n'ont pas été identifiées à ce jour mais un schéma de dégradation similaire est probable.

B. La κ -carraghénase

1. De la κ -carraghénase native à la κ -carraghénase recombinante.

Les productions des κ -carraghénases de *P. carrageenovora* et *Z. galactanivorans* ont été induites, respectivement, en présence de κ -carraghénane (Weigl *et al.*, 1966b) et de λ -carraghénane (Potin *et al.*, 1991). Ces κ -carraghénases ont été purifiées à partir des surnageants de culture et leurs poids moléculaires ont été estimés à 35 kDa pour la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* (McLean *et al.*, 1979a), et 40 kDa pour celle de *Z. galactanovorans*. Les profils d'activité de ces deux κ -carraghénases ont montré un maximum d'activité respectivement à un pH de 8 (McLean *et al.*, 1979a) et de 7,2 (Potin *et al.*, 1991) et à une température de 40 °C.

Les κ -carraghénases de *P. carrageenovora* et *Z. galactanivorans* ont ensuite été séquencées et la comparaison des gènes a indiqué que ces protéines étaient homologues (Barbeyron *et al.*, 1994; Barbeyron *et al.*, 1998). Ces κ -carraghénases appartiennent à la famille 16 des glycosides hydrolases. Cette classification en famille structurale se base sur les similarités de séquence et sur la conservation des acides aminés catalytiques (classification CAZY - Carbohydrates Actives enZYmes) (Henrissat *et al.*, 1997). Les gènes correspondants

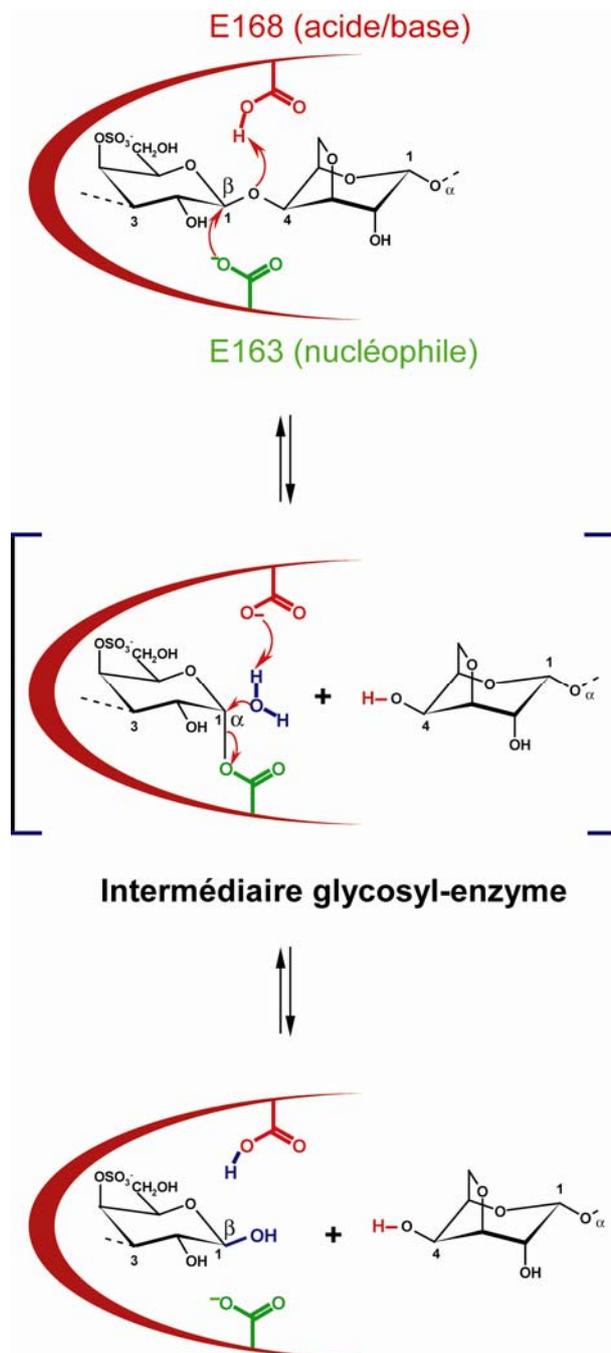


Figure 17 : Mécanisme de coupure des κ -carraghénases.

La κ -carraghénase de *P. carrageenovora* coupe les liaisons glycosidiques du κ -carraghénane avec une rétention de la configuration anomérique. Les deux acides aminés catalytiques E163 et E168 du site actif de la κ -carraghénase sont représentés.

aux formes matures des κ -carraghénases de *P. carrageenovora* et *Z. galactanivorans* sont de 31,7 kDa et 32,6 kDa respectivement (Potin *et al.*, 1995; Barbeyron *et al.*, 1998). Le gène correspondant à la forme mature de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* a été cloné et la protéine surexprimée chez *E. coli* (Michel *et al.*, 1999).

2. Mécanisme de coupure des κ -carraghénases.

Les κ -carraghénases coupent spécifiquement les liaisons β -(1 \rightarrow 4) du κ -carraghénane. En effet les produits limites de ces enzymes ont été caractérisés par RMN comme appartenant à la série néo- κ -carrabiose. Les produits limites de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* sont les néo- κ -carrabiose et néo- κ -carratétraose (Weigl *et al.*, 1966a; McLean *et al.*, 1979a; Bellion *et al.*, 1982; Rochas *et al.*, 1983), et ceux de la κ -carraghénase de *Z. galactanivorans* sont le néo- κ -carratétraose et le néo- κ -carrahexaose (Potin *et al.*, 1991). Ce qui suppose que les substrats minimum de ces enzymes pour une fixation productive (reconnaissance et coupure) soient respectivement un néo- κ -carrahexaose et un néo- κ -carraoctaose.

La κ -carraghénase, comme les autres glycosides hydrolases de la famille 16 (GH 16), agit avec une rétention de la configuration anomérique (**Figure 17**). Ce mécanisme a été démontré par l'apparition du néo- κ -carratétraose d'anomérie β , lors du suivi cinétique par RMN de l'hydrolyse du néo- κ -carrahexaose (Potin *et al.*, 1995).

La rétention de configuration du carbone anomérique lors de l'hydrolyse est la conséquence d'un mécanisme de substitution nucléophile de type S_N1 , à deux étapes (McCarter *et al.*, 1994; Davies *et al.*, 1995). La première étape est une attaque du groupement carboxyle nucléophile sur le carbone anomérique, avec coupure simultanée de la liaison RO^- activée par sa neutralisation par le groupement carboxyle acide. Cette étape aboutit à la formation d'un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme. Le groupement carboxyle acide/base capture ensuite un proton d'une molécule d'eau, activant ainsi le nucléophile OH^- , qui attaque le carbone anomérique, hydrolysant l'intermédiaire glycosyl-enzyme. Cette seconde étape peut être une transglycosylation si le groupement nucléophile est issu, non pas d'une molécule d'eau HO^- , mais d'un galactopyranose RO^- .

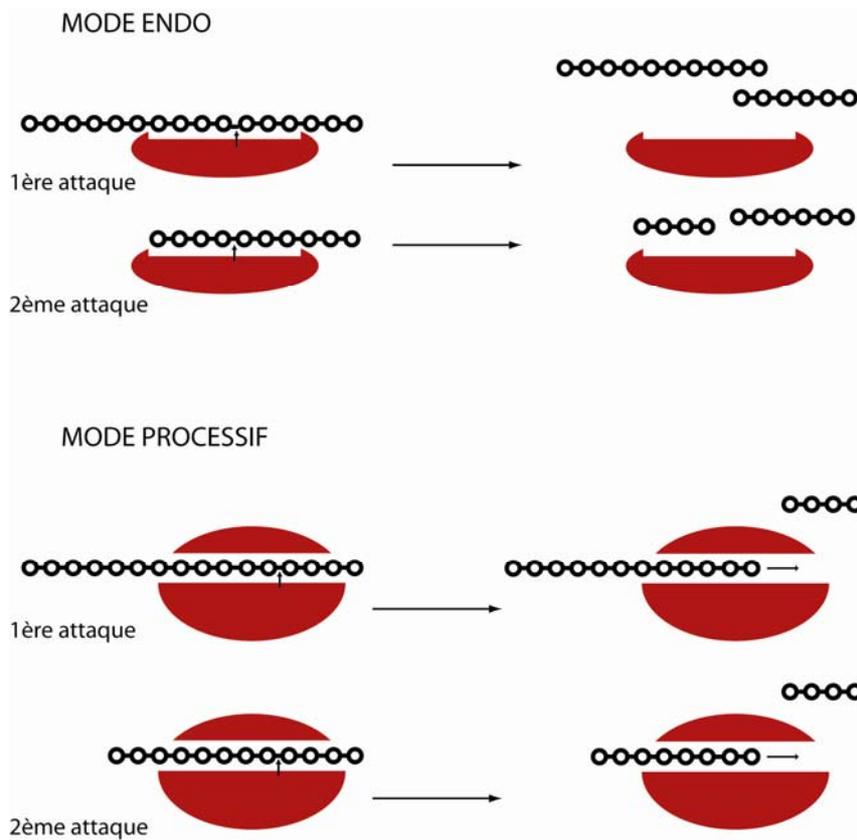


Figure 18 : Schématisation des modes d'action endo et processif des glycoside hydrolases.

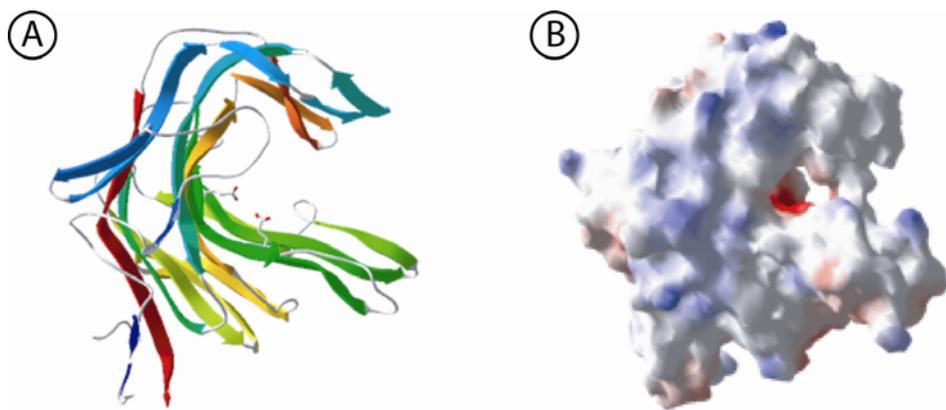


Figure 19 : Structure secondaire de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora*.

(A) Représentation en ruban du repliement sandwich β . (B) Surface moléculaire colorée suivant les potentiels électrostatiques du bleu foncé (+) au rouge (-) Visualisation de la topologie en tunnel du site actif (Michel *et al.*, 2001b).

La résolution de la structure de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* par diffraction des rayons X (Michel *et al.*, 2001b) a confirmé l'identification des deux acides aminés catalytiques du site actif participant à l'hydrolyse de la liaison β -(1 \rightarrow 4), l'acide aminé nucléophile est le glutamate E163, et l'acide aminé acide/base le glutamate E168. Ils sont séparés par une distance de 5,4 Å, distance couramment rencontrée chez une enzyme avec un mécanisme de rétention de configuration (McCarter *et al.*, 1994; Davies *et al.*, 1995).

3. Mode d'action des κ -carraghénases

Les premières études biochimiques des κ -carraghénases suggèrent un mode d'action endo (Weigl *et al.*, 1966a; McLean *et al.*, 1979a; Knutsen *et al.*, 2001). Elles se lient aléatoirement le long de la chaîne polysaccharidique, et après chaque coupure de liaison, elles se décrochent de la chaîne et peuvent cliver une nouvelle chaîne (**Figure 18**). Ce mode d'action se caractérise par une chute rapide du poids moléculaire du carraghénane et une baisse rapide de la viscosité.

La κ -carraghénase adopte un repliement en sandwich β constitué de deux feuillets β antiparallèles (Michel *et al.*, 2001b) (**Figure 19**). Ce repliement est commun aux enzymes de la famille GH16, dont font aussi partie les β -agarases (EC 3.2.1.81). Ce repliement forme une cavité profonde dans laquelle se fixe la chaîne κ -carraghénane. La gorge catalytique est recouverte par deux feuillets β associés, conférant à l'enzyme une topologie de site actif en tunnel. Cette topologie tunnel suggère que la κ -carraghénase pourrait agir selon un mode endo-processif (Michel *et al.*, 2001b) (**Figure 18**). Après une coupure endo, la κ -carraghénase fixerait la chaîne de κ -carraghénane dans le tunnel, et progresserait par processivité le long de celle-ci, de l'extrémité réductrice vers l'extrémité non réductrice, jusqu'au prochain site de coupure. L'enzyme devant se déplacer de 4 unités avant de retrouver la même géométrie de chaîne dans le site actif, il est supposé que cette progression s'effectue par « saut » avec un élargissement passager du tunnel. La taille du tunnel ne laisse de la place que pour une seule chaîne de κ -carraghénane, ce qui soulève la question de la séparation des chaînes et des doubles hélices par l'enzyme (Michel *et al.*, 2001b).

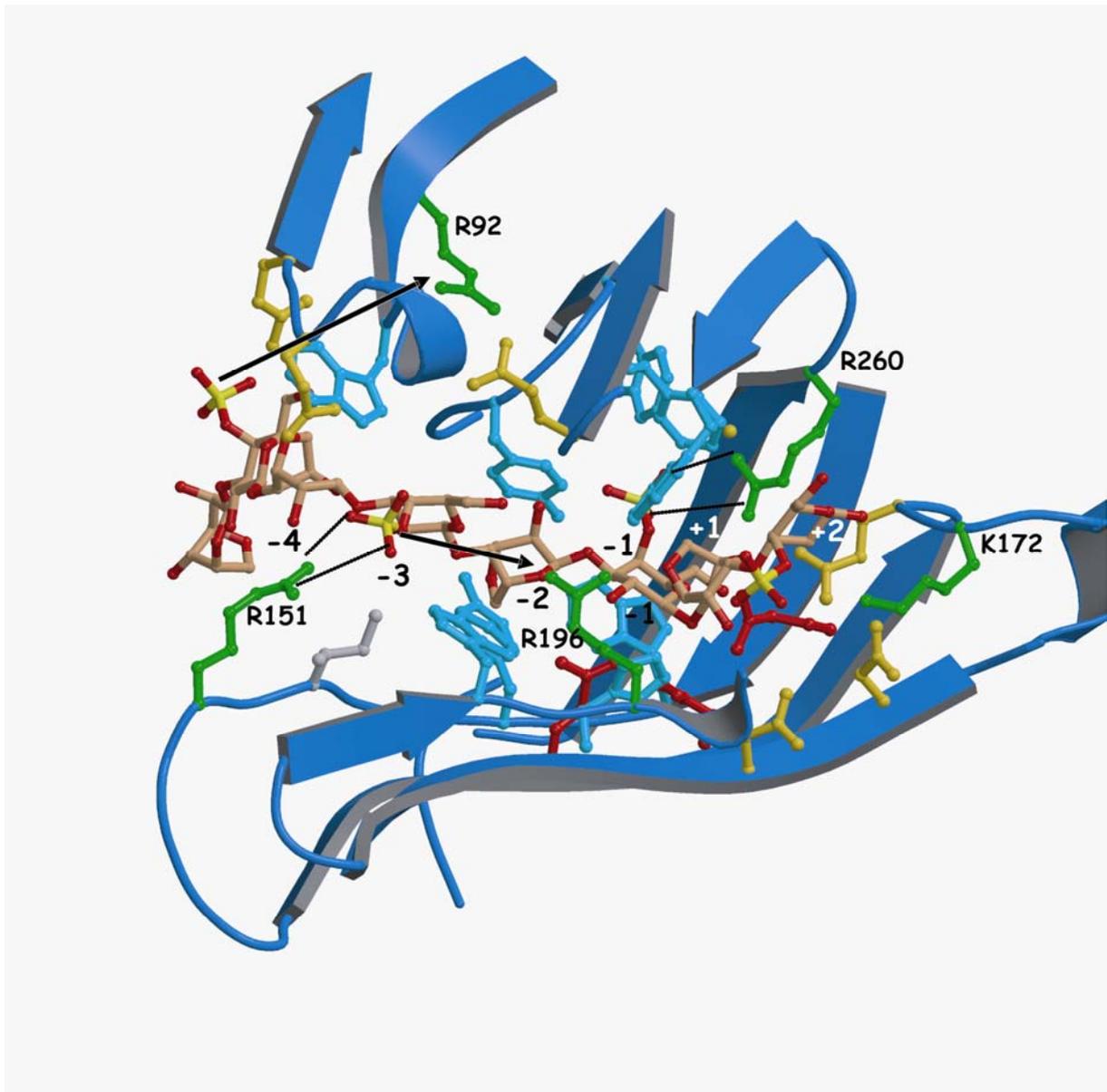


Figure 20 : Structure du site actif de la κ -carraghénase.

Visualisation du néo- κ -carrageose co-cristallisé dans les sous-sites du site actif de la κ -carraghénase. Les sous-sites +1 et +2 ont été modélisés ainsi que les deux unités ajoutées à l'extrémité non-réductrice (Mirjam Czjzek, communication personnelle, travaux en cours de rédaction).

4. Site actif de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora*

Par modélisation, 7 sous-sites de fixation (-5, -4, -3, -2, -1, +1, +2) ont été visualisés dans le tunnel catalytique de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* (Michel *et al.*, 2001b). Les acides aminés catalytiques ont été identifiés comme étant les glutamates E163 (nucléophile) et E168 (acide/base). Pour la reconnaissance des chaînes, les résidus basiques lysine et arginines du site catalytique (K191, R151, R260, R196) en positions (-5, -3, -1, +2) interagiraient avec les unités sulfatées du κ -carraghénane (G4S), alors que les groupements DA, en positions (-4, -2, +1), seraient dans un environnement hydrophobe (Y64, W266, F271). Le déterminant majeur de la reconnaissance est le résidu conservé R260 positionné au sous-site -1 où il fixe l'unité G4S portant la liaison β -(1 \rightarrow 4) à hydrolyser. Cette unité G4S est supposée être dans une conformation distordue 1B_4 , avec son groupement hydroxyle en C2 relié par une liaison hydrogène à l'histidine H183. Ceci expliquerait que le motif DA2S du ι -carraghénane ne pourrait se positionner au sous-site -1, car le groupement sulfate en C2 provoquerait une gêne stérique et un positionnement incorrect de la liaison au site de clivage (Michel *et al.*, 2001b). Ces résultats ont été confirmés récemment par une co-cristallisation du néo- κ -carrahexaose avec la κ -carraghénase (**Figure 20**) (Mirjam Czjzek, communication personnelle, travaux non publiés). Afin d'éviter une hydrolyse de l'oligosaccharide, l'activité hydrolytique de la κ -carraghénase a été supprimée par le remplacement de l'acide aminé catalytique glutamate par une alanine.

C. La ι -carraghénase

1. De la ι -carraghénase native à la ι -carraghénase recombinante.

La production des ι -carraghénases natives d'*A. fortis* (Bellion *et al.*, 1982; Greer *et al.*, 1984c) et de *Z. galactanivorans* (Potin, 1992; Barbeyron *et al.*, 2000) a été induite par du ι -carraghénane. Ces enzymes ont été purifiées à partir du surnageant des cultures et caractérisées par SDS-PAGE respectivement à 57 kDa et 50 kDa. Les tests d'activité sur la ι -carraghénase d'*A. fortis* ont montré une activité maximale à une température de 40 °C et à pH 8 (Greer *et al.*, 1984a).

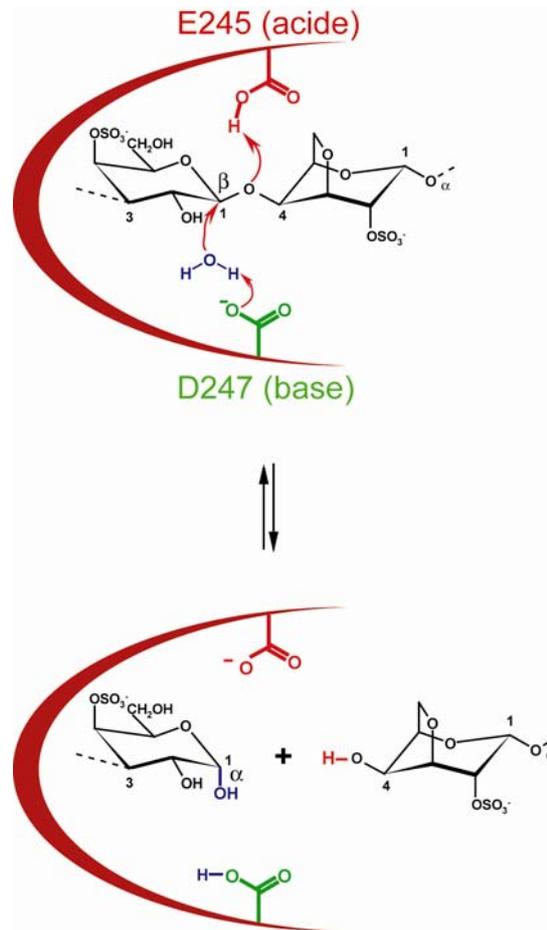


Figure 21 : Mécanisme de coupure des ι -carraghénases.

La ι -carraghénase d'*A. fortis* coupe les liaisons glycosidiques du ι -carraghénane avec une inversion de la configuration anomérique. Les deux acides aminés catalytiques, le glutamate E245 et l'acide aspartique E247, du site actif de la ι -carraghénase sont représentés.

Le séquençage des gènes des ι -carraghénases d'*A. fortis* et *Z. galactanivorans* a montré que ces enzymes étaient homologues (Barbeyron, 1993; Barbeyron *et al.*, 2000). Aucune similarité de séquence significative avec d'autres enzymes n'ayant été relevée, ces ι -carraghénases constituent une nouvelle famille de glycoside hydrolases, la famille 82, dont elles sont toujours les uniques membres. Les gènes correspondants aux formes matures des ι -carraghénases d'*A. fortis* et *Z. galactanivorans* sont de 51,9 kDa et 51,3 kDa (Barbeyron, 1993; Barbeyron *et al.*, 2000). Le gène correspondant à la forme mature de la ι -carraghénase d'*A. fortis* a été cloné et la protéine surexprimée chez *E. coli* (Michel *et al.*, 2000).

2. Mécanisme de la ι -carraghénase

Les ι -carraghénases coupent spécifiquement les liaisons β -(1 \rightarrow 4) du ι -carraghénane (Bellion *et al.*, 1982; Greer *et al.*, 1984c; Greer *et al.*, 1985) (Barbeyron *et al.*, 2000). Ceci a été démontré par la caractérisation RMN des produits limites d'hydrolyse de ces deux ι -carraghénases : le néo- ι -carratétraose et le néo- ι -carrahexaose. Le substrat minimal nécessaire pour une fixation productive est donc le néo- ι -carraoctaose. Bellion avait aussi montré l'existence de souches bactériennes (n° 2, 3, 4, 5 (Bellion *et al.*, 1982)) avec des activités ι -carraghénases conduisant aux produits limites néo- ι -carratétraose et néo- ι -carrabiose, mais ces souches n'ont pas été caractérisées.

La ι -carraghénase d'*A. fortis* agit selon un mécanisme d'inversion de configuration anomérique (**Figure 21**). Ce mécanisme a été montré par l'apparition initiale d'extrémités réductrices de configuration α , lors du suivi cinétique par RMN de l'hydrolyse du ι -carraghénane (Barbeyron *et al.*, 2000).

L'inversion de configuration se produit lors d'un mécanisme d'hydrolyse concerté stéréospécifique de substitutions nucléophiles (S_N2). Les acides aminés catalytiques de la ι -carraghénase d'*A. fortis* seraient le glutamate E245 (proton donneur) et l'acide aspartique D247 (base) (Michel *et al.*, 2003). L'acide aspartique est utilisé comme base catalytique dans l'attaque d'une molécule d'H₂O, libérant le nucléophile OH⁻ qui attaque le carbone anomérique avec départ concomitant de la liaison RO- qui se neutralise avec le H⁺ du catalyseur acide, le glutamate. La distance entre les deux catalyseurs est de 4.94 Å, ce qui est

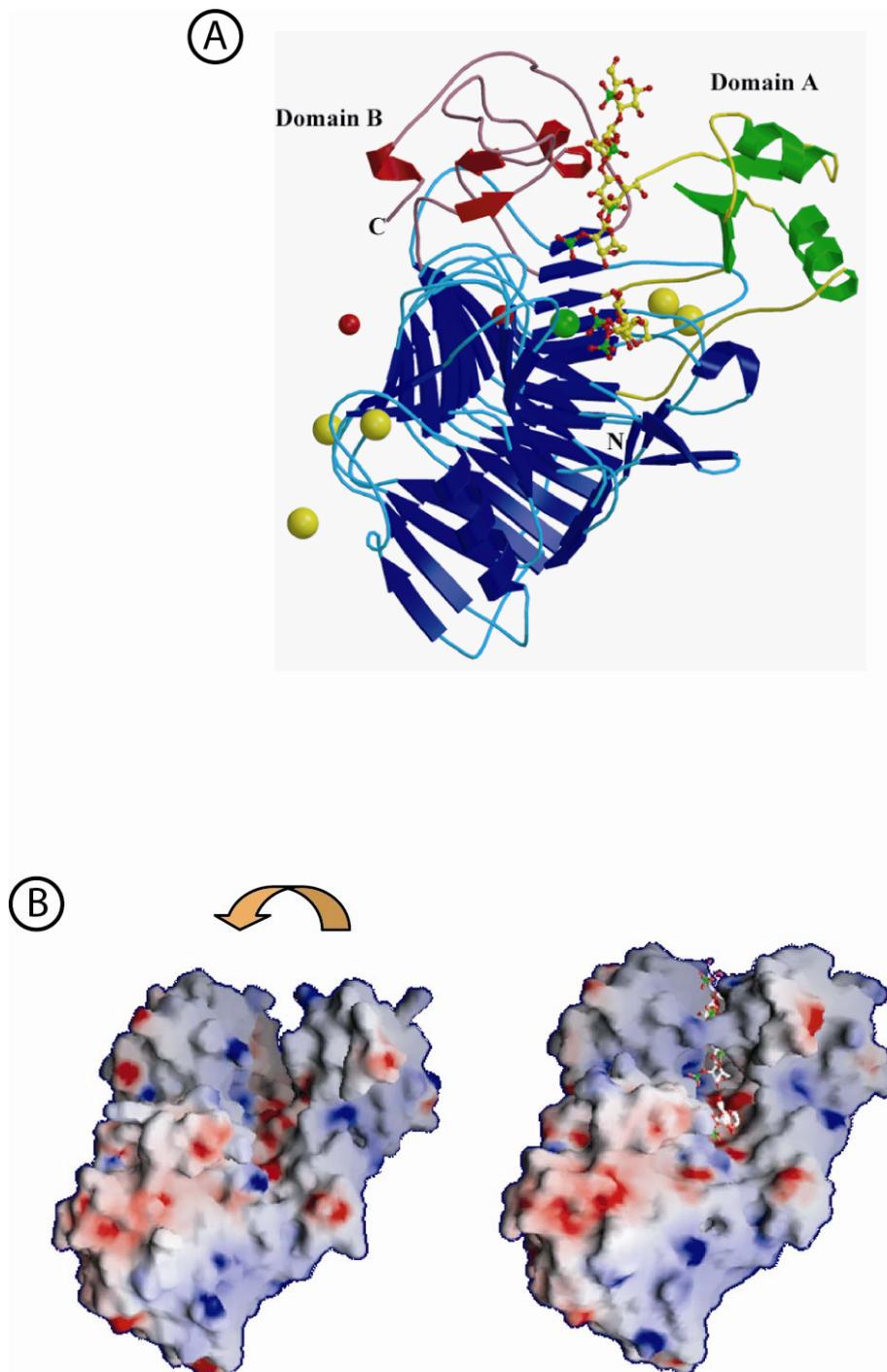


Figure 22 : Structure secondaire de la ι -carraghénase de *A. fortis*.

(A) Représentation en ruban du repliement de la ι -carraghénase. Les sphères rouges, vertes et jaunes représentent respectivement les ions sodium, calcium et chlorure. (B) Surface moléculaire colorée suivant les potentiels électrostatiques du bleu foncé (+) au rouge (-). Visualisation de la fermeture du site actif en topologie sillon, par basculement du domaine A, une fois l'oligosaccharide fixé à l'intérieur (Michel *et al.*, 2003).

relativement peu courant pour un mécanisme avec inversion de configuration. Cette distance est généralement d'environ 10 Å, afin de laisser de la place pour la molécule d'eau entre le sucre et l'acide aminé catalytique (Davies *et al.*, 1995).

3. Mode d'action des ι -carraghénases.

Les ι -carraghénases d'*A. fortis* et *Z. galactanivorans* agiraient selon un mode endo en phase liquide (Potin, 1992; Barbeyron *et al.*, 2000; Knutsen *et al.*, 2001). Mais en phase solide, la ι -carraghénase agirait selon un mode processif, comme l'a montré la dégradation enzymatique de gels de ι -carraghénane par microscopie électronique à transmission. Un affinement progressif des fibres sans destruction du réseau fibrillaire a en effet été observé (Michel *et al.*, 2003).

La structure de la ι -carraghénase d'*A. fortis* a révélé un repliement en une hélice β droite de 10 tours composée de 4 feuillets β parallèles. Elle comporte deux domaines importants A et B dans la région C-terminale (**Figure 22A**). Cette structure a révélé une grande crevasse, zone de fixation de la chaîne de ι -carraghénane (Michel *et al.*, 2001a). Il a été montré que le domaine A se refermait sur la crevasse lorsqu'une chaîne de ι -carraghénane s'y était fixée (**Figure 22B**) expliquant ainsi la processivité observée (Michel *et al.*, 2003). La ι -carraghénase aurait ainsi deux conformations, une conformation ouverte permettant l'attaque endo d'une chaîne isolée, et une conformation de type tunnel, induite par la fixation du substrat, créant les conditions de la processivité. La processivité s'effectue probablement de l'extrémité non-réductrice vers l'extrémité réductrice, le déplacement de la chaîne de ι -carraghénane étant facilité par des interactions avec les molécules d'eau et les résidus basiques présents dans le tunnel (Michel *et al.*, 2003).

La gorge catalytique ne peut lier qu'une seule chaîne de ι -carraghénane. Les agrégats de doubles hélices, associés fortement par les ions calcium, doivent donc être en premier lieu dissociés, puis les doubles hélices séparées en deux brins, avant d'être hydrolysées. La surface externe de la ι -carraghénase non catalytique, fortement basique, pourrait déplacer les ions calcium et ainsi dissocier les agrégats de doubles hélices (Michel *et al.*, 2001a). La dissociation des doubles hélices reste pour l'instant inexplicée.

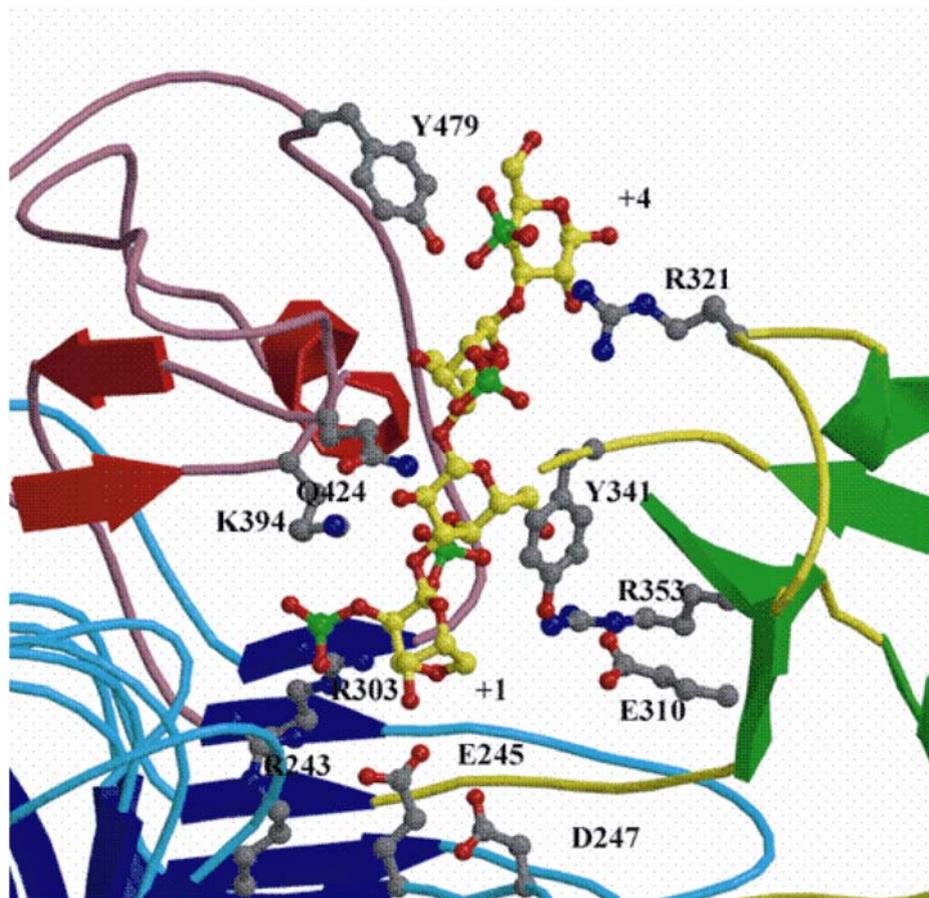


Figure 23 : Structure du site actif de la ι -carraghénase d'*A. fortis*.

Visualisation du néo- ι -carratétruose lié dans les sous-sites (+1,+2,+3 ,+4) du site actif en topologie tunnel de la ι -carraghénase d'*A. fortis* (Michel *et al.*, 2003).

4. Site actif de la ι -carraghénase d'*A. fortis*

La structure de la ι -carraghénase d'*A. fortis* complexée avec un néo- ι -carrabiose et un néo- ι -carratétraose a été résolue. Le disaccharide DA2S-G4S s'est fixé dans le site actif dans les sous-sites -4 et -3 et le tétrasaccharide DA2S-G4S-DA2S-G4S dans les sous-sites +1, +2, +3 et +4, les sous-sites -2 et -1 restant vides (Michel *et al.*, 2003) (**Figure 23**). La reconnaissance de la chaîne de ι -carraghénane est essentiellement dominée par des interactions électrostatiques entre les groupements sulfates des unités G4S et DA2S et les résidus basiques conservés Lysine et Arginines (K394, R125, R243, R303, R353, R321). La non-reconnaissance du κ -carraghénane par la ι -carraghénase pourrait ainsi s'expliquer par un nombre insuffisant de groupements sulfates autour du site de clivage.

Présentation du travail

Présentation du travail

Structure hybride	Glycoside Hydrolases (EC 3.2.1.x) Polysaccharide Lyases (EC 4.2.2.x)	Exemples de références
Carraghénane	κ -Carraghénase (EC 3.2.1.83) ι -Carraghénase (EC 3.2.1.57) λ -Carraghénase	(Weigl <i>et al.</i> , 1966a; Bellion <i>et al.</i> , 1981; Bellion <i>et al.</i> , 1982; Rochas <i>et al.</i> , 1983; Greer <i>et al.</i> , 1984e; Greer <i>et al.</i> , 1984a; Greer <i>et al.</i> , 1984b; Greer <i>et al.</i> , 1984d; Knutsen <i>et al.</i> , 1992a; Ekeberg <i>et al.</i> , 2001; Knutsen <i>et al.</i> , 2001)
Agar	α -Agarase (EC 3.2.1.158) β -Agarase (EC 3.2.1.81)	(Morrice <i>et al.</i> , 1983; Usov <i>et al.</i> , 1987; Lahaye <i>et al.</i> , 1989; Potin <i>et al.</i> , 1993; Rochas <i>et al.</i> , 1994; Jam <i>et al.</i> , 2005)
Alginate	Alginate lyase Mannuronate lyase (EC 4.2.2.3) Guluronate lyase (EC 4.2.2.11)	(Heyraud <i>et al.</i> , 1996; Wong <i>et al.</i> , 2000; Zhang <i>et al.</i> , 2004)
Fucane	Fucanase	(Colin <i>et al.</i> , 2006)
Ulvane	Ulvane lyase	(Lahaye <i>et al.</i> , 1997; Lahaye, 1998)
Pectine	Polygalacturonase (EC 3.2.1.15) Pectine methylesterase (EC 3.1.1.11) α -(1 \rightarrow 5) arabinase (EC 3.2.1.99) β -(1 \rightarrow 4) galactanase (EC 3.2.1.89) Rhamnogalacturonane hydrolase	(Bonnin <i>et al.</i> , 2002; Voragen, 2003; Strom <i>et al.</i> , 2004)

Tableau 15 : Utilisation des enzymes dans l'analyse structurale des polysaccharides.

Exemples d'enzymes (Glycoside Hydrolases ou Polysaccharide Lyases), coupant les liaisons glycosidiques, utilisées dans l'analyse des structures complexes des principaux polysaccharides constituant la phase matricielle des parois des algues et des plantes supérieures.

Présentation du travail

Les analyses chimiques et spectroscopiques des carraghénanes ont montré qu'il s'agissait de structures hybrides, c'est-à-dire que leurs chaînes sont composées de plusieurs motifs disaccharidiques. Ces structures hybrides se rencontrent aussi chez d'autres polysaccharides extraits d'algues (alginates, agars) et de plantes supérieures (pectines) (**Tableau 15**). Des techniques d'analyses chimiques et spectroscopiques, similaires à celles présentées pour les carraghénanes, sont utilisées couramment pour caractériser ces structures. Depuis les années 1980 environ, la caractérisation d'un nombre grandissant d'enzymes dégradant ces polysaccharides pariétaux, a conduit au développement de l'utilisation de ces enzymes comme outils d'analyse structurale.

Ces glycoside hydrolases (GH) ou polysaccharide lyases (PL) ont l'avantage de présenter une spécificité de substrat, contrairement à l'hydrolyse acide. Elles reconnaissent spécifiquement une séquence de monomères et hydrolysent toujours le même type de liaisons. Dans le cas des structures complexes, comme la pectine, l'utilisation conjointe de plusieurs enzymes, de spécificités différentes, est nécessaire à une hydrolyse totale du substrat (**Tableau 15**). Ces types d'hydrolyse sont reproductibles et conduisent à la formation de produits d'hydrolyse définis, des oligosaccharides, qui sont ensuite analysés par des méthodes d'analyse usuelles (HPLC, électrophorèse capillaire, SEC) et caractérisés par spectrométrie de masse et RMN. Ces oligosaccharides sont représentatifs de la structure du polymère, l'hydrolyse enzymatique ne provoquant aucune modification structurale, contrairement à l'hydrolyse acide (désulfatation, déméthylation, ouverture du pont 3,6-anhydro) (Stevenson *et al.*, 1991). L'identification des produits d'hydrolyse et leur proportion relative permettent d'obtenir des informations sur l'organisation structurale des chaînes.

L'utilisation des carraghénases comme outils d'analyse structurale des carraghénanes a débuté dans les années 1980 par des études de Greer et de Bellion, qui ont ensuite été poursuivies par Knutsen (références **Tableau 15**). Ils ont principalement utilisé, séparément et/ou conjointement, les κ - et ι -carraghénases natives de *P. carrageenovora* sur différentes structures de carraghénane.

Les premières analyses ont démontré l'hétérogénéité des chaînes du κ -carraghénane de *K. alvarezii* (Bellion *et al.*, 1981; Bellion *et al.*, 1982). L'hydrolyse de ces chaînes par la κ -

carraghénase a conduit à une hydrolyse de 80% du substrat en oligo- κ -carraghénanes, alors que l'hydrolyse par la ι -carraghénase a conduit à une dépolymérisation de 10% du substrat en oligomères de taille importante mais sans production d'oligo- ι -carraghénanes. Ces résultats ont été interprétés comme représentatifs d'une structure hybride kappa majoritaire avec insertion de courts blocs iota. Des résultats semblables ont ensuite été obtenus sur le κ -carraghénane extrait de *Hypnea musciformis* (Greer *et al.*, 1984e). Les mêmes hydrolyses ont été menées sur les ι -carraghénanes extraits d'*E. spinosum* et *E. nudum*, et les résultats ont inversement démontré une structure hybride iota majoritaire avec des insertions de blocs kappa (Bellion *et al.*, 1981; Bellion *et al.*, 1982; Greer *et al.*, 1984b).

Greer a aussi démontré, par hydrolyse enzymatique, la nature hybride des chaînes de κ/β -carraghénanes extraits d'*E. gelatinae* et *F. fastigiata* (Greer *et al.*, 1984a). Ces résultats ont été confirmés par Knutsen par l'analyse $^1\text{H-NMR}$ des produits de l'hydrolyse par la κ -carraghénase des κ/β -carraghénanes d'*E. gelatinae* et *F. lumbricalis*. L'analyse $^1\text{H-NMR}$ a en effet montré la présence d'oligo- κ/β -carraghénanes hybrides de poids moléculaires variables (Knutsen *et al.*, 1987; Knutsen *et al.*, 1992a). Aucun oligo- κ/β -carraghénane n'a par contre été purifié à l'homogénéité.

Cette utilisation des κ - et ι -carraghénases comme outils d'analyse structurale a ainsi permis d'apporter les premiers éléments de preuve de structures hétéropolymères de ces carraghénanes, notamment par la caractérisation d'oligo-carraghénanes de structure hybride parmi les produits d'hydrolyse. Des informations sur l'agencement (bloc, aléatoire) des différents motifs au sein d'une même chaîne ont aussi été obtenues.

L'objectif de la thèse s'inscrit dans la continuité de ces premières analyses. Afin de pouvoir mieux caractériser la structure des carraghénanes, il a tout d'abord été nécessaire de mieux caractériser les outils enzymatiques utilisés, les carraghénases. Depuis les dernières analyses de Bellion, Greer et Knutsen, les κ - et ι -carraghénases ont été surexprimées, leurs structures établies et leurs modes d'action et de reconnaissance caractérisés. Par contre, concernant la λ -carraghénase, peu d'études ont été effectuées depuis celle de Greer en 1984.

Le premier volet de ce projet de thèse a donc porté sur la caractérisation biochimique de la λ -carraghénase de *P. carrageenovora*. Cette enzyme a ensuite été utilisée comme outil pour l'analyse structurale de λ -carraghénanes, et notamment pour démontrer l'hétérogénéité des chaînes du λ -carraghénane extrait de *G. skottsbergii*. La caractérisation des produits d'hydrolyse a nécessité d'adapter les nouvelles méthodes d'analyse désormais disponibles aux

spécificités des oligo-carraghénanes.

Le second chapitre porte sur la structure de κ/ι -carraghénanes extraits de Gigartinaceae, couramment utilisés dans l'industrie pour leurs propriétés particulières dans certains produits laitiers. Ces κ/ι -carraghénanes ont été hydrolysés par les κ - et ι -carraghénases et les produits d'hydrolyse obtenus ont été caractérisés. Les résultats obtenus ont permis d'apporter la preuve d'une structure d'hétéropolymère et de mieux comprendre l'organisation structurale de ces κ/ι -carraghénanes. L'attention a été particulièrement portée sur les différences d'organisation structurale des κ/ι -carraghénanes en fonction de l'espèce de l'algue dont ils ont été extraits.

La troisième partie aborde la question de la répartition des motifs précurseurs mu minoritaires au sein des chaînes de κ -carraghénane de *K. alvarezii*. L'utilisation de la κ -carraghénase sur ce substrat et l'analyse de structure des κ/μ -carraghénanes parmi les produits d'hydrolyse ont permis d'apporter les informations structurales recherchées. Les motifs mu étant couramment transformés par un traitement alcalin industriel en motifs kappa, l'influence sur la structure du carraghénane des différents procédés utilisés sera aussi abordée dans ce chapitre.

Les perspectives de ces travaux seront énoncées dans le dernier chapitre où l'utilisation conjointe des trois enzymes sur des carraghénanes complexes sera abordée.

Chapitre I :
Analyse structurale du λ -carraghénane
par la λ -carraghénase

Chapitre I : Analyse structurale du λ -carraghénane par la λ -carraghénase

INTRODUCTION

Les études menées ces dernières années sur les κ - et ι -carraghénases ont permis d'obtenir des caractérisations relativement complètes de ces enzymes, mais l'activité λ -carraghénase est restée peu exploitée.

L'activité extracellulaire λ -carraghénase a été détectée, pour la première fois, chez *P. carrageenovora*, en présence de carraghénane non fractionné (Weigl *et al.*, 1966b). Afin de minimiser la production associée de κ -carraghénase, la culture a ensuite été effectuée en présence de λ -carraghénane de *C. crispus* (Johnston *et al.*, 1973). Après purification partielle de la λ -carraghénase, l'hypothèse d'un complexe enzymatique extracellulaire impliquant trois hydrolases a été avancée (Johnston *et al.*, 1973). Cette hypothèse fut écartée par la purification à l'homogénéité de la λ -carraghénase comme protéine unique de 98 kDa (Greer, 1984; Potin, 1992).

Le séquençage récent de l'enzyme a révélé que la λ -carraghénase ferait partie d'une nouvelle famille de glycoside hydrolase. Elle ne s'apparente ni à la famille 16 de la κ -carraghénase, ni à la famille 82 de la ι -carraghénase (Colin, 2005). Le gène de la λ -carraghénase code une protéine de 942 acides aminés, avec un poids moléculaire de 105 kDa. La surexpression de la λ -carraghénase a abouti à une production de l'enzyme sous forme de corps d'inclusion. Après dénaturation à l'urée 8 M, le repliement de l'enzyme a été possible par dilution rapide mais avec un faible rendement (Colin, 2005).

Les premières mesures biochimiques réalisées avaient montré une activité optimale à pH 6,5 et à 30 °C (Greer, 1984). La λ -carraghénase hydrolyserait spécifiquement les fractions lambda (KCl solubles) de carraghénanes extraits de Gigartinaceae (Johnston *et al.*, 1973) et plus particulièrement les structures π - (G2S-DP2S), ξ - (G2S-D2S) et λ -carraghénanes extraits de formes tétrasporophytes de *G. canaliculata*, *G. pistillata* et *C. crispus* (Greer, 1984). Greer avait donc avancé que la sulfatation en 2 sur l'unité G2S serait nécessaire à la reconnaissance. Les produits limites d'hydrolyse de la λ -carraghénase n'ont pas été caractérisés mais seraient des oligosaccharides de faibles poids moléculaires (Johnston *et al.*, 1973; Greer, 1984).

Des études ont été menées sur les structures de carraghénanes de la famille lambda (λ , ξ , π , θ) présentes dans la paroi des formes tétrasporophytes de nombreuses espèces de Gigartinaceae (McCandless *et al.*, 1983). Ces structures ont été caractérisées principalement par des techniques d'analyses chimiques et spectroscopiques (IR, RMN). L'analyse du λ -carraghénane par RMN est difficilement réalisable à cause de la forte viscosité des solutions. Un spectre ^{13}C -RMN correctement résolu de λ -carraghénane a pu néanmoins être obtenu et assigné (Falshaw *et al.*, 1994; Stortz *et al.*, 1994; van de Velde *et al.*, 2004). L'assignation du spectre ^1H -RMN a, par contre, été limitée au proton du carbone anomérique α (Stortz *et al.*, 1994; van de Velde *et al.*, 2004).

Dans ce contexte, nous avons réalisé une étude de l'hydrolyse enzymatique, par la λ -carraghénase, de λ -carraghénanes extraits de Gigartinaceae. La stratégie proposée réside en l'analyse des produits d'hydrolyse, afin de déterminer la structure de ces λ -carraghénanes et de mieux connaître le mode d'action de la λ -carraghénase.

Afin de pouvoir utiliser cette λ -carraghénase comme outil pour l'analyse structurale du λ -carraghénane, il a été nécessaire, dans un premier temps, de compléter les connaissances sur cette enzyme. Les études présentées dans ce chapitre ont été menées sur la λ -carraghénase native de *P. carrageenovora*, la λ -carraghénase recombinante ne pouvant être, pour l'instant, obtenue en quantité suffisante. Les profils d'hydrolyse enzymatique de ces λ -carraghénanes ont été comparés, et le λ -carraghénane de *G. skottsbergii*, présentant la structure lambda la plus régulière, a été sélectionné comme substrat d'étude. La formation des oligo-carraghénanes au cours de l'hydrolyse enzymatique du λ -carraghénane de *G. skottsbergii* a été suivie par différentes méthodes d'analyse. Les oligo- λ -carraghénanes, produits majoritaires de l'hydrolyse enzymatique, ont été purifiés et caractérisés par RMN. Cette caractérisation a permis de corriger les attributions ^{13}C -RMN du polymère λ -carraghénane et d'obtenir les attributions ^1H -RMN. La caractérisation d'oligo- λ -carraghénanes hybrides minoritaires au sein des produits d'hydrolyse, a apporté des informations sur la nature et sur les arrangements de ces motifs minoritaires dans la structure lambda majoritaire. Ces études des produits d'hydrolyse ont permis, parallèlement, de déterminer le mode d'action de la λ -carraghénase, son site de coupure, la nature de ses produits limites et sa spécificité.

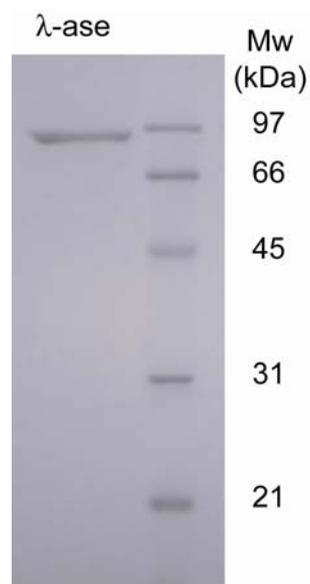


Figure 24 : Gel SDS-PAGE de la λ -carraghénase de *P. carrageenovora* purifiée.

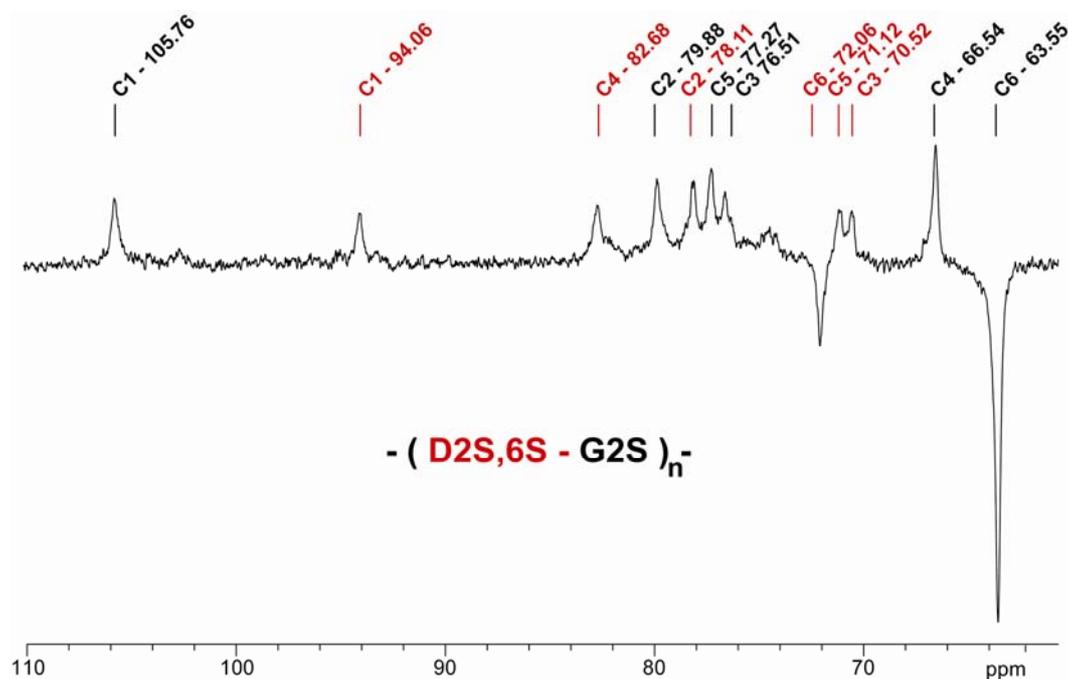


Figure 25 : Spectre Jmod à 25 °C du λ -carraghénane extrait de *G. skottsbergii*.

Le polymère a été préalablement dépolymérisé par broyage. Les 12 signaux caractéristiques du λ -carraghénane sont présents. Les signaux négatifs correspondent aux carbones primaires C6 des G2S et D2S,6S. Le signal du G2S-C6 est particulièrement important comparativement aux autres signaux mais une augmentation du D1 a peu d'impact sur l'importance du signal.

RESULTATS

I. Production et purification de la λ -carraghénase.

La production de λ -carraghénase par la bactérie *P. carrageenovora* dans le milieu extracellulaire, a été induite par la présence dans le milieu de culture du λ -carraghénane extrait du tétrasporophyte de *G. skottsbergii*. La purification de la λ -carraghénase a été réalisée en se basant principalement sur les propriétés hydrophobes de l'enzyme, tout d'abord par une précipitation de l'enzyme par saturation au sulfate d'ammonium (30-70%), puis par une purification sur colonne Phenyl Sepharose par gradient décroissant de sulfate d'ammonium. La purification de 5 L de culture nous a permis d'obtenir environ 500 μg de λ -carraghénase pure (gel SDS) à une concentration de 59,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Son poids moléculaire a été estimé sur gel SDS vers 98 kDa (**Figure 24**), comme précédemment décrit (Greer, 1984; Potin, 1992).

II. Choix du substrat d'étude.

Pour étudier les paramètres biochimiques de la λ -carraghénase, il a été nécessaire de trouver un substrat d'étude possédant une structure proche d'une structure lambda idéale (G2S-D2S,6S). Une analyse RMN de quatre substrats λ -carraghénanes, extraits de Gigartinaceae (*G. skottsbergii*, *G. acicularis*, *G. pistillata* et *C. crispus*), n'a pas permis de caractériser leur structure, les spectres obtenus étant peu résolus, en raison d'une grande viscosité des solutions. La dépolymérisation du λ -carraghénane de *G. skottsbergii* par broyage a néanmoins permis d'obtenir un spectre Jmod de résolution correcte (**Figure 25**). Ce spectre présente les 12 pics carbones caractéristiques d'une structure λ -carraghénane (van de Velde *et al.*, 2004).

Afin d'obtenir des informations structurales plus précises, l'action de la λ -carraghénase a été testée sur ces quatre substrats et l'analyse des produits d'hydrolyse a été effectuée par chromatographie d'exclusion de taille (SEC) et par chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC) (**Figure 26 A et B**). Des profils chromatographiques différents ont été obtenus pour chaque espèce d'algues, caractérisés par un nombre plus ou moins important de produits d'hydrolyse. La complexité de ces profils d'hydrolyse est le reflet de la structure du polymère.

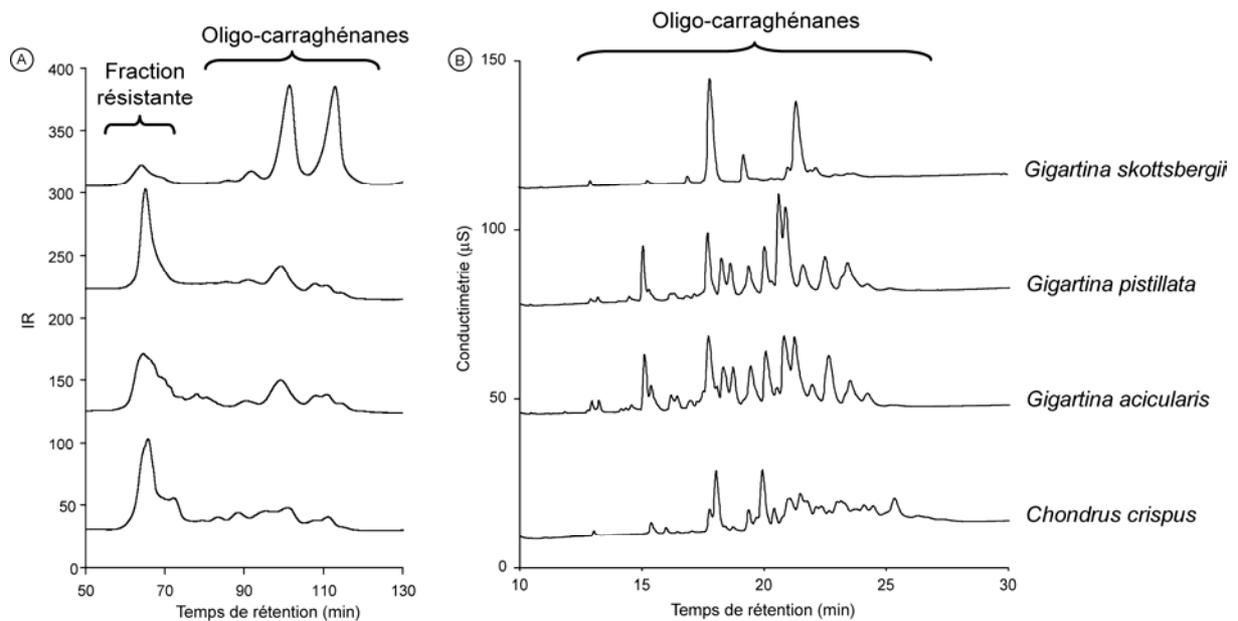


Figure 26 : Analyse des hydrolysats obtenus par hydrolyse par la λ -carraghénase de λ -carraghénanes extraits de différentes algues

Les analyses ont été réalisées par (A) chromatographie d'exclusion de taille (SEC) sur Superdex 30 semi-préparative et par (B) chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC) sur colonne AS11.

Le λ -carraghénane extrait de *G. skottsbergii* semblerait posséder la structure la plus régulière. En effet, il a été majoritairement hydrolysé en deux oligosaccharides de petites tailles, alors que les trois autres carraghénanes présentent une fraction résistante importante à l'hydrolyse (**Figure 26A**).

Les deux oligo- λ -carraghénanes du profil HPAEC du λ -carraghénane extrait de *G. skottsbergii* (**Figure 26B**) semblent également présents sur les trois autres profils, au milieu d'autres oligosaccharides de structures non déterminées. La proportion et le nombre de ces derniers sont révélateurs du degré d'irrégularité structurale de ces trois λ -carraghénanes. Les profils chromatographiques des λ -carraghénanes de *G. pistillata* et *G. acicularis* sont complexes mais présentent des similitudes très nettes (mêmes pics d'intensités proches). Le profil du λ -carraghénane de *C. crispus* révèle lui aussi une diversité importante de produits d'hydrolyse mais qui semblent différents de ceux des algues du genre *Gigartina*.

Le λ -carraghénane de *G. skottsbergii* a donc été choisi comme substrat d'étude car il semble être le seul de ces 4 substrats à présenter une structure lambda majoritaire, comme le confirmera la caractérisation de ses deux produits d'hydrolyse majoritaires.

III. Propriétés de la λ -carraghénase.

A. Mesure de l'activité enzymatique.

L'activité enzymatique des glycoside hydrolases est généralement mesurée par dosage colorimétrique des extrémités réductrices formées au cours de l'hydrolyse par la coupure des liaisons. L'activité des κ - et ι -carraghénases a été précédemment mesurée par réaction d'oxydo-réduction entre les extrémités réductrices G4Sr des κ - et ι -carraghénanes et le ferricyanide (potassium hexacyanoferrate(III)) (Potin *et al.*, 1995). L'activité enzymatique de la λ -carraghénase a été jusqu'à maintenant mesurée principalement par viscosimétrie, le ferricyanide ayant montré une faible activité oxydante envers les extrémités réductrices G2Sr du λ -carraghénane (Greer, 1984). Afin de pallier la faible réactivité des sucres réducteurs du λ -carraghénane, la concentration de ceux-ci dans le milieu a été augmentée d'un facteur 9 avec une faible variation de la concentration en ferricyanide (facteur 1,1). Dans ces conditions, la réactivité des extrémités réductrices des oligo- λ -carraghénanes est mesurable

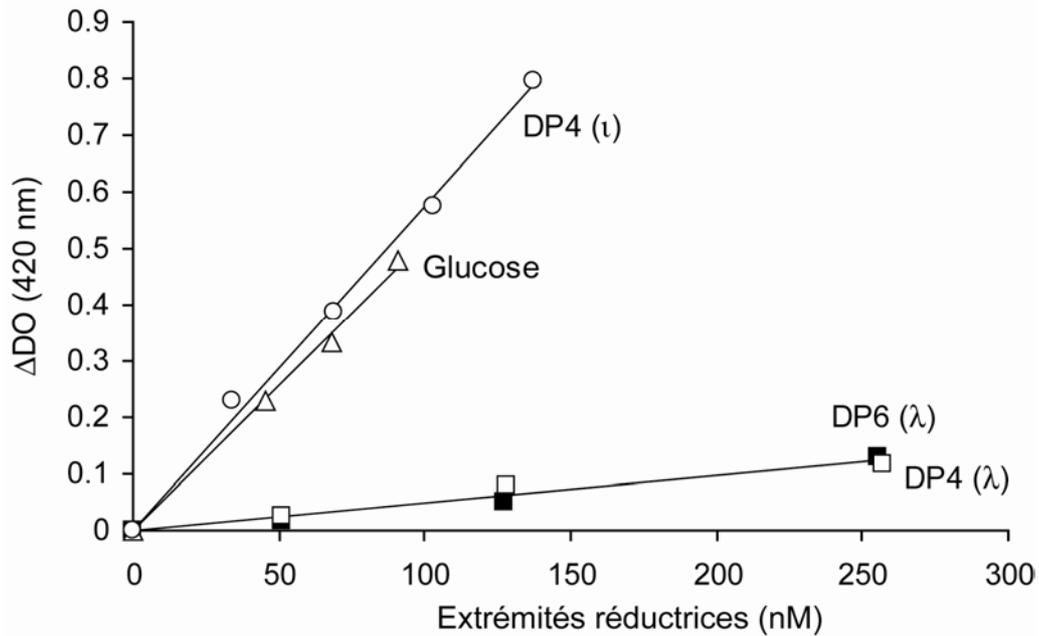


Figure 27 : Comparaison de la réactivité des extrémités réductrices des oligo- λ -carraghénanes (DP4, DP6), oligo- ι -carraghénane (DP4) et du glucose envers le réactif ferricyanide.

La réactivité a été mesurée en traçant la ΔDO mesurée à 420nm en fonction de la concentration de ces composés.

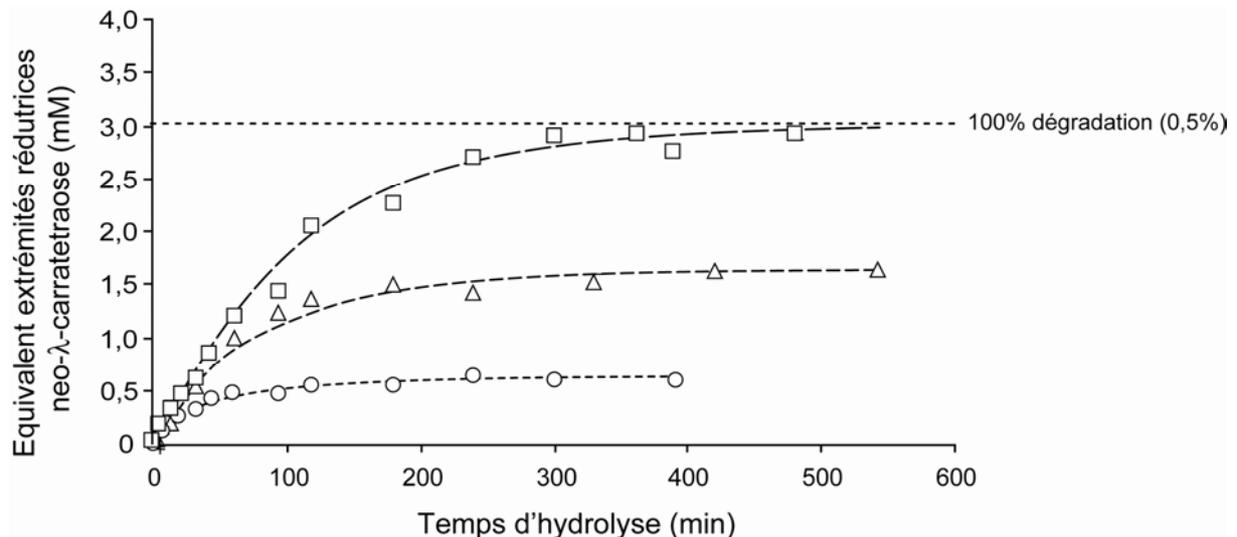


Figure 28 : Cinétique d'hydrolyse du λ -carraghénane à des concentrations de 0,1% (o), 0,3% (Δ) et 0,5% (\square) par la λ -carraghénase.

Les sucres réducteurs formés au cours de l'hydrolyse sont exprimés en équivalent néo- λ -carratetraose (mM) d'après la droite étalon $\Delta DO = f[\text{oligo-}\lambda\text{-carraghénane DP4}]$.

(**Figure 27**). La droite étalon $\Delta DO = f[\text{oligo-}\lambda\text{-carraghénane DP4}]$ a pu être établie. Ces mesures ont confirmé que les extrémités réductrices des oligo- λ -carraghénanes étaient 10 fois moins réactives que celles du D-glucose et de l'oligo- ι -carraghénane DP4 (**Figure 27**). Le degré de polymérisation (DP) des oligo- λ -carraghénanes DP4 (tétrasaccharide) ou DP6 (hexasaccharide) ne semble pas avoir d'influence sur la réactivité des extrémités réductrices. Leur faible réactivité peut être due à la présence sur l'extrémité réductrice du λ -carraghénane G2Sr d'un groupement sulfate en C2 qui peut gêner la réaction du ferricyanide sur l'hydroxyle réactif en C1 (Greer, 1984).

L'hydrolyse a été réalisée sur des solutions de concentration 0,5%, 0,3% et 0,1% en λ -carraghénane (**Figure 28**). La concentration en extrémités réductrices a augmenté très rapidement au début de l'hydrolyse, traduisant un grand nombre de coupures, pour ensuite atteindre un plateau lorsque tout le substrat a été hydrolysé vers 300 min d'hydrolyse pour la concentration de 0,5%.

Le calcul des paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) a été tenté mais la faible gamme de concentrations de λ -carraghénane a empêché l'obtention de données exploitables. En effet, en dessous d'une concentration de 0,1% la formation des extrémités réductrices était difficilement détectable et au dessus de 0,5% la viscosité de la solution était trop importante, notamment dans les temps courts (env. 10 min) de l'hydrolyse. L'activité spécifique de la λ -carraghénase a néanmoins pu être estimée à 30 U/mg à une concentration de λ -carraghénane de 0,5%.

B. Evolution du poids moléculaire du λ -carraghénane au cours de l'hydrolyse.

Afin d'étudier l'évolution du poids moléculaire moyen des chaînes de λ -carraghénane au cours de l'hydrolyse, des prélèvements ont été analysés par chromatographie d'exclusion de taille sur Superdex 200 couplée à une détection MALLS (**Figure 29**). La détection par réfractométrie de l'élution des chaînes (**Figure 29A**) a montré, après 15 min d'hydrolyse, une diminution de la taille moyenne des chaînes, précédant leur hydrolyse quasi-totale en oligosaccharides après 3 h d'hydrolyse. Dans les 15 premières minutes, l'hydrolyse des chaînes de λ -carraghénane n'est pas visualisable sur colonne S200, car les chaînes possèdent toujours un poids moléculaire trop élevé et sont exclues de la colonne. Mais l'analyse MALLS de ces chaînes dans ces 15 premières minutes d'hydrolyse (9% des coupures

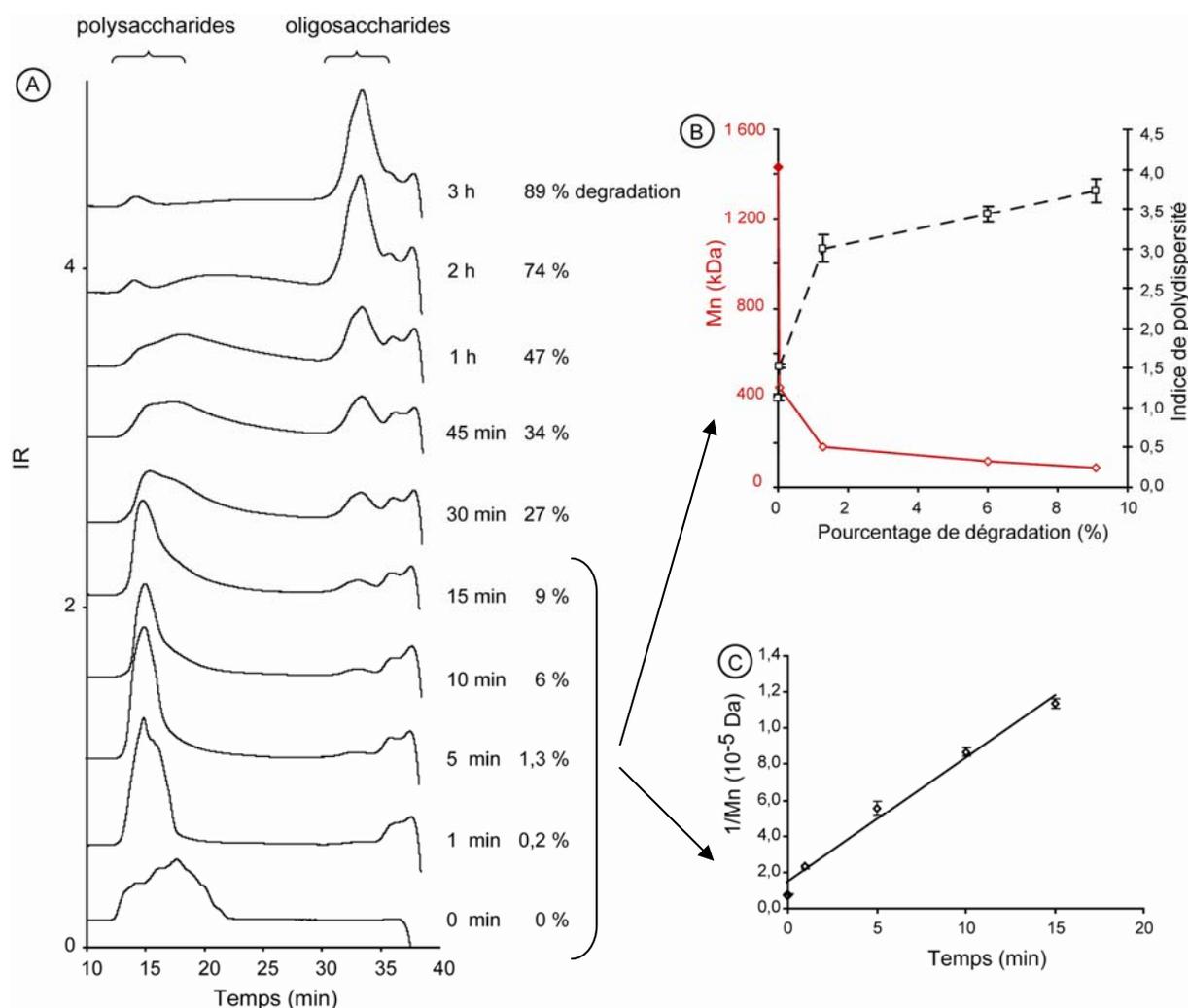


Figure 29 : Etude par HPSEC-MALLS de l'évolution du poids moléculaire du λ -carraghénane au cours de l'hydrolyse.

(A) Profils obtenus par détection réfractométrique après séparation des chaînes par chromatographie d'exclusion de taille sur colonne Superdex 200. (B) Expression du poids moléculaire moyen en nombre (Mn) et de la polydispersité (Mw/Mn) du λ -carraghénane, déterminés par diffusion de la lumière (MALLS), en fonction du pourcentage de dégradation (% sucres réducteurs). (C) Tracé de l'inverse du Mn en fonction du temps d'hydrolyse.

hydrolytiques effectuées) (**Figure 29B**) a permis de montrer une chute très rapide de 1 430 kDa à 88 kDa, de leur poids moléculaire moyen (Mn). Les chaînes de λ -carraghénanes de 88 kDa obtenues sont d'ailleurs très polydisperses avec un coefficient de polydispersité (Mw/Mn) de 3,7, alors que le polymère de départ était monodisperse (1,1).

Le tracé de $1/Mn_t$ en fonction du temps d'hydrolyse (t) est une droite (**Figure 29C**), ce qui est caractéristique d'une dépolymérisation du 1^{er} ordre suivant l'équation : $1/Mn_t = 1/Mn_0 + kt$ (Simha, 1941; Masson, 1955). Ces résultats sont caractéristiques d'une dépolymérisation, acide ou enzymatique, par coupures aléatoires dans les chaînes de carraghénanes (Masson, 1955; Singh *et al.*, 1994). Ces coupures conduisent à une dépolymérisation rapide et à une augmentation de la polydispersité.

C. Formation des produits limites de l'hydrolyse

L'étude de la formation des oligosaccharides a nécessité l'utilisation d'une colonne Superdex 30 de résolution plus fine que la Superdex 200, qui permet de séparer les oligosaccharides de différents degrés de polymérisation (DP) (**Figure 30**). Les oligo- λ -carraghénanes formés (caractérisés par RMN §III.D) sont peu nombreux et de tailles inférieures à DP8 (octasaccharide). Les oligosaccharides DP4, DP6 majoritaires, et DP8 minoritaire, apparaissent dès le début de l'hydrolyse, et leur concentration augmente au cours de celle-ci. Après 5 h d'hydrolyse, la concentration en DP8 et DP6 décroît, et celle du DP4 augmente. Après un nouvel ajout d'enzyme à 22 h d'hydrolyse, une diminution plus notable du DP6 est observée, conjointement à l'augmentation du DP4 et à l'apparition du DP2.

Etonnamment, les oligosaccharides de tailles intermédiaires (DP10-DP20) n'ont pas été observés par détection réfractométrique. Ceux-ci sont bien présents, mais en quantité très faible, comme le montre l'analyse de ces prélèvements cinétiques par la technique électrophorétique Carbohydrate-PAGE présentée **Figure 31**. La détection au bleu d'Alcian utilisée avec cette méthode est en effet très sensible à la présence d'oligo-carraghénanes.

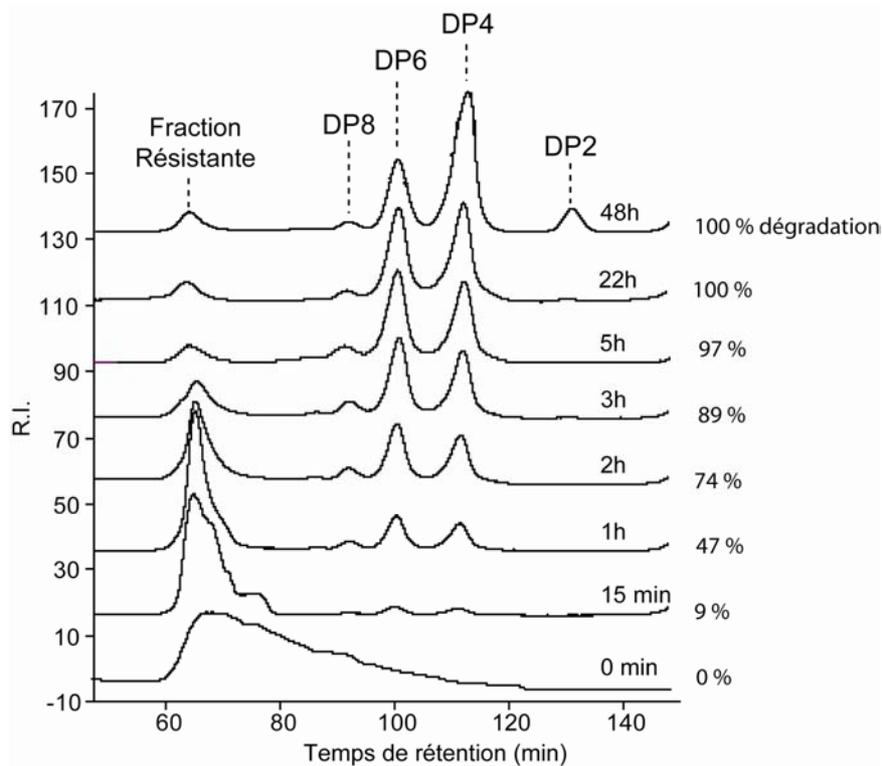


Figure 30 : Séparation par chromatographie d'exclusion de taille sur Superdex 30 des oligo- λ -carraghénanes produits lors de l'hydrolyse du λ -carraghénane de *G. skottsbergii*.

Le DP2 est défini comme un disaccharide.

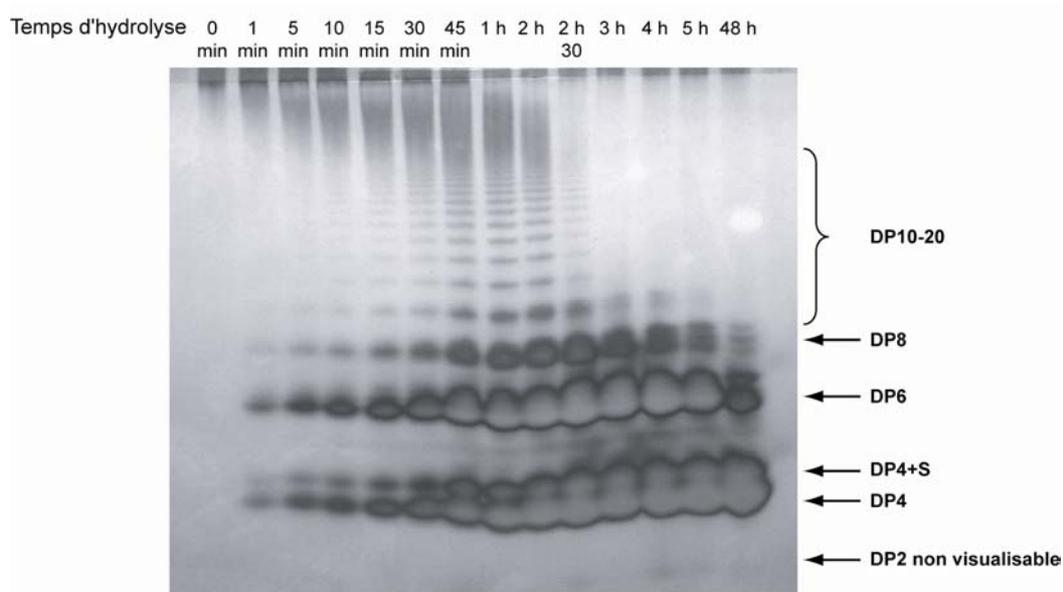


Figure 31 : Séparation par Carbohydrate-PAGE des oligo- λ -carraghénanes.

Le DP2 n'est pas révélé par la coloration au bleu d'Alcian.

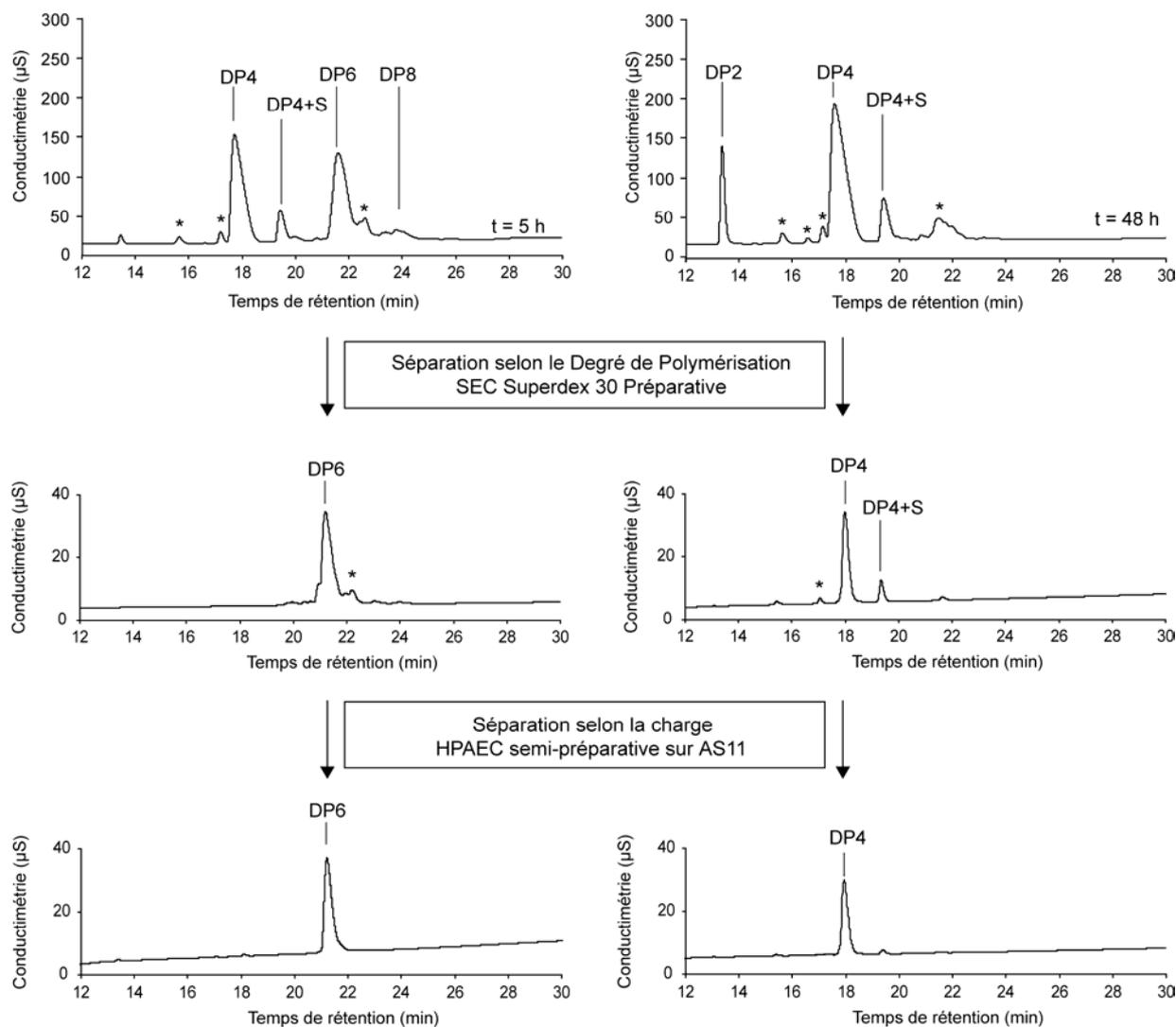


Figure 32 : Analyse par HPAEC analytique de la pureté des oligo- λ -carraghénanes DP6 et DP4, après chaque étape de purification.

Le DP6 a été purifié à partir de l'hydrolysate obtenu après 5 h d'hydrolyse, et le DP4 à partir de l'hydrolysate final (48 h). Deux étapes de purification par SEC et HPAEC ont été nécessaires pour purifier les DP4, DP4S, DP6 et DP8. Les oligosaccharides indiqués par un astérisque sont présents en trop faible quantité pour être purifiés.

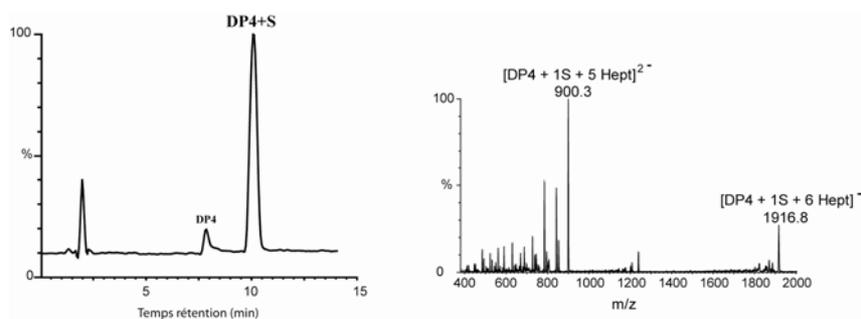


Figure 33 : Chromatogramme LC-ESI-MS du DP4+S par appariement d'ions sur colonne C₁₈ et spectre de masse obtenu pour ce pic.

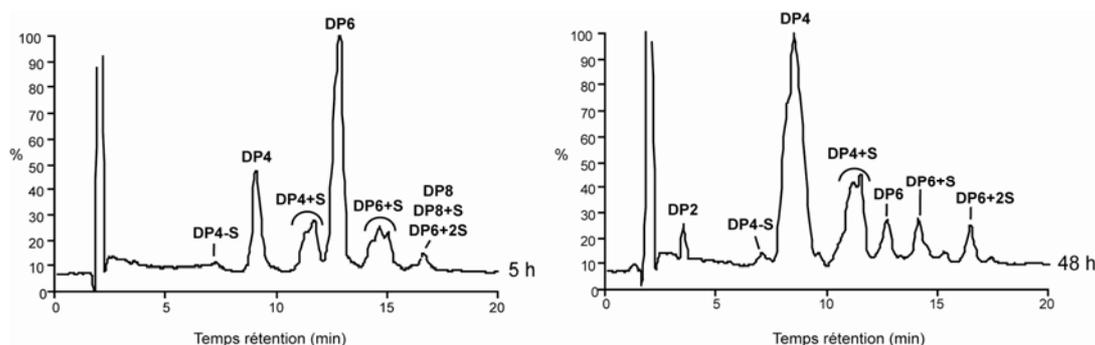


Figure 34 : Analyse par LC-MS des produits obtenus après 5 h et 48 h d'hydrolyse, par la technique d'appariement d'ions sur colonne Altima C₁₈.

	Ionisation directe	LC-ESI-MS Mode d'ionisation négative	
	<i>m/z</i>		<i>m/z</i>
λ DP2	193	$[(D2S,6S-G2S) + (C_7H_{15}NH^+)_2]^{2-}$ $[(D2S,6S-G2S) + (C_7H_{15}NH^+) + H]^-$	811 696.4
λ DP4-S		$[(D2S,6S-G2S)_2 - SO_3 + (C_7H_{15}NH^+)_3]^{2-}$	704.6
λ DP4		$[(D2S,6S-G2S)_4 + (C_7H_{15}NH^+)_5]^-$ $[(D2S,6S-G2S)_4 + (C_7H_{15}NH^+)_4]^{2-}$	1721.8 802.7
λ DP4+S		$[(D2S,6S-G2S)_2 + SO_3 + (C_7H_{15}NH^+)_6]^-$ $[(D2S,6S-G2S)_2 + SO_3 + (C_7H_{15}NH^+)_5]^{2-}$	1917.2 900.2
λ DP6		$[(D2S,6S-G2S)_6 + (C_7H_{15}NH^+)_7]^{2-}$ $[(D2S,6S-G2S)_6 + (C_7H_{15}NH^+)_6]^{3-}$	1257.6 799.6
λ DP6+S		$[(D2S,6S-G2S)_3 + SO_3 + (C_7H_{15}NH^+)_8]^{2-}$ $[(D2S,6S-G2S)_3 + SO_3 + (C_7H_{15}NH^+)_7]^{3-}$	1355.1 865.0
λ DP6+2S		$[(D2S,6S-G2S)_3 + 2SO_3 + (C_7H_{15}NH^+)_9]^{2-}$ $[(D2S,6S-G2S)_3 + 2SO_3 + (C_7H_{15}NH^+)_8]^{3-}$	1452.9 929.6
λ DP8		$[(D2S,6S-G2S)_4 + (C_7H_{15}NH^+)_9]^{2-}$ $[(D2S,6S-G2S)_4 + (C_7H_{15}NH^+)_8]^{3-}$	1712.4 1103.2
λ DP8+S		$[(D2S,6S-G2S)_4 + SO_3 + (C_7H_{15}NH^+)_9]^{3-}$	1167.9

Tableau 16 : Ions majoritaires des oligo- λ -carraghénanes obtenus par ESI en mode d'ionisation négative et ions obtenus après la LC-ESI-MS sur colonne Altima C₁₈.

Pour chaque oligosaccharide analysé des ions de différentes masses sont obtenus suivant le nombre de molécules d'heptilamide appariées. Seul le lambda carrabiose a pu être analysé par ionisation directe sans être fragmenté dans la source.

D. Purification et caractérisation des produits d'hydrolyse.

1. Purification des oligo- λ -carraghénanes.

Les oligosaccharides ont été purifiés au stade de l'hydrolyse auquel leur concentration était maximale, c'est-à-dire après 5 h d'hydrolyse pour les oligosaccharides DP8 et DP6, et au stade final de l'hydrolyse (48 h) pour les oligosaccharides DP4 et DP2.

Une première séparation des oligosaccharides, selon leurs degrés de polymérisation, a été réalisée par chromatographie d'exclusion de taille sur la colonne Superdex 30 préparative. L'analyse de chacun des pics de SEC par HPAEC (**Figure 32**) a révélé la présence de plusieurs oligosaccharides sous un même pic. Par exemple le pic de DP4 de SEC, correspondait en fait à une élution conjointe de deux oligo- λ -carraghénanes DP4 avec des taux de sulfatation différents : DP4 et DP4+S (cf § suivant : caractérisation). Seul le DP2 a été obtenu sous forme pure.

Une seconde purification par HPAEC semi-préparative a permis de séparer les oligosaccharides DP4, DP4+S, DP6 et DP8 des autres oligosaccharides minoritairement présents (indiqués par un astérisque) (**Figure 32**). Ces derniers étaient présents en trop faible quantité dans l'hydrolysate pour être purifiés et caractérisés par RMN.

2. Caractérisation des oligo- λ -carraghénanes par spectrométrie de masse.

L'analyse massique par infusion directe des oligo- λ -carraghénanes purifiés DP4, DP4S et DP6 et DP8 n'a pu être réalisée. La densité de charge de trois sulfates par unité disaccharidique est en effet importante et les oligo- λ -carraghénanes se sont fragmentés lors de l'ionisation. Ce phénomène avait déjà été observé pour les oligo- ι -carraghénanes (Antonopoulos, 2005). Seule l'analyse de l'oligo- λ -carraghénane DP2 (D2S,6S-G2S) a été possible, et la masse m/z 193 a été obtenue.

Une analyse des oligosaccharides purifiés DP4, DP4+S, DP6 et DP8 a été néanmoins réalisée indirectement par chromatographie liquide sur colonne C_{18} , couplée à un spectromètre de masse opérant en mode d'ionisation négative (**Figure 33**). Afin d'être séparés sur la colonne de type C_{18} , les oligo- λ -carraghénanes chargés négativement ont été appariés à des molécules d'heptilamide. Le masquage des charges des oligo- λ -carraghénanes a aussi l'avantage de prévenir la fragmentation de ces oligosaccharides dans la source. L'analyse

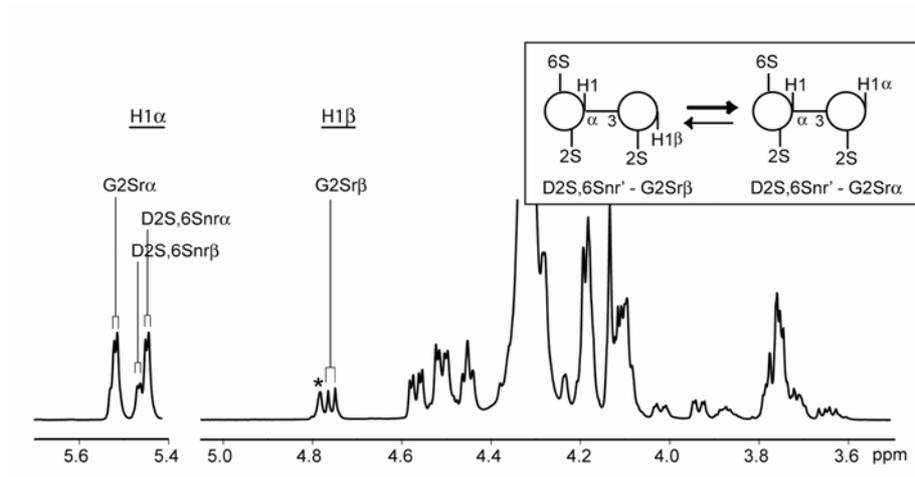


Figure 35 : Spectre ^1H -RMN à 70 °C du néo- λ -carrabiose (DP2) sous ses formes anomériques α et β .

La nature du pic désigné par l'astérisque n'a pas été déterminée.

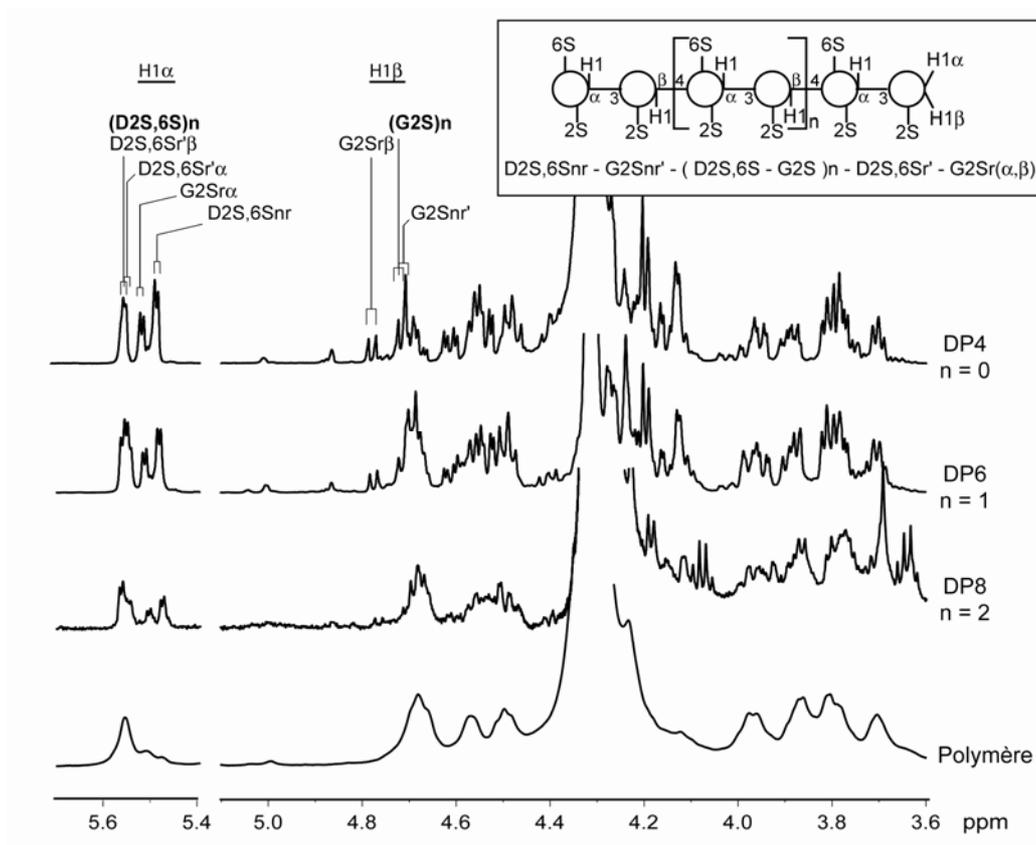


Figure 36: Spectre ^1H -RMN à 70 °C du polymère λ -carraghénane broyé et des oligosaccharides néo- λ -carraoctose (DP8), néo- λ -carrahexaose (DP6) et néo- λ -carraoctose (DP4).

Les doublets des protons anomériques H1 α et H1 β sont annotés.

massique de ces pics a montré que pour un même oligosaccharide plusieurs degrés de substitution par les molécules d'heptilamide sont observables, toutes les formes possédant au moins un sulfate libre étant détectées (**Tableau 16**)

La caractérisation des oligosaccharides minoritaires présents dans les hydrolysats 5 h et 48 h, a aussi pu être réalisée par couplage LC-MS par appariement d'ions sur colonne C_{18} (**Figure 34**). La séparation des oligo- λ -carraghénanes obtenue sur colonne hydrophobe C_{18} est comparable à celle obtenue sur colonne anionique AS11 (**Figure 32**) bien que les pics soient moins bien résolus, phénomène qui reste pour l'instant à éclaircir. Ces analyses LC-MS ont montré la présence majoritaire des oligo- λ -carraghénanes DP2, DP4, DP6 et DP8. Les produits minoritaires ont pu être identifiés comme étant des oligo- λ -carraghénanes possédant un ou deux sulfates supplémentaires (DP4+S, DP6+S, DP8+S, DP6+2S) ou un sulfate en moins (DP4-S). Seule l'analyse RMN de ces oligosaccharides pourrait déterminer la position de ces sulfates supplémentaires. L'analyse RMN n'a pu être réalisée que pour le DP4+S, purifiable en quantité suffisante.

3. Caractérisation des oligo- λ -carraghénanes par RMN.

Les spectres protons des oligo- λ -carraghénanes présentés **figures 35** et **36** ont été enregistrés à 70°C, afin de déplacer le pic d'eau hors de la zone des signaux des protons anomériques H1 α et H1 β . Le spectre ^1H -RMN obtenu pour l'oligo- λ -carraghénane DP2 (**Figure 35**) est la superposition de deux spectres, celui du (D2S,6Snr' α -G2Sr α) et celui du (D2S,6Snr' α -G2Sr β) dans le rapport 0,7/0,3, résultant de l'équilibre anomérique α/β . Le doublet à 4,747 ppm de $^3J_{\text{H1-H2}} = 8$ Hz correspond à l'unique H1 de configuration β de l'unité G2Sr β . Les trois doublets observés dans la zone 5,4 -5,6 ppm, de $^3J_{\text{H1-H2}} = 3$ Hz correspondent aux protons H1 α . Le signal H1 α à 5,508 ppm a été attribué à G2Sr α -H1. Les deux autres signaux H1 α superposés, de déplacements 5,436 ppm (intégration 0,7) et 5,455 ppm (intégration 0,3), ont été attribués aux D2S,6Snr' α -H1 et D2S,6Snr' β -H1, respectivement. Les spectres RMN d'un disaccharide présentent des signaux que l'on ne retrouve pas sur les spectres des oligo-carraghénanes de plus haut degré de polymérisation (Knutsen *et al.*, 1992b). En effet l'unité D2S,6Snr d'un disaccharide possède un environnement unique, à la fois d'unité non réductrice et d'unité voisine de l'extrémité réductrice G2Sr. L'analyse RMN de l'oligo- λ -carraghénane DP2 a donc conclu à une structure D2S,6Snr'-G2Sr, structure de la série néo- λ -carrabiose (coupure liaison β -(1 \rightarrow 4), à laquelle appartiennent aussi les oligo- λ -

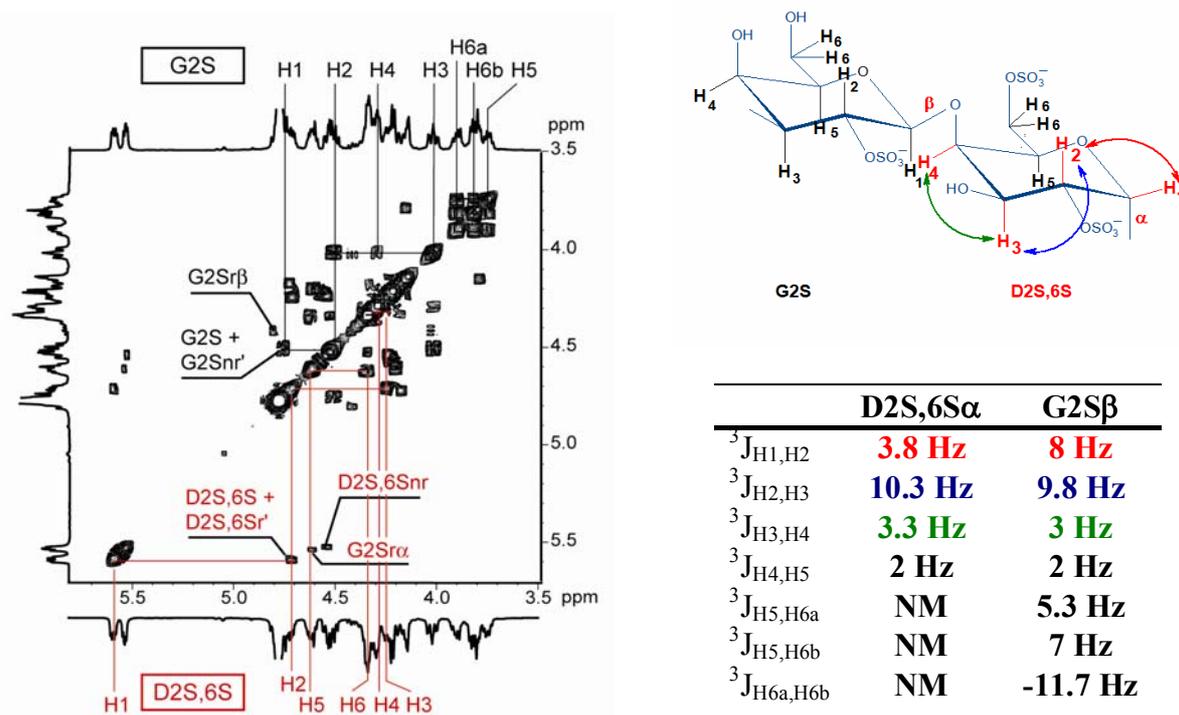


Figure 37 : Spectre 1H COSY à 25 °C du néo- λ -carrhexaose.

Les corrélations entre les protons des motifs centraux G2S (en noir) et D2S,6S (rouge) sont indiquées.

Les constantes de couplage (J Hz) des néo- λ -carrabioses mesurées sont indiquées dans le tableau.

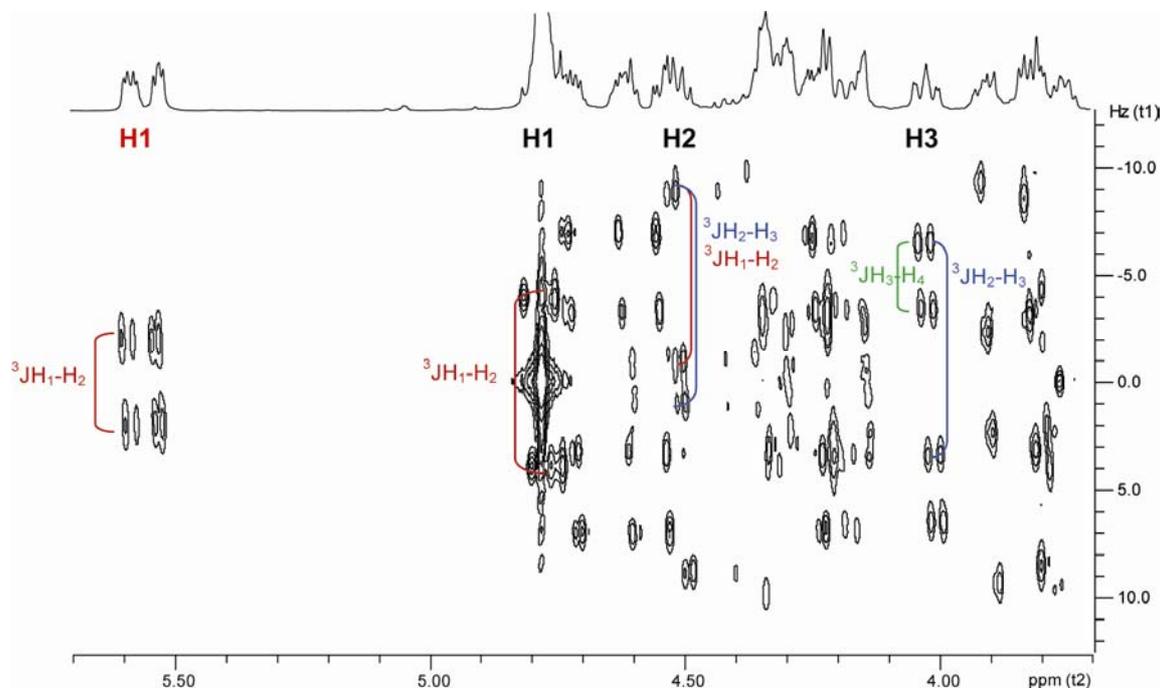


Figure 38 : Spectre Jdelta à 25 °C du néo- λ -carrhexaose.

Les constantes de couplages (Hz) $^3J_{H1,H2}$, $^3J_{H2,H3}$ et $^3J_{H3,H4}$ de l'unité G2S (en noir) et $^3J_{H1,H2}$ de l'unité D2S,6S (en rouge) sont visualisables sur l'axe F1.

carraghénanes DP4, DP6 et DP8.

Les spectres des oligo- λ -carraghénanes DP4, DP6 et DP8 ont en commun les signaux des unités non-réductrices (D2S,6Snr-G2Snr') et des unités réductrices (D2S,6Sr'-G2Sr). Les signaux des unités centrales (D2S,6S-G2S), absents chez le DP4, augmentent d'intensité avec le degré de polymérisation de l'oligosaccharide (**Figure 36**).

Le D2S,6Snr-H1, dont l'intensité reste constante avec l'augmentation du DP, est observé à 5,481 ppm. Le proton anomérique α résonnant à 5,558 ppm a été attribué au D2S,6S-H1 des motifs internes, signal qui se retrouve dans le spectre du polymère à 5,554 ppm. Son signal est superposé à celui du D2S,6Sr' β -H1, visible sur le spectre du DP4, qui possède le même environnement. L'unité D2S,6Sr' α étant liée à une unité G2S d'anomérie α , le doublet de son H1 est déplacé à 5,543 ppm. L'intégration des protons H1 de ces différentes unités D2S,6S a confirmé le degré de polymérisation, déterminé par spectrométrie de masse, des différents oligosaccharides.

Les protons d'anomérie β des motifs central G2S et non-réducteur G2Snr sont mesurés avec déplacements similaires, respectivement à 4,740 et 4,723 ppm. Les signaux de l'unité réductrice G2Sr α et G2Sr β , respectivement à 5,515 et 4,772 ppm, sont les seuls signaux communs à ceux du DP2 (**Figure 36**).

L'attribution de tous les protons et carbones des unités D2S,6S et G2S a été réalisée par des expériences 2D : COSY (**Figure 37**), Jdelta (**Figure 38**), HMQC (**Figure 39**) et HMBC (**Figure 40**).

Les signaux H1 ont été utilisés comme points d'entrée pour l'analyse du spectre COSY (**Figure 37**). Les corrélations présentées sur le spectre permettent l'identification des protons H1 (d), H2 (dd), H3 (dd) et H4 (dd). Les constantes de couplages ont été mesurées précisément par une expérience Jdelta (**Figure 38**) qui représente les constantes de couplage en F1 et les déplacements chimiques en F2. La constante de couplage $^3J_{H4-H5}$ étant trop faible (**Figure 37**), la tache de corrélation ne peut être visualisée sur un spectre COSY. Les systèmes H4/H5/H6 des différentes unités n'ont donc pu être attribués par la seule analyse COSY.

L'analyse HMQC (**Figure 39**) établissant les couplages $^1J_{H-C}$ a permis d'établir la corrélation entre les H1/C1, H2/C2, H3/C3 et H4/C4 des unités. Les signaux des C1 des unités D2S,6S et G2Sr α de conformation α sont présents dans la zone 93,5-95 ppm. Les signaux des G2Snr-C1 et G2S-C1 de conformation β sont plus blindés vers 105,7 ppm. Le signal du G2Sr β -C1 est observé à 98,04 ppm.

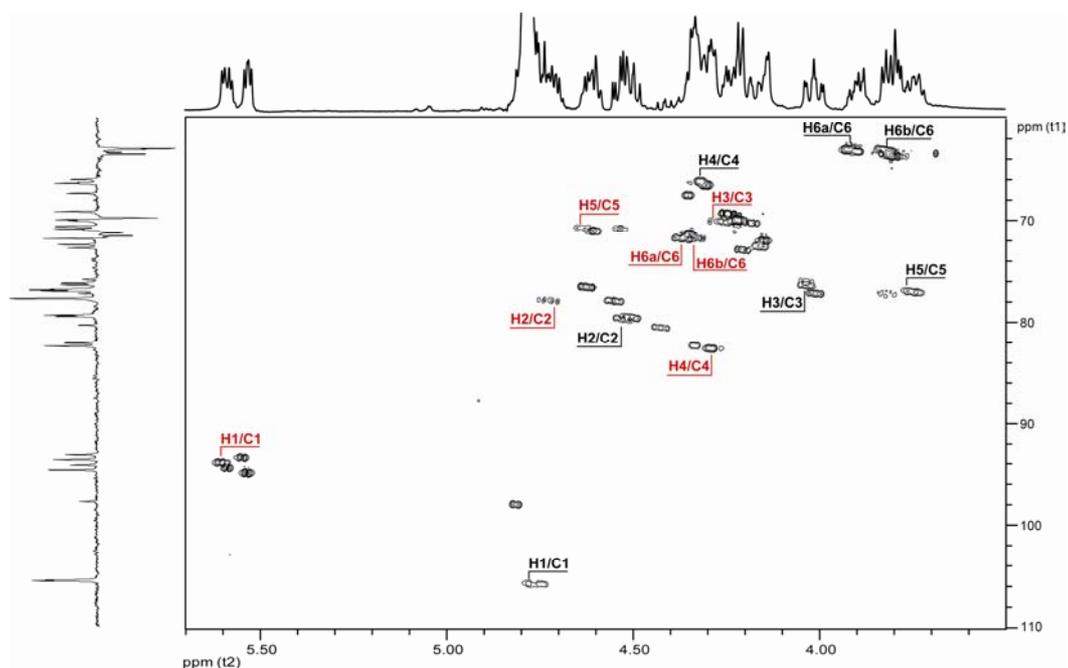


Figure 39 : Spectre hétéronucléaire $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMQC à 25 °C du néo- λ -carrageane.

Les corrélations des protons et carbones des motifs centraux G2S (en noir) et D2S,6S (en rouge) sont indiqués.

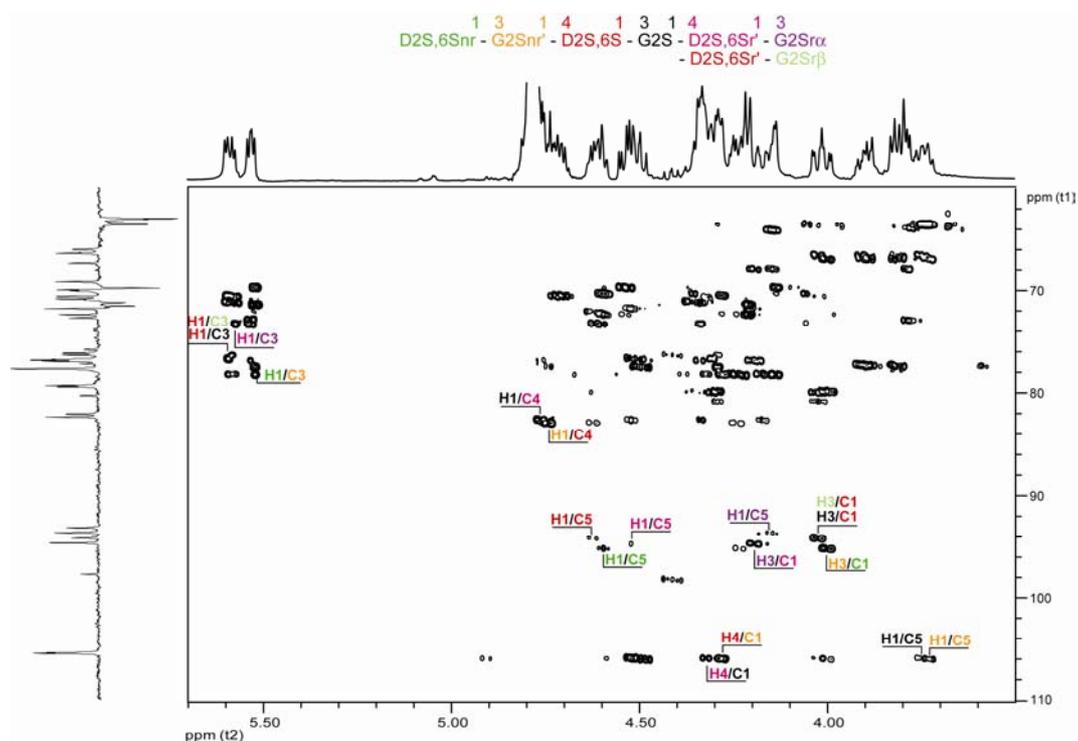


Figure 40 : Spectre hétéronucléaire $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC à 25 °C du néo- λ -carrageane.

Les corrélations des protons/carbones des différentes liaisons sont indiquées ainsi que les couplages H1/C5.

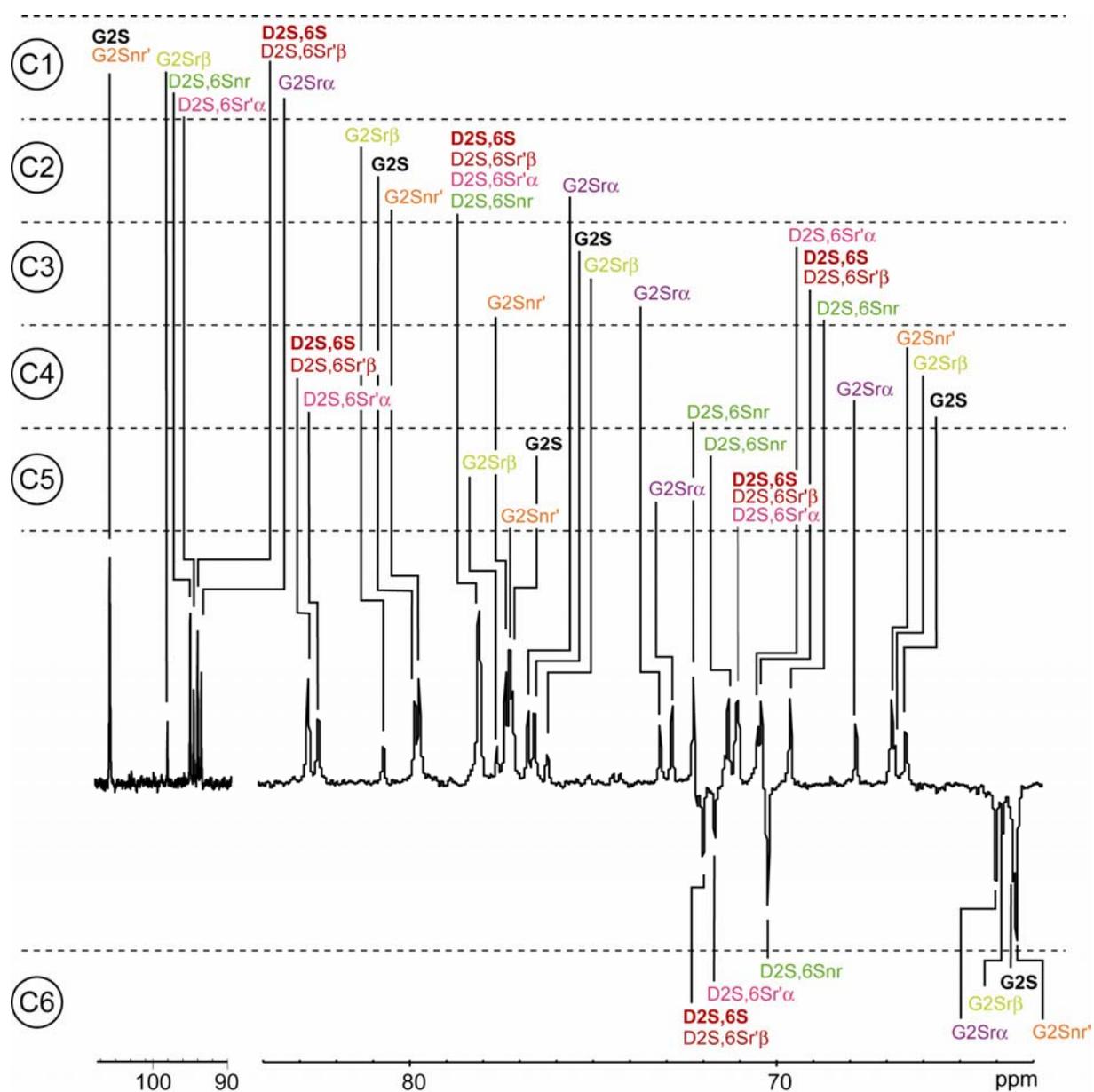


Figure 41 : Spectre Jmod à 25 °C du néo- λ -carrhexaose.

Tous les carbones sont attribués et les carbones des motifs centraux G2S et D2S,6S sont indiqués en noir et en rouge respectivement.

Chapitre I : Analyse structurale du λ -carraghénane par la λ -carraghénase

		λ -carrageenan	(D2S,6S-G2S) ₃	(D2S,6S-G2S) ₂	D2S,6S-G2S,4S- D2S,6S-G2S	D2S,6S-G2S
G2Sr α	H1		5.548 (5.515)	5.518 (5.515)	5.520	5.549 (5.508)
G2Sr β	H1		4.814 (4.772)	4.803 (4.776)	4.790	4.792 (4.747)
G2S	H1	4.781 *	4.781			
G2Snr'	H1		4.746	4.760	4.780	
G2Sr α	H2		4.624	4.607	4.603	4.584
G2Sr β	H2		4.426	4.406	4.408	4.385
G2S	H2	4.503	4.533			
G2Snr'	H2		4.502	4.480	4.461	
G2Sr α	H3		4.208	4.195	4.190	4.149
G2Sr β	H3		4.036	4.025	4.013	3.997
G2S	H3	3.965	4.036			
G2Snr'	H3		4.012	4.005	4.102	
G2Sr α	H4		4.354	4.341	4.332	4.314
G2Sr β	H4		4.304	4.295	4.281	4.272
G2S	H4	4.319 *	4.319			
G2Snr'	H4		4.304	4.295	5.033	
G2Sr α	H5		4.158	4.147	4.140	4.139
G2Sr β	H5	3.749	3.816	3.800	3.790	3.751
G2S	H5		3.757			
G2Snr'	H5		3.741	3.741	3.826	
G2Sr α	H6a		3.785	3.765	3.770	3.770
G2Sr β	H6a		3.813	3.805	ND	3.817
G2S	H6a	3.873	3.826			
G2Snr'	H6a		3.826	3.807	3.852	
G2Sr α	H6b		3.813	3.795	3.794	3.789
G2Sr β	H6b		3.898	3.885	ND	3.817
G2S	H6b	3.822	3.922			
G2Snr'	H6b		3.922	3.916	3.898	
D2S,6Sr' α	H1		5.589 (5.543)	5.580 (5.555)	5.571	
D2S,6Sr' β	H1		5.607 (5.558)	5.585 (5.560)	5.575	
D2S,6S	H1	5.592 (5.554)	5.607 (5.558)			(β) 5.516 (5.455) /
D2S,6Snr	H1		5.537 (5.481)	5.522 (5.483)	5.518	(α) 5.492 (5.436)
D2S,6Sr' α	H2		4.740	4.733	4.702	
D2S,6Sr' β	H2		4.711	4.705	ND	
D2S,6S	H2	4.711 *	4.711			
D2S,6Snr	H2		4.550	4.537	4.527	(β/α) 4.522
D2S,6Sr' α	H3		4.184	4.169	4.150	
D2S,6Sr' β	H3		4.258	4.247	4.233	
D2S,6S	H3	4.258 *	4.258			
D2S,6Snr	H3		4.247	4.234	4.392	(β) 4.225 / (α) 4.153
D2S,6Sr' α	H4		4.336	4.325	4.314	
D2S,6Sr' β	H4		4.293	4.284	4.272	
D2S,6S	H4	4.293 *	4.293			
D2S,6Snr	H4		4.149	4.136	4.134	(β) 4.134 / (α) 4.153
D2S,6Sr' α	H5		4.535	4.522	4.497	
D2S,6Sr' β	H5		4.637	4.601	4.587	
D2S,6S	H5	4.637 *	4.637			
D2S,6Snr	H5		4.607	4.589	4.429	(β) 4.584 / (α) 4.503
D2S,6Sr' α	H6a		4.349	4.334	4.335	
D2S,6Sr' β	H6a		4.319	4.313	4.318	
D2S,6S	H6a	4.367 *	4.367			
D2S,6Snr	H6a		4.223	4.208	4.208	(β) 4.210 / (α) 4.210
D2S,6Sr' α	H6b		4.349	4.334	4.335	
D2S,6Sr' β	H6b		4.367	4.356	4.358	
D2S,6S	H6b	4.367 *	4.367			
D2S,6Snr	H6b		4.223	4.208	4.208	(β) 4.210 / (α) 4.210

Tableau 17 : Déplacements chimiques protons du λ -carraghénane et des oligo- λ -carraghénanes à 25 °C.

Entre parenthèses sont indiqués les déplacements à 70°C. Les valeurs indiquées par un astérisque ont été déduites des valeurs du motif central du néo- λ -carraghénane.

Chapitre I : Analyse structurale du λ -carraghénane par la λ -carraghénase

		λ -carrageenan	(D2S,6S-G2S) ₃	(D2S,6S-G2S) ₂	D2S,6S-G2S,4S- D2S,6S-G2S	D2S,6S-G2S
G2Sr α	C1		93.51	93.49	93.50	93.45
G2Sr β	C1		98.04	98.03	98.00	98.05
G2S	C1	105.76	105.72			
G2Snr'	C1		105.79	105.68	105.80	
G2Sr α	C2		76.76	76.74	76.68	76.58
G2Sr β	C2		80.71	80.69	80.92	80.59
G2S	C2	79.88	79.85			
G2Snr'	C2		79.74	79.66	79.83	
G2Sr α	C3		73.17	73.14	72.99	74.27
G2Sr β	C3		76.23	76.21	76.27	76.89
G2S	C3	76.51	76.59			
G2Snr'	C3		77.37	77.34	77.36	
G2Sr α	C4		67.83	67.79	67.66	68.44
G2Sr β	C4		66.78	66.75	66.56	67.09
G2S	C4	66.54	66.47			
G2Snr'	C4		66.85	66.87	<u>76.27</u>	
G2Sr α	C5		72.83	72.81	72.72	72.90
G2Sr β	C5		77.60	77.59	77.50	77.67
G2S	C5	77.27	77.20			
G2Snr'	C5		77.26	77.34	77.09	
G2Sr α	C6		64.01	63.99	63.97	63.93
G2Sr β	C6		63.82	63.81	63.69	63.75
G2S	C6	63.55	63.52			
G2Snr'	C6		63.45	63.45	63.42	
D2S,6Sr' α	C1		94.53	94.49	94.45	
D2S,6Sr' β	C1		93.99	93.95	93.97	
D2S,6S	C1	94.06	93.99			
D2S,6Snr'	C1		94.99	94.98	97.92	(β) 94.85 / (α) 95.89
D2S,6Sr' α	C2		78.11	78.09	77.91	
D2S,6Sr' β	C2		78.11	78.09	77.91	
D2S,6S	C2	78.11	78.11			
D2S,6Snr'	C2		78.11	78.09	78.19	(β/α) 78.07
D2S,6Sr' α	C3		70.50	70.50	70.26	
D2S,6Sr' β	C3		70.41	70.42	N.D	
D2S,6S	C3	70.52	70.41			
D2S,6Snr'	C3		69.62	69.60	69.57	(β/α) 69.67
D2S,6Sr' α	C4		82.48	82.37	82.97	
D2S,6Sr' β	C4		82.76	82.66	83.24	
D2S,6S	C4	82.68	82.76			
D2S,6Snr'	C4		72.26	72.25	71.97	(β) 72.28/ (α) 72.07
D2S,6Sr' α	C5		71.09	71.04	71.08	
D2S,6Sr' β	C5		71.03	71.04	71.08	
D2S,6S	C5	71.12	71.03			
D2S,6Snr'	C5		71.30	71.30	71.62	(β) 71.36 / (α) 71.20
D2S,6Sr' α	C6		71.67	71.60	71.62	
D2S,6Sr' β	C6		71.99	72.08	72.17	
D2S,6S	C6	72.06	71.99			
D2S,6Snr'	C6		70.23	70.23	69.71	(β) 70.40 / (α) 69.79

Tableau 18 : Déplacements chimiques protons du λ -carraghénane et des oligo- λ -carraghénanes à 25 °C.

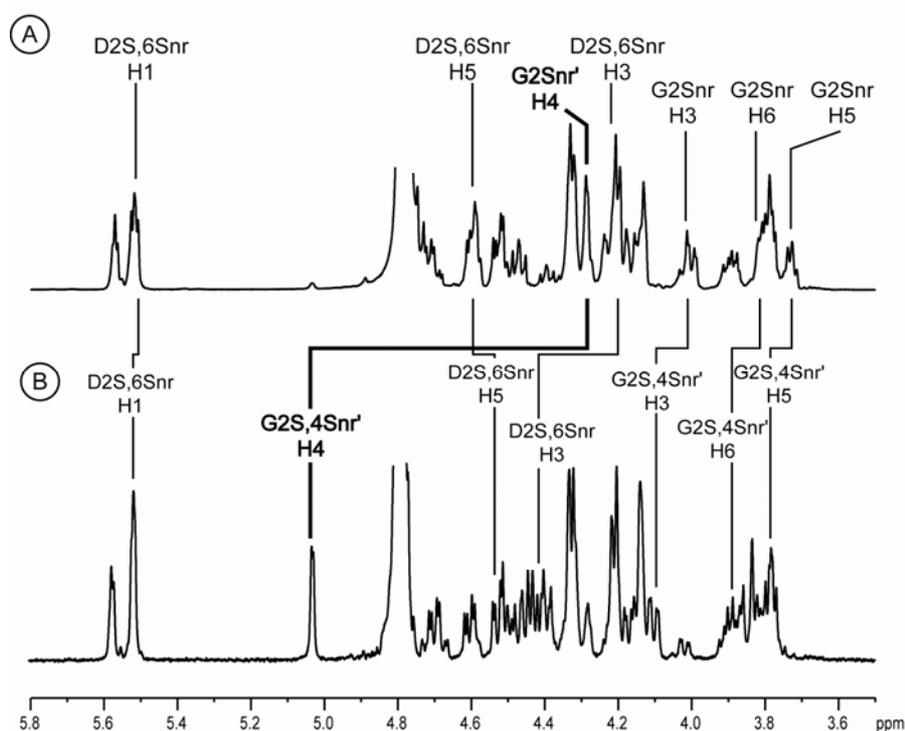


Figure 42 : Spectres ^1H -RMN à 25 °C des tétrasaccharides DP4 (D2S,6Snr-G2Snr'-D2S,6Sr'-G2Sr) et DP4+S (D2S,6Snr-G2S,4Snr'-D2S,6Sr'-G2Sr).

Les déplacements des signaux causés par la sulfatation supplémentaire en C4 du G2Snr' sont indiqués.

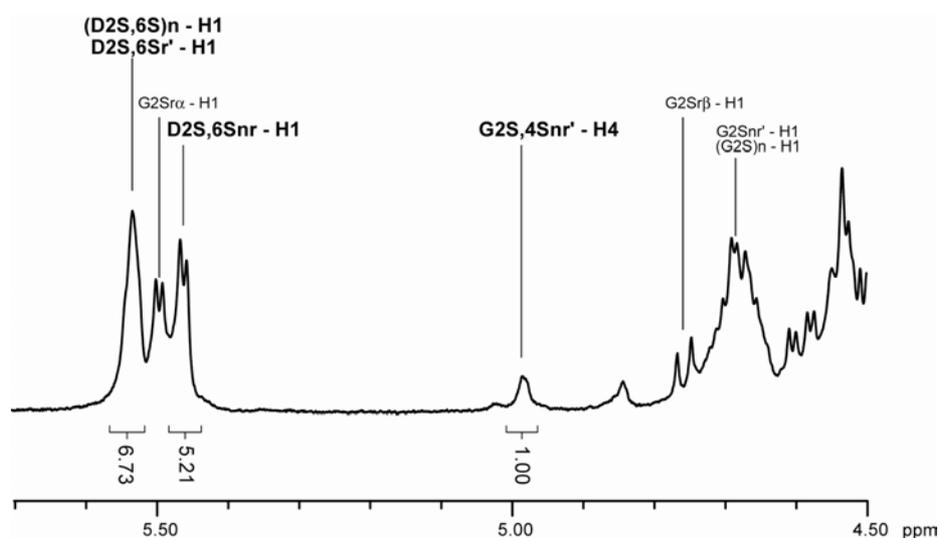


Figure 43: Spectre ^1H -RMN à 70 °C du pool d'oligosaccharides purifiés par SEC après 5h d'hydrolyse.

Détermination du taux d'unité G2S,4S par intégration du signal du G2S,4Snr'-H4 et des D2S,6S-H1.

L'expérience HMBC (**Figure 40**) a permis de visualiser le couplage 3J entre H1/C5 et H5/C1 ce qui a permis de relier le système H1/C1-H4/C4 au système H5/C5-H6/C6 d'un même cycle pyranose. La différenciation entre C5 et C6 a été confirmée par l'expérience Jmod (**Figure 41**) qui permet de différencier les carbones primaires (C1-C5, signaux positifs) des carbones secondaires (C6, signaux négatifs). Les valeurs 1H et ^{13}C -RMN obtenues sont présentées dans les **tableaux 17** et **18**. L'expérience HMBC (**Figure 40**) a aussi permis de déterminer la séquence des différentes unités par identification des couplages entre les G2S-H1/D2S,6S-C4 et G2S-C1/D2S,6S-H4 des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$ et les D2S,6S-H1/G2S-C3 et D2S,6S-C1/G2S-H3 des liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$

Analyse RMN du tétrasaccharide sulfaté DP4+S

L'analyse RMN de l'oligosaccharide DP4+S a été réalisée pour déterminer la position de son sulfate supplémentaire, détecté par spectrométrie de masse. La sulfatation d'un groupement hydroxyle cause un déblindage (8-11 ppm) du carbone auquel il est lié (effet α du substituant) alors que les 2 carbones voisins sont blindés (2-4 ppm) (effet β) (Usov, 1984). La sulfatation cause aussi un déblindage du proton géminale de 0,6 ppm et son effet sur les protons vicinaux dépend de l'orientation axiale/équatoriale des deux groupements (Harris *et al.*, 1970).

La comparaison des spectres 1H et ^{13}C -RMN du DP4 et du DP4S (**Figure 42**) montre que le sulfate supplémentaire devrait être positionné sur le groupement hydroxyle en C4 de l'unité G2S'nr. Le G2S'nr-C4 et le proton géminale G2Snr'-H4 sont en effet déblindés de 9,4 ppm et 0,72 ppm respectivement sur le spectre du DP4+S. L'effet α de la sulfatation est par contre inexistant sur G2S'nr-C3 et très faible sur G2S'nr-C5 (-0,25 ppm) (**Tableau 17**). Les protons voisins G2S'nr-H3 et G2S'nr-H5 ont par contre été plus affectés par cette sulfatation supplémentaire et montre respectivement un déblindage de 0,097 et 0,085 ppm (**Tableau 16**).

L'estimation du taux de cette sulfatation supplémentaire sur l'hydroxyle en G2S'nr-C4 a été réalisée par analyse 1H -RMN à 70 °C du pool d'oligosaccharides obtenus après 5 h d'hydrolyse (**Figure 43**). La fraction molaire de l'unité G2S,4S a été déterminée en divisant

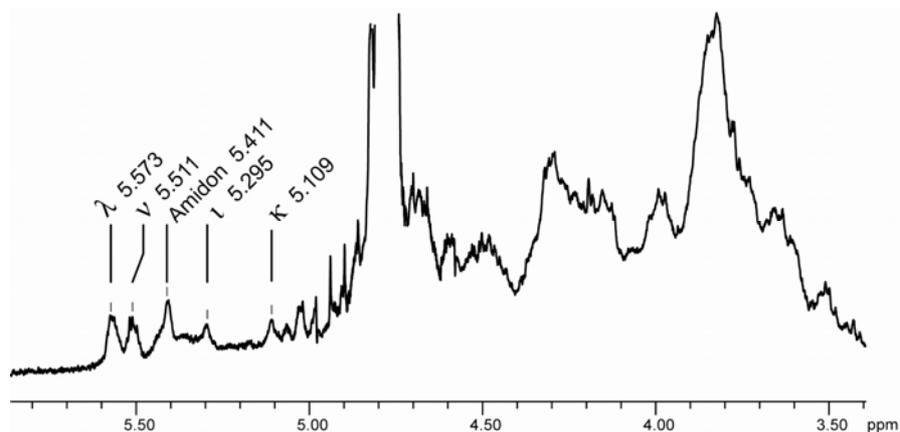


Figure 44 : Spectre ^1H -RMN à 25 °C de la fraction résistante à la λ -carraghénase du λ -carraghénane de *G. skottsbergii*.

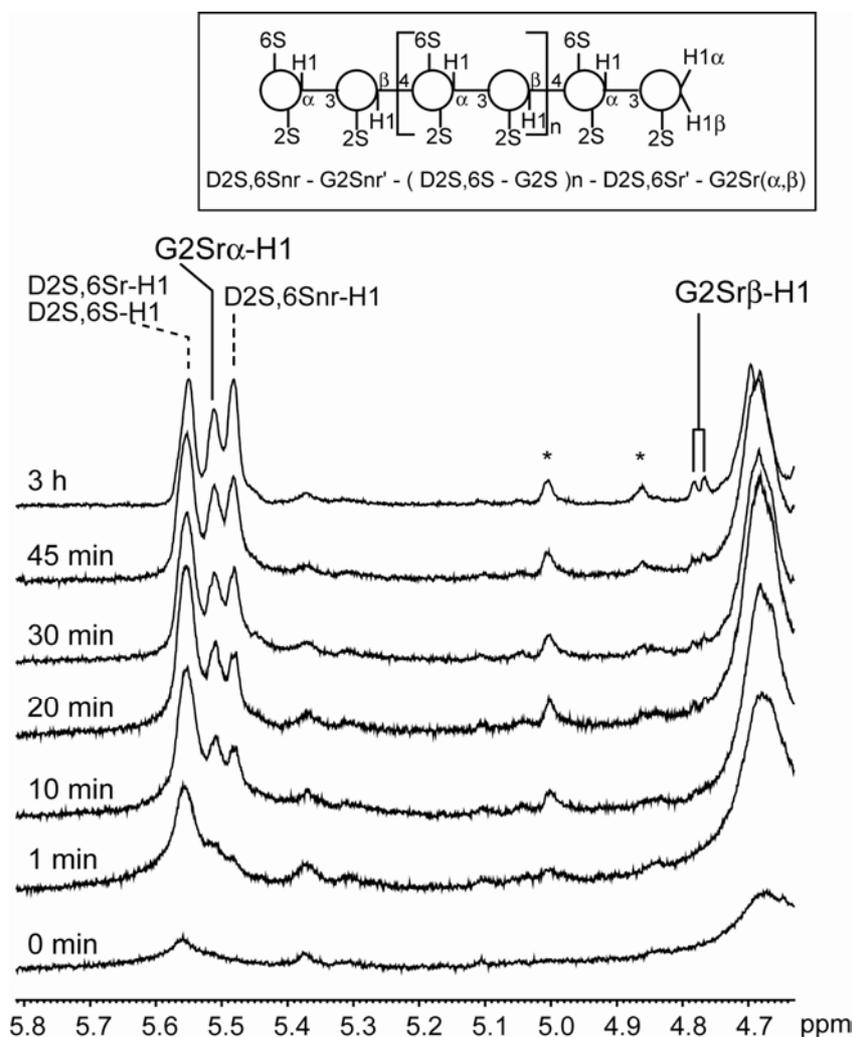


Figure 45 : Suivi de l'hydrolyse enzymatique du λ -carraghénane par ^1H -RMN à 70 °C.

Les signaux des protons anomériques des extrémités réductrices G2Sr α et G2Sr β sont indiqués.

l'intégration du signal G2S,4Snr'-H4 à 4.99 ppm par la somme des intégrations des signaux H1 des unités D2S,6S (non réductrices, centrales et réductrices). La somme des intégrations des signaux D2S,6S-H1 devrait être identique à la somme des intégrations des signaux G2S,4S-H-4 et G2S-H-4. Une proportion de 8% d'unités G2S,4S a ainsi été déterminée au sein de la chaîne de λ -carraghénane hydrolysée par l'enzyme.

E. Analyse de la fraction résistante à l'enzyme

L'analyse HPSEC-MALLS de la fraction résistante à l'enzyme (FR) (**Figure 29, p75**), a permis d'estimer celle-ci à approximativement 5% de la masse initiale du λ -carraghénane. Après avoir été purifiée lors de la séparation sur Superdex 30 préparative, l'analyse RMN de la fraction résistante (**Figure 44**) a montré qu'elle était composée dans des proportions similaires de carraghénanes de motifs lambda résiduel, mais aussi de motifs nu, iota et kappa carrabioses et peut-être d'amidon floridéen. La faible résolution du spectre RMN ne permet pas une caractérisation plus précise de cette fraction résistante. La présence de groupement méthyle ou pyruvate n'a pas été détectée.

F. Etude du mode d'action de l'enzyme

Les produits limites d'hydrolyse présentent une anomérisation α/β de 0,7/0,3. Afin de déterminer si la coupure de la liaison β -(1 \rightarrow 4) a été réalisée avec rétention ou inversion de configuration, l'hydrolyse du polymère a été suivie par spectrométrie ^1H -RMN (**Figure 45**).

Avant action de l'enzyme, le spectre ^1H -RMN présente uniquement le signal peu résolu de l'unité centrale D2S,6S-H1 du polymère à 5,55 ppm. Après coupure du polymère, les signaux des protons anomériques des extrémités non-réductrices D2S,6Snr-H1 et réductrices G2Sr α -H1, sont apparus respectivement à 5,48 et 5,52 ppm en proportion égale. L'apparition en premier de l'anomère α traduit une inversion de la configuration lors de la coupure de la liaison. Ce n'est qu'après 20 min d'hydrolyse que l'interconversion s'est produite et que le signal de l'anomère G2Sr β -H1 a été détecté à 4,77 ppm.

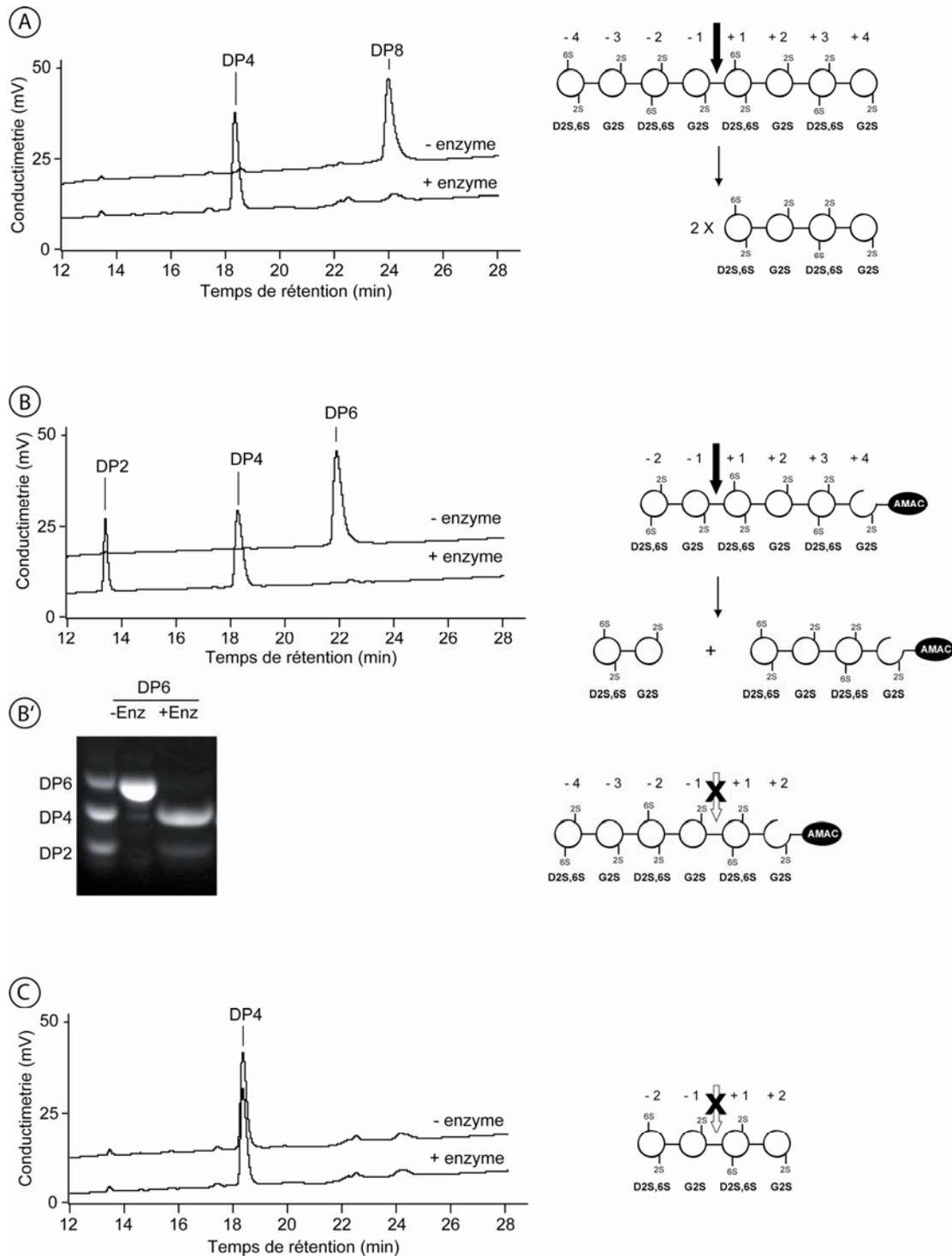


Figure 46 : Etude du site actif de la λ -carraghénase.

Analyse par HPAEC de l'hydrolyse par la λ -carraghénase des oligo- λ -carraghénanes purifiés DP8 (A), DP6 (B) et DP4 (C) afin de déterminer la taille minimale du substrat hydrolysable. B'. Afin de visualiser le site de coupure sur le DP6, le DP6 a été marqué par la molécule fluorescente AMAC à son extrémité réductrice et son hydrolyse a été suivie par C-PAGE et le résultat visualisé sous UV. Un mélange d'oligosaccharides marqués DP2, DP4 et DP6 a été utilisé comme standard de migration.

G. Etude du site actif.

Afin d'obtenir des informations sur le site actif de la λ -carraghénase, l'hydrolyse des oligo- λ -carraghénanes DP8, DP6 et DP4 de la série néo- λ -carrabiose a été réalisée, et le suivi de leur hydrolyse effectuée par HPAEC (**Figure 46**). Le DP8 a été hydrolysé en deux molécules de DP4 (**Figure 46A**). La coupure serait donc centrale, et le DP8 se placerait dans les sous-sites -4,-3,-2,-1,+1,+2,+3,+4 du site actif de l'enzyme. Le DP6 a été hydrolysé en DP4 et DP2 (**Figure 46B**). Deux sites de coupure étant possibles pour obtenir ces produits, l'unité réductrice de l'hexasaccharide a été marquée par une molécule fluorescente (AMAC) avant l'hydrolyse (**Figure 46B**). L'obtention très majoritaire de DP4 fluorescent montre que l'hexasaccharide fluorescent s'est placé dans les sous-sites -2,-1,+1,+2,+3,+4 de l'enzyme. Le DP4 n'a pu être hydrolysé en 2 molécules de DP2, il est donc bien un produit limite d'hydrolyse (**Figure 46C**).

DISCUSSION

I. Mode d'action de la λ -carraghénase de *P. carrageenovora*

Les produits d'hydrolyse libérés par la λ -carraghénase ont été caractérisés par RMN comme appartenant à la série néo- λ -carrabiose, ce qui démontre que la λ -carraghénase de *P. carrageenovora* coupe les liaisons β -(1 \rightarrow 4) du polymère λ -carraghénane. La coupure de cette liaison glycosidique semble être un point commun à toutes les carraghénases déjà étudiées (κ -, ι - et λ -carraghénases). Il est possible que l'énergie de cette liaison soit plus faible que la liaison α -(1 \rightarrow 3), donc plus facilement hydrolysable.

Le mode de coupure diffère néanmoins selon les carraghénases. La ι -carraghénase agit par inversion de configuration du proton anomérique, contrairement à la κ -carraghénase qui retient la configuration. Le suivi cinétique par ^1H -RMN de l'hydrolyse a démontré que la λ -carraghénase agissait par inversion de configuration du proton anomérique, libérant ainsi des oligo- λ -carraghénanes d'extrémité réductrice d'anomérie α . Un équilibre des formes anomériques α/β s'établit ensuite en faveur de la forme α par un mécanisme d'interconversion. La présence d'un sulfate en position 2 sur l'unité G du λ -carraghénane pourrait être la cause de ce mécanisme d'inversion de configuration. En effet, un mécanisme avec rétention de configuration impliquerait l'attaque du groupement carbonyle basique sur le carbone anomérique et la formation d'un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme, ce qui semble très improbable avec la présence d'un groupement sulfate imposant en position 2. Cet encombrement du site de coupure est favorable au mécanisme d'inversion de configuration observé, qui implique uniquement l'attaque d'un groupement OH^- en C1.

La λ -carraghénase dépolymérise le λ -carraghénane selon un mode d'attaque endo. Ce mode d'attaque se caractérise par la dépolymérisation très rapide du λ -carraghénane après un faible nombre de coupures enzymatiques, observée par HPSEC-MALLS. La formation de chaînes de différentes tailles a été observée, caractérisée par une polydispersité élevée, jusqu'à atteindre les produits limites d'hydrolyse. Deux phénomènes inhabituels à un mode endo strict ont été observés; la formation très rapide des produits limites de DP4 et DP6 dès

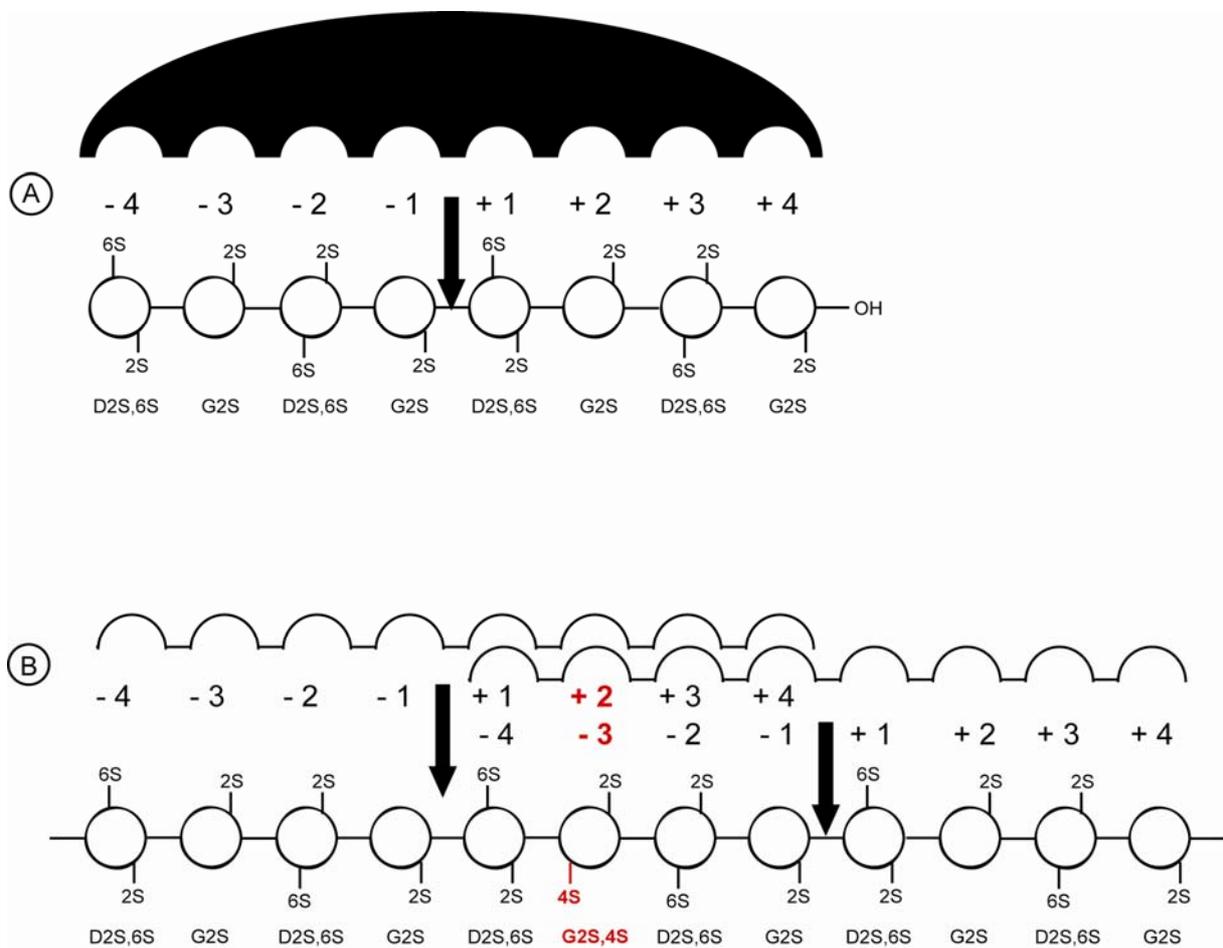


Figure 47 : Données obtenues sur la spécificité du site actif de la λ -carraghénase.

(A) Positionnement et coupure des chaînes de motifs λ -carraghénane. (B) Positionnements des unités G2S,4S dans le site actif de l'enzyme pour obtenir le tétrasaccharide D2S,6S-G2S,4S-D2S,6S-G4S.

les premiers instants de l'hydrolyse, et la faible concentration des oligosaccharides de tailles intermédiaires DP10-20 environ.

La formation très rapide des produits limites de DP4 et DP6 ne peut pas s'expliquer par un mode d'action de type endo-processif de la λ -carraghénase. En effet, dans le cas d'un mode processif, l'enzyme se déplacerait le long de la chaîne et rencontrerait des liaisons β -(1 \rightarrow 4) d'orientation correcte pour une fixation productive tous les deux motifs disaccharidiques. Elle libérerait donc dans ce cas uniquement des oligosaccharides DP4 et multiples de DP4. Or la formation simultanée d'oligosaccharides DP4 et DP6 dans les mêmes proportions a été observée. La λ -carraghénase serait donc endo stricte. La faible concentration des oligosaccharides de tailles intermédiaires DP10-20 environ, pourrait s'expliquer par une hydrolyse prioritaire par l'enzyme de ces oligosaccharides dès qu'ils sont formés en oligosaccharides de DP4 et DP6. Cette propriété de l'enzyme pourrait s'être développée en réponse à une faible mobilité des longues chaînes dans le milieu visqueux des premiers temps de l'hydrolyse.

II. Spécificité du site actif de la λ -carraghénase.

Le site actif de la λ -carraghénase a été étudié à travers l'hydrolyse des néo- λ -carrabioses de DP8, DP6 et DP4. Les résultats ont montré que la λ -carraghénase posséderait 8 sous-sites (-4, -3, -2, -1, +1, +2, +3, +4) et que le substrat minimum requis pour une fixation productive serait le néo- λ -carrahexaose. Celui-ci se positionnerait dans les sous-sites (-2, -1, +1, +2, +3, +4) du site actif (**Figure 47A**). La faible concentration de DP8, par rapport à la concentration de DP6, observée lors de l'hydrolyse, montrerait une hydrolyse plus rapide lorsque tous les 8 sous-sites de l'enzyme sont occupés, permettant une meilleure fixation du substrat.

L'analyse des hydrolysats de carraghénanes extraits de tétrasporophytes de différentes algues a montré la présence d'oligosaccharides de structures hybrides, en plus des oligosaccharides de la série néo- λ -carrabiose. Ceci montre que la λ -carraghénase peut accepter dans son site actif des motifs autres que des motifs lambda (G2S-D2S,6S). Cette flexibilité de reconnaissance a déjà été reportée pour la κ -carraghénase (Knutsen *et al.*, 1987), et reflète probablement l'adaptation des carraghénases aux structures hybrides rencontrées dans la paroi des algues.

La caractérisation du tétrasaccharide DP4+S (D2S,6S-G2S,4S-D2S,6S-G2S) parmi les produits d'hydrolyse de la λ -carraghénase, a établi que l'enzyme pourrait hydrolyser des structures contenant des motifs G2S,4S-D2S,6S. Pour obtenir ce tétrasaccharide, les unités G2S,4S du polymère se seraient positionnées dans le sous-site -3 lors de l'hydrolyse du côté réducteur, et dans le sous-site +2 lors de l'hydrolyse du côté non-réducteur (**Figure 47B**). Ce qui suppose une flexibilité de ces sous-sites pour pouvoir accepter un groupement sulfate supplémentaire. La λ -carraghénase pourrait donc être très stricte sur des unités G2S et D2S,6S placées dans les sous-sites -2, -1 et +1, et accepter des unités G2S,4S dans les sous-sites -3 et +2.

Greer a aussi montré la présence de motifs θ (G2S-DA2S), ξ (G2S-D2S) et π (G2S-DP2S), dans les produits de l'hydrolyse par la λ -carraghénase du carraghénane extrait de *G. canaliculata* (Greer, 1984). La λ -carraghénase semblerait être spécifique des carraghénanes de la famille lambda, c'est à dire des carraghénanes possédant un sulfate en position 2 de l'unité G2S. Il reste désormais à déterminer si la λ -carraghénase hydrolyserait par exemple des polymères de motifs θ (G2S-DA2S), ce qui supposerait que la λ -carraghénase puisse accepter des unités DA2S en position +1 de son site actif. Un λ -carraghénane avec une répartition aléatoire de ces motifs θ , ξ , π dans sa chaîne serait certainement plus facilement hydrolysable par la λ -carraghénase, car ces unités DA2S, D2S ou DP2S pourraient occuper les sous-sites -4, -2 ou +3 de l'enzyme probablement plus flexibles. A l'avenir, les analyses de la structure des différents oligosaccharides obtenus par action de la λ -carraghénase sur des substrats plus hétérogènes aideront à la caractérisation de la spécificité de l'enzyme, et réciproquement.

III. Analyse RMN du λ -carraghénane et des oligo- λ -carraghénanes.

L'analyse RMN des oligo- λ -carraghénanes n'a pas été facilitée par le peu de points de comparaison avec les données RMN disponibles sur cette structure lambda. Seule une attribution ^{13}C -RMN du polymère était disponible ainsi que celle du proton anomérique de conformation α . La complexité des spectres des oligo- λ -carraghénanes est la conséquence d'un changement d'environnement électromagnétique suivant la position des unités G2S et D2S,6S dans l'oligosaccharide (non réductrice, centrale et réductrice). De plus les signaux des unités G2Sr et D2S,6Sr' « se dédoublent » à cause de l'anométrie α/β à l'extrémité réductrice

G2Sr. Cette complexité des spectres ^{13}C -RMN des oligo- λ -carraghénanes de DP4 et DP6 avait été interprétée par Greer (Greer, 1984), comme étant un mélange d'oligosaccharides idéaux et hybrides.

Malgré cette complexité, l'obtention de très bonnes résolutions de spectres 1D et 2D a permis l'attribution complète des protons et carbones de ces oligo- λ -carraghénanes. L'analyse des spectres ^{13}C -RMN a permis de corriger les attributions précédemment établies pour le λ -carraghénane (van de Velde *et al.*, 2004)(**Tableau 6, p.29**). Le spectre du polymère montre en effet 3 signaux carbones proches vers 76-78 ppm et l'analyse RMN des oligosaccharides a permis de montrer que les signaux à 78,11, 77,27 et 76,51 ppm devraient être en fait attribués aux D2S,6S-C2, G2S-C5 et G2S-C3 respectivement, au lieu de G2S-C3, D2S,6S-C2 et G2S-C5. Les signaux attribués au D2S,6S-C3 et D2S,6S-C6 doivent aussi être inversés. Les constantes de couplages obtenues pour les unités G2S sont semblables à celles déjà relevées pour les unités G4S du κ - et ι -carraghénanes (**Tableau 11, p.33**). Les constantes de couplages de l'unité D2S,6S sont par contre différentes de celles des unités DA et DA2S à cause de la présence du pont 3,6-anhydro. En effet, la formation du pont 3,6-anhydro conduirait à une réduction des constantes de couplages de 3-5 Hz pour les $^3J_{\text{H2-H3}}$ et les $^3J_{\text{H3-H4}}$ et à une augmentation de 1-2Hz pour les $^3J_{\text{H4-H5}}$ (Usov, 1984). C'est ce qui est ici observé avec respectivement une réduction d'environ 4,3 et 2,3 Hz des $^3J_{\text{H2-H3}}$ et les $^3J_{\text{H3-H4}}$ et une augmentation de 1 Hz du $^3J_{\text{H4-H5}}$ entre les unités D2S,6S du λ -carraghénane et DA du ι -carraghénane.

IV. Structure hybride du λ -carraghénane de *G. skottsbergii*.

La détermination de la première structure de λ -carraghénane par hydrolyse enzymatique a été menée au cours de ce projet sur le λ -carraghénane de *G. skottsbergii*. Le λ -carraghénane a été dépolymérisé à 95% par l'enzyme et les produits d'hydrolyse obtenus, représentatifs de la structure du carraghénane, ont été caractérisés. Les oligosaccharides de la série néo- λ -carrabiose sont majoritairement présents parmi les produits d'hydrolyse démontrant une structure lambda prédominante. Un oligosaccharide hybride majoritaire a été observé et a pu être caractérisé par RMN comme étant de structure D2S,6Snr-G2S,4Snr'-D2S,6Sr'-G2Sr. La principale irrégularité dans la structure λ -carraghénane de *G. skottsbergii* est donc une sulfatation supplémentaire positionnée en C4 de l'unité G2S. Ces unités G2S,4S ont été estimées à 8% des unités G2S du polymère (**Figure 48**). La présence de G2S,4S

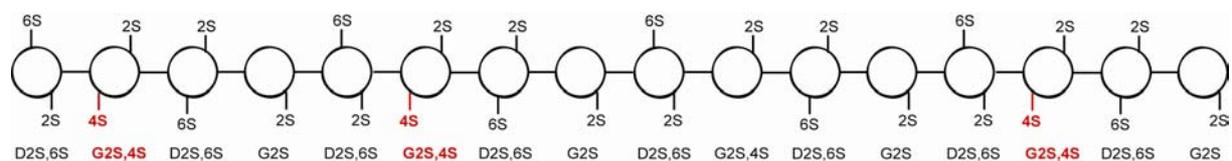


Figure 48 : Schématisation de la structure du λ -carraghénane extrait des tétrasporophytes de *G. skottsbergii*.

Sa structure est composée de motifs lambda avec une dispersion aléatoire de 8% d'unités G2S,4S.

avait déjà été observée chez le tétrasporophyte de *G. skottsbergii* dans des proportions similaires (Matulewicz *et al.*, 1990; Falshaw *et al.*, 2001).

L'analyse LC-MS des oligo-carraghénanes hybrides minoritaires a conclu à des structures lambda avec des taux de sulfatation variables (DP4-S, DP6+S, DP6+2S, DP8+S). Le sulfate supplémentaire observé sur le DP6+S et le DP8+S pourrait aussi être positionné en C4 de l'unité G2S comme sur le DP4+S, mais aussi en C6 de l'unité G2S. La présence d'unités G2S,6S a en effet déjà été observée chez le tétrasporophyte de *G. skottsbergii* (Matulewicz *et al.*, 1990; Falshaw *et al.*, 2001).

Le faible degré de polymérisation de l'oligosaccharide DP4+S contenant cette unité G2S,4S, suggère une distribution aléatoire des 8% d'unités G2S,4S au sein de la chaîne lambda D2S,6S-G2S (**Figure 48**). Le DP6+2S, qui démontrerait la présence de deux motifs tétrasulfatés consécutifs, est présent seulement en très faible quantité. L'existence d'une structure bloc (D2S,6S-G2S,4S) est peu probable d'après l'analyse RMN des 5% de fraction résistante.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les études biochimiques menées sur la λ -carraghénase ont permis de déterminer les différentes caractéristiques relatives à son mode d'action, notamment la spécificité de son site actif. La capacité de la λ -carraghénase à hydrolyser différentes structures de carraghénanes de la famille lambda, a conduit à la formation de produits d'hydrolyse de structures variées. Chaque carraghénane possède ainsi sa propre signature de profil de produits d'hydrolyse. La nature et la proportion de chacun des oligosaccharides de ces profils sont le reflet de la complexité du substrat. La caractérisation de ces différents oligosaccharides permettrait donc de déterminer la structure du polymère.

La première étape a été de purifier et de caractériser par RMN, à partir de l'hydrolysate du λ -carraghénane de *G. skottsbergii*, les oligosaccharides de la série néo- λ -carrabiose présents sur ces profils. La caractérisation des oligosaccharides de structures hybrides a été ensuite entreprise. Un oligosaccharide de structure hybride présent sur le profil d'hydrolyse du λ -carraghénane de *G. skottsbergii* a été caractérisé par RMN comme étant le tétrasaccharide D2S,6Snr-G2S,4Snr'-D2S,6Sr'-G2Sr. Sa caractérisation a permis de démontrer que le λ -carraghénane de *G. skottsbergii* était un λ -carraghénane composé majoritairement de motifs lambda et avec 8% d'unités G2S,4S distribuées aléatoirement dans la chaîne.

Les oligosaccharides hybrides minoritaires de ce profil ont été analysés par LC-MS et leurs degrés de polymérisation et de sulfatation ont pu être déterminés. L'analyse LC-MS des oligosaccharides des profils d'hydrolyse sera toujours nécessaire pour caractériser les oligosaccharides minoritaires, mais la résolution des signaux du profil chromatographique est à perfectionner. Les profils d'hydrolyse des trois carraghénanes extraits de *C. crispus*, *G. pistillata* et *G. acicularis* sont complexes et sont peut-être composés d'oligosaccharides de motifs π , ξ et/ou θ . La purification et la caractérisation RMN de ces oligosaccharides sont encore à réaliser. Le nombre de structures possibles d'oligosaccharides hybrides à caractériser sera néanmoins toujours limité par la spécificité de l'enzyme.

Chapitre II :
Analyse structurale des $\kappa/1$ -carraghénanes

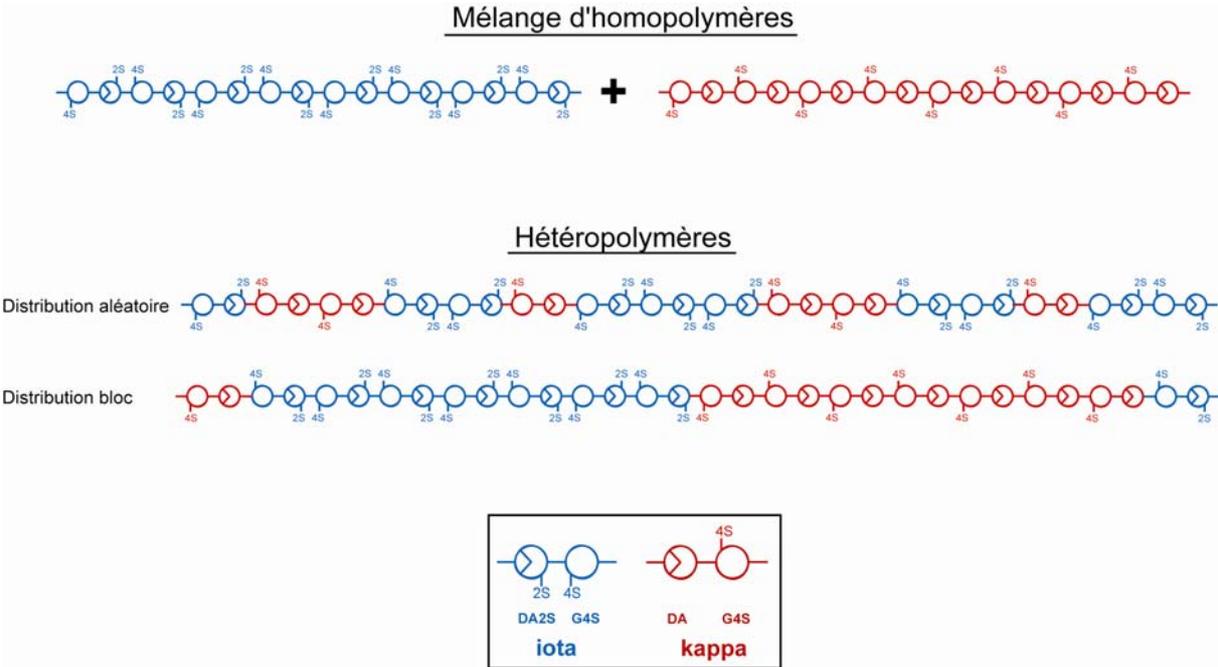


Figure 49 : Schémas d'organisations structurales possibles des κ/ι -carraghénanes.

Chapitre II : Analyse structurale des κ/ι -carraghénanes

INTRODUCTION

Le terme κ/ι -carraghénane définit les carraghénanes dont la structure comporte à la fois des motifs kappa carrabiose et des motifs iota carrabiose. Ces κ/ι -carraghénanes sont aussi parfois appelés κ -2-carraghénanes, terme qui regroupe arbitrairement les κ/ι -carraghénanes avec un taux de iota carrabiose de 20 à 45% (Bixler, 1996).

Ces structures κ/ι -carraghénanes constituent la paroi de gamétophytes de nombreuses espèces de la famille Gigartinaceae. Différentes analyses chimiques et spectroscopiques (IR, RMN) ont été utilisées pour caractériser ces structures κ/ι -carraghénanes, notamment sur les extraits d'algues des genres *Gymnogongrus*, *Ahnfeltia*, *Stenogramme* (Furieux *et al.*, 1985), et des espèces *G. skottsbergii* (Matulewicz *et al.*, 1990), *Iridaea undulosa* (Stortz *et al.*, 1993; Stortz *et al.*, 1994), *C. crispus* (van de Velde *et al.*, 2001). La proportion de motifs kappa carrabiose et iota carrabiose rencontrée est variable suivant ces espèces, répertoriées dans un diagramme, appelé diagramme de Stancioff (**Figure 7, p.11**). Les motifs précurseurs mu et nu carrabioses, qui peuvent être naturellement présents dans ces structures κ/ι , sont souvent éliminés lors de l'extraction par transformation alcaline.

Pour la production commerciale, les κ -2-carraghénanes ont été extraits, à l'origine, des gamétophytes de *C. crispus* (Canada), mais les algues *G. skottsbergii*, *G. chamissoi* et *Sarcothalia crispata* sont désormais les principales ressources (van de Velde *et al.*, 2005). Les applications alimentaires de ces κ -2-carraghénanes sont de plus en plus importantes (Bixler *et al.*, 2001; Falshaw *et al.*, 2001; Falshaw *et al.*, 2003; Villanueva *et al.*, 2004). En effet, ces carraghénanes possèdent des propriétés fonctionnelles particulières dans les produits laitiers. Ils forment des gels plus faibles dans l'eau que les κ -carraghénanes, tout en gardant une réactivité forte par rapport au lait (Falshaw *et al.*, 2001).

Différents travaux faisant intervenir plusieurs approches (DSC, rotation optique, viscosimétrie, réactivité avec le lait) ont montré que ces κ/ι -carraghénanes ne possédaient pas les mêmes propriétés physiques et rhéologiques que des mélanges artificiels d'homopolymères κ - et ι -carraghénanes (Stancioff, 1981; Ridout *et al.*, 1996; van de Velde *et al.*, 2001) (**Figure 49**). Il est donc désormais communément accepté que ces κ/ι -

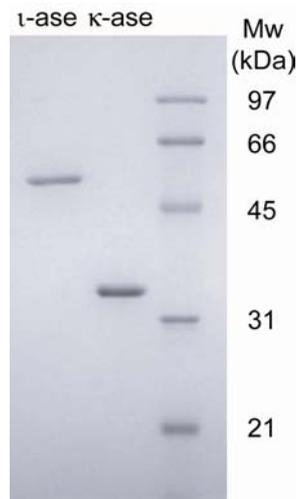


Figure 50 : Analyse par gel SDS-PAGE de la pureté de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* et de la ι -carraghénase d'*A. fortis*, purifiées par chromatographie d'affinité.

La coloration a été effectuée au bleu de Coomassie.

carraghénanes seraient des hétéropolymères, c'est-à-dire que leurs motifs kappa et iota seraient présents sur la même chaîne du carraghénane. Mais aucune preuve structurale directe n'a été apportée pour le confirmer ou pour montrer une répartition bloc ou aléatoire de ces motifs kappa et iota dans la chaîne hétérogène (**Figure 49**).

Par contre, l'hétérogénéité κ/ι de chaînes de κ -carraghénanes extraits de *K. alvarezii* (Bellion *et al.*, 1981; Bellion *et al.*, 1982) et de *Hypnea musciformis* (Greer *et al.*, 1984e) a déjà été démontrée en utilisant les κ - et ι -carraghénases comme outils d'analyse structurale. Ces κ -carraghénanes possèderait une structure kappa bloc majoritaire avec une répartition de motifs iota carrabioses minoritaires. Ces résultats ont été déduits de l'analyse de profils de chromatographie d'exclusion de taille des produits d'hydrolyse obtenus par action des deux enzymes, combinée à des analyses ^{13}C -RMN des produits d'hydrolyse et des fractions résistantes. L'utilisation de ces enzymes sur des κ/ι -carraghénanes qui contiennent un taux de motifs iota plus élevé que ces κ -carraghénanes, devrait aussi permettre d'obtenir des informations sur l'agencement des motifs kappa et iota dans leurs structures.

Pour utiliser ces enzymes comme outils d'analyse structurale, il est nécessaire d'avoir accès à des enzymes pures et dont les propriétés sont bien caractérisées. Les carraghénases utilisées pour cette étude sont la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* et la ι -carraghénase d'*A. fortis*, qui sont produites sous formes recombinantes au laboratoire (**Figure 50**). La caractérisation de ces κ - et ι -carraghénases a démontré qu'elles coupaient spécifiquement les liaisons β -(1 \rightarrow 4) respectivement des κ - et ι -carraghénanes. Les produits limites de la κ -carraghénase sont les néo- κ -carrabiose et néo- κ -carratétraose, et ceux de la ι -carraghénase sont les néo- ι -carratétraose et néo- ι -carrahexaose (Bellion *et al.*, 1982).

L'action des ces deux carraghénases a été testée sur des κ/ι -carraghénanes extraits de quatre espèces d'algues de la famille Gigartinaceae. La comparaison des profils d'hydrolyse obtenus, avec ceux de mélanges d'homopolymères κ - et ι -carraghénanes, a permis de conclure que ces κ/ι -carraghénanes étaient des hétéropolymères. La caractérisation des oligo- κ/ι -carraghénanes produits au cours de l'hydrolyse, a permis d'obtenir des données sur les agencements des deux motifs kappa et iota au sein des chaînes des κ/ι -carraghénanes.

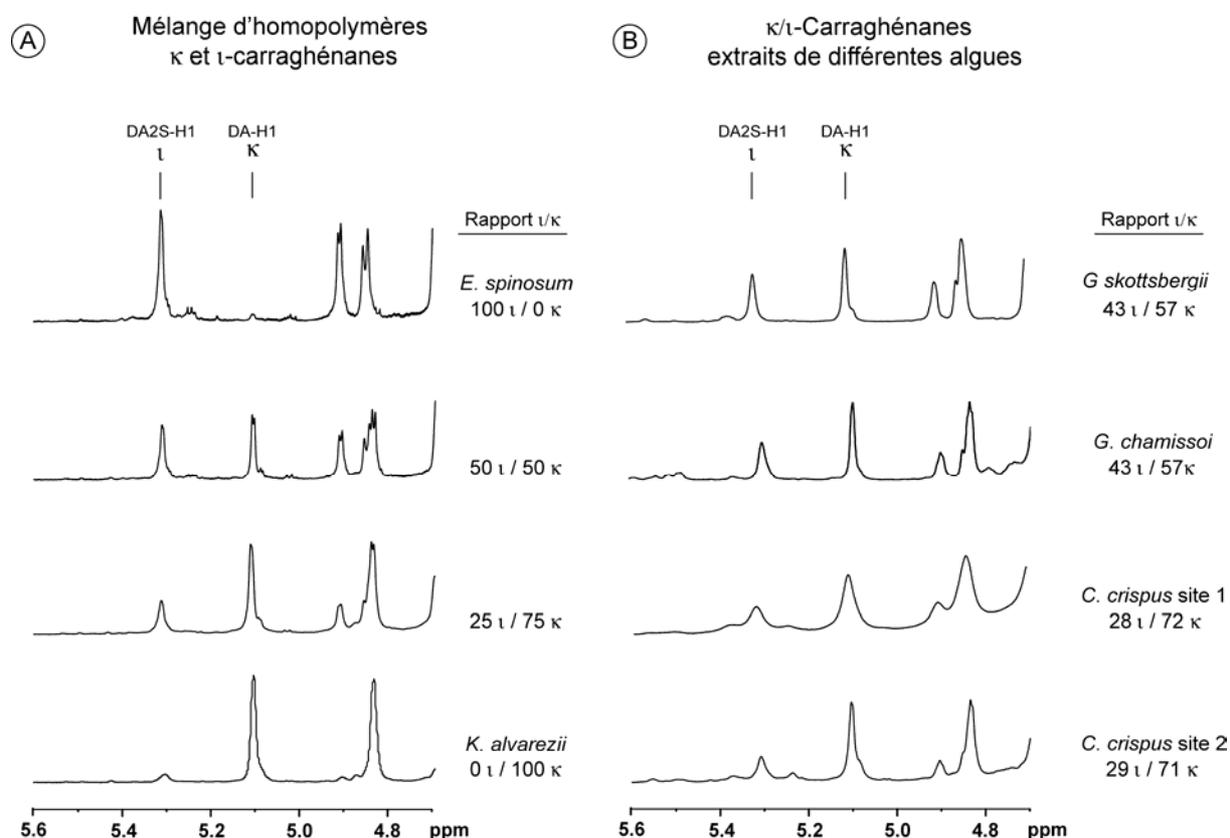


Figure 51 : Spectres ^1H -RMN à 70 °C (A) de mélanges de κ -carraghénane et de ι -carraghénane, (B) de κ/ι -carraghénanes extraits de différentes algues.

Les déplacements chimiques du proton anomérique des unités DA du κ -carraghénane et des unités DA2S du ι -carraghénane sont respectivement de 5,1 ppm et 5,3 ppm. Seuls les rapports des motifs iota/ kappa des carraghénanes sont indiqués mais d'autres motifs minoritaires ont aussi été détectés sur ces spectres.

RESULTATS

I. Analyse ^1H -RMN des κ/ι -carraghénanes.

La technique d'analyse ^1H -RMN est couramment utilisée pour déterminer les motifs constituant la structure d'un carraghénane. La structure κ -carraghénane est caractérisée par la présence du pic du proton anomérique de l'unité DA à 5,1 ppm, comme indiqué sur le spectre du κ -carraghénane extrait de *K. alvarezii* (**Figure 51A**). La structure ι -carraghénane est caractérisée par la présence du signal DA2S-H1 à 5,3 ppm, comme indiqué sur le spectre du ι -carraghénane extrait d'*E. spinosum* (**Figure 51A**). Il a été considéré dans cette étude que le κ -carraghénane de *K. alvarezii* était composé de 100% de motifs kappa carrabiose (0 ι / 100 κ) et que le ι -carraghénane de *E. spinosum* était composé de 100% de motifs iota carrabiose (100 ι / 0 κ).

Les analyses par ^1H -RMN des carraghénanes extraits des espèces d'algues *C. crispus* des sites 1 et 2, *G. skottsbergii* et *G. chamissoi* ont montré la présence prépondérante des signaux DA-H1 et DA2S-H1 des motifs kappa et iota carrabioses, à 5,1 ppm et 5,3 ppm respectivement (**Figure 51B**). Le taux de chaque motif dans les différentes structures a été mesuré par intégration de ces deux pics. Les carraghénanes extraits des deux *C. crispus* possèdent un rapport d'environ 30/70 de motifs ι/κ , et les carraghénanes extraits des deux *Gigartina* un rapport plus équilibré de 43 ι /57 κ . Ces rapports sont conformes à ceux couramment observés pour ces espèces (van de Velde *et al.*, 2005). D'autres motifs sont aussi minoritairement présents sur ces spectres. Ce sont des motifs précurseurs μ et ν carrabioses (5,25 ppm et 5,50 ppm), traduisant une transformation alcaline incomplète, et des motifs λ -carraghénane (5,55 ppm), montrant la présence minoritaire de formes tétrasporophytes dans ces extraits.

L'analyse RMN n'apporte par contre aucune indication sur l'organisation de ces motifs kappa et iota carrabioses au sein des chaînes de carraghénanes. Aucune différence n'est en effet visible entre les spectres RMN de κ/ι -carraghénanes extraits d'algues (**Figure 51B**) et les spectres RMN de mélanges d'homopolymères de rapports ι/κ similaires. Ces mélanges ont été réalisés dans des rapports approximatifs 50 ι / 50 κ et 25 ι / 75 κ , à partir du ι -carraghénane d'*E. spinosum* (0 ι / 100 κ) et du κ -carraghénane de *K. alvarezii* (100 ι / 0 κ) (**Figure 51A**).

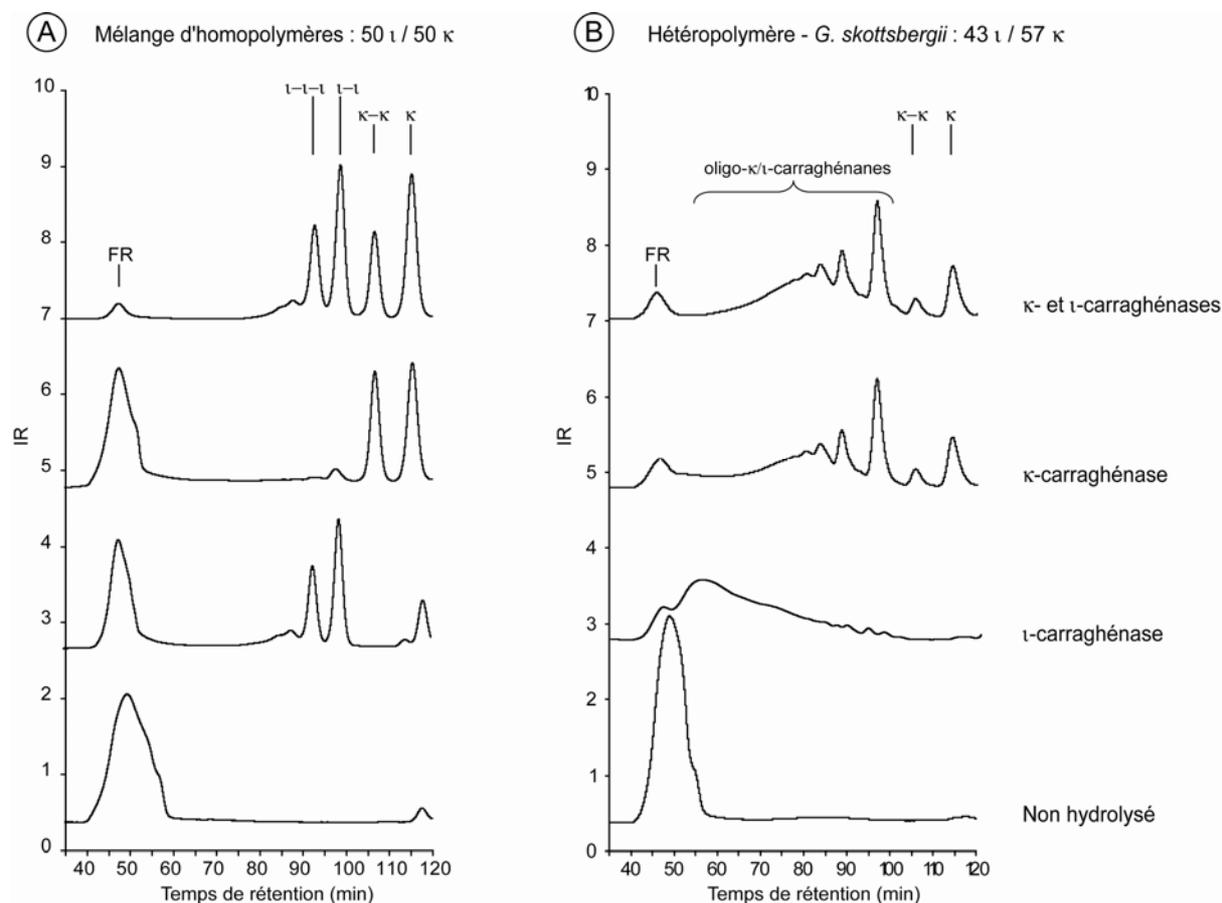


Figure 52 : Produits des hydrolyses, par les κ - et ι -carraghénases, (A) d'un mélange d'homopolymères 50 ι /50 κ et (B) du κ/ι -carraghénane extrait de *G. skottsbergii*.

La séparation des produits d'hydrolyse a été effectuée sur colonnes d'exclusion de taille (colonnes Superdex 200 + Superdex 30) couplées à des détecteurs d'indice de réfraction et de diffusion de la lumière (MALLS). La diffusion de la lumière a permis de calculer la masse des fractions résistantes aux enzymes et d'en déduire le taux d'hydrolyse.

II. Structure hétérogène du κ/ι -carraghénane de *G. skottsbergii*

L'action des κ - et ι -carraghénases, séparément et successivement, a été testée sur un mélange de polymères ι - et κ -carraghénanes réalisé dans un rapport approximatif 50 ι /50 κ (**Figure 52A**). Les hydrolysats ont ensuite été analysés par chromatographie d'exclusion de taille. L'action de la ι -carraghénase sur ce mélange a conduit à l'hydrolyse sélective des chaînes de ι -carraghénane en néo- ι -tétraose et néo- ι -hexaose, et les chaînes de κ -carraghénanes non hydrolysées composent la fraction résistante. De la même façon, l'action de la κ -carraghénase sur ce mélange a conduit à l'hydrolyse spécifique des chaînes de κ -carraghénane en néo- κ -carrabiose et néo- κ -tétraose et le polymère ι -carraghénane constitue cette fois-ci la fraction résistante. L'utilisation successive des deux enzymes a conduit, comme attendu, à la dégradation quasi-totale du mélange en oligosaccharides des séries néo- κ -carrabiose et néo- ι -carrabiose.

Si l'on effectue les mêmes traitements sur le κ/ι -carraghénane extrait de l'algue *G. skottsbergii*, on observe que l'action de la ι -carraghénase conduit à la formation de produits d'hydrolyse polydisperses et de tailles élevées (**Figure 52B**). Les produits limites d'hydrolyse, néo- ι -carratétraose et néo- ι -carrahexaose, ne semblent présents qu'en très faible quantité. L'action de la ι -carraghénase sur le substrat a donc visiblement conduit à la dégradation d'une partie des motifs iota du carraghénane mais avec un nombre de coupures limité.

La dégradation de ce même substrat par la κ -carraghénase a conduit à une hydrolyse de 86% du polymère en oligosaccharides (**Figure 52B**). Les néo- κ -carrabiose et néo- κ -carratétraose sont observés parmi les produits d'hydrolyse, mais ils sont minoritaires. Les produits majoritairement formés sont des oligosaccharides de plus hauts degrés de polymérisation qui possèdent des temps de rétention différents de ceux des oligosaccharides des séries néo- ι -carrabiose et néo- κ -carrabiose. On peut faire l'hypothèse que ces oligosaccharides possèdent des structures κ/ι hybrides (**Figure 52B**). Cette formation d'oligo- κ/ι -carraghénanes expliquerait le taux d'hydrolyse de 86% observé, qui est supérieur au taux de motifs kappa contenus dans le κ/ι -carraghénane de *G. skottsbergii* (43 ι /57 κ). Une partie des motifs iota a donc aussi été hydrolysée en oligo- κ/ι -carraghénanes.

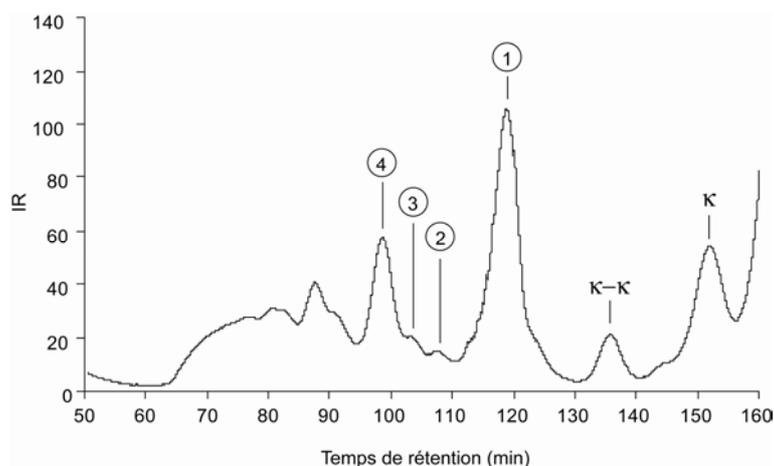


Figure 53 : Purification des oligo- κ/ι -carraghénanes, produits de l'hydrolyse par la κ -carraghénase du carraghénane de *G. skottsbergii*.

La purification a été effectuée sur une colonne Superdex 30 avec une élution au carbonate d'ammonium. La fraction résistante a été préalablement éliminée de l'hydrolysate par ultrafiltration.

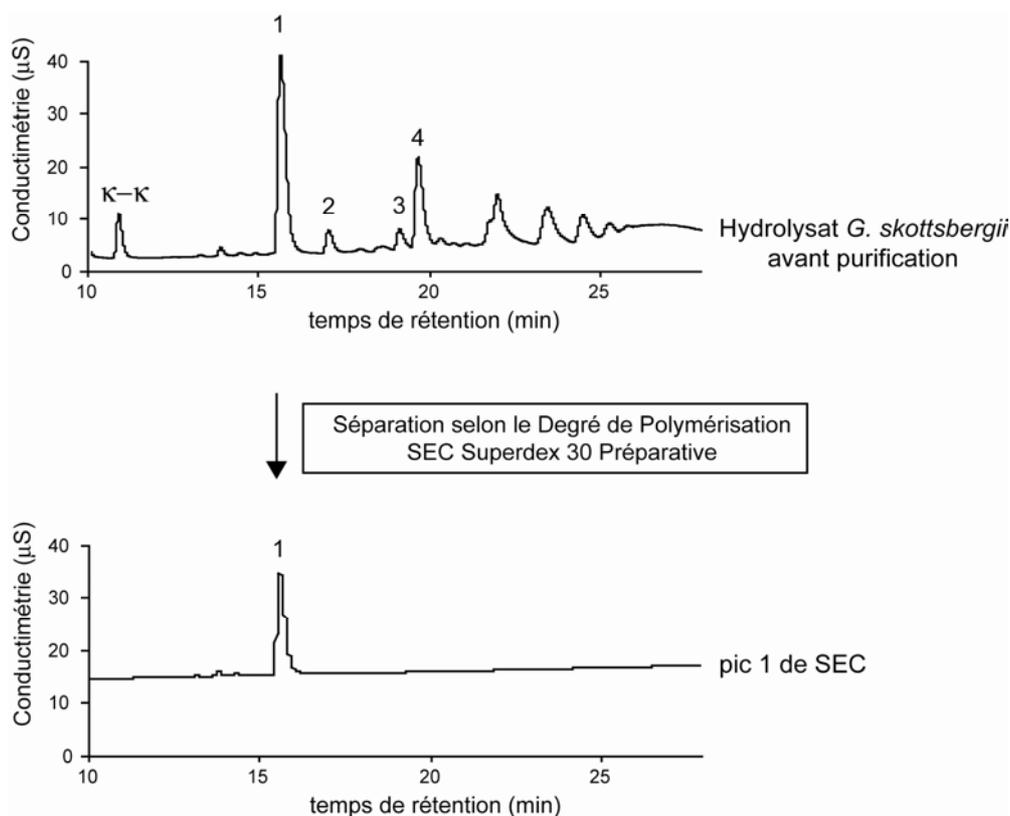


Figure 54 : Analyse par HPAEC de la pureté des oligo- κ/ι -carraghénanes purifiés par SEC à partir de l'hydrolysate du carraghénanes de *G. skottsbergii*.

Analyse du taux de pureté de l'oligo- κ/ι -carraghénane issu de la purification du pic 1 de SEC de l'hydrolysate de *G. skottsbergii*.

L'hydrolyse successive par les κ - et ι -carraghénases, a conduit à une hydrolyse légèrement plus accentuée du polymère (91%), que par la κ -carraghénase seule (86%). Les profils d'hydrolyse restent d'ailleurs très similaires. Il est à noter que l'ordre d'utilisation des carraghénases ne semble avoir aucune influence sur les produits finaux d'hydrolyse formés.

Les produits d'hydrolyse obtenus par action des κ - et ι -carraghénases sont donc différents suivant que le substrat κ/ι -carraghénane est un mélange d'homopolymères κ - et ι -carraghénanes, ou qu'il est naturellement extrait d'une algue comme *G. skottsbergii*.

III. Caractérisation des oligo- κ/ι -carraghénanes.

A. Purification des oligo- κ/ι -carraghénanes par SEC

Les produits de l'hydrolyse par la κ -carraghénase du κ/ι -carraghénane extrait de *G. skottsbergii*, ont été purifiés par chromatographie d'exclusion de taille (SEC) sur colonne Superdex 30 préparative (**Figure 53**). La résolution de la colonne a permis de séparer les oligo-carraghénanes selon leurs différents degrés de polymérisation, mais aussi selon leurs charges, les groupements sulfates ayant des volumes hydrodynamiques importants.

La purification de quatre oligo- κ/ι -carraghénanes (numérotés de 1 à 4, **Figures 53**) a pu être réalisée avec un degré de pureté d'environ 95%. La pureté a été estimée par chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC) (**Figure 54**).

B. Caractérisation des oligo- κ/ι -carraghénanes par RMN.

La structure des quatre oligo- κ/ι -carraghénanes purifiés a été analysée par RMN. Les spectres ^1H -RMN obtenus sont présentés **Figure 55**. L'attribution des déplacements chimiques a été réalisée par comparaison avec les spectres des néo- κ -carrahexaose et néo- ι -carrahexaose (**Figure 55**). L'attribution des déplacements chimiques du spectre du néo- κ -carrahexaose avait déjà été établie (Knutsen *et al.*, 1992b), mais l'analyse des spectres ^1H -RMN du néo- ι -carrahexaose n'avait été que partiellement réalisée (Knutsen *et al.*, 2001). L'analyse des signaux du néo- ι -carrahexaose a donc été complétée par une série

d'expériences RMN 1D et 2D et les attributions des signaux sont présentées **Tableau 19** et **20, p123 et 124**.

Le caractère hybride de ces quatre oligo- κ/ι -carraghénanes a été confirmé par la présence sur chacun des spectres ^1H -RMN des signaux caractéristiques des protons DA2S-H1 du motif iota carrabiose interne à 5,30 ppm et DA2S-H1 du motif kappa carrabiose interne à 5,11 ppm (**Figure 55**). Tous ces oligo- κ/ι -carraghénanes possèdent à leurs extrémités non-réductrice et réductrice des motifs kappa carrabioses DANr-G4Snr et DAr-GASr. En effet, les signaux des protons DANr-H1 (5,09 ppm) et DAr' α -H1 (5,13 ppm) sont présents sur tous les spectres, alors que les signaux des protons DA2Snr-H1 (5,28 ppm) et DAr2Sr'-H1 (5,31 ppm) des motifs iota carrabioses sont absents. Les déplacements chimiques des motifs kappa carrabiose, DANr-G4Snr et DAr-GASr, ne semblent pas être influencés par la nature kappa (DA-G4S) et/ou iota (DA2S-G4S) des motifs internes.

Le nombre de motifs centraux de type kappa et/ou iota carrabioses a été déterminé en comparant les intégrations des signaux DA2S-H1 à 5,30 ppm et DA-H1 à 5,11 ppm, par rapport à l'intégration du signal DANr-H1. Les quatre oligo- κ/ι -carraghénanes ont ainsi été identifiés comme étant un hexasaccharide de structure $\kappa\text{-}\iota\text{-}\kappa$ (1), deux octasaccharides de structures $\kappa\text{-}[\kappa/\iota]\text{-}\kappa$ (2) et $\kappa\text{-}\iota\text{-}\iota\text{-}\kappa$ (3), et un décasaccharide de structure $\kappa\text{-}[\kappa/\iota/\iota]\text{-}\kappa$ (4). Les motifs indiqués entre crochets signifient que leur séquence dans l'oligosaccharide n'est pas connue. Une attribution de tous les déplacements chimiques protons et carbonés de ces oligo- κ/ι -carraghénanes (**Tableaux 18 et 19**) a été effectuée à 25°C par des expériences RMN 1D et 2D : COSY, HMQC (**Figure 56**), HMBC (**Figure 57**), Jdelta et Jmod. Le cheminement d'analyse suivi a été similaire à celui décrit au chapitre I pour les oligo- λ -carraghénanes, à partir des signaux des différents protons anomériques.

Si l'on considère les oligo- κ/ι -carraghénanes $\kappa\text{-}\iota\text{-}\iota\text{-}\kappa$ et $\kappa\text{-}[\kappa/\iota]\text{-}\kappa$, ils sont composés de plusieurs unités DA, DA2S, et G4S comme indiqué sur leurs spectres HMQC et HMQC (**Figure 56 et 57**). Les déplacements chimiques des unités DA (en rouge) et DA2S (en bleu) de ces oligo- κ/ι -carraghénanes sont identiques aux déplacements reportés pour ces unités dans des structures régulières néo- κ -carrhexaose et néo- ι -carrhexaose respectivement (**Tableaux 18 et 19**). Ce résultat n'est pas surprenant puisque ces unités DA et DA2S sont toujours positionnées entre deux unités G4S, que ce soit dans des structures régulières ou hybrides.

Les déplacements chimiques des unités G4S sont par contre variables suivant qu'elles sont entourées de deux unités DA2S (néo- ι -carrhexaose) ou de deux unités DA (néo- κ -

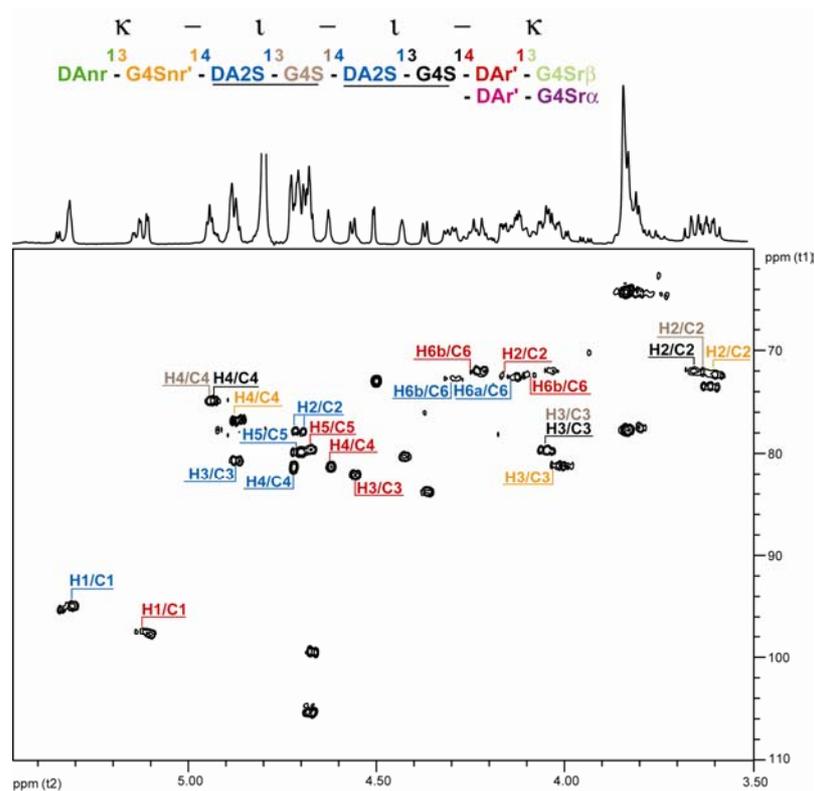


Figure 56 : Spectre hétéronucléaire $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC à 25 °C de l'octasaccharide κ -1-1- κ .

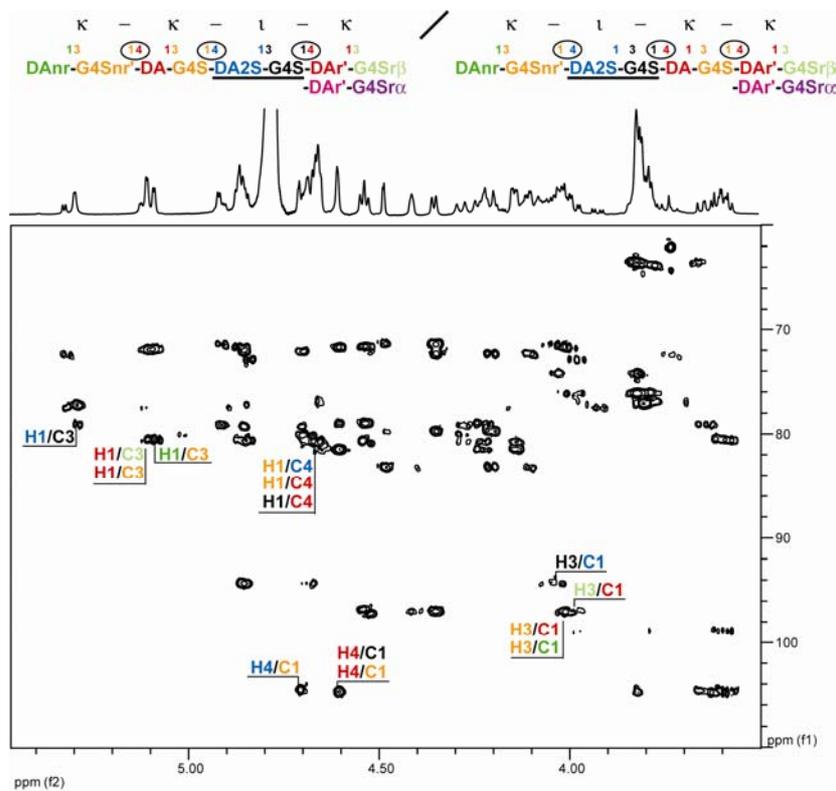


Figure 57 : Spectre hétéronucléaire $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC à 25 °C de l'octasaccharide κ -[κ/ι]- κ .

carrahaose). Dans une structure hybride, l'environnement électronique des unités G4S devrait donc varier suivant la nature DA et/ou DA2S des unités voisines (**Figure 56**). Dans la structure $\kappa\text{-}\iota\text{-}\iota\text{-}\kappa$, l'unité G4S (en marron), qui est entourée par deux unités DA2S, présente des déplacements protons et carbones identiques à ceux reportés pour une unité G4S de motif iota. L'unité G4S (en noir), entourée, du côté non-réducteur d'une unité DA2S, et du côté réducteur d'une unité DA, présente des déplacements chimiques très similaires à ceux d'une unité G4S de structure iota. Par contre, l'unité G4S (orange), entourée, du côté non-réducteur d'une unité DA et du côté réducteur d'une unité DA2S, possède les déplacements chimiques d'une unité G4S de structure kappa. Le groupement sulfate positionné sur le carbone 2 de l'unité DA2S, provoque donc principalement un changement de l'environnement électronique de l'unité G4S (noire) à laquelle elle est liée par la liaison $\alpha\text{-}(1\rightarrow3)$. Un motif iota devrait donc se décrire dans le cadre de données RMN, par le motif néo-carrabiose DA2S-G4S.

Ces expériences RMN n'ont pas permis de résoudre la structure de l'oligo- κ/ι -carraghénane $\kappa\text{-}[\kappa/\iota]\text{-}\kappa$, les deux structures possibles, $\kappa\text{-}\kappa\text{-}\iota\text{-}\kappa$ ou $\kappa\text{-}\iota\text{-}\kappa\text{-}\kappa$, étant non distinguables sur les différents spectres RMN. L'expérience HMBC (**Figure 57**) a permis de déterminer les liaisons $\alpha\text{-}(1\rightarrow3)$ au sein des motifs DA-G4S et DA2S-G4S par l'attribution des différentes taches de corrélation H1/C3 et H3/C1. Mais la séquence des motifs kappa et iota centraux, qui aurait dû être définie par la nature des liaisons $\beta\text{-}(1\rightarrow4)$ de l'oligosaccharide, n'a pu être établie car les taches de corrélation HMBC, H1/C4 et H4/C1 caractéristiques, sont identiques quelle que soit la séquence (**Figure 57**). La structure de l'oligosaccharide $\kappa\text{-}[\kappa/\iota]\text{-}\kappa$ qui possède une structure encore plus complexe n'a pu être déterminée.

Chapitre II : Analyse structurale des κ/ι -carraghénanes

		κ - κ - κ (Knutsen)	κ - ι - κ	κ - κ - ι - κ	κ - ι - ι - κ	κ - ι - κ - ι - κ	ι - ι - ι
G4S _α	H ₁	5.320	5.329	5.329	5.323	5.330	5.329
G4S _β	H ₁	4.654	4.667	4.662	4.656	4.660	4.660
G4S	H ₁	-	4.667	4.667	-	4.668	-
G4S	H ₁	-	-	-	4.669	4.668	4.671
G4S	H ₁	4.660	-	4.667	-	4.668	-
G4S _{nr}	H ₁	4.658	4.667	4.667	4.669	4.668	4.671
G4S _α	H ₂	3.917	3.928	3.924	3.927	3.928	3.966
G4S _β	H ₂	3.593	3.601	3.608	3.602	3.604	3.635
G4S	H ₂	-	3.648	3.655	3.646	3.647	-
G4S	H ₂	-	-	-	3.629	3.638	3.630
G4S	H ₂	3.599	-	3.592	-	3.595	-
G4S _{nr}	H ₂	3.596	3.592	3.592	3.589	3.595	3.630
G4S _α	H ₃	4.165	4.185	4.181	4.182	4.184	4.214
G4S _β	H ₃	3.983	3.988	3.989	3.984	3.989	4.012
G4S	H ₃	-	4.039	4.041	4.037	4.037	-
G4S	H ₃	-	-	-	4.037	4.037	4.038
G4S	H ₃	4.013	-	4.009	-	4.011	-
G4S _{nr}	H ₃	4.003	4.009	4.009	4.006	4.011	4.049
G4S _α	H ₄	4.901	4.907	4.905	4.902	4.906	4.966
G4S _β	H ₄	4.835	4.847	4.850	4.845	4.850	4.904
G4S	H ₄	-	4.925	4.920	4.919	4.924	-
G4S	H ₄	-	-	-	4.928	4.924	4.930
G4S	H ₄	4.855	-	-	-	4.880	-
G4S _{nr}	H ₄	4.855	4.869	-	4.867	4.880	4.930
G4S _α	H ₅	4.186	4.194	4.190	4.191	-	4.194
G4S _β	H ₅	3.774	3.786	3.789	3.789	-	3.783ap
G4S	H ₅	-	3.825	-	3.825	-	-
G4S	H ₅	-	-	-	-	-	3.821*
G4S	H ₅	3.817	-	-	-	-	-
G4S _{nr}	H ₅	3.817	3.825	-	-	-	3.821ap
G4S _α	H _{6a}	3.790	3.800	3.805	3.804	-	3.824
G4S _β	H _{6a}	3.783	3.786	-	-	-	3.783ap
G4S	H _{6a}	-	3.825	-	-	-	-
G4S	H _{6a}	-	-	-	-	-	3.828*
G4S	H _{6a}	3.800	-	-	-	-	-
G4S _{nr}	H _{6a}	3.800	3.825	-	-	-	3.828ap
G4S _α	H _{6b}	3.731	3.739	3.735	3.738	3.742	3.759
G4S _β	H _{6b}	3.783	-	-	-	-	3.783ap
G4S	H _{6b}	-	-	-	-	-	-
G4S	H _{6b}	-	-	-	-	-	3.828*
G4S	H _{6b}	3.800	-	-	-	-	-
G4S _{nr}	H _{6b}	3.800	-	-	-	-	3.828ap
DAr _α	H ₁	5.120	5.127	5.127	5.126	5.127	-
DAr _β	H ₁	5.103	5.109	5.111	5.108	5.110	5.308
DA2S	H ₁	-	-	-	5.292	5.300	-
DA2S	H ₁	-	5.298	5.305	5.292	5.300	5.296
DA	H ₁	5.103	-	5.111	-	5.110	-
DA2S _{nr}	H ₁	5.084	5.092	5.091	5.086	5.092	5.282
DAr _α	H ₂	4.142	4.147	4.148	4.142	4.149	4.706
DAr _β	H ₂	4.142	4.147	4.148	4.142	4.149	4.706
DA2S	H ₂	-	-	-	4.695*	4.694	-
DA2S	H ₂	-	4.692	4.697	4.687*	4.694	4.706
DA	H ₂	4.138	-	4.148	-	4.149	-
DA2S _{nr}	H ₂	4.102	4.018	4.107	4.107	4.110	4.671
DAr _α	H ₃	4.535	4.542	4.550	4.542	4.552	4.870
DAr _β	H ₃	4.535	4.542	4.550*	4.542	4.552*	4.870
DA2S	H ₃	-	-	-	4.858	4.867	-
DA2S	H ₃	-	4.860	4.866	4.858	4.867	4.870
DA	H ₃	4.529	-	4.535*	-	4.539*	-
DA2S _{nr}	H ₃	4.352	4.357	4.359	4.349	4.357	4.686
DAr _α	H ₄	4.607	4.611	4.612	4.608	4.612	4.712
DAr _β	H ₄	4.607	4.611	4.612	4.608	4.612*	4.712
DA2S	H ₄	-	-	-	4.708	4.716	-
DA2S	H ₄	-	4.710	4.714	4.708	4.716	4.712
DA	H ₄	4.607	-	4.612	-	4.603*	-
DA2S _{nr}	H ₄	4.479	4.491	4.488	4.489	4.491	4.572
DAr _α	H ₅	4.650	4.675	4.667	4.658	-	4.701
DAr _β	H ₅	4.650	4.675	4.667	4.658	-	4.701
DA2S	H ₅	-	-	-	4.687	-	-
DA2S	H ₅	-	4.681	4.691	4.687	-	4.701
DA	H ₅	4.650	-	4.667	-	-	-
DA2S _{nr}	H ₅	4.409	4.413	4.416	4.414	4.417	4.468
DAr _α	H _{6a}	4.061	4.074	4.076	4.072	-	4.303
DAr _β	H _{6a}	4.061	4.074	4.076	4.072	-	4.292
DA2S	H _{6a}	-	-	-	4.102	-	-
DA2S	H _{6a}	-	4.112	4.114	4.120	-	4.292
DA	H _{6a}	4.061	-	4.066	-	-	-
DA2S _{nr}	H _{6a}	4.020	4.036	4.025	4.024	4.028	4.075
DAr _α	H _{6b}	4.234	4.246	4.264	4.239	-	4.121
DAr _β	H _{6b}	4.224	4.224	4.240	4.226	-	4.121
DA2S	H _{6b}	-	-	-	4.278*	-	-
DA2S	H _{6b}	-	4.289	4.293	4.287*	4.292	4.121
DA	H _{6b}	4.224	-	4.240	-	-	-
DA2S _{nr}	H _{6b}	4.207	4.211	4.215	4.212	4.214	4.271

Tableau 19 : Déplacements chimiques des protons des oligo- κ/ι -carraghénanes à 25°C.

Les valeurs indiquées par des astérisques pourraient être interverties.

Les signaux des G4S-H5 et G4S-H6 sont trop proches pour mesurer précisément leurs déplacements chimiques, mais ils sont similaires à ceux du néo- κ -carraxéose.

Chapitre II: Analyse structurale des κ/ι -carraghénanes

		K-K-K	K-l-K	K-K-l-K	K-l-l-K	K-l-K-l-K	l-l-l
G4S _{ru}	C ₁	94.82	94.84	94.82	94.81	94.82	94.64
G4S _{rp}	C ₁	99.01	99.03	99.01	99.03	99.01	98.98
G4S	C ₁	-	104.84	104.96	104.81	104.78*	-
G4S	C ₁	-	-	-	104.59	104.66*	104.60
G4S	C ₁	104.93	-	104.71	-	104.86*	-
G4S _{nr}	C ₁	104.89	104.80	104.82	104.81	104.81*	104.69
G4S _{ru}	C ₂	69.71	69.72	69.70	69.69	69.70	69.45
G4S _{rp}	C ₂	73.04	73.06	73.04	73.03	73.04	72.79
G4S	C ₂	-	71.59	71.58	71.57	71.58	-
G4S	C ₂	-	-	-	71.57	71.58	71.56
G4S	C ₂	71.86	-	71.87	-	71.86	-
G4S _{nr}	C ₂	71.86	71.86	71.87	71.84	71.86	71.56
G4S _{ru}	C ₃	77.65	77.66	77.61	77.59	77.62	76.05
G4S _{rp}	C ₃	80.74	80.74	80.67	80.71	80.71	79.35/41
G4S	C ₃	-	79.23	79.20	79.19	79.22	-
G4S	C ₃	-	-	-	79.23	79.22	79.25
G4S	C ₃	80.57*	-	80.67	-	80.71	-
G4S _{nr}	C ₃	80.66*	80.74	80.67	80.71	80.71	79.11
G4S _{ru}	C ₄	77.34	77.38	77.34	77.35	77.35	75.18
G4S _{rp}	C ₄	76.17	76.26	76.26	76.20	76.24	74.36
G4S	C ₄	-	74.41	74.38	74.37	74.38	-
G4S	C ₄	-	-	-	74.42	74.38	74.40
G4S	C ₄	76.25	-	76.27	-	76.35	-
G4S _{nr}	C ₄	76.25	76.36	76.27	76.35	76.35	74.40
G4S _{ru}	C ₅	72.58	72.60	72.60	72.59	72.59	72.44
G4S _{rp}	C ₅	77.04	77.05	77.04	77.04	77.04	77.12
G4S	C ₅	-	77.29	77.28	77.22	77.28	-
G4S	C ₅	-	-	-	77.28	77.28	77.27
G4S	C ₅	77.21	-	77.21	-	77.17	-
G4S _{nr}	C ₅	77.21	77.19	77.21	77.17	77.17	77.27
G4S _{ru}	C ₆	64.01	64.02	64.02	64.00	64.01	64.02
G4S _{rp}	C ₆	63.91	63.92	63.91	63.90	63.91	64.02
G4S	C ₆	-	63.82	63.81	63.81	63.79	-
G4S	C ₆	-	-	-	63.73	63.79	63.79
G4S	C ₆	63.70	-	63.66	-	63.64	-
G4S _{nr}	C ₆	63.70	63.65	63.66	63.66	63.64	63.79
DAr _{ru}	C ₁	97.12	97.13	97.11	97.08	97.09	96.35*
DAr _{rp}	C ₁	97.02	97.04	97.00	96.97	96.99	96.35*
DA2S	C ₁	-	94.46	94.42	94.42*	94.44	-
DA2S	C ₁	-	-	-	94.47*	94.44	94.49*
DA	C ₁	97.12	-	97.26	-	97.29	-
DA2S _{nr}	C ₁	97.12	97.21	97.11	97.20	97.20	94.25
DAr _{ru}	C ₂	72.16	72.17	72.13	72.14	72.15	77.38
DAr _{rp}	C ₂	72.06	72.04	72.03	72.02	72.04	77.38
DA2S	C ₂	-	77.38	77.34	77.35	77.35	-
DA2S	C ₂	-	-	-	77.35	77.35	77.38
DA	C ₂	72.06	-	72.03	-	72.04	-
DA2S _{nr}	C ₂	72.00	72.04	72.03	72.02	72.04	77.27
DAr _{ru}	C ₃	81.62	81.62	81.61	81.60	81.60	80.16
DAr _{rp}	C ₃	81.62	81.62	81.61	81.60	81.60	80.16
DA2S	C ₃	-	80.27	80.23	80.26	80.25	-
DA2S	C ₃	-	-	-	80.17	80.25	80.16
DA	C ₃	81.62	-	81.61	-	81.60	-
DA2S _{nr}	C ₃	83.32	83.32	83.32	83.31	83.31	81.98
DAr _{ru}	C ₄	80.87	80.84	80.83	80.81	80.81	80.88*
DAr _{rp}	C ₄	80.87	80.84	80.83	80.81	80.81	80.88*
DA2S	C ₄	-	80.95	80.99	81.00	80.94	-
DA2S	C ₄	-	-	-	81.00	80.94	80.79*
DA	C ₄	80.92	-	80.83	-	80.81	-
DA2S _{nr}	C ₄	72.49	72.50	72.49	72.48	72.49	72.83/79
DAr _{ru}	C ₅	79.09	79.14	79.14	79.13	79.13	79.41/35
DAr _{rp}	C ₅	79.09	79.14	79.14	79.13	79.13	79.41/35
DA2S	C ₅	-	79.38	79.38	79.41	79.39	-
DA2S	C ₅	-	-	-	79.33	79.39	79.41/35
DA	C ₅	79.09	-	79.07	-	79.13	-
DA2S _{nr}	C ₅	79.85	79.86	79.85	79.83	79.84	80.16
DAr _{ru}	C ₆	71.80	71.82	71.80	71.80	71.79	72.23
DAr _{rp}	C ₆	71.80	71.82	71.80	71.80	71.79	72.23
DA2S	C ₆	-	72.27	72.24	72.23	72.24	-
DA2S	C ₆	-	-	-	72.23	72.24	72.23
DA	C ₆	71.80	-	71.80	-	71.79	-
DA2S _{nr}	C ₆	71.51	71.52	71.50	71.50	71.51	71.86

Tableau 20 : Déplacements chimiques des carbones des oligo- κ/ι -carraghénanes à 25°C.

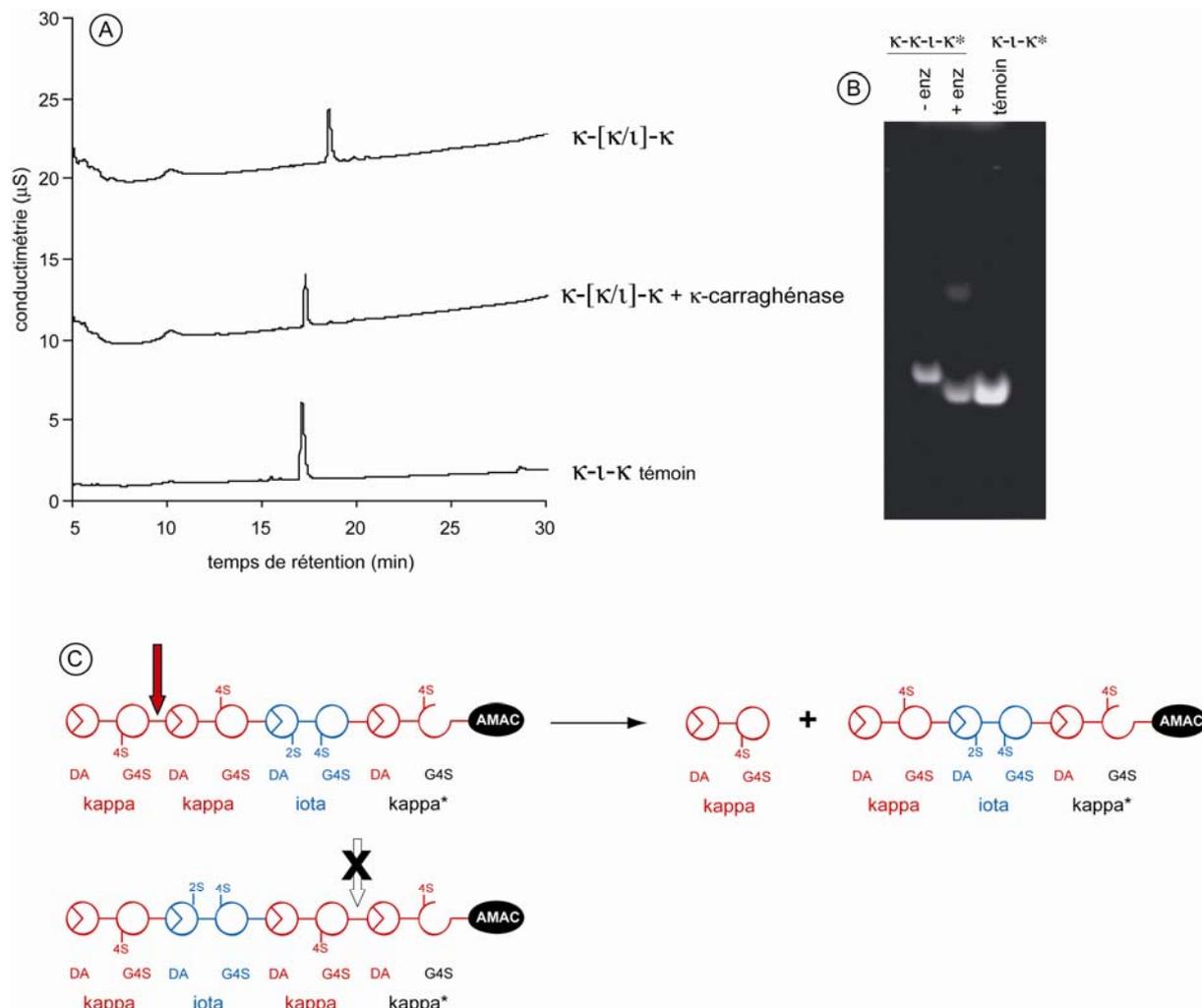


Figure 58: Détermination de la séquence des motifs dans l'oligosaccharide κ -[κ/ι]- κ .

(A) Analyse par HPAEC de l'hydrolyse par la κ -carraghénase de l'octasaccharide κ -[κ/ι]- κ en hexasaccharide κ - ι - κ et disaccharide κ . Le disaccharide κ n'est pas visualisé par HPAEC car son temps de rétention est identique à celui des sels.

(B) Afin de déterminer le site de coupure de l'enzyme, l'octasaccharide κ -[κ/ι]- κ * a été marqué à son extrémité réductrice par une molécule fluorescente AMAC et son hydrolyse a été suivie sous UV.

(C) Schématisation du site de coupure de la κ -carraghénase sur l'octasaccharide de structure κ - κ - ι - κ *.

C. Détermination de la séquence des motifs dans les oligosaccharides κ -[κ/ι]- κ et κ -[$\kappa/\iota/\iota$]- κ .

La séquence des motifs dans l'oligosaccharide κ -[κ/ι]- κ a pu être déterminée par l'analyse de ses produits d'hydrolyse enzymatique. En effet, la liaison β -(1 \rightarrow 4) entre les motifs κ - κ consécutifs de cet oligosaccharide est hydrolysable par la κ -carraghénase, conduisant à la formation des disaccharide κ et hexasaccharide κ - ι - κ (**Figure 58A**). Un marquage par la molécule fluorescente AMAC de l'extrémité réductrice du κ -[κ/ι]- κ a alors été réalisé, et ses produits d'hydrolyse ont été visualisés sous UV après leur séparation sur gel C-PAGE (**Figure 58B**). Il s'est avéré que la présence de l'hexasaccharide marqué (*) κ - ι - κ * a été détectée, démontrant ainsi une structure κ - κ - ι - κ * de l'octasaccharide (**Figure 58C**). Dans le cas d'une structure κ - ι - κ - κ *, on aurait obtenu un disaccharide marqué κ * et un hexasaccharide κ - ι - κ non marqué .

La séquence des unités au sein du décasaccharide κ -[$\kappa/\iota/\iota$]- κ n'a pu être déterminée par le même principe, étant non hydrolysable par la κ -carraghénase. L'action de la ι -carraghénase sur cet oligosaccharide a aussi été inefficace

IV. Comparaison des profils d'hydrolyse enzymatique de différents κ/ι -carraghénanes.

Des hydrolyses par les κ - et ι -carraghénases, séparément et successivement, ont ensuite été réalisées sur les κ/ι -carraghénanes extraits des algues *C. crispus* sites 1 et 2, et *G. chamissoi*.

Les profils chromatographiques d'exclusion de taille (HPSEC) des produits d'hydrolyse obtenus par action de la ι -carraghénase montrent, comme pour le κ/ι -carraghénanes de *G. skottsbergii*, des faibles taux d'hydrolyse (**Figure 59A**). Les produits d'hydrolyse sont en effet polydisperses et de hauts poids moléculaires. Les proportions des oligomères de grandes tailles varient suivant les sources de κ/ι -carraghénanes. L'analyse des oligosaccharides, produits minoritaires de l'hydrolyse, par chromatographie d'échange d'anions (HPAEC) (**Figure 60A**), a néanmoins permis de détecter la présence des néo- ι -

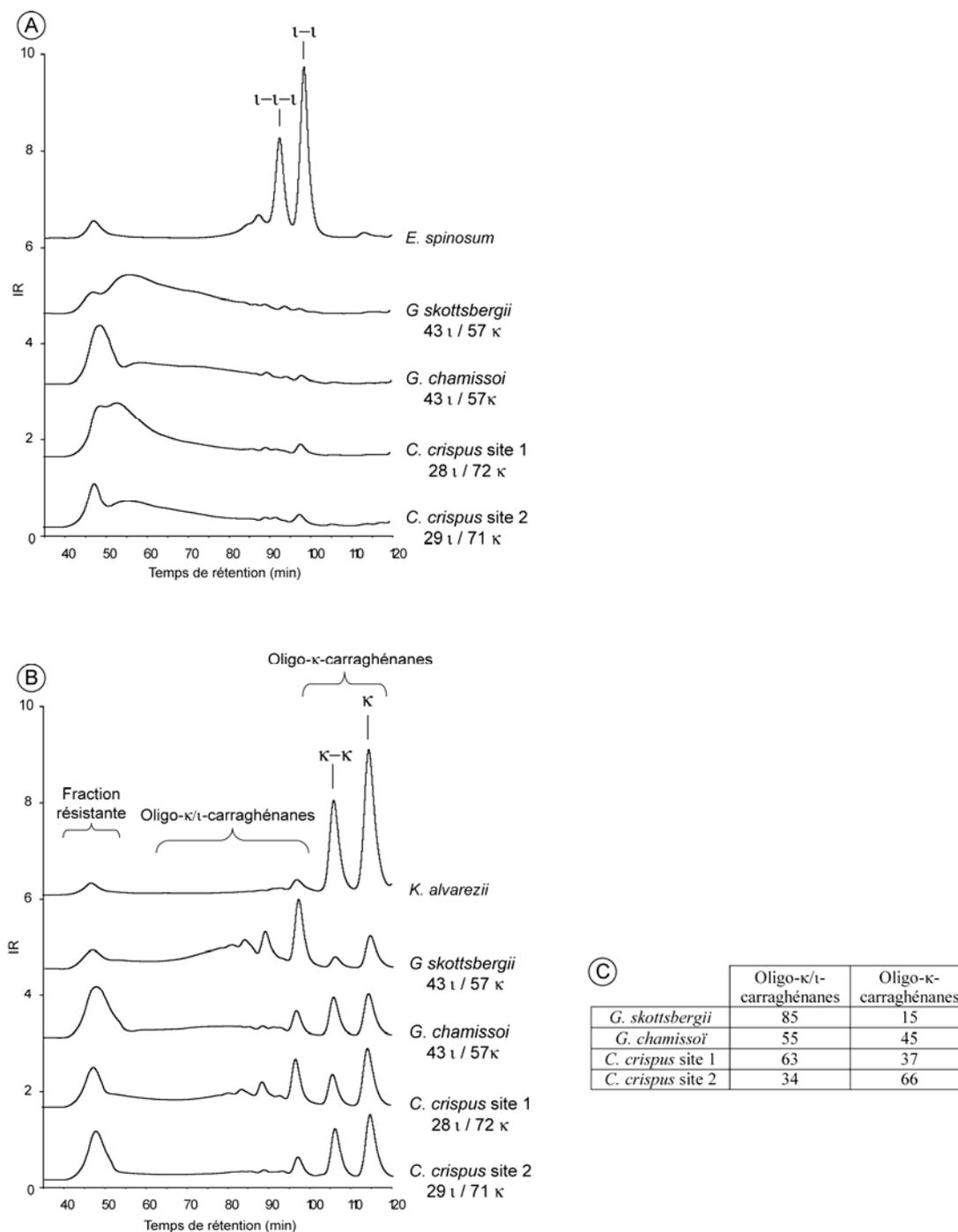


Figure 59: Produits des hydrolyses par (A) la ι -carraghénase et (B) la κ -carraghénase de différents κ/ι -carraghénanes.

La séparation des produits d'hydrolyse a été effectuée sur colonnes d'exclusion de taille (colonnes Superdex 200 + Superdex 30) couplées à des détecteurs d'indice de réfraction et de diffusion de la lumière (MALLS). (C) En estimant que les dn/dc des oligo- κ -carraghénanes et d'oligo- κ/ι -carraghénanes sont similaires, leur proportion relative a été estimée par intégration des signaux de réfractométrie.

carrahexaose et néo- ι -carratétraose.

Les profils chromatographiques d'exclusion de taille des produits de l'hydrolyse par la κ -carraghénase ont en commun la présence d'une fraction résistante, d'oligo- κ/ι -carraghénanes et d'oligo- κ -carraghénanes (**Figure 59B**). Mais ces profils diffèrent dans les proportions de ces différents éléments, notamment dans les proportions relatives d'oligo- κ/ι -carraghénanes et d'oligo- κ -carraghénanes (**Figure 59C**). L'hydrolyse du κ/ι -carraghénane extrait de *G. skottsbergii* a conduit à une formation prépondérante d'oligo- κ/ι -carraghénanes par rapport à celle d'oligo- κ -carraghénanes (rapport 85/15). La proportion de ces deux types d'oligosaccharides est par contre de l'ordre de 55/45 sur le profil d'hydrolyse du κ/ι -carraghénane extrait de *G. chamissoi*, bien qu'ils possèdent des rapports κ/ι similaires (env. 57 κ /43 ι). Quant aux profils d'hydrolyse des κ/ι -carraghénanes (env. 70 κ /30 ι) extraits de la même espèce d'algue *C. crispus* mais de deux sites de culture différents, ils montrent des teneurs opposées de 63/37 (site 1) et de 34/66 (site 2) en oligo- κ/ι -carraghénanes et en oligo- κ -carraghénanes (**Figure 59C**).

Afin d'obtenir plus de précisions sur la nature des oligo-carraghénanes formés par action de la κ -carraghénase, ils ont été séparés par chromatographie d'échange d'anions (**Figure 60B**). Des oligo- κ -carraghénanes, seul le néo- κ -carratétraose est visible à 11 min sur les profils car le néo- κ -carrabiose est élué conjointement avec les sels. Les autres pics observés correspondent aux oligo- κ/ι -carraghénanes. Quatre d'entre eux κ - ι - κ , κ - κ - ι - κ , κ - ι - ι - κ et κ -[$\kappa/\kappa/\iota$]- κ ont déjà été caractérisés par RMN à partir de l'hydrolysate du κ/ι -carraghénane de *G. skottsbergii*. Il est à noter que les mêmes oligo- κ/ι -carraghénanes (temps de rétention similaires) sont présents sur les différents profils mais dans des proportions différentes suivant les origines des κ/ι -carraghénanes (espèces et sites de culture).

L'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse de ces oligo- κ/ι -carraghénanes a confirmé que ces différents profils étaient composés des mêmes oligosaccharides (**Figure 61, Tableau 21**). La séparation des oligosaccharides, appariés à des molécules d'heptilamide, sur la colonne C₁₈ Ultima, est comparable à la séparation obtenue par échange d'ions sur colonne AS11. Les masses obtenues ont confirmé les structures des quatre oligo- κ/ι -carraghénanes caractérisées par RMN et elles ont aussi permis de déterminer le degré de polymérisation (DP12 et DP14), et le nombre de motifs iota (3 motifs) de deux autres oligo- κ/ι -carraghénanes de tailles plus élevées (**Figure 61, Tableau 21**). La séquence

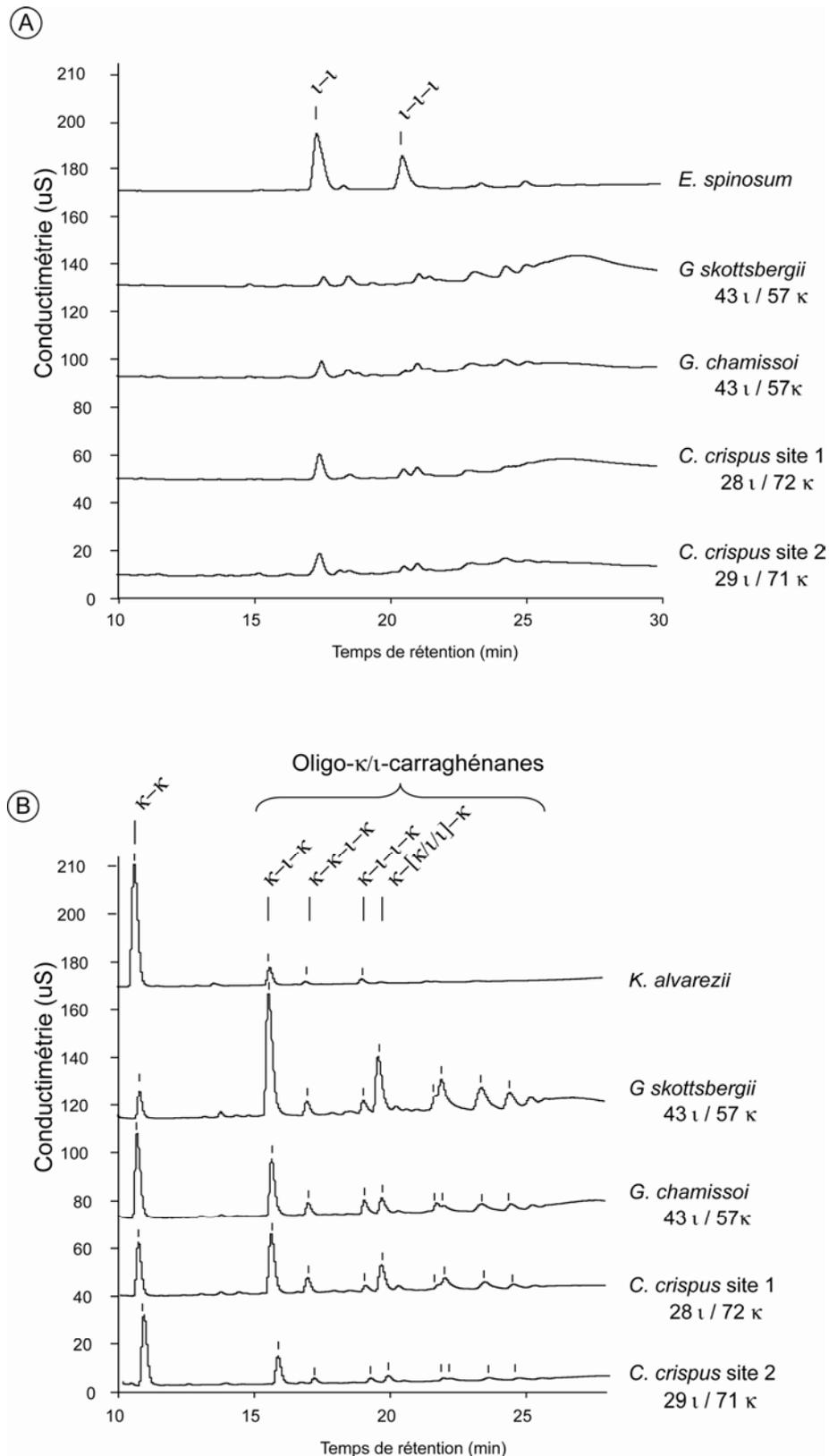


Figure 60 : Analyse par HPAEC sur AS11 des produits de l'hydrolyse des κ/ι -carraghénanes par (A) la ι -carraghénase et (B) la κ -carraghénase.

L'hydrolysats de *E. spinosum* a été dilué 5 fois.

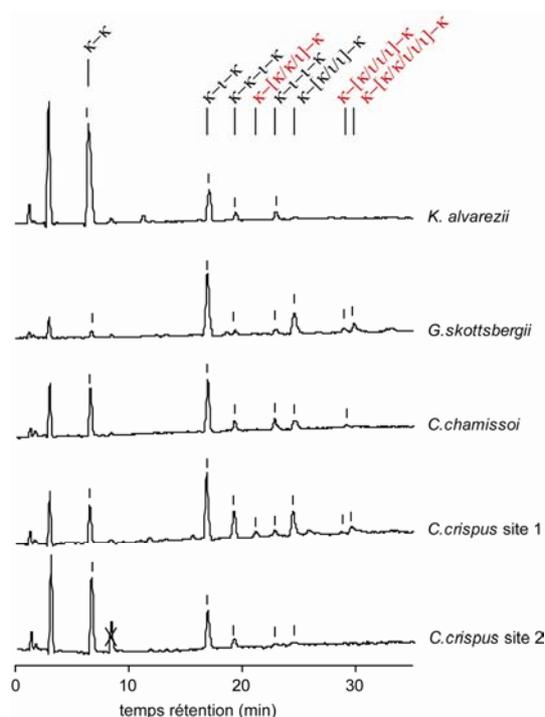


Figure 61 : Chromatogrammes LC-ESI-MS des oligo- κ/ι -carraghénanes produits par hydrolyse par la κ -carraghénase des κ/ι -carraghénanes de différentes sources d'algues.

Les oligo- κ/ι -carraghénanes ont été appariés à des molécules d'heptilamide pour être analysables sur la colonne C18 Ultima.

	ESI-MS Ionisation négative		LC-ESI-MS Mode d'ionisation négative	
		m/z		m/z
κ	$[\text{DA-G4S}]^-$	403		
$\kappa-\kappa$	$[(\text{DA-G4S})_2-2\text{H}]^{2-}$	394.1	$[(\text{DA-G4S})_2 + (\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}^+)]^-$	904.4
(1) $\kappa-\iota-\kappa$	$[(\text{DA-G4S})_2(\text{DA2S-G4S})-4\text{H}]^{4-}$	313.4	$[(\text{DA-G4S})_3 + \text{SO}_3 + (\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}^+)_2]^{2-}$	742.6
(2) $\kappa-\kappa-\iota-\kappa$	$[(\text{DA-G4S})_3(\text{DA2S-G4S})-5\text{H}]^{5-}$	327.8	$[(\text{DA-G4S})_4 + \text{SO}_3 + (\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}^+)_3]^{2-}$	993.0
$\kappa-[\kappa/\iota]-\kappa$	$[(\text{DA-G4S})_4(\text{DA2S-G4S})-6\text{H}]^{6-}$		$[(\text{DA-G4S})_5 + \text{SO}_3 + (\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}^+)_4]^{2-}$	1244.3
(3) $\kappa-\iota-\iota-\kappa$	$[(\text{DA-G4S})_2(\text{DA2S-G4S})_2-6\text{H}]^{6-}$	286.4	$[(\text{DA-G4S})_4 + 2\text{SO}_3 + (\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}^+)_4]^{2-}$	1090.6
(4) $\kappa-[\kappa/\iota/\iota]-\kappa$	$[(\text{DA-G4S})_3(\text{DA2S-G4S})_2-7\text{H}]^{7-}$	300.6	$[(\text{DA-G4S})_5 + 2\text{SO}_3 + (\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}^+)_5]^{2-}$	1341.6
$\kappa-[\kappa/\iota/\iota/\iota]-\kappa$			$[(\text{DA-G4S})_6 + 3\text{SO}_3 + (\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}^+)_7]^{2-}$	1690.0
$\kappa-[\kappa/\kappa/\iota/\iota/\iota]-\kappa$			$[(\text{DA-G4S})_7 + 3\text{SO}_3 + (\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NH}^+)_7]^{3-}$	1255.1

Tableau 21 : Ions majoritaires des oligo- κ/ι -carraghénanes obtenus par ESI en mode d'ionisation négative et ions obtenus après la LC-ESI-MS sur colonne Altima C₁₈ et appariement avec les molécules d'heptilamide.

Le disaccharide kappa $[\text{DA-G4S}]^-$ n'est pas toujours détecté en mode d'ionisation négative car il est peut être neutralisé par une molécule d'heptilamine.

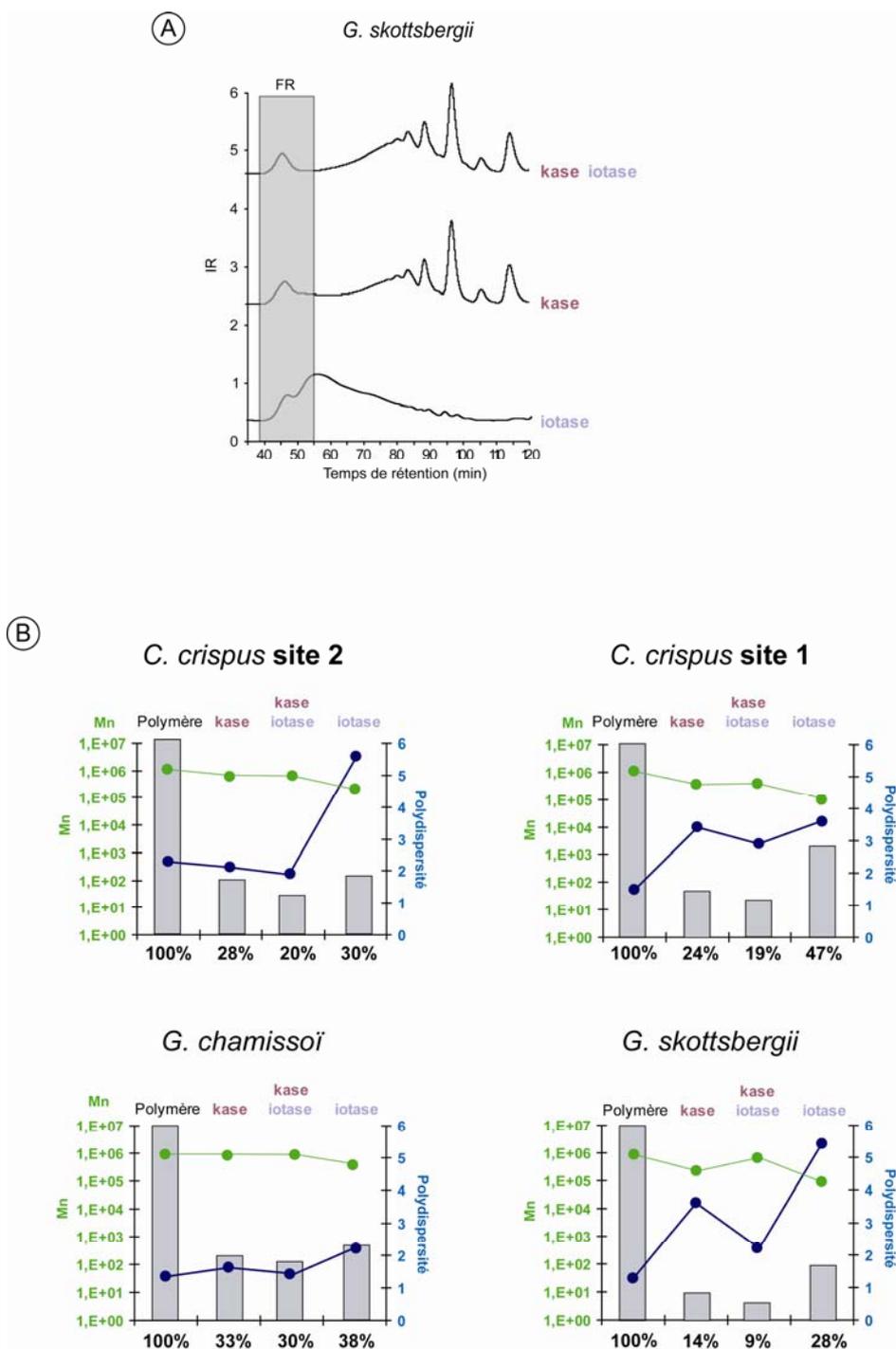


Figure 62 : Analyse par HPSEC-MALLS des fractions résistantes des κ/ι -carraghénanes aux hydrolyses par les carraghénases.

(A) Délimitation des fractions résistantes sur les différents profils d'hydrolyse illustrée sur le profil de *G. skottsbergii*. (B) Poids moléculaires moyens et polydispersités des fractions résistantes, calculés par l'analyse des signaux MALLS et RI à la sortie de la SEC. Le pourcentage massique de la fraction résistante est indiqué par rapport à la masse de départ.

des motifs kappa et iota carrabioses dans ces oligosaccharides n'a pu être pour l'instant déterminée par des techniques de fragmentation (Antonopoulos, 2005).

V. Caractérisation des fractions résistantes aux carraghénases.

La quantification, la mesure du poids moléculaire moyen M_w et la polydispersité des fractions résistantes ont été réalisées par l'analyse des données HPSEC-MALLS obtenues sur les différents hydrolysats (**Figure 62**). La délimitation de la zone de fraction résistante a été fixée pour tous les polymères entre les temps de rétention 39-55 min (**Figure 62A**). Cette délimitation est arbitraire pour la fraction résistante à la ι -carraghénase, car les produits d'hydrolyse de hautes tailles ne se différencient pas de la fraction résistante avec la résolution de ces colonnes. Les valeurs calculées pour la fraction résistante à la ι -carraghénase ne sont donc qu'indicatives (**Figure 62B**). Les fractions résistantes à la κ -carraghénase représentent 28%, 24%, 33% et 14% de la masse initiale des κ/ι -carraghénanes extraits de *C. crispus* site 2, *C. crispus* site 1, *G. chamissoi* et *G. skottsbergii* respectivement (**Figure 62B**). L'utilisation conjointe des deux enzymes ne baisse que faiblement ces proportions à 20%, 19%, 30% et 9%.

Les fractions résistantes ont un poids moléculaire moyen du même ordre (10^6 Da) que le polymère non hydrolysé, ce qui suggère que les chaînes de la fraction résistante ont subi peu d'hydrolyse. La polydispersité est plus élevée pour les fractions résistantes à la ι -carraghénase puisqu'elles contiennent aussi en partie des oligosaccharides de hauts poids moléculaires. Une hausse de la polydispersité a été observée dans les fractions résistantes à la κ -carraghénase des κ/ι -carraghénanes extraits de *C. crispus* et *G. skottsbergii* par rapport au polymère d'origine (**Figure 62B**).

La composition des fractions résistantes a été déterminée par ^1H -RMN (**Figure 63**). Ces fractions résistantes ont été séparées des produits d'hydrolyse par ultrafiltration à 50 kDa. La composition des fractions résistantes à la ι -carraghénase est similaire à celle des polymères d'origine. Mais de même, la coupure à 50 kDa est arbitraire pour délimiter la fraction résistante à la ι -carraghénase, la composition obtenue n'est donc pas uniquement celle de la fraction résistante.

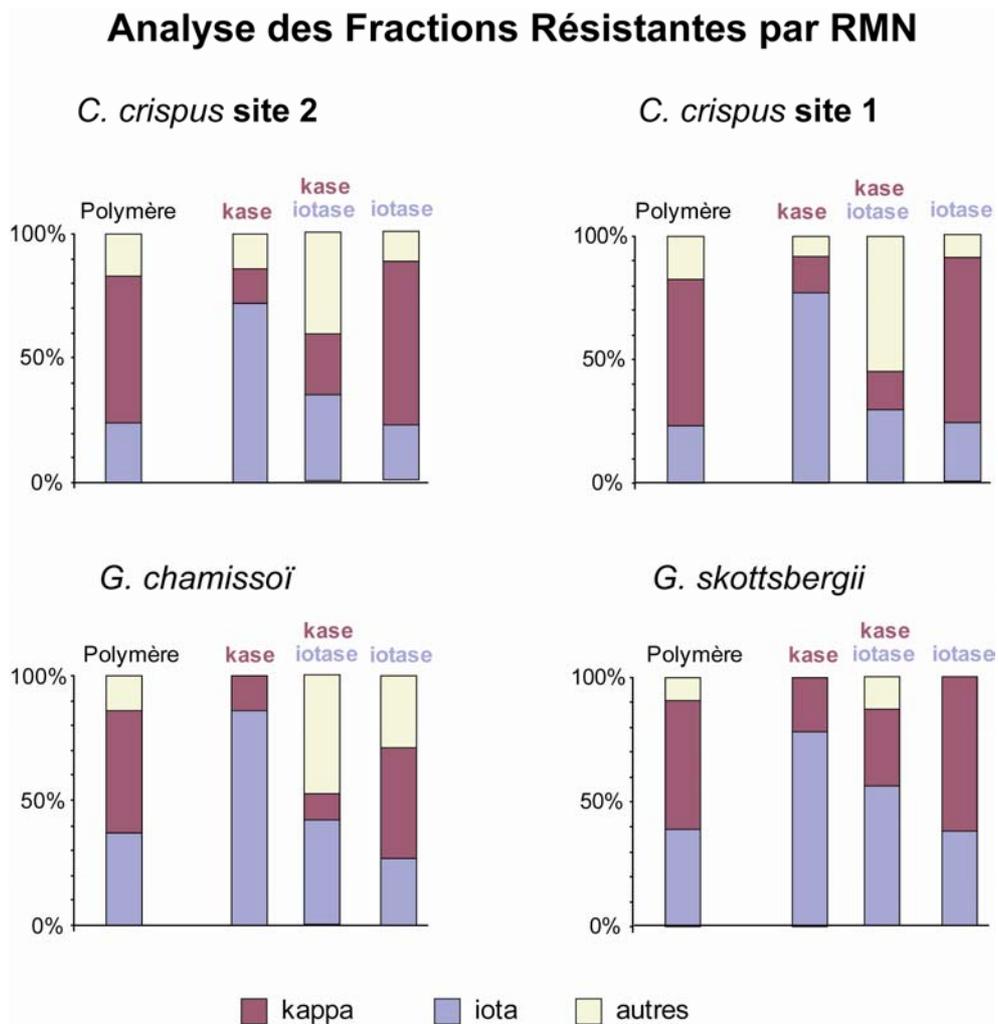


Figure 63 : Analyse par ^1H -RMN des fractions résistantes aux κ - et ι -carraghénases.

Les fractions résistantes ont été séparées des oligosaccharides par ultrafiltration des hydrolysats à 50 kDa.

Les analyses $^1\text{H-RMN}$ des fractions résistantes à la κ -carraghénase ont montré une prédominance des motifs iota autour de 80%. Les faibles proportions des motifs kappa, par rapport aux polymères d'origine, sont significatives de leur hydrolyse en oligosaccharides. L'hydrolyse, par la ι -carraghénase, de ces fractions résistantes à la κ -carraghénase, a fait chuter le taux de motifs iota d'environ 80% à 30-40% (**Figure 63**). Les fractions résistantes à l'action des deux enzymes sont majoritairement composées d'autres polysaccharides qui sont essentiellement d'autres carraghénanes (μ , ν , λ) et de l'amidon floridéen. Seuls les 9% de fraction résistante du κ/ι -carraghénane de *G. skottsbergii* sont majoritairement composés de motifs kappa et de motifs iota carrabioses.

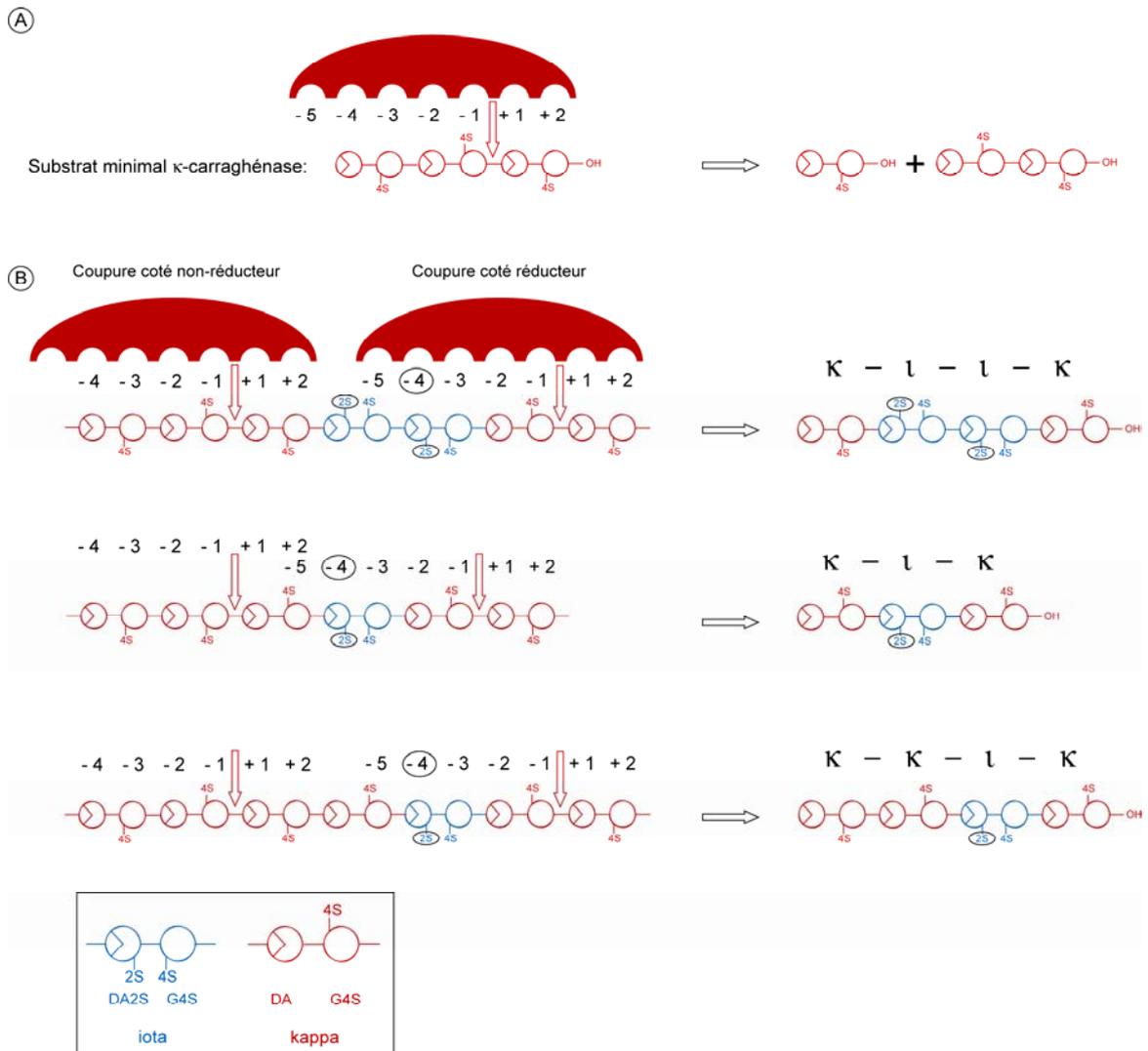


Figure 64 : Obtention des oligo- κ/ι -carraghénases par action de la κ -carraghénase sur les chaînes de κ/ι -carraghénanes.

(A) Hydrolyse du néo- κ -carrhexaose par la κ -carraghénase. (B) Hydrolyse des chaînes κ/ι hybrides et formation des produits limites d'hydrolyse de structures hybrides κ - ι - ι - κ , κ - ι - κ et κ - κ - ι - κ .

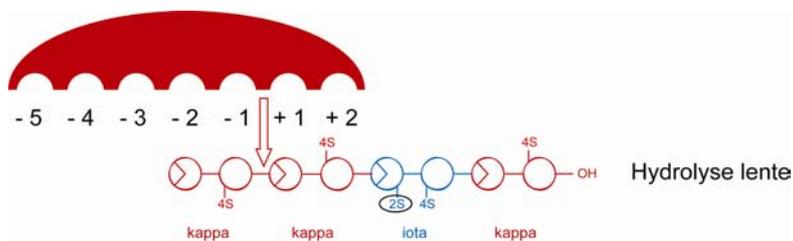


Figure 65 : Hydrolyse de l'oligosaccharide κ - κ - ι - κ par la κ -carraghénase.

DISCUSSION

I. Données sur la spécificité du site actif des carraghénases

A. Spécificité de la κ -carraghénase

Notre étude a montré que la κ -carraghénase était capable d'hydrolyser des hétéropolymères κ/ι -carraghénanes. La spécificité de la κ -carraghénase ne se limiterait donc pas strictement aux structures polymériques de motifs kappa G4S-DA. Des motifs iota pourraient aussi être acceptés dans le site actif de la κ -carraghénase.

L'analyse structurale de la κ -carraghénase (Michel *et al.*, 2001b) a montré que le site actif de la κ -carraghénase possédait potentiellement 7 sous-sites de fixation (-5, -4, -3, -2, -1, +1, +2). Il serait nécessaire que 6 de ces sous-sites soient au minimum occupés pour qu'il y ait une fixation productive, et il a été démontré que le néo- κ -hexaose se plaçait dans les sous-unités (-4, -3, -2, -1, +1, +2) (Potin *et al.*, 1995) (**Figure 64A**).

La caractérisation des oligo- κ/ι -carraghénanes en tant que produits d'hydrolyse de la κ -carraghénase, a permis d'obtenir des informations supplémentaires sur la spécificité du site actif de l'enzyme. Tous les oligo- κ/ι -carraghénanes possèdent des motifs kappa (DA-G4S) à leurs extrémités réductrice et non-réductrice. Ce qui signifie que les sous-sites (-2, -1, +1, +2) sont toujours occupés par des motifs kappa lors des hydrolyses (**Figure 64B**). Le positionnement d'unités DA2S en (-2) et (+1) semble donc exclu, le groupement sulfate supplémentaire provoquant probablement une gêne stérique et/ou électrostatique.

La formation d'oligo- κ/ι -carraghénanes de structures $\kappa\text{-}\iota\text{-}\kappa$ ou $\kappa\text{-}\iota\text{-}\iota\text{-}\kappa$ suppose que l'unité DA2S du motif iota se soit placée dans le sous-site -4 du site actif de la κ -carraghénase lors de la coupure du côté réducteur (**Figure 64B**). Lors de l'hydrolyse du côté non-réducteur, l'unité DA2S se trouverait hors du site actif de l'enzyme (+3) et n'interférerait donc pas *a priori* dans la reconnaissance.

Dans les profils limites d'hydrolyse, un octasaccharide de structure $\kappa\text{-}\kappa\text{-}\iota\text{-}\kappa$ a été caractérisé (**Figure 65**). Or une fois purifié, la liaison β -(1 \rightarrow 4) entre les deux motifs kappa consécutifs de sa structure a pu être hydrolysée par la κ -carraghénase. Sa présence parmi les produits limites d'hydrolyse pourrait s'expliquer par une hydrolyse lente due à une

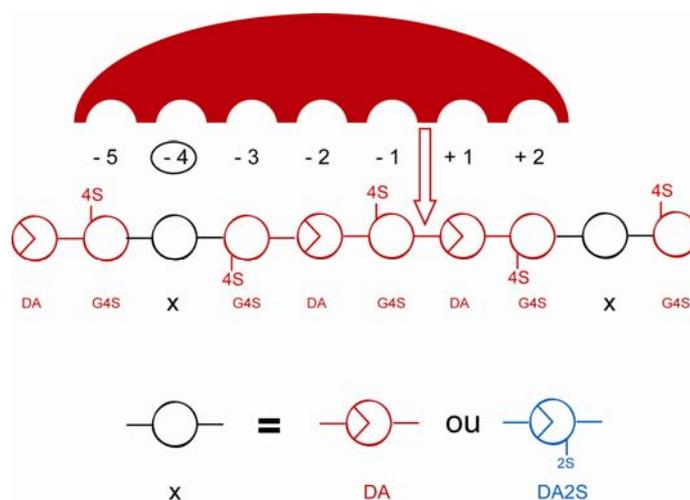


Figure 66 : Données obtenues sur la spécificité du site actif de la κ -carraghénase.

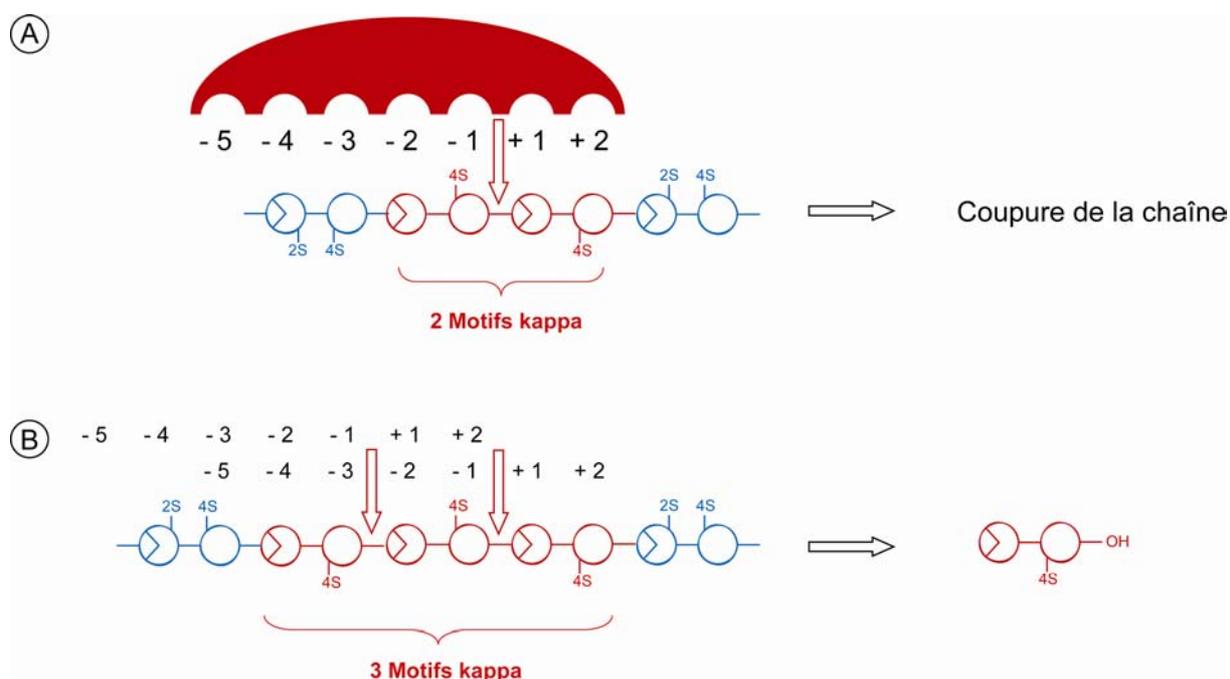


Figure 67 : Nombre de motifs kappa consécutifs dans un κ/ι -carraghénane nécessaire à une fixation productive entraînant (A) une coupure de la chaîne, (B) la formation d'oligo- κ -carraghénanes.

La présence de 3 motifs kappa consécutifs dans les chaînes de κ/ι -carraghénanes serait donc nécessaire pour qu'un néo- κ -carrabiose soit formé et la présence de 4 motifs kappa consécutifs pourrait conduire à la formation de néo- κ -carratétraose.

interaction insuffisante de l'oligosaccharide avec l'enzyme. En effet, le positionnement de cet oligosaccharide dans le site actif de l'enzyme laisse les sous-sites -4 et -3 inoccupés, limitant le nombre d'interactions possibles (**Figure 65**). Mais la topologie en tunnel de la κ -carraghénase a pu aider au maintien de l'oligosaccharide dans le site actif, et permettre son hydrolyse.

La caractérisation des oligo- κ/ι -carraghénanes nous a apporté des informations sur la spécificité de la κ -carraghénase. Il est désormais établi que la κ -carraghénase peut accepter une unité DA2S en position -4 de son site actif (**Figure 66**). De plus, il semblerait que la présence de deux motifs kappa carrabioses consécutifs soit nécessaire et suffisante pour que la κ -carraghénase coupe une chaîne hybride de κ/ι -carraghénane (**Figure 67**). Pour qu'il y ait formation d'oligo- κ -carraghénanes, la présence de 3 motifs kappa consécutifs serait, par contre, au minimum requise (**Figure 67**).

B. Spécificité de la ι -carraghénase

L'hydrolyse de ces κ/ι -carraghénanes par la ι -carraghénase a conduit à la formation en faible quantité d'oligo- ι -carraghénanes et d'autres oligosaccharides de petites tailles (**Figure 60, p129**). Il est probable que ces oligosaccharides soient des oligo- κ/ι -carraghénanes, mais leur quantité était insuffisante pour qu'ils soient purifiés et caractérisés par RMN. Peu d'informations ont donc pu être obtenues sur la spécificité du site actif de la ι -carraghénase et notamment il n'a pu être démontré que la ι -carraghénase pouvait accepter les unités DA des motifs kappa dans ses sous-sites.

Les études réalisées antérieurement sur la ι -carraghénase ont montré que le substrat minimum de la ι -carraghénase était un néo- ι -carraoctaose qui se positionnerait dans les sous-sites -4, -3, -2, -1, +1, +2, +3, +4 du site actif de l'enzyme (**Figure 68A**) (Michel *et al.*, 2003). La reconnaissance des motifs iota (G4S-DA2S) est essentiellement conditionnée par des interactions électrostatiques entre les groupements sulfates du ι -carraghénane et les résidus basiques du site actif (Michel *et al.*, 2003). D'un point de vue stérique une unité DA pourrait remplacer une unité DA2S dans un des sous-sites, mais les interactions électrostatiques ne

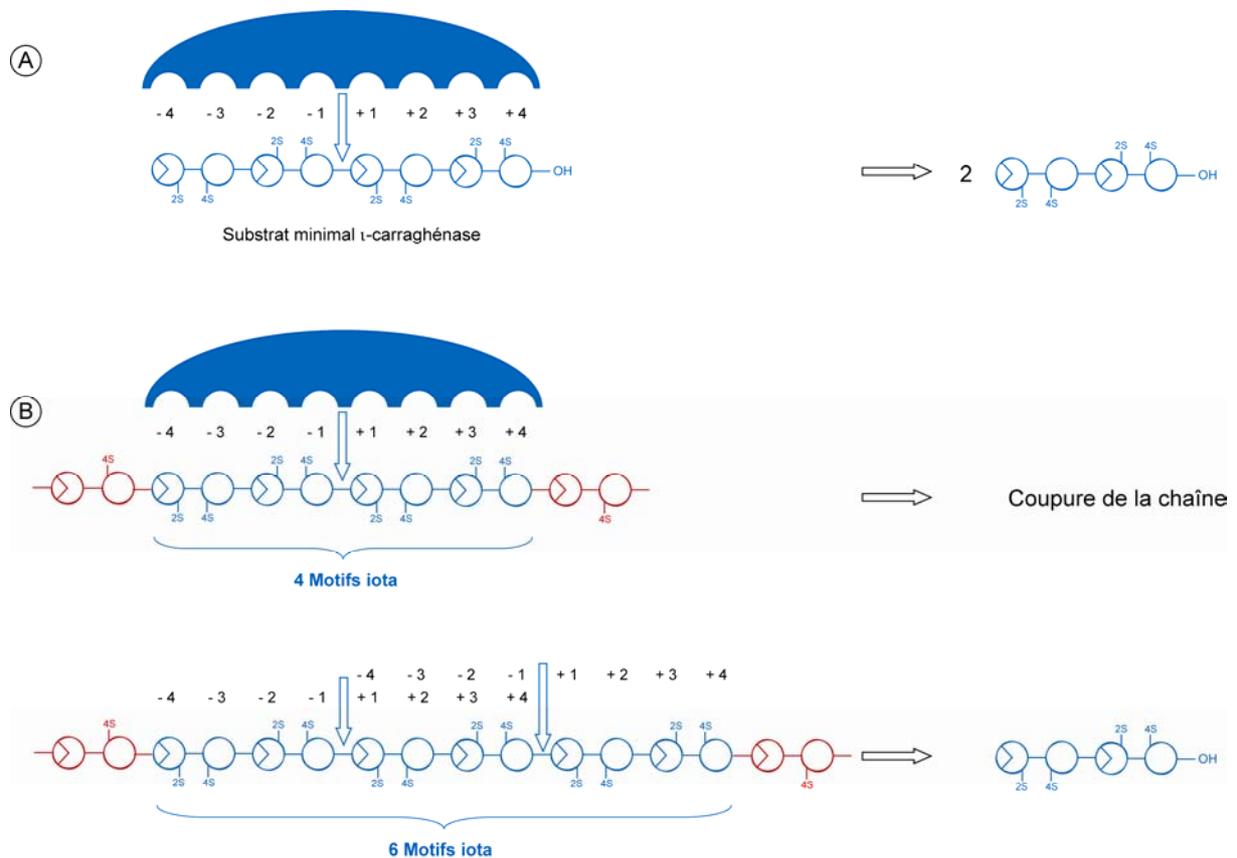


Figure 68 : Spécificité du site actif de la ι -carraghénase.

(A) Hydrolyse du néo- ι -octaose, substrat minimum de l'enzyme. (B) Quatre motifs iota consécutifs seraient nécessaires pour que la ι -carraghénase coupe des chaînes κ/ι hybrides et (C) six motifs iota seraient nécessaires pour qu'il y ait formation d'oligo- ι -carraghénanes de DP4.

pourraient s'établir avec les unités DA, ce qui pourrait diminuer la stabilité du substrat dans le site actif.

Les κ/ι -carraghénanes étudiés possèdent un nombre de motifs iota carrabioses inférieur au nombre de motifs kappa carrabioses, limitant ainsi la probabilité d'obtenir les 4 motifs iota carrabioses consécutifs nécessaires à une fixation productive des chaînes de κ/ι -carraghénanes (**Figure 68B**). La formation limitée d'oligo- ι -carraghénanes s'expliquerait d'autant plus par la nécessité d'avoir 6 motifs iota consécutifs pour qu'il y ait formation d'un néo- ι -carratétraose. S'il s'avérait que la ι -carraghénase puisse accepter des motifs kappa dans ses sous-sites, le nombre minimum de motifs iota consécutifs serait à reconsidérer.

L'hydrolyse par la ι -carraghénase d'un κ/ι -carraghénane possédant une structure iota majoritaire pourrait conduire à une formation plus importante d'oligo- ι -carraghénanes et d'oligo-carraghénanes hybrides qui pourraient ainsi être purifiés et caractérisés par RMN. S'il s'avérait que leur structure soit du type ι - $[\iota/\kappa]$ - ι , la possibilité pour la ι -carraghénase d'accepter des unités DA dans ses sous-sites pourrait être étudiée.

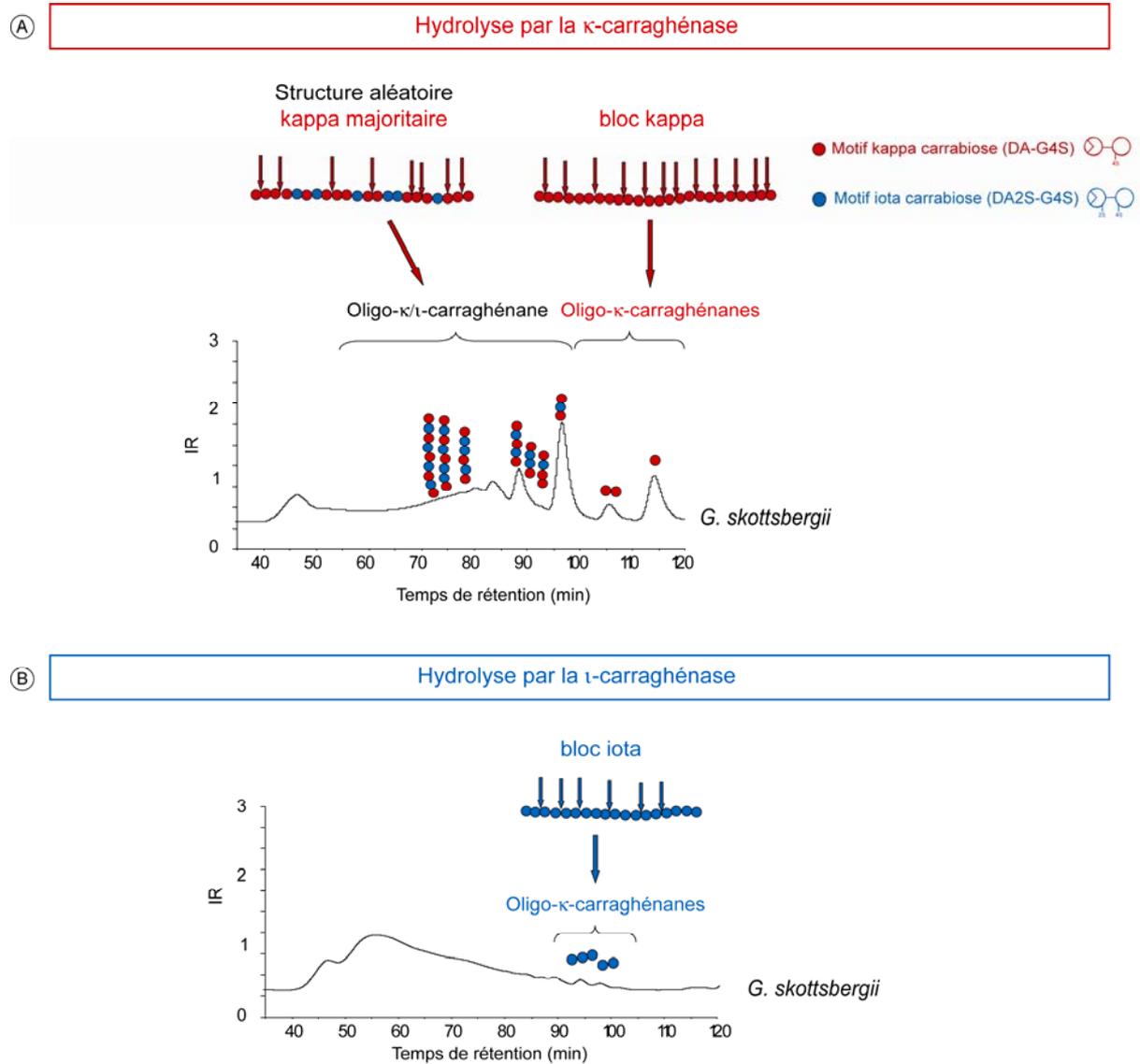


Figure 69 : Proposition d'organisation structurale des chaînes de κ/ι -carraghénanes hydrolysées (A) par la κ -carraghénase et (B) par la ι -carraghénase.

II. Proposition de schéma d'organisation des κ/ι -carraghénanes.

L'étude des κ/ι -carraghénanes par hydrolyse enzymatique a montré qu'il s'agissait d'hétéropolymères et non d'un mélange d'homopolymères. La caractérisation des produits d'hydrolyse formés après l'action des κ - et ι -carraghénases, a aussi permis d'étudier la distribution des motifs kappa et iota dans ces chaînes hétérogènes.

La présence d'oligo- κ -carraghénanes parmi les produits de l'hydrolyse par la κ -carraghénase traduit la présence de blocs kappa carrabioses au sein des chaînes de κ/ι -carraghénanes, mais ne permet pas de déterminer la longueur et le nombre de ces blocs dans les chaînes (**Figure 69A**). La longueur de ces blocs serait au minimum de 3 motifs pour pouvoir obtenir un néo- κ -carrabiose. La formation d'oligo- κ/ι -carraghénanes, de type κ - ι - κ et κ - ι - ι - κ , par action de la κ -carraghénase, montre l'existence de segments de chaînes contenant majoritairement des kappa carrabioses avec une probable dispersion aléatoire de un ou deux iota carrabioses consécutifs. La longueur de ces segments hybrides ne peut pour l'instant être définie (**Figure 69A**).

Ces κ/ι -carraghénanes posséderaient aussi dans leur structure des blocs iota de longueur minimale de 6 motifs pour pouvoir être hydrolysés en néo- ι -carratétraose (**Figure 69B**). Les oligo- ι -carraghénanes ont été obtenus en faible quantité traduisant le faible nombre de blocs iota dans la structure. Mais une hydrolyse importante du polymère en oligomères de grandes tailles a été observée (**Figure 69B**), ce qui supposerait une présence fréquente dans les chaînes des 4 motifs iota carrabioses consécutifs nécessaires à une fixation productive.

Les chaînes de κ/ι -carraghénanes seraient donc composées de plusieurs types de séquences hydrolysables par les κ - et ι -carraghénases, mais il n'a pas été établi si ces différentes séquences étaient présentes dans la même chaîne ou sur des chaînes distinctes.

Certaines chaînes de κ/ι -carraghénanes ont des structures non hydrolysables par les κ - et ι -carraghénases (fraction résistante). Pour ne pas être hydrolysées, ces chaînes de κ/ι -carraghénanes ne doivent pas posséder plus d'un motif kappa carrabiose et plus de trois motifs iota carrabioses consécutifs. Les différentes structures théoriquement possibles sont présentées **figure 70A**.

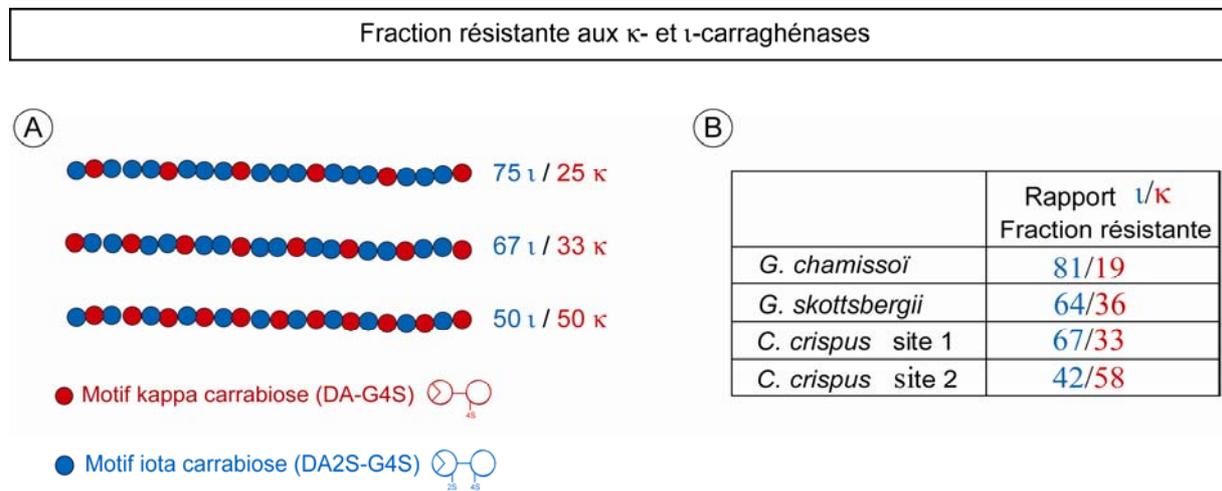


Figure 70 : Composition des chaînes de κ/ι -carraghénanes non hydrolysables par les deux carraghénases.

(A) Composition théorique de la fraction résistante (B) Composition déterminée par RMN.

Le rapport des motifs carrabioses ι/κ de ces chaînes varierait entre 50 ι /50 κ et 75 ι /25 κ . Ces structures seraient concordantes avec les taux de kappa/iota observés par ^1H -RMN pour les fractions résistantes des κ/ι -carraghénanes de *G. skottsbergii* et *C. crispus* site 1 (**Figure 70B**). Les fractions résistantes des κ/ι -carraghénanes de *G. chamissoi*, avec un rapport de 81 ι /19 κ , et de *C. crispus* site 2, avec un rapport de 42 ι /58 κ , sont en dehors des valeurs 75 ι /25 κ et 50 ι /50 κ .

Ces rapports peuvent être expliqués par une hydrolyse incomplète des séquences hydrolysables composant ces fractions résistantes. Mais ces rapports peuvent être faussés par une mauvaise résolution des signaux RMN et par la superposition partielle des signaux des autres structures analysées dans la fraction résistante. Il serait d'ailleurs nécessaire d'avoir une meilleure préparation préalable des substrats. En effet, l'élimination de λ -carraghénane, de motifs précurseurs et d'amidon floridéen pourrait être réalisable et éviter ainsi l'obtention de fractions résistantes composées à plus de 50% de structures autres que kappa et iota, et altérant ainsi les résultats.

Une amélioration de la mesure des poids moléculaires des fractions résistantes et des polymères serait aussi à apporter. Dans cette étude les poids moléculaires étaient d'environ 10⁶ Da, ce qui est environ deux fois plus élevé que ceux habituellement décrits. Les analyses étant effectuées à température ambiante, il est possible qu'un phénomène d'agrégation des chaînes ait pu se produire. Un système de four à 60°C environ pour les colonnes devrait être à l'avenir utilisé. Les poids moléculaires obtenus pour ces fractions résistantes ne peuvent donc pas être pour l'instant interprétés.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'analyse structurale des κ/ι -carraghénanes par hydrolyse enzymatique a permis de déterminer qu'ils s'agissaient d'hétéropolymères, c'est-à-dire que les motifs kappa et iota carrabioses sont situés sur des mêmes chaînes. La structure d'un κ/ι -carraghénane serait composée de différentes organisations de chaînes avec des blocs kappa carrabioses, des blocs iota carrabioses et des segments avec une dispersion variable de ces deux motifs. L'hydrolyse de ces structures se traduit par la formation d'oligo- κ -carraghénanes, d'oligo- ι -carraghénanes et d'oligo- κ/ι -carraghénanes. La structure des produits d'hydrolyse est identique quelle que soit l'algue dont le κ/ι -carraghénane est extrait mais leur proportion varie suivant l'espèce de l'algue (*Gigartina*, *Chondrus*) ou le site de récolte (*C. crispus* site 1 et 2). Ces variations reflètent des différences dans la répartition des motifs kappa et iota carrabiose sur les chaînes de carraghénanes, même s'ils possèdent le même rapport kappa/iota déterminé par RMN.

Ces chaînes de carraghénanes avec des motifs kappa et iota carrabioses ont probablement été formées lors de la biosynthèse de la paroi mais il est aussi possible que des enzymes interviennent ensuite dans la régulation du taux de sulfate sur les chaînes. Cette régulation de taux de sulfate des chaînes de κ/ι -carraghénanes semblerait varier suivant les espèces et les sites de culture des algues et pourrait peut-être influencer les propriétés physico-chimiques de leurs parois.

Afin d'obtenir une meilleure caractérisation de ces chaînes hétérogènes, l'utilisation d'autres carraghénases avec des propriétés de fixations productives différentes serait à envisager. Il a été démontré l'existence de bactéries (souche 2,3,4,5 (Bellion *et al.*, 1982)) qui pourraient couper six motifs iota carrabiose consécutifs au lieu de huit, ce qui permettrait peut-être d'obtenir un taux d'hydrolyse plus important des κ/ι -carraghénanes et la formation d'oligosaccharides hybrides en quantité suffisante pour être caractérisés. L'utilisation de la κ -carraghénase de *Z. galactanivorans* serait aussi à tester sur ces substrats puisqu'elle requiert, pour couper la chaîne, deux motifs kappa supplémentaires par rapport à la κ -carraghénase de *P. carrageenovora*. La corrélation des caractérisations des oligosaccharides et des fractions résistantes obtenus par action de ces différentes carraghénases, devrait permettre d'obtenir des informations plus précises sur l'agencement des motifs iota et kappa carrabioses dans les chaînes de κ/ι -carraghénanes.

Chapitre III :
Analyse structurale des κ/μ -carraghénanes

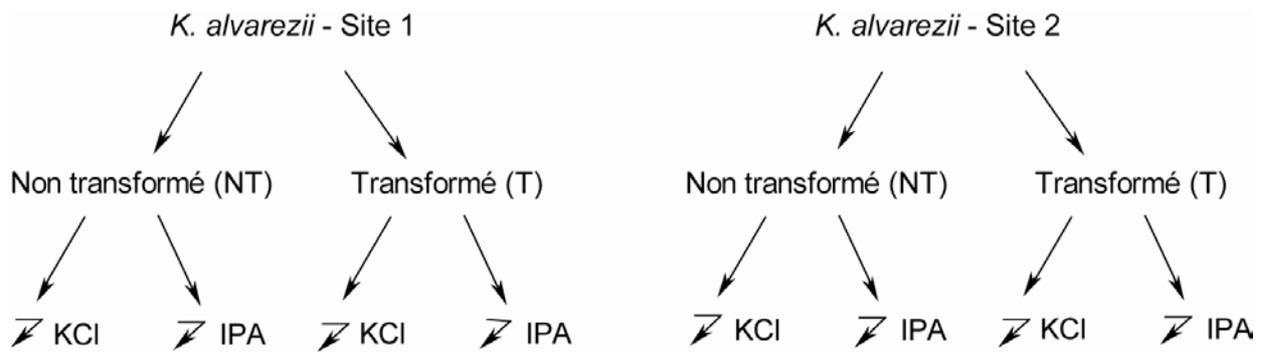


Figure 71 : Préparation, à l'échelle pilote, de 8 lots de κ -carraghénanes à partir de deux sources de *K.alvarezii*, par deux procédés d'extraction et deux procédés de précipitation.

Chapitre III : Analyse structurale des κ/μ -carraghénanes

INTRODUCTION

La présence des motifs μ - et ν -carraghénanes a été détectée dans la paroi de nombreuses algues rouges par des analyses chimiques et spectroscopiques (Bellion *et al.*, 1983; Ciancia *et al.*, 1993b). Les motifs μ - et ν -carraghénanes (G4S-D6S et G4S-D2S,6S) sont les précurseurs biosynthétiques respectivement des motifs κ - et ι -carraghénanes (G4S-DA et G4S-DA2S). La transformation des motifs précurseurs serait réalisée par l'action de deux galactose-6-sulfurylases différentes lors de la biosynthèse (Craigie *et al.*, 1979). Cette transformation peut aussi être effectuée *in vitro* à chaud en milieu alcalin. Le mécanisme de cette réaction a été l'objet d'études et il a été démontré que la réaction se déroulait par une réaction de substitution SN_2 , par une fermeture du cycle concomitante avec le départ du groupement sulfate en C6. Cette réaction peut être 40 fois plus rapide que la transformation des motifs λ -carraghénanes en motifs θ -carraghénanes (Ciancia *et al.*, 1993b).

La teneur en précurseurs rencontrée dans les carraghénanes est généralement de l'ordre 10-20% mais aucune information n'est actuellement disponible sur la répartition de ces motifs précurseurs dans les chaînes de κ - ou ι -carraghénanes. Les propriétés rhéologiques particulières de ces chaînes soutiendraient l'hypothèse d'une dispersion aléatoire de ces motifs (van de Velde *et al.*, 2002).

Nous avons entrepris l'étude, par hydrolyse enzymatique, des structures hybrides κ/μ -carraghénanes extraits, sans transformation alcaline, des algues *K. alvarezii*. L'étude de l'influence de l'origine de l'algue (sites 1 et 2) sur la structure des carraghénanes a été réalisée, ainsi que celle de l'influence des deux modes de précipitation couramment appliqués industriellement, au chlorure de potassium (KCl) et à l'isopropanol (IPA). Les mêmes études ont été réalisées parallèlement sur les κ -carraghénanes extraits de ces algues avec transformation alcaline.

Au total huit lots de carraghénanes ont été soumis à une analyse structurale par hydrolyse enzymatique, par la κ -carraghénase (**Figure 71**).

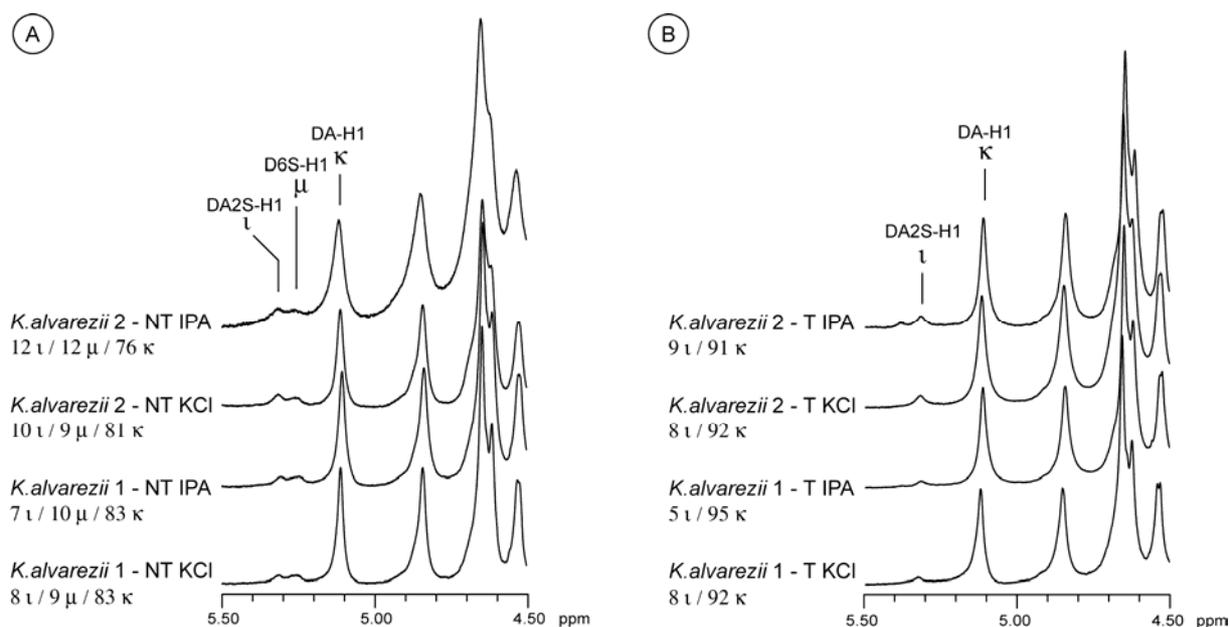


Figure 72 : Spectres ^1H -RMN de carraghénanes extraits des algues *K. alvarezii*.

(A) extraits sans transformation et (B) extraits avec transformation alcaline. Les spectres ont été enregistrés à 70°C. Les signaux des protons anomériques des unités DA des κ -carraghénanes, DA2S des ι -carraghénanes et D6S du μ -carraghénane sont indiqués.

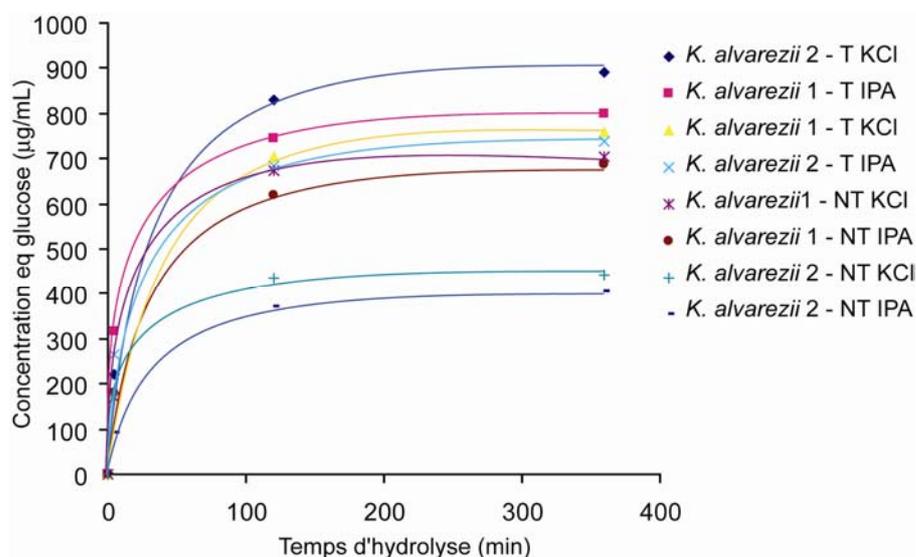


Figure 73 : Dosage des extrémités réductrices formées au cours de l'hydrolyse des κ -carraghénanes transformés et non transformés par la κ -carraghénase.

RESULTATS

I. Analyse ^1H -RMN des κ -carraghénanes extraits de *K. alvarezii*.

Des analyses ^1H -RMN ont été réalisées à 70°C sur les 8 lots de carraghénanes extraits des algues *K. alvarezii*. Tous les spectres présentent les signaux caractéristiques du κ -carraghénane dont le signal du proton anomérique des unités DA résonne à 5,1 ppm (**Figure 72**). La présence d'environ 10% de motifs iota a aussi été mesurée sur les différents spectres par l'intégration du signal du proton DA2S-H1 à 5,3 ppm. Sur les spectres des carraghénanes non transformés (**Figure 72A**), la présence d'environ 10% de motifs mu a été également estimée par intégration des signaux D6S-H1 à 5,25 ppm. Ces signaux D6S-H1 des motifs mu ne sont plus présents sur les spectres des carraghénanes transformés (**Figure 72B**), traduisant une transformation alcaline totale apparente des unités D6S des motifs mu en unités DA des motifs kappa.

Les intégrations des signaux minoritaires des protons anomériques des unités DA2S (iota) et D6S (mu) varient d'environ 2-3%. Mais la résolution limitée des spectres ^1H -RMN ne permet pas de distinguer objectivement de différences structurales entre les 4 κ -carraghénanes non transformés et entre les 4 κ -carraghénanes transformés suivant l'origine de l'algue et les modes de précipitation utilisés.

II. Hydrolyse des κ -carraghénanes transformés et non-transformés par la κ -carraghénase.

Les κ -carraghénanes extraits de *K. alvarezii*, transformés et non transformés, ont été hydrolysés par la κ -carraghénase. Le nombre de coupures réalisé par l'enzyme a été mesuré par le dosage des extrémités réductrices formées (**Figure 73**). Dans les premiers temps de l'hydrolyse le nombre d'extrémités réductrices formées augmente rapidement, pour se stabiliser après 2h d'hydrolyse et atteindre un plateau en fin d'hydrolyse. La vitesse et le taux d'hydrolyse des κ -carraghénanes transformés et des κ -carraghénanes non transformés du site 1 sont du même ordre de grandeur. Mais le taux d'hydrolyse des κ -carraghénanes non transformés du site 2 est très nettement inférieur, le nombre de coupures effectuées semble

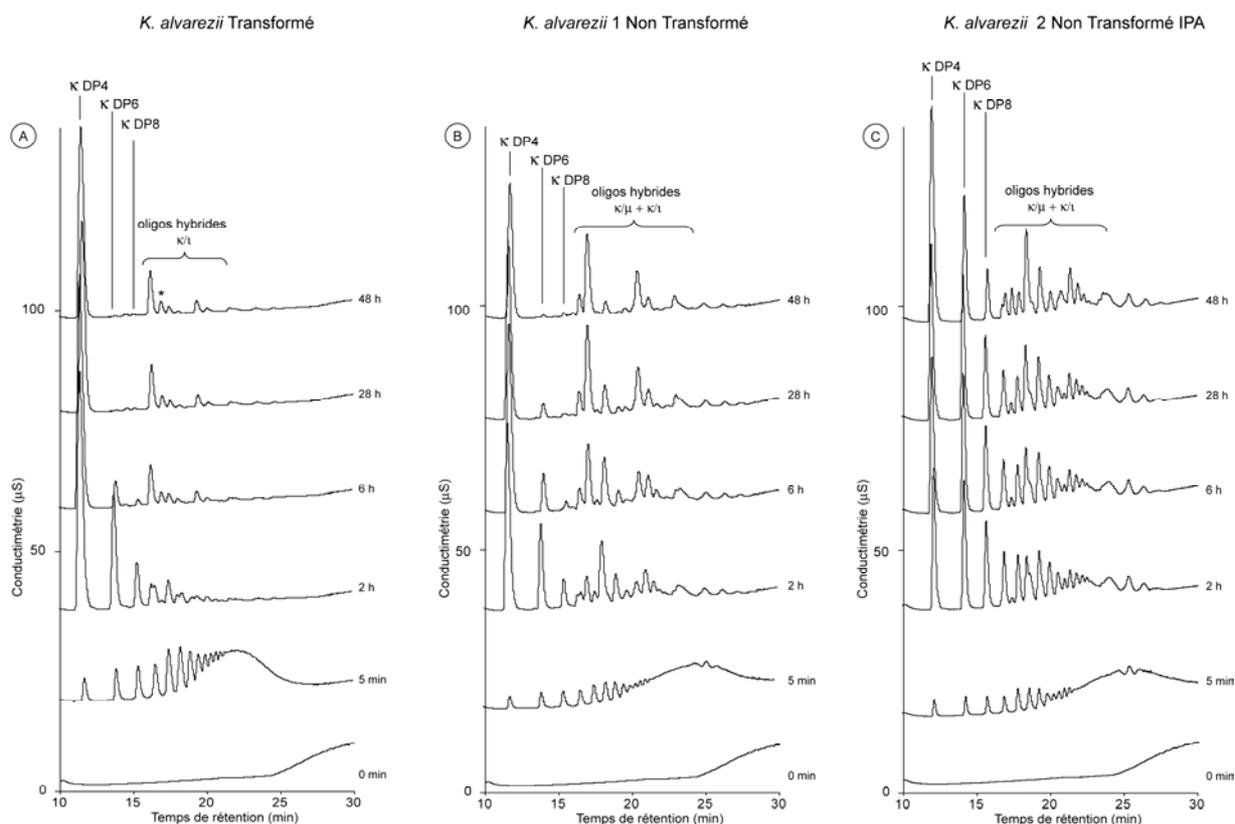


Figure 74 : Suivi cinétique par HPAEC de la formation des produits d'hydrolyse enzymatique des κ -carraghénanes extraits de *K. alvarezii*

L'hydrolyse a été réalisée par la κ -carraghénase sur les κ -carraghénanes (A) transformés (4 profils identiques) et sur les κ -carraghénanes non transformés (B) du site 1 et (C) du site 2, précipités par l'IPA. Le néo- κ -carrabiose n'est pas détectable par cette méthode car élué conjointement aux sels.

environ deux fois moins important.

La formation des produits d'hydrolyse a aussi été suivie par analyse HPAEC (**Figure 74**). Les profils cinétiques obtenus pour l'hydrolyse des κ -carraghénanes transformés (**Figure 74A**) sont tous identiques, quelle que soit l'origine de l'algue (sites 1 et 2) ou le processus de transformation (IPA ou KCl). La cinétique montre la libération d'oligosaccharides de tailles intermédiaires, qui ont ensuite été eux-mêmes hydrolysés en oligosaccharides de plus en plus courts, ce qui est propre au caractère endo de la κ -carraghénase. Après 2h d'hydrolyse, la majorité des coupures a été effectuée, et seuls les oligosaccharides de DP6-12 de la série néo- κ -carrabiose sont encore observés. Après 28h d'hydrolyse, le néo- κ -carrahexaose, substrat minimum de la κ -carraghénase, a été complètement hydrolysé en néo- κ -carratétraose et néo- κ -carrabiose. Les autres produits limites d'hydrolyse visibles sur les profils sont les oligo- κ/ι -carraghénanes déjà caractérisés au chapitre II.

Les profils d'hydrolyse des carraghénanes non transformés (**Figure 74B et C**) sont plus complexes que les profils des carraghénanes transformés (**Figure 74A**). Ils se caractérisent par la présence additionnelle d'oligosaccharides de temps de rétention différents de ceux des oligo- κ -carraghénanes et des oligo- κ/ι -carraghénanes. Il s'agit très probablement d'oligo- κ/μ -carraghénanes issus de l'hydrolyse des motifs μ présents dans la structure des κ -carraghénanes non transformés.

Le mode de précipitation (KCl ou IPA) semble n'avoir aucune influence sur la structure des carraghénane non transformés de *K. alvarezii* du site 1, leurs profils d'hydrolyse à 48h sont identiques (**Figure 75**). Les profils des κ -carraghénanes non transformés extraits des algues du site 2 sont plus complexes que ceux du site 1. Le néo- κ -carrahexaose est toujours présent après 48 h d'hydrolyse et le nombre et la proportion des oligo- κ/μ -carraghénanes sont plus importants. De plus, dans le cas du carraghénane non transformé du site 2, bien que la nature des produits d'hydrolyse semble identique (mêmes temps de rétention), le mode de précipitation semblerait avoir une influence sur la concentration en oligosaccharides formés, qui paraît supérieure si le κ -carraghénane est précipité à l'IPA.

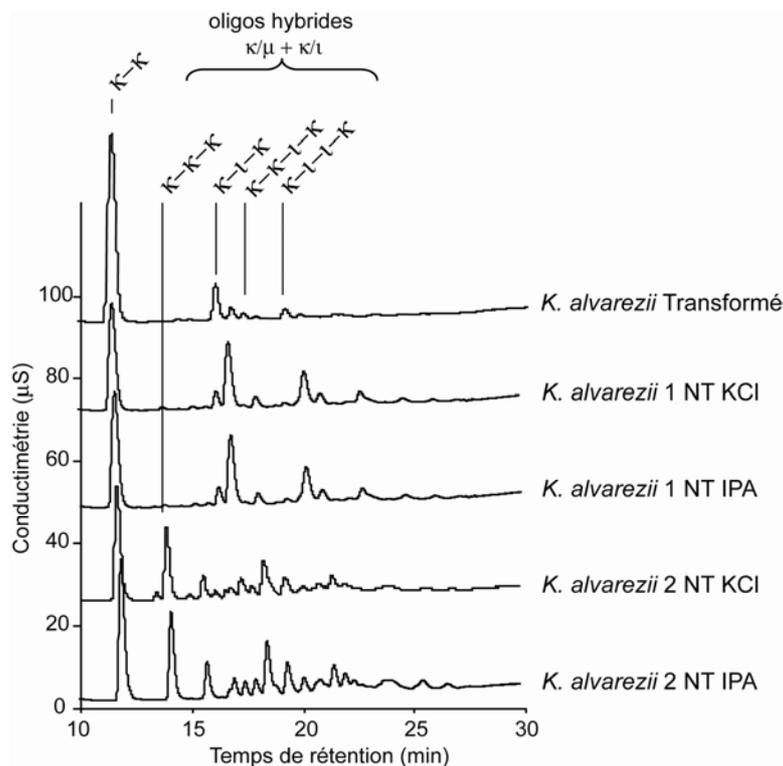


Figure 75 : Analyse par HPAEC des produits obtenus après 48 h d’hydrolyse enzymatique des κ -carraghénanes extraits de *K. alvarezii*

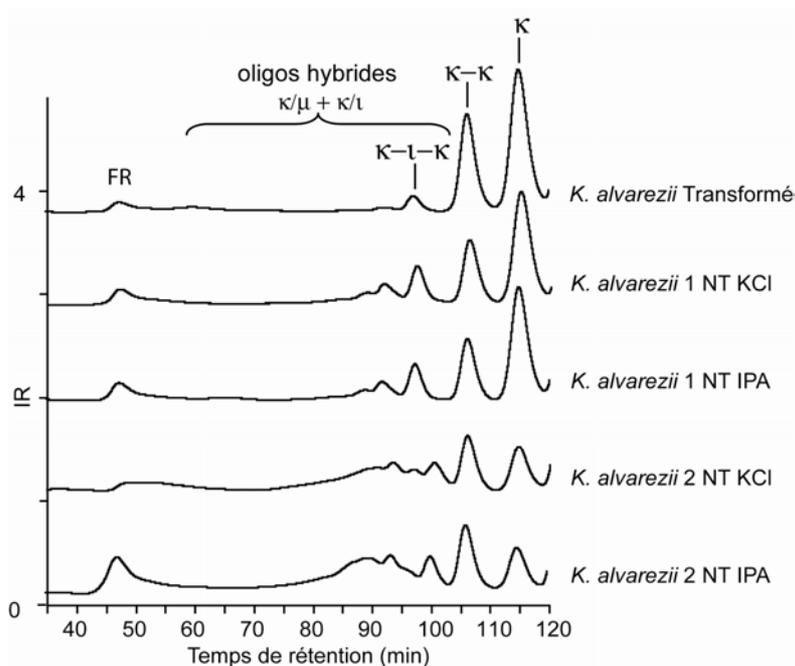


Figure 76 : Analyse par HPSEC-MALLS des produits obtenus après 48 h d’hydrolyse par la κ -carraghénase des κ -carraghénanes extraits de *K. alvarezii*

L'analyse HPSEC-MALLS des hydrolysats, à 48 h d'hydrolyse, des κ -carraghénanes transformés et non-transformés (**Figure 76**), montre des fractions résistantes d'un taux proche de 5%, ce qui suggère une hydrolyse presque totale du polymère en oligosaccharides. Les profils des κ -carraghénanes non-transformés extraits de *K. alvarezii* site 2, montrent la présence non négligeable d'oligosaccharides de DP plus élevés, reliée à un taux d'hydrolyse moins important. Cette analyse confirme le dosage plus faible en sucres réducteurs formés à la fin de l'hydrolyse (**Figure 73**). La fraction résistante a été collectée et analysée par ^1H -RMN (**Figure 77**). Les spectres obtenus sont peu résolus mais indiquent que les fractions résistantes seraient composées majoritairement de motifs ι -carraghénane. La présence de motifs μ n'a pas été détectée.

III. Caractérisation des oligo- κ/μ -carraghénanes.

A. Purification des oligo- κ/μ -carraghénanes

Les oligo- κ/μ -carraghénanes ont été purifiés par chromatographie sur Superdex 30 préparative, à partir de l'hydrolysat du κ -carraghénane non transformé extrait de *K. alvarezii* site 1 précipité à l'IPA (**Figures 78 et 79**). Cette purification a permis de séparer, selon leur volume hydrodynamique, quatre oligo- κ/μ -carraghénanes (numérotés de 1 à 4, **Figure 78**). Leur pureté a ensuite été analysée par HPAEC (**Figure 79**). Chacun de ces oligo- κ/μ -carraghénanes a été élué conjointement avec un des oligo- κ/ι -carraghénanes présents minoritairement dans l'hydrolysat. Une seconde purification a donc été réalisée par HPAEC semi-préparative sur colonne AS11 pour chacun des quatre oligo- κ/μ -carraghénanes (**Figure 79**). Cette purification a permis d'obtenir les oligo- κ/μ -carraghénanes à un degré de pureté supérieur à 95% et ainsi de réaliser leur analyse par RMN. Il est à noter que ces oligo- κ/μ -carraghénanes sont beaucoup moins stables que les oligo- κ/ι -carraghénanes, et que l'étape de lyophilisation peut conduire à une dégradation rapide de ceux-ci.

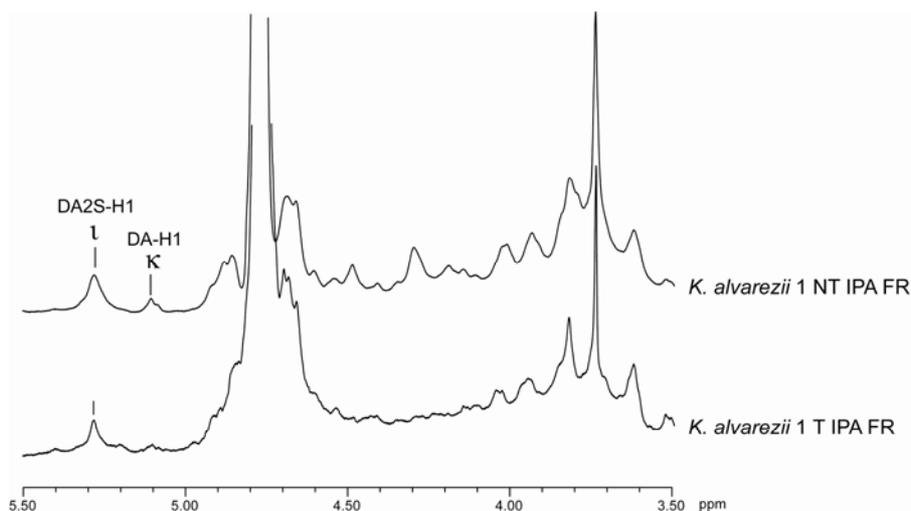


Figure 77 : Spectre ^1H -RMN des fractions résistantes à la κ -carraghénase des κ -carraghénanes extraits de *K. alvarezii* à 25 °C.

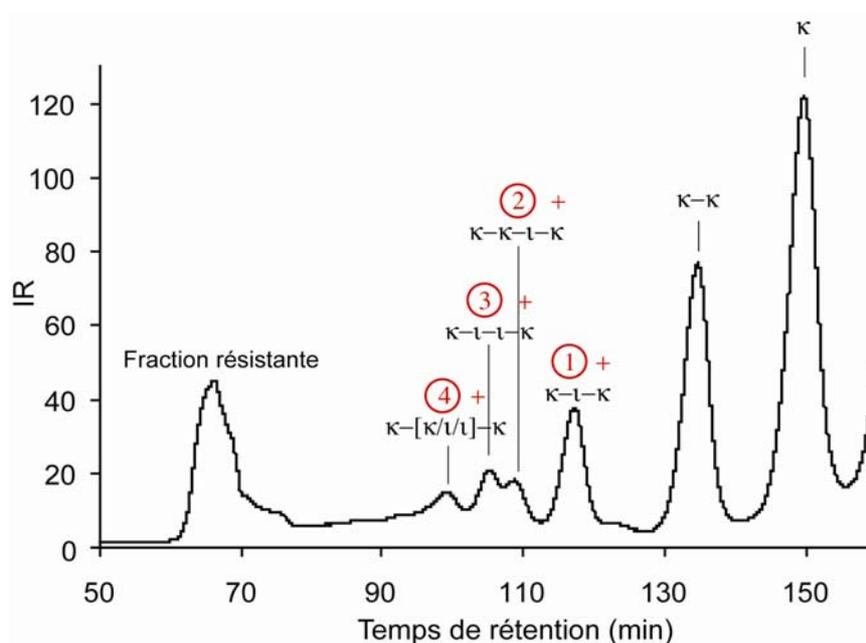


Figure 78 : Purification par chromatographie d'exclusion de taille des oligo- κ/μ -carraghénanes.

Les oligo- κ/μ -carraghénanes ont été produits par l'hydrolyse par la κ -carraghénase du κ -carraghénane non transformé, traité par l'IPA, extrait de l'algue *K. alvarezii* du site 1. La séparation a été effectuée sur Superdex 30 préparative. Sous chaque pic un oligo- κ/μ -carraghénane (numérotés 1-4) est élué conjointement à un oligo- κ/μ -carraghénane précédemment caractérisé.

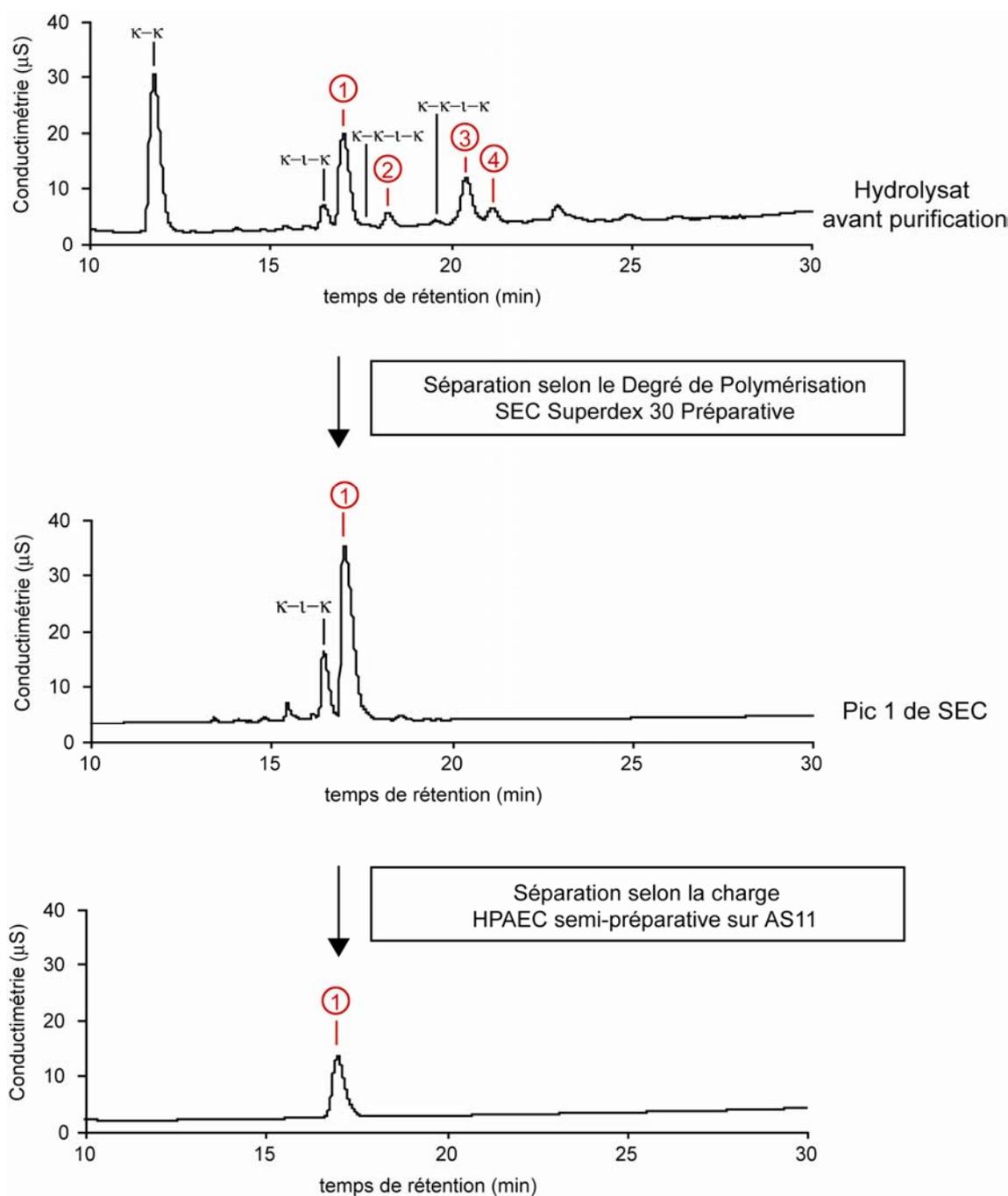


Figure 79 : Analyse par HPAEC analytique de la pureté des oligo- κ/μ -carraghénanes purifiés par SEC préparative et HPAEC semi-préparative.

Le schéma de purification est illustré par la purification de l'oligo- κ/μ -carraghénane $\kappa-\mu-\kappa$ (1). Les oligo- κ/μ -carraghénanes ont été purifiés à partir de l'hydrolysats du κ -carraghénane non transformé, traité par l'IPA, extrait de l'algue *K. alvarezii* du site 1.

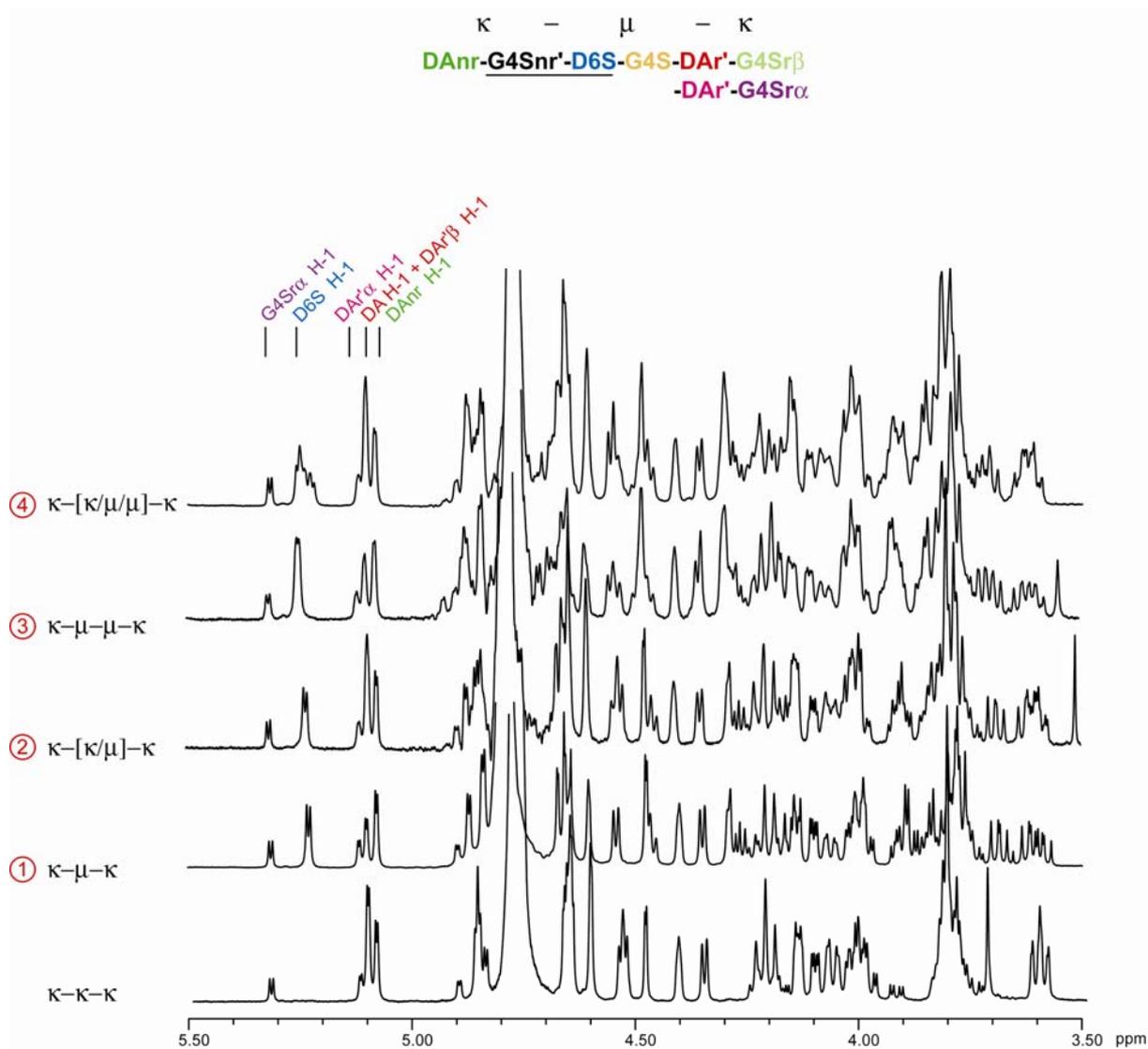


Figure 80 : Spectres ^1H -RMN à 25 °C des oligo- κ/μ -carraghénanes purifiés.

Le spectre du néo- κ -carrahexaose est présenté en référence. Les déplacements des protons anomériques α sont indiqués

B. Caractérisation par RMN des oligo- κ/μ -carraghénanes.

Les quatre oligosaccharides (numérotés 1, 2, 3 et 4) purifiés par HPAEC ont été analysés par ^1H -RMN (**Figure 80**). L'analyse des spectres a confirmé pour chacun des oligosaccharides une structure hybride de type κ/μ . Sur chaque spectre ^1H -RMN, est présent à 5,24 ppm le pic caractéristique du proton D6S-H1 des motifs mu (van de Velde *et al.*, 2004) et à 5,1 ppm, le pic caractéristique du proton DA-H1 des motifs kappa carrabioses internes. Comme pour les oligo- κ/μ -carraghénanes, les extrémités non-réductrices (DAnr-G4Snr') et réductrices (DAr'-G4Sr) des oligo- κ/μ -carraghénanes sont occupées par des motifs kappa. En effet, les signaux spécifiques des protons DAnr-H1 (5,08 ppm), DAr' α -H1 (5,10 ppm) sont présents sur les différents spectres.

Le nombre de motifs kappa (G4S-DA) et mu (G4S-D6S) carrabioses internes, déterminant le degré de polymérisation, a été calculé par intégration des signaux DA-H1 à 5,1 ppm et D6S-H1 à 5,3 ppm et comparé à l'intégration du signal DAnr-H1. Les structures des quatre oligo- κ/μ -carraghénanes purifiés sont donc $\kappa\text{-}\mu\text{-}\kappa$ (1), $\kappa\text{-}[\kappa/\mu]\text{-}\kappa$ (2), $\kappa\text{-}\mu\text{-}\mu\text{-}\kappa$ (3) et $\kappa\text{-}[\kappa/\kappa/\mu]\text{-}\kappa$ (4).

Les déplacements chimiques protons et carbones de ces quatre oligo- κ/μ -carraghénanes a été déterminée par une série d'analyse ^1H (**Figure 80**), COSY, HMQC (**Figure 81**), HMBC (**Figure 82**), Jdelta et Jmod à 25°C.

Ces oligo- κ/μ -carraghénanes comportent dans leurs structures différentes unités DA, D6S et G4S. Les déplacements chimiques protons et carbones attribués aux unités DA (non réductrice, interne, réductrice) de ces oligo- κ/μ -carraghénanes sont identiques aux unités DA correspondantes dans une structure néo- κ -carrhexaose, puisque ces unités sont toujours entourées d'unités G4S (**Figure 81**, **Tableau 22** et **23**). Les déplacements carbones attribués aux unités D6S des mu carrabioses des oligo- κ/μ -carraghénanes, concordent avec les déplacements précédemment attribués dans des structures polymériques (Ciancia *et al.*, 1993b; van de Velde *et al.*, 2004) (**Tableau 23**). Seules les valeurs des C2 et C5 sont plus élevées (72,13 ppm au lieu de 70,70 ppm, et 71,32 ppm au lieu de 70,50 ppm). Les déplacements chimiques protons des unités D6S ont été, par cette analyse, pour la première fois attribués et sont reportés dans le **tableau 22**.

Dans ces structures oligo- κ/μ -carraghénanes, l'environnement électronique des unités G4S varie suivant la nature DA et/ou D6S des unités voisines. Par exemple, dans une

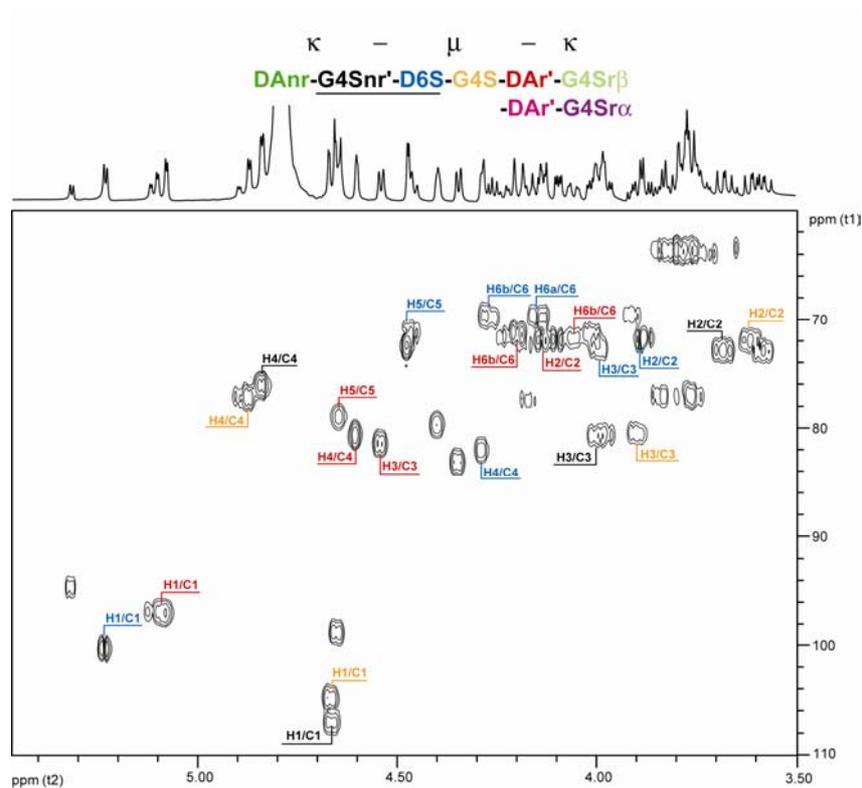


Figure 81 : Spectre hétéronucléaire $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC à 25 °C de l'hexasaccharide κ - μ - κ .

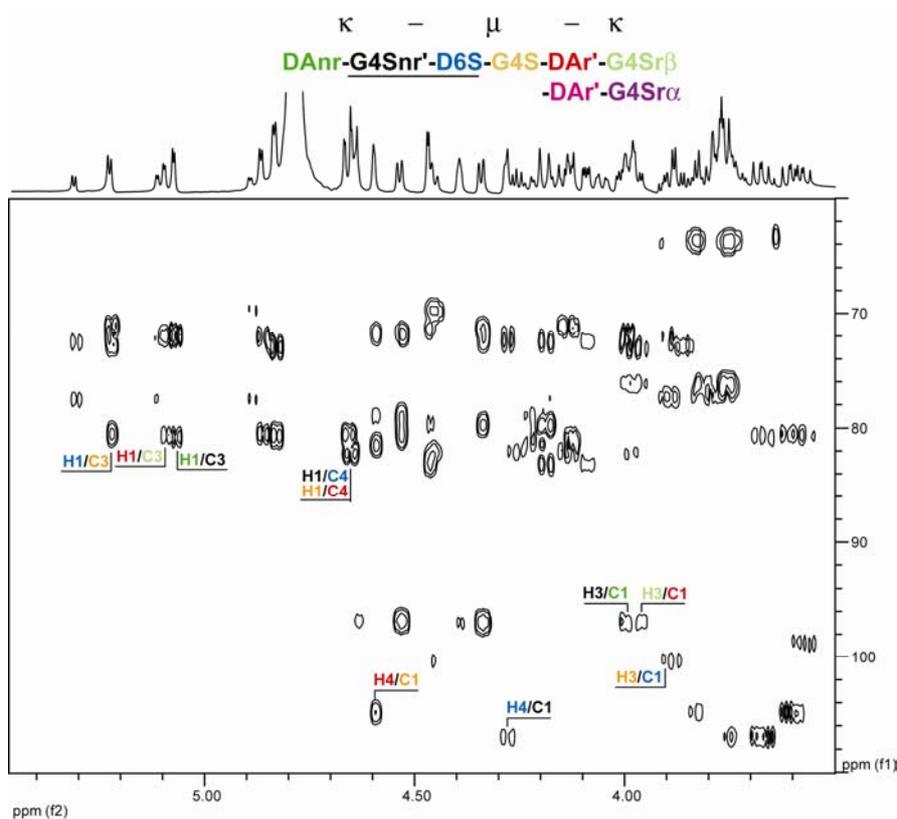


Figure 82 : Spectre hétéronucléaire $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC à 25 °C de l'hexasaccharide κ - μ - κ .

structure κ - μ - κ , trois unités G4S différentes sont présentes G4Snr, G4S et G4Sr (coloration noire, orange et verte respectivement, **Figure 81**). L'unité G4Sr (verte) possède les mêmes déplacements que dans une structure néo- κ -carrahexaose (**Tableau 22 et 23**). L'unité G4S (noire) est entourée du côté non-réducteur d'une unité DA, et du côté réducteur d'une unité D6S et elle possède des déplacements chimiques carbones similaires à ceux reportés pour une unité G4S de structure mu (**Tableau 23**). L'unité G4S (orange) est entourée du côté non-réducteur d'une unité D6S et du côté réducteur d'une unité DA. Cependant ses déplacements ^{13}C -RMN sont très similaires à ceux d'une unité G4S de structure kappa. Mais les déplacements du C4 sont particuliers, le C4 de l'unité G4S (noire) correspond en effet à celui d'un motif kappa et le C4 de l'unité G4S (orange) à celui d'un motif mu. Quant aux déplacements protons des unités G4S sur les spectres ^1H -RMN du κ - μ - κ , ils sont différents de ceux d'un G4S d'un motif kappa, qu'ils soient du côté réducteur ou non-réducteur de l'unité D6S. Pour obtenir les valeurs véritables des déplacements ^{13}C -RMN et ^1H -RMN d'une unité G4S d'un motif mu, il aurait fallu pouvoir analyser la structure κ - μ - μ - κ où une des unités G4S est entourée par deux unités D6S. Mais les spectres 2D obtenus n'ont pas été assez résolus pour obtenir les déplacements chimiques de cette unité G4S. En effet, une quantité insuffisante d'oligo- κ/μ -carraghénane avait été purifiée pour obtenir un spectre exploitable.

Il semblerait donc que le changement de conformation induit par l'absence de pont 3,6-anhydro ainsi que la sulfatation en 6 provoqueraient des variations dans l'environnement électronique des deux unités G4S voisines de l'unité D6S mais principalement sur les carbones de l'unité G4S située de son côté non réducteur.

La quantité purifiée des oligosaccharides κ - $[\kappa/\mu]$ - κ et κ - $[\kappa-\mu-\mu]$ - κ n'a pas été assez importante pour obtenir des spectres 2D-RMN HMBC et HMQC assez résolus et pour déterminer l'enchaînement des unités dans ces structures. Le marquage à l'AMAC n'a pas été réalisé pour déterminer l'enchaînement de ces motifs car contrairement à l'oligo- κ/ι -carraghénane κ - κ - ι - κ , les oligosaccharides κ - $[\kappa/\mu]$ - κ et κ - $[\kappa-\mu-\mu]$ - κ ne sont pas hydrolysables par la κ -carraghénase.

Chapitre III : Analyse structurale des κ/μ -carraghénanes

		k-k- κ Knutsen	κ - μ - κ	κ -[κ/μ]- κ	κ - μ - μ - κ	κ -[$\kappa/\mu/\mu$]- κ
G4S _{FD}	H ₁	5.320	5.324	5.322	5.322	5.326
G4S _{FD}	H ₁	4.654	4.658	4.655	4.651	4.654
G4S	H ₁	4.660	4.669	4.670	4.666	4.685
G4S	H ₁	-	-	-	4.700	4.703
G4S	H ₁	-	4.669(nr)	4.665	4.676	4.672
G4S _{nr}	H ₁	4.658	-	4.655	-	4.654
G4S _{FD}	H ₂	3.917	3.915	3.916	3.921	3.926
G4S _{FD}	H ₂	3.593	3.593	3.590	3.591	3.601
G4S	H ₂	3.599	3.621	3.620	3.625	3.627
G4S	H ₂	-	-	-	3.726	3.728
G4S	H ₂	-	3.692 (nr)	3.689	3.690	3.702
G4S _{nr}	H ₂	3.596	-	3.595	-	3.610
G4S _{FD}	H ₃	4.165	4.178	4.173	4.178	4.185
G4S _{FD}	H ₃	3.983	3.986	3.980	3.980	3.983
G4S	H ₃	4.013	3.905	3.906	3.929	3.913
G4S	H ₃	-	-	-	3.940	3.939
G4S	H ₃	-	4.008 (nr)	4.009	4.014	4.018
G4S _{nr}	H ₃	4.003	-	4.009	-	4.018
G4S _{FD}	H ₄	4.901	4.904	4.902	4.902	4.905
G4S _{FD}	H ₄	4.835	4.844	4.857	4.843	4.845
G4S	H ₄	4.855	4.876	4.877	4.873	4.883
G4S	H ₄	-	-	-	4.888	4.883
G4S	H ₄	-	4.844 (nr)	4.837	4.843	4.848
G4S _{nr}	H ₄	4.855	-	4.837	-	4.848
G4S _{FD}	H ₅	4.186	4.188	4.182	-	4.194
G4S _{FD}	H ₅	3.774	3.785	-	-	-
G4S	H ₅	3.817	3.845	-	-	-
G4S	H ₅	-	-	-	-	-
G4S	H ₅	-	3.757 (nr)	-	-	-
G4S _{nr}	H ₅	3.817	-	-	-	-
G4S _{FD}	H _{6a}	3.790	3.801	3.787	-	3.803
G4S _{FD}	H _{6a}	3.783	-	-	-	-
G4S	H _{6a}	3.800	3.774	-	-	-
G4S	H _{6a}	-	-	-	-	-
G4S	H _{6a}	-	3.839 (nr)	-	-	-
G4S _{nr}	H _{6a}	3.800	-	-	-	-
G4S _{FD}	H _{6b}	3.731	3.730	3.724	-	3.733
G4S _{FD}	H _{6b}	3.783	-	-	-	-
G4S	H _{6b}	3.800	3.774	-	-	-
G4S	H _{6b}	-	-	-	-	-
G4S	H _{6b}	-	3.839 (nr)	-	-	-
G4S _{nr}	H _{6b}	3.800	-	-	-	-
DAr ^r _{FD}	H ₁	5.120	5.122	5.119	5.124	5.124
DAr ^r _{FD}	H ₁	5.103	5.106	5.100	5.105	5.107
D6S	H ₁	-	-	-	5.253	5.256
D6S	H ₁	-	5.237	5.238	5.253	5.230
DA	H ₁	5.103	5.100	5.100	-	5.107
DA2S _{nr}	H ₁	5.084	5.084	5.080	5.080	5.089
DAr ^r _{FD}	H ₂	4.142	4.145	4.138	4.138	4.145
DAr ^r _{FD}	H ₂	4.142	4.145	4.138	4.138	4.145
D6S	H ₂	-	-	-	3.911	3.904
D6S	H ₂	-	3.888	3.885	3.902	3.886?
DA	H ₂	4.138	-	4.138	-	4.145
DA2S _{nr}	H ₂	4.102	4.107	4.099	4.104	4.110
DAr ^r _{FD}	H ₃	4.535	4.549	4.547	4.533	4.558
DAr ^r _{FD}	H ₃	4.535	4.549	4.547	4.552	4.558
D6S	H ₃	-	-	-	4.000 env	4.031
D6S	H ₃	-	4.003	4.000	4.000 env	4.005
DA	H ₃	4.529	-	4.528	-	4.558
DA2S _{nr}	H ₃	4.352	4.358	4.350	4.355	4.356
DAr ^r _{FD}	H ₄	4.607	4.609	4.607	4.597	4.611
DAr ^r _{FD}	H ₄	4.607	4.609	4.607	4.612	4.611
D6S	H ₄	-	-	-	4.296	4.303
D6S	H ₄	-	4.298	4.291	4.296	4.299
DA	H ₄	4.607	-	4.607	-	4.611
DA2S _{nr}	H ₄	4.479	4.478	4.478	4.483	4.488
DAr ^r _{FD}	H ₅	4.650	4.653	4.650	-	4.659
DAr ^r _{FD}	H ₅	4.650	4.653	4.650	-	4.659
D6S	H ₅	-	-	-	-	4.488
D6S	H ₅	-	4.472	4.468	-	4.488
DA	H ₅	4.650	-	4.650	-	4.659
DA2S _{nr}	H ₅	4.409	4.407	4.409	4.405	4.409
DAr ^r _{FD}	H _{6a}	4.061	4.068	4.068	-	4.071
DAr ^r _{FD}	H _{6a}	4.061	4.068	4.068	-	4.071
D6S	H _{6a}	-	-	-	4.168	4.172
D6S	H _{6a}	-	4.156	4.157	4.168	4.172
DA	H _{6a}	4.061	-	4.049	-	4.079
DA2S _{nr}	H _{6a}	4.020	4.019	4.015	-	4.022
DAr ^r _{FD}	H _{6b}	4.234	4.238	4.237	-	4.242
DAr ^r _{FD}	H _{6b}	4.224	4.227	4.222	-	4.229
D6S	H _{6b}	-	-	-	4.286	4.286
D6S	H _{6b}	-	4.276	4.271	4.272	4.286
DA	H _{6b}	4.224	-	4.222	-	4.229
DA2S _{nr}	H _{6b}	4.207	4.205	4.197	4.202	4.207

Tableau 22 : Déplacements chimiques des protons des oligo- κ/μ -carraghénanes à 25 °C.

Les valeurs soulignées sont caractéristiques des motifs μ . Les valeurs manquantes n'ont pu être mesurées précisément. Les valeurs du néo- κ -carrahexaose ont été déterminées par Knutsen en 1992.

Chapitre III : Analyse structurale des κ/μ -carraghénanes

		κ - κ - κ	κ - μ - κ	κ - $[\kappa/\mu]$ - κ	κ - μ - μ - κ	Motif mu Van de Velde
G4S _{ra}	C ₁	94.82	94.84	94.87	94.86	107.0
G4S _{rβ}	C ₁	99.01	99.03	99.08	99.05	
G4S	C ₁	104.93	105.13	105.13	105.14	
G4S	C ₁	-	-	-	107.32	
G4S	C ₁	-	<u>107.22 (nr)</u>	<u>107.17</u>	<u>107.20</u>	
G4S _{nr}	C ₁	104.89	-	104.91	-	
G4S _{ra}	C ₂	69.71	69.73	69.72	-	72.69
G4S _{rβ}	C ₂	73.04	73.07	73.09	-	
G4S	C ₂	71.86	71.91	71.83	-	
G4S	C ₂	-	-	-	-	
G4S	C ₂	-	<u>73.02 (nr)</u>	<u>72.95</u>	-	
G4S _{nr}	C ₂	71.86	-	71.83	-	
G4S _{ra}	C ₃	77.65	77.65	77.65	77.67	80.54
G4S _{rβ}	C ₃	80.74	80.77	80.67	80.76	
G4S	C ₃	80.57*	80.65	80.85*	-	
G4S	C ₃	-	-	-	-	
G4S	C ₃	-	<u>80.96 (nr)</u>	<u>80.85</u>	-	
G4S _{nr}	C ₃	80.66*	-	80.48*	-	
G4S _{ra}	C ₄	77.34	77.3	77.30	-	76.25
G4S _{rβ}	C ₄	76.17	76.27	76.26	76.28	
G4S	C ₄	76.25	<u>77.21*</u>	<u>77.27</u>	-	
G4S	C ₄	-	-	-	-	
G4S	C ₄	-	<u>76.35 (nr)</u>	76.27	-	
G4S _{nr}	C ₄	76.25	-	76.27	-	
G4S _{ra}	C ₅	72.58	72.59	72.57	72.62	77.10
G4S _{rβ}	C ₅	77.04	77.04	77.03	-	
G4S	C ₅	77.21	77.29*	77.27	-	
G4S	C ₅	-	-	-	-	
G4S	C ₅	-	<u>77.29* (nr)</u>	77.27	-	
G4S _{nr}	C ₅	77.21	-	77.27	-	
G4S _{ra}	C ₆	64.01	64.00	63.98	64.01	63.48
G4S _{rβ}	C ₆	63.91	63.90	63.89	63.92	
G4S	C ₆	63.70	63.74	63.71	63.76	
G4S	C ₆	-	-	-	63.71	
G4S	C ₆	-	<u>63.74 (nr)</u>	63.71	63.76	
G4S _{nr}	C ₆	63.70	-	63.71	-	
DAr _{ra} ⁺	C ₁	97.12	97.14	97.12	97.16	100.26
DAr _{rβ} ⁺	C ₁	97.02	97.04	97.02	97.07	
D6S	C ₁	-	<u>100.52</u>	<u>100.35</u>	<u>100.26</u>	
D6S	C ₁	-	-	-	<u>100.05</u>	
DA	C ₁	97.12	-	97.12	-	
DA2S _{nr}	C ₁	97.12	97.23	97.22	97.24	
DAr _{ra} ⁺	C ₂	72.16	72.12	72.43	-	70.70
DAr _{rβ} ⁺	C ₂	72.06	72.02	72.05	-	
D6S	C ₂	-	<u>72.14</u>	<u>72.13</u>	-	
D6S	C ₂	-	-	-	-	
DA	C ₂	72.06	-	72.05	-	
DA2S _{nr}	C ₂	72.00	72.02	71.99	-	
DAr _{ra} ⁺	C ₃	81.62	81.62	81.64	81.65	72.80
DAr _{rβ} ⁺	C ₃	81.62	81.62	81.64	81.65	
D6S	C ₃	-	<u>72.85</u>	<u>72.82</u>	<u>72.86</u>	
D6S	C ₃	-	-	-	<u>72.86</u>	
DA	C ₃	81.62	-	81.64	-	
DA2S _{nr}	C ₃	83.32	83.33	83.35	83.34	
DAr _{ra} ⁺	C ₄	80.87	80.83	80.85	-	81.40
DAr _{rβ} ⁺	C ₄	80.87	80.83	80.85	-	
D6S	C ₄	-	<u>82.19</u>	<u>82.07</u>	<u>82.01</u>	
D6S	C ₄	-	-	-	<u>82.15</u>	
DA	C ₄	80.92	-	80.85	-	
DA2S _{nr}	C ₄	72.49	72.52	72.50	72.53	
DAr _{ra} ⁺	C ₅	79.09	79.12	79.12	79.15	70.50
DAr _{rβ} ⁺	C ₅	79.09	79.12	79.12	79.15	
D6S	C ₅	-	<u>71.28</u>	<u>71.32</u>	<u>71.36</u>	
D6S	C ₅	-	-	-	<u>71.40</u>	
DA	C ₅	79.09	-	79.12	-	
DA2S _{nr}	C ₅	79.85	79.87	79.91	79.90	
DAr _{ra} ⁺	C ₆	71.80	71.85	-	-	69.89
DAr _{rβ} ⁺	C ₆	71.80	71.85	-	-	
D6S	C ₆	-	<u>69.89</u>	<u>70.04</u>	<u>70.13</u>	
D6S	C ₆	-	-	-	<u>70.13</u>	
DA	C ₆	71.80	-	-	-	
DA2S _{nr}	C ₆	71.51	71.50	71.53	71.53	

Tableau 23 : Déplacements chimiques des carbones des oligo- κ/μ -carraghénanes à 25 °C.

Les valeurs publiées pour le μ -carraghénane sont indiquées (van de Velde *et al.*, 2004). Les valeurs soulignées sont caractéristiques des motifs mu.

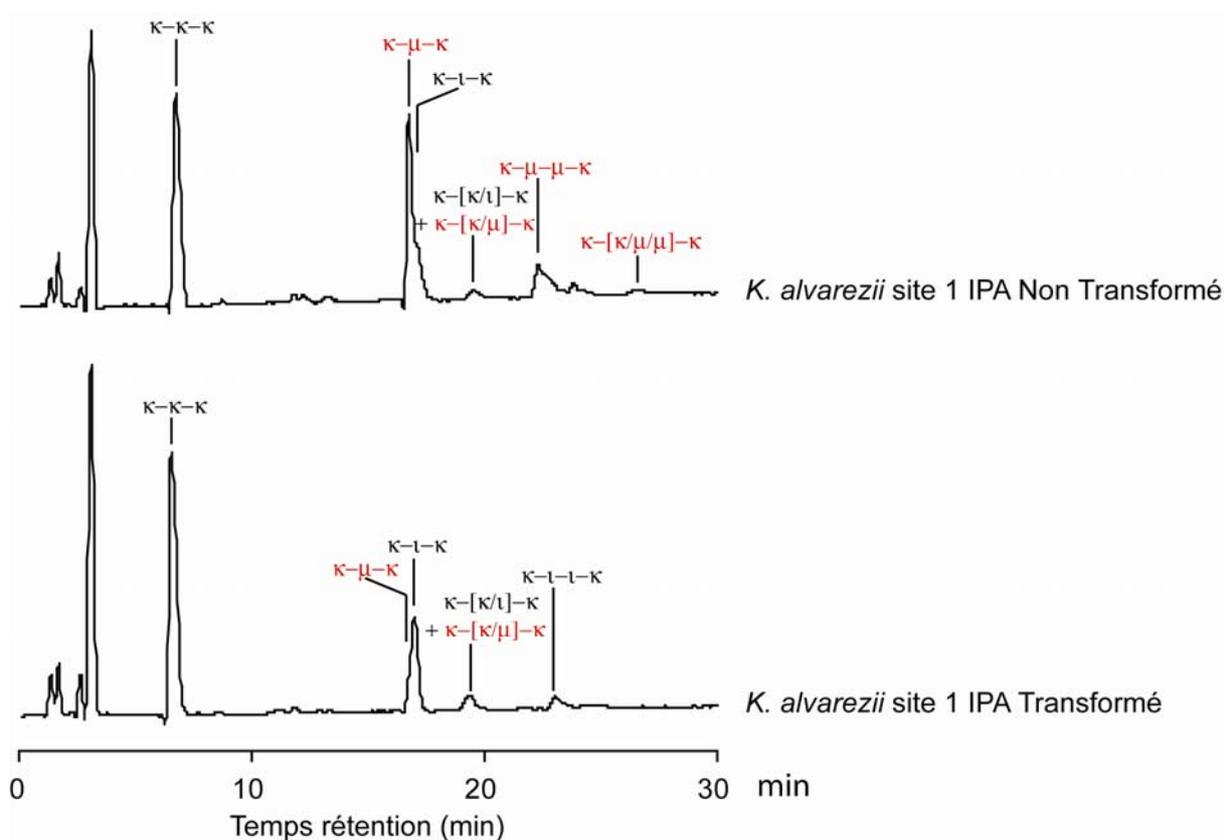


Figure 83 : Chromatogrammes LC-ESI-MS des hydrolysats des κ -carraghénanes de *K. alvarezii* sur une colonne Altima C₁₈ en mode d'ionisation négative.

	ESI-MS Mode d'ionisation négative	m/z	LC-ESI-MS Mode d'ionisation négative	m/z
κ - μ - κ	$[(DA-G4S)_2(D6S-G4S)-4H]^+$	317.7	$[(DA-G4S)_2(D6S-G4S)+(C_7H_{15}NH^+)_2]^{2-}$	751.5
κ - $[\kappa/\mu]$ - κ	$[(DA-G4S)_3(D6S-G4S)-5H]^5-$	331.5	$[(DA-G4S)_3(D6S-G4S)+(C_7H_{15}NH^+)_3]^{2-}$	1002.3
κ - $[\mu/\mu]$ - κ	$[(DA-G4S)_2(D6S-G4S)_2-6H]^6-$	292.4	$[(DA-G4S)_2(D6S-G4S)_2+(C_7H_{15}NH^+)_4]^{2-}$	1108.8
κ - $[\kappa/\mu/\mu]$ - κ	$[(DA-G4S)_3(D6S-G4S)_2-7H]^7-$	305.6	$[(DA-G4S)_3(D6S-G4S)_2+(C_7H_{15}NH^+)_5]^{2-}$	1359.5

Tableau 24 : Ions majoritaires des oligo- κ/μ -carraghénanes obtenus par ESI en mode d'ionisation négative et ions obtenus après la LC-ESI-MS sur colonne Altima C₁₈ et appariement avec les molécules d'heptilamide.

C. Caractérisation des oligo- κ/μ -carraghénanes par LC-MS.

Ces oligo- κ/μ -carraghénanes ont aussi été analysés par un couplage LC-ESI-MS. Les oligo-carraghénanes ont été séparés sur colonne Alltima C18 après appariement avec des molécules d'heptilamide (**Figure 83**). Les oligosaccharides ont ensuite été analysés par ESI-MS et les masses obtenues (**Tableau 24**) ont confirmé le nombre de motifs kappa et mu composant les structures $\kappa-\mu-\kappa$, $\kappa-[\kappa/\mu]-\kappa$, $\kappa-\mu-\mu-\kappa$ et $\kappa-[\kappa/\mu/\mu]-\kappa$ identifiées par RMN. La séparation des oligo- κ/μ -carraghénanes et des oligo- κ/ι -carraghénanes, de degré de polymérisation et de charge identique (ex : $\kappa-\mu-\kappa$ et $\kappa-\iota-\kappa$), n'a pu être réalisée sur ce type de colonne C₁₈. Les oligo- κ/μ -carraghénanes purifiés ont aussi été analysés par injection directe, leur densité de charge n'étant pas trop élevée, ils ont été peu fractionnés lors de l'ionisation (**Tableau 24**).

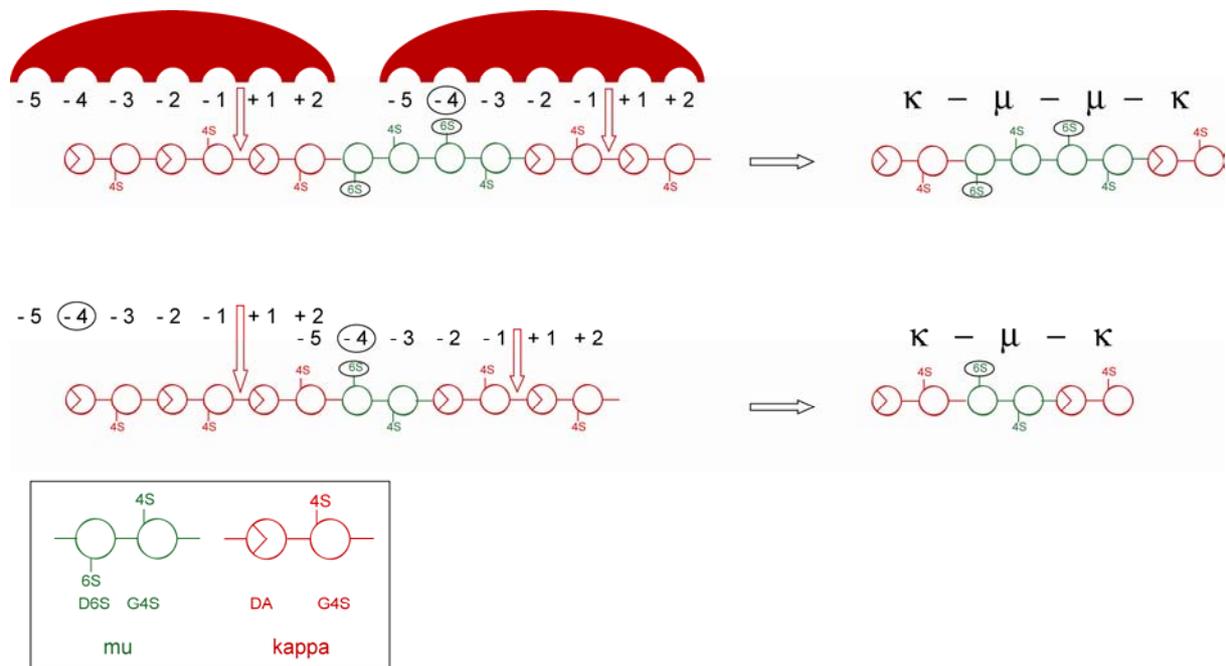


Figure 84 : Positionnement des motifs mu dans le site actif de la κ -carraghénase. Visualisation des sites de coupe de l'enzyme.

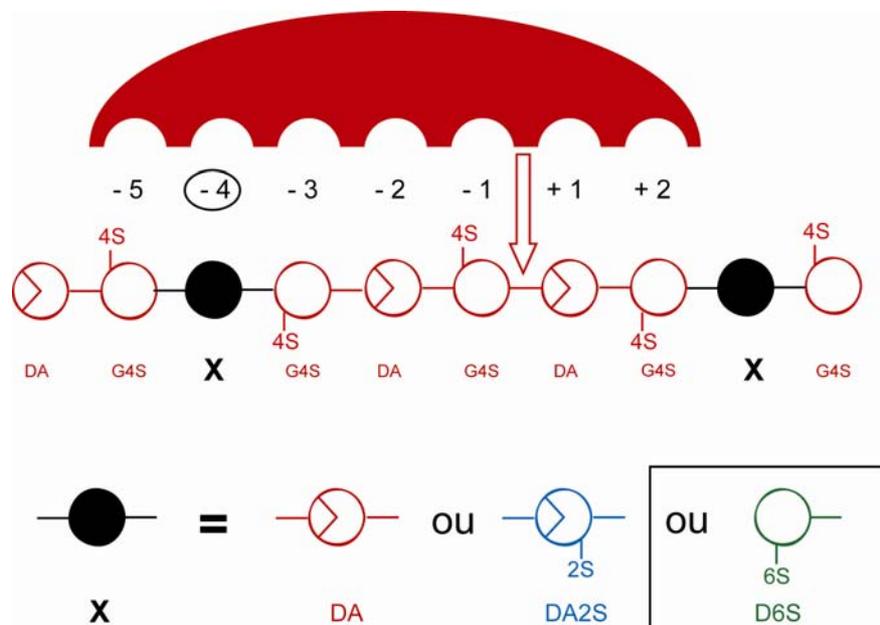


Figure 85 : Données obtenues sur la spécificité du site actif de la κ -carraghénase.

DISCUSSION

I. Données sur la spécificité du site actif de la κ -carraghénase.

Cette étude a permis de démontrer que la κ -carraghénase était capable d'hydrolyser des structures κ -carraghénanes comportant minoritairement des motifs iota et des motifs mu. La caractérisation d'oligo- κ/μ -carraghénanes parmi les produits d'hydrolyse de la κ -carraghénase, démontre que la κ -carraghénase peut accepter les unités D6S des motifs mu dans un des sept sous-sites (-5, -4, -3, -2, -1, +1, +2) de son site actif.

La détermination de la structure de certains de ces oligo- κ/μ -carraghénanes a permis d'obtenir des informations sur la spécificité du site actif de l'enzyme. Comme les oligo- κ/ι -carraghénanes, les oligo- κ/μ -carraghénanes possèdent des motifs kappa (DA-G4S) à leurs extrémités réductrice et non-réductrice. Ce qui signifie que l'hydrolyse s'effectue toujours par la coupure d'une liaison β -(1 \rightarrow 4) entre deux motifs kappa carrabioses placés dans les sous-sites (-2, -1) et (+1, +2) de la κ -carraghénase (**Figure 84 et 85**).

Les quatre produits d'hydrolyse identifiés κ - μ - κ , κ - μ - μ - κ , κ - $[\kappa/\mu]$ - κ et κ - $[\kappa/\mu/\mu]$ - κ ont des structures similaires aux oligo- κ/ι -carraghénanes identifiés au chapitre II. La κ -carraghénase adopte donc le même mode de coupure pour des structures κ/ι et κ/μ . L'obtention d'oligo- κ/μ -carraghénanes de structures κ - μ - κ et κ - μ - μ - κ prouve que les unités D6S des motifs mu pourraient se positionner dans le sous-site -4 du site actif, lorsque la coupure s'effectue du côté réducteur, et en position +3, donc hors du site actif, lors de la coupure du côté non réducteur (**Figure 84 et 85**). Ceci implique donc une flexibilité autour du sous-site -4 de la κ -carraghénase. En effet le remplacement d'une unité DA par une unité D6S, implique qu'il y ait assez de place pour un groupement sulfate en C6 dans l'environnement hydrophobe de ce sous-site, ainsi qu'une adaptation aux changements de positions des groupements qu'entraîne un changement de conformation de 1C_4 en 4C_1 .

La séquence des motifs kappa et mu dans l'oligosaccharide κ - $[\kappa/\mu]$ - κ n'a pu être déterminée, mais la structure κ - κ - μ - κ serait plus probable comme produit limite d'hydrolyse que la structure κ - μ - κ - κ . En effet l'oligosaccharide κ - μ - κ - κ devrait pouvoir être facilement hydrolysable en κ - μ - κ et κ , en se plaçant dans les sous-sites -5 à +2 de l'enzyme (**Figure 85**). Quant à l'oligosaccharide κ - κ - μ - κ , il serait plus difficilement

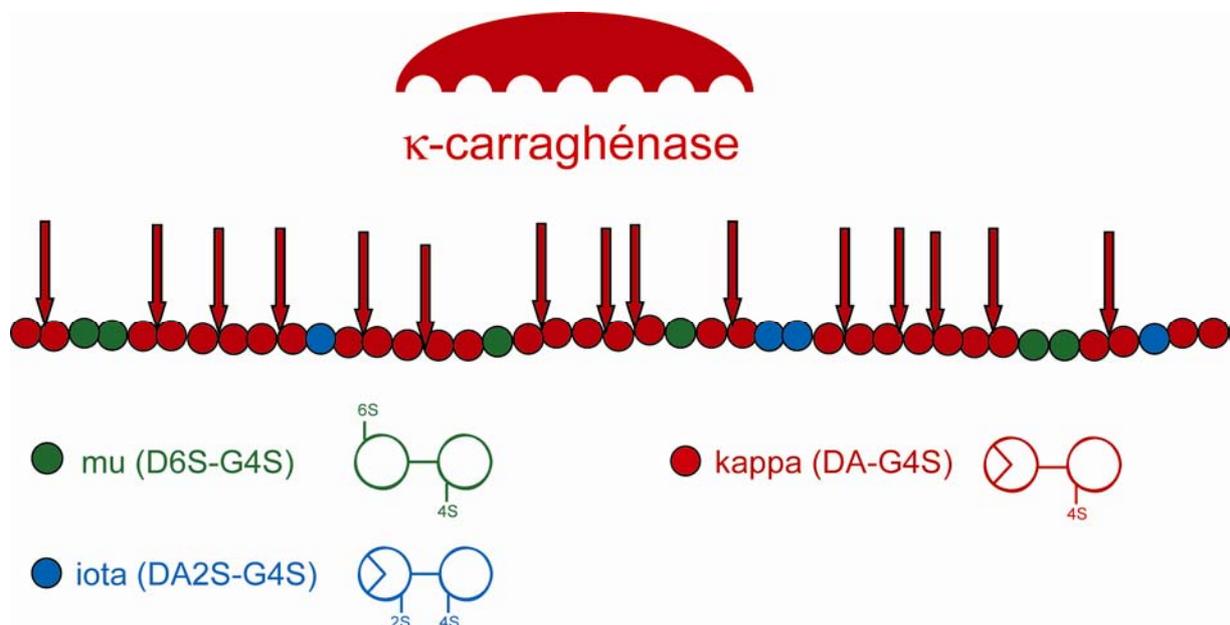


Figure 86 : Structure probable des κ/μ -carraghénanes avec une dispersion des motifs mu dans la chaîne majoritaire κ -carraghénane.

Les sites de coupures probables de la κ -carraghénase sont visualisés.

hydrolysable, car son interaction avec l'enzyme serait plus faible. En effet, il occuperait uniquement les sous-sites -2 à +2 de l'enzyme et son unité D6S en position +3 pourrait occasionner des gênes stériques et électrostatiques.

II. Les motifs précurseurs mu sont dispersés aléatoirement dans la chaîne de κ -carraghénane.

Les κ -carraghénanes extraits des algues *K. alvarezii* 1 et 2 non transformés ont été hydrolysés, à environ 95%, par la κ -carraghénase, et majoritairement en oligo- κ -carraghénanes. La présence minoritaire d'oligo- κ/μ -carraghénanes et d'oligo- κ/ι -carraghénanes parmi les produits d'hydrolyse est révélatrice de la structure hétérogène de ces κ -carraghénanes. La structure de ces oligosaccharides hybrides ($\kappa-\mu-\kappa/\kappa-\iota-\kappa$, $\kappa-\mu-\mu-\kappa/\kappa-\iota-\iota-\kappa$) traduit une dispersion des motifs mu et iota, selon un ou deux motifs consécutifs, le long des chaînes de κ -carraghénanes (**Figure 86**). Des blocs de motifs mu semblent absents des chaînes de carraghénanes, ou peut-être à un taux peu élevé qui n'a pu être détecté avec la faible résolution des spectres $^1\text{H-RMN}$ de la fraction résistante.

Bien que possédant des profils RMN similaires, les carraghénanes de la paroi des algues *K. alvarezii* des sites de culture 1 et 2 semblent avoir des structures différentes. En effet, les carraghénanes extraits sans transformation des algues du site 2, montrent des profils d'hydrolyse plus complexes que ceux extraits des algues du site 1. Ces résultats seraient révélateurs de la présence d'un plus grand nombre de motifs mu dans la structure des κ -carraghénanes des algues du site 2. Il est possible que la structure de la paroi, et donc ses propriétés, soient modifiées par les enzymes de l'algue suivant les contraintes de leur environnement (ex : force du courant, illumination, nutriment).

Cette distribution aléatoire de motifs mu dans les chaînes kappa serait la conséquence probable d'une transformation partielle, par les galactose-6-sulfurylases, de chaînes de motifs mu en motifs kappa, lors de la biosynthèse de la paroi. Ces enzymes pourraient agir suivant un mode endo strict ou suivant un mode endo-processif le long des chaînes de motifs mu. Une modulation du taux de précurseurs dans la paroi pourrait s'effectuer lors de la biosynthèse par une expression plus ou moins importante de galactose-6-sulfurylases.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Une étude structurale par hydrolyse enzymatique a été réalisée par action de la κ -carraghénase sur des κ -carraghénanes extraits de l'algue *K. alvarezii* sans transformation alcaline. Ces résultats sont les premières données qui permettent de comprendre la localisation des motifs précurseurs dans les chaînes de carraghénanes. Les motifs précurseurs μ seraient dispersés aléatoirement dans la chaîne de κ -carraghénane et cette distribution serait variable suivant l'origine de l'algue. Mais ces différences de structure peuvent être « gommées » par la transformation alcaline lors du procédé d'extraction. Le degré de transformation du carraghénane peut d'ailleurs être mesuré après hydrolyse enzymatique par la détection ou non d'oligo- κ/μ -carraghénanes parmi les produits d'hydrolyse. Les modes de précipitation employés (KCl ou isopropanol) ont été comparés et il semblerait qu'ils n'aient que peu d'influence sur la structure du carraghénane.

La détermination des déplacements chimiques protons du μ -carraghénane a été pour la première fois réalisée. Les caractérisations par ^{13}C -RMN des structures minoritaires, comme les μ et ν -carraghénanes, avaient été jusqu'ici effectuées sur des polymères. Il était alors admis que les valeurs obtenues correspondaient à celles de motifs μ carrabioses entourés d'autres motifs μ . Or il semblerait que ces valeurs soient celles de motifs μ carrabioses entourés de motifs kappa carrabioses, puisque la présence de blocs μ n'a pas été détectée.

La caractérisation de certains oligo- κ/μ -carraghénanes par RMN n'a pu être totalement réalisée, la quantité purifiée étant insuffisante. Cette étude serait donc à poursuivre pour obtenir des données RMN complètes, et l'utilisation de la nouvelle cryosonde TCI $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ devrait permettre d'obtenir des meilleures résolutions de spectres. Des expériences de fragmentation en mode positif en MALDI-TOF (Antonopoulos *et al.*, 2004a) pourraient à l'avenir, en complément de la RMN, déterminer la séquence des unités μ et kappa au sein des oligo- κ/μ -carraghénanes.

Chapitre IV :

Conclusions et perspectives

	κ -carraghénase	ι -carraghénase	λ -carraghénase
Bactérie	<i>P. carrageenovora</i>	<i>A. fortis</i>	<i>P. carrageenovora</i>
séquençage	oui	oui	oui
Surexpression	oui	oui	faible
Famille GH	16	82	Nouvelle famille 108?
Liaison coupée	β -(1 \rightarrow 4)	β -(1 \rightarrow 4)	β-(1\rightarrow4)
Mécanisme	Rétention	Inversion	Inversion
Mode d'action	Endo-processif	Endo-processif	Endo
Produits limites	Néo- κ -carrabiose	Néo- ι -carratétraose	Néo-λ-carrabiose
	Néo- κ -carratétraose	Néo- ι -carrahexaose	Néo-λ-carratétraose
Site actif	6 ou 7 sous-sites	8 sous-sites	8 sous-sites
	-5,-4,-3,-2,-1,+1,+2	-4,-3,-2,-1,+1,+2,+1,+2	-4,-3-2,-1,+1,+2,+3,+4
Flexibilité du site actif	DA2S en -4 D6S en -4 DA en +2 (Knutsen)		G2S,4S en -3

Tableau 25 : Bilan des connaissances sur les carraghénases nécessaires à leur utilisation comme outils d'analyse structurale des carraghénanes.

Les parties grisées représentent l'apport des données obtenues au cours de cette thèse.

Chapitre IV : Conclusions et perspectives

I. Les carraghénases

L'utilisation des carraghénases comme outils d'analyse structurale des carraghénanes a permis d'approfondir les connaissances sur les carraghénanes mais également sur les enzymes. Les caractéristiques principales de la λ -carraghénase qui étaient peu définies sont désormais connues (**Tableau 25**). La caractérisation des produits limites d'hydrolyse de l'enzyme comme appartenant à la série néo- λ -carrabiose, a démontré que la λ -carraghénase, comme les κ - et ι -carraghénases, coupait les liaisons β -(1 \rightarrow 4) des carraghénanes. Les suivis cinétiques d'hydrolyse ont révélé que la λ -carraghénase agissait selon un mode d'action endo et par un mécanisme d'inversion de configuration anomérique. L'étude de l'hydrolyse des oligo- λ -carraghénanes a montré que la λ -carraghénase possédait 8 sous-sites dans son site actif et que le substrat minimum pour une fixation productive était le néo- λ -carrahexaose.

L'action des κ -, ι - et λ -carraghénases sur des substrats de structures hétérogènes a conduit à la formation d'oligo-carraghénanes hybrides. L'analyse de la structure de ces oligosaccharides a permis d'affiner la caractérisation des sous-sites de ces enzymes.

La caractérisation d'un tétrasaccharide de structure D2S,6S-G2S,4S-D2S,6S-G2S parmi les produits d'hydrolyse du λ -carraghénane de *G. skottsbergii* a démontré qu'un motif G2S,4S pouvait se positionner dans le sous-site -3 du site actif de la λ -carraghénase. L'hydrolyse par la λ -carraghénase de carraghénanes contenant des motifs ξ , π ou θ (Greer, 1984), et la caractérisation des produits d'hydrolyse obtenus, pourraient apporter de nouvelles données sur la spécificité de son site actif.

La caractérisation de structures particulières d'oligo- κ / ι -carraghénanes et oligo- κ / μ -carraghénanes parmi les produits d'hydrolyse de la κ -carraghénase a montré que l'enzyme pouvait accepter dans son sous-site -4 des unités DA, DA2S ou D6S, ce qui suppose une certaine flexibilité de ce sous-site. Knutsen avait aussi avancé (Knutsen *et al.*, 1992a), par l'analyse d'oligo- κ / β -carraghénanes que cette κ -carraghénase pourrait accepter les unités G des motifs beta dans son site actif en position +2 (**Figure 87**).

Des données sur la spécificité de la ι -carraghénase d'*A. fortis* pourraient être

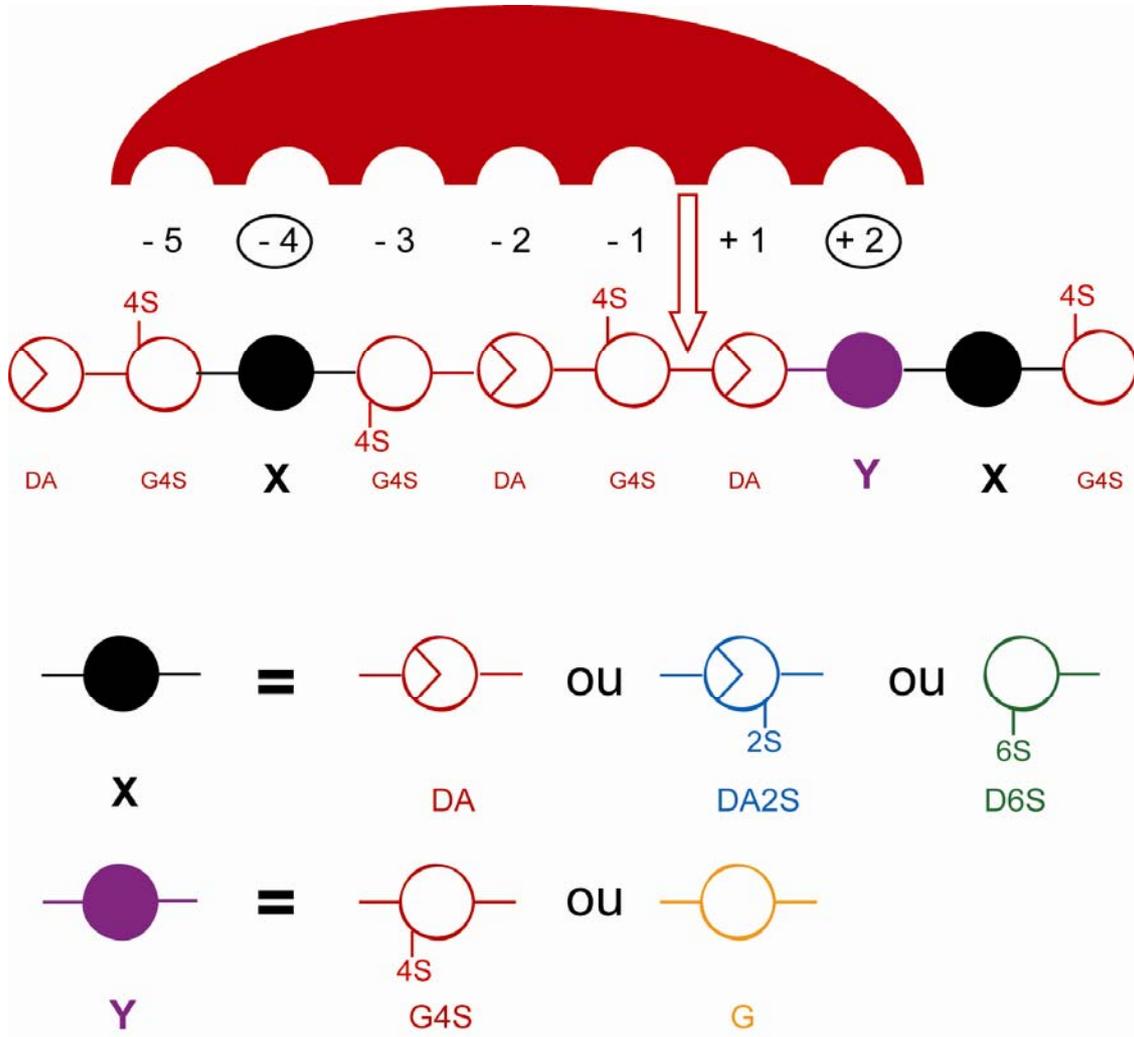


Figure 87 : Bilan des connaissances obtenues sur la spécificité du site actif de la κ -carraghénase.

obtenues prochainement car il a été montré récemment au laboratoire (Master2 de R. Plassard) que la ι -carraghénase hydrolysait en oligo- ι/ν -carraghénanes des ι -carraghénanes extraits, sans transformation, de *E. denticulatum*. La caractérisation de ces oligo- ι/ν -carraghénanes devrait permettre de connaître le placement des unités D2S,6S dans les sous-sites de la ι -carraghénase.

Afin d'obtenir plus d'informations sur le positionnement et les interactions de ces oligo-carraghénanes hybrides dans les sous-sites de ces enzymes, des expériences de co-cristallisation ont été tentées. Aucun cristal exploitable n'a été pour l'instant obtenu par co-cristallisations de la κ -carraghénase avec les oligo- κ/ι -carraghénanes et oligo- κ/μ -carraghénanes, mais ces expériences seront poursuivies (Collaboration équipe M. Czjzek). Aucune structure de la λ -carraghénase n'a été obtenue jusqu'ici mais la surexpression de la λ -carraghénase pourrait permettre sa purification en quantité suffisante pour obtenir des cristaux. Des expériences de co-cristallisation de la λ -carraghénase avec les oligo- λ -carraghénanes idéaux purifiés pourraient peut-être favoriser l'obtention de cristaux de λ -carraghénase.

Actuellement seules trois carraghénases, les κ -, ι - et λ -carraghénases ont été identifiées et caractérisées. Plusieurs κ - et ι -carraghénases, avec des fixations productives variables, ont déjà été caractérisées chez différentes bactéries. Le séquençage de ces trois carraghénases devrait faciliter la découverte, par des homologies de séquence, de nouvelles κ -, ι - et λ -carraghénases avec potentiellement des spécificités de substrats différentes. Il existe actuellement un décalage entre le nombre de carraghénases caractérisées et le nombre de structures différentes de carraghénanes déjà répertoriées. La présence, par exemple, de β -, α -, ω -, π -, θ , ξ -, μ -carraghénases parmi les enzymes des bactéries carraghénolytiques est très probable, il reste maintenant à les identifier. L'outil enzymatique que sont les carraghénases, pourrait donc être à l'avenir assez varié, avec des carraghénases possédant des sites actifs de spécificités différentes. Elles pourraient être utilisées comme outils d'analyse structurale sur plusieurs autres carraghénanes hybrides de type κ/β , ι/ν , λ/θ , α/β , ...

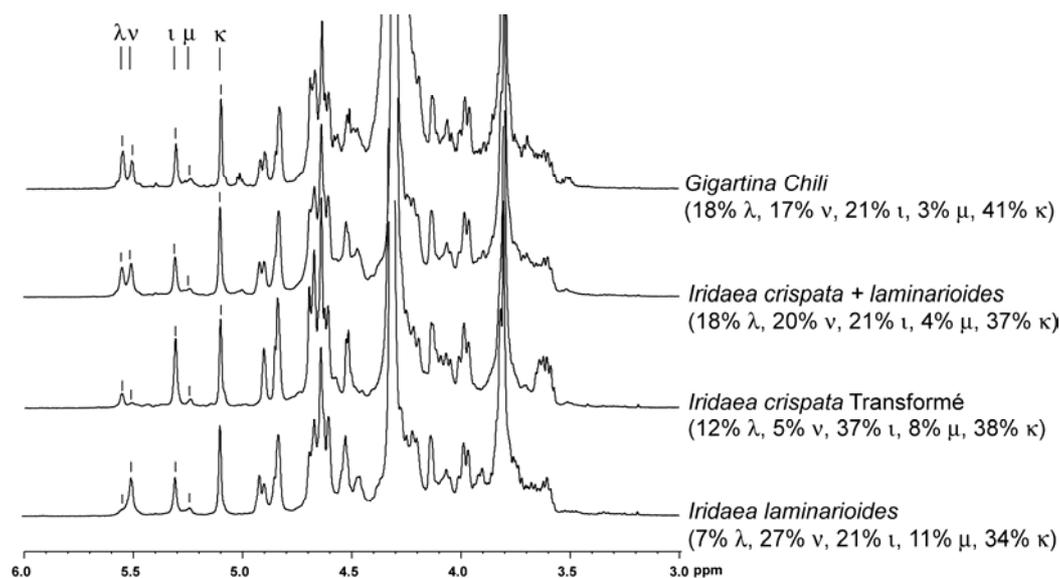


Figure 88 : Spectres $^1\text{H-RMN}$ à 70 °C de carraghénanes extraits de différentes espèces de Gigartinaceae.

Les signaux correspondant aux protons anomériques des unités D2S,6S des motifs lambda et nu, de l'unité DA2S du motif iota, de l'unité D6S du motif mu, et de l'unité DA du motif kappa, sont indiqués sur les spectres. La proportion de chacun de ces motifs a été calculée par intégration de ces signaux.

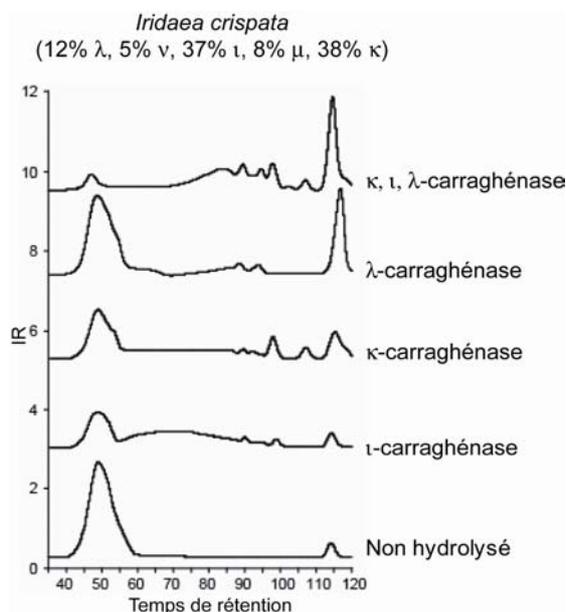


Figure 89 : Analyse par chromatographie d'exclusion de taille des hydrolysats obtenus par hydrolyse du carraghénane extrait de *I. crispata* avec chacune des carraghénases séparément et successivement.

II. Hydrolyse enzymatique de carraghénanes de structures complexes.

Notre étude a confirmé que les carraghénanes extraits des parois des algues ont des structures hétérogènes, avec une répartition variable de différents motifs de carraghénanes dans une même chaîne. Dans le cas des Gigartinaceae, les structures hétérogènes ont été démontrées pour le λ -carraghénane, extrait de la forme tétrasporophyte de *G. skottsbergii*, et pour les κ/ι -carraghénanes, extraits des formes gamétophytes de plusieurs espèces. Le caractère hybride κ/μ des κ -carraghénanes extraits de *K. alvarezii* (Soleriaceae) est aussi désormais caractérisé.

Mais les extraits industriels de carraghénanes sont encore plus complexes car ce sont le plus souvent des mélanges de différentes algues qui possèdent chacune des structures hétérogènes. C'est ainsi, par exemple, que l'extraction des carraghénanes des Gigartinaceae conduit souvent à une extraction conjointe des carraghénanes contenus dans les parois des gamétophytiques (κ , ι) et des tétrasporophytes (λ). Les spectres ^1H -RMN de carraghénanes extraits des algues *Gigartina* (Chili), *Iridaea crispata*, *Iridaea laminarioides* et d'un mélange de *Iridaea crispata* et *laminarioides* donne une bonne vision de cette complexité (**Figure 88**). Tous les spectres ^1H -RMN montrent la présence à la fois de λ -carraghénane et de κ - et ι -carraghénanes. La présence des motifs précurseurs μ et ν est aussi discernable sur tous les spectres, et la teneur en motif ν est particulièrement importante (20-30%), excepté pour le carraghénane extrait de *Iridaea crispata* qui a subi un traitement alcalin lors de son extraction.

L'utilisation conjointe des trois carraghénases sur ces extraits complexes de carraghénanes devrait permettre de pouvoir analyser leur structure, c'est à dire leur composition mais aussi la distribution des différents motifs. L'action individuelle de chacune de ces carraghénases ne conduit qu'à une hydrolyse partielle du substrat, comme illustré par l'exemple de l'hydrolyse du carraghénane extrait de *I. crispata* (**Figure 89**). Mais après l'action des trois carraghénases, la fraction résistante restante est très faible et l'ordre d'utilisation des κ -, ι - et λ -carraghénases n'influe pas sur les profils d'hydrolyse obtenus. L'action de ces trois enzymes serait donc suffisante pour obtenir la caractérisation totale de ce carraghénane complexe extrait de *I. crispata* par l'analyse des produits d'hydrolyse présents sur les différents profils.

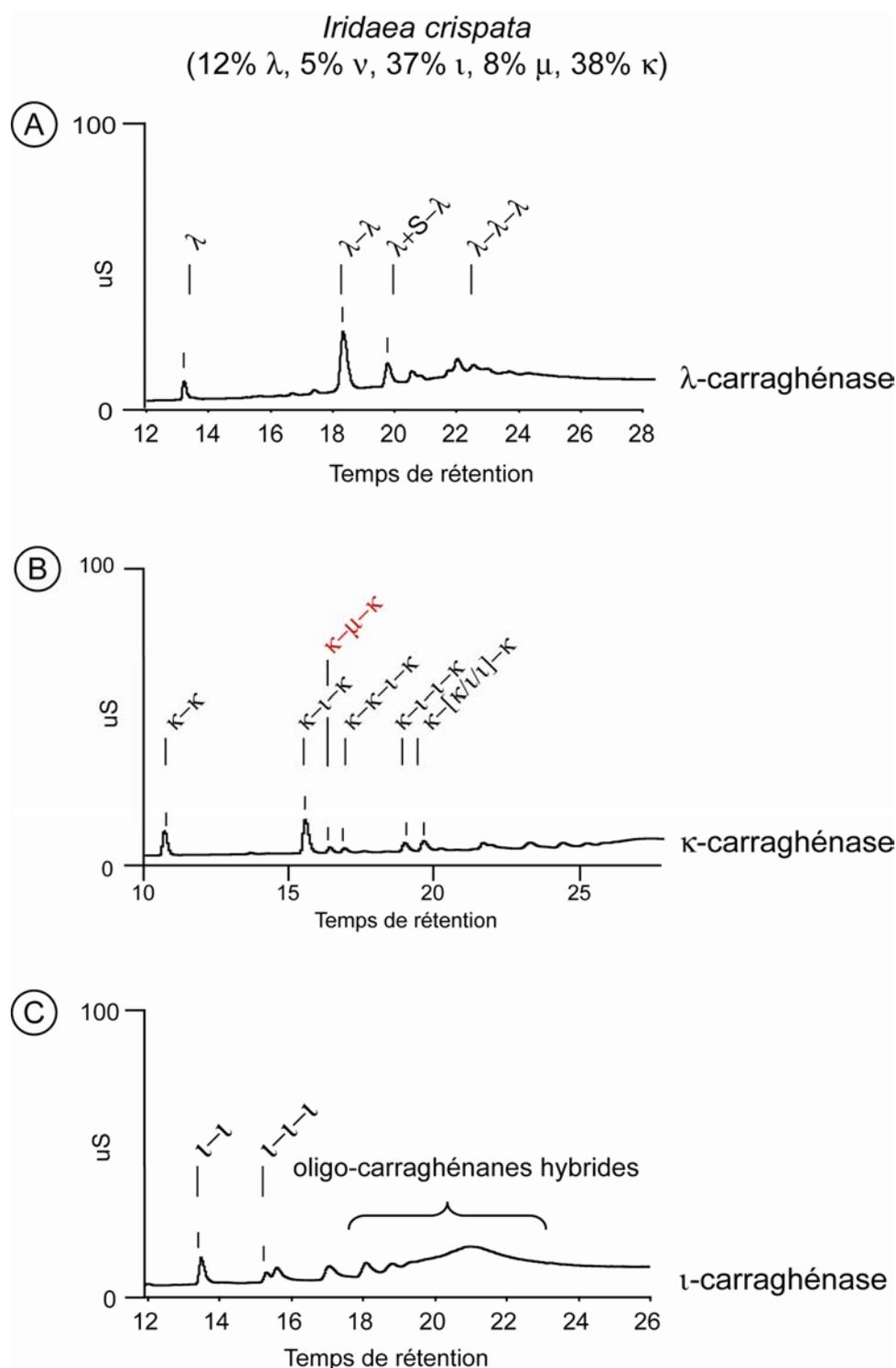


Figure 90 : Analyse par HPAEC sur colonnes AS11 des produits des hydrolyses du carraghénane extrait de *I. crispata* par (A) la λ -carraghénase, (B) la ι -carraghénase et (C) la κ -carraghénase.

Les pics ont été assignés par comparaison aux profils obtenus dans les chapitres précédents

L'action de la λ -carraghénase sur l'extrait de *I. crispata* a conduit à la formation d'oligo- λ -carraghénanes (DP2 et DP4) mais aussi du tétrasaccharide hybride DA-G2S,4S-DA-G4S (**Figure 90A**). La structure lambda de l'extrait proviendrait du tétrasporophyte de cette algue qui aurait donc une structure lambda avec une dispersion aléatoire de motifs G2S,4S. L'hydrolyse de l'extrait de *I. crispata* par la κ -carraghénase a montré la présence d'oligo- κ -carraghénanes, mais aussi d'oligo- κ/ι -carraghénanes et d'oligo- κ/μ -carraghénanes parmi les produits d'hydrolyse (**Figure 90B**). La paroi des gamétophytes de cette algue serait donc composée d'une structure kappa majoritaire avec une dispersion aléatoire de motifs iota et mu. L'hydrolyse par la ι -carraghénase de l'extrait de *I. crispata* a conduit à la formation d'oligo- ι -carraghénanes mais en faible quantité (**Figure 90C**). Le nombre d'oligosaccharides de tailles intermédiaires formés est significatif. Il pourrait s'agir d'oligo- ι/ν -carraghénanes, des taux de motifs nu de 5% et de motifs iota de 37% ayant été analysés par $^1\text{H-RMN}$. Mais il pourrait aussi s'agir d'oligo- κ/ι -carraghénanes ; les taux de motifs kappa et de motifs iota étant équivalents dans ce substrat, l'hydrolyse par la ι -carraghénase serait facilitée.

L'utilisation des carraghénases pourrait donc permettre, par une analyse des produits d'hydrolyse par chaque enzyme, de déterminer la structure des carraghénanes des formes tétrasporophytes et gamétophytes d'une algue sans séparation préalable de celles-ci. Une analyse des fractions résistantes serait aussi nécessaire. Par exemple, dans le cas du carraghénane de *I. crispata*, l'absence de motifs lambda dans la fraction résistante à la λ -carraghénase confirmerait que le profil d'hydrolyse à la λ -carraghénase est bien représentatif des 12 % de motifs lambda détectés par $^1\text{H-RMN}$.

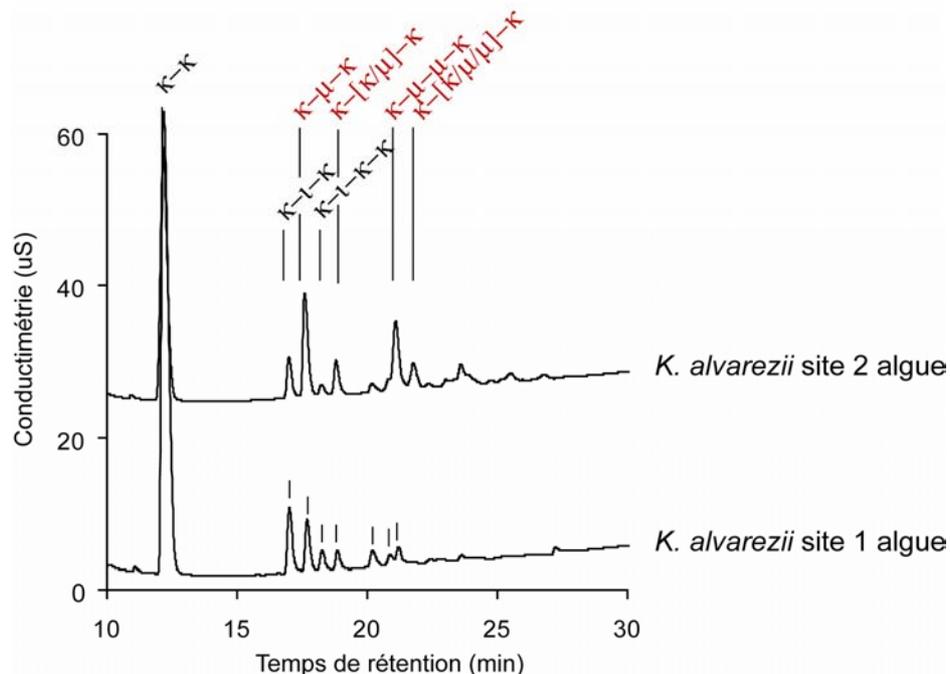


Figure 91 : Comparaison par analyse par HPAEC des produits d'hydrolyse obtenus par action de la κ -carraghénase directement sur la paroi des algues *K. alvarezii* des sites 1/2.

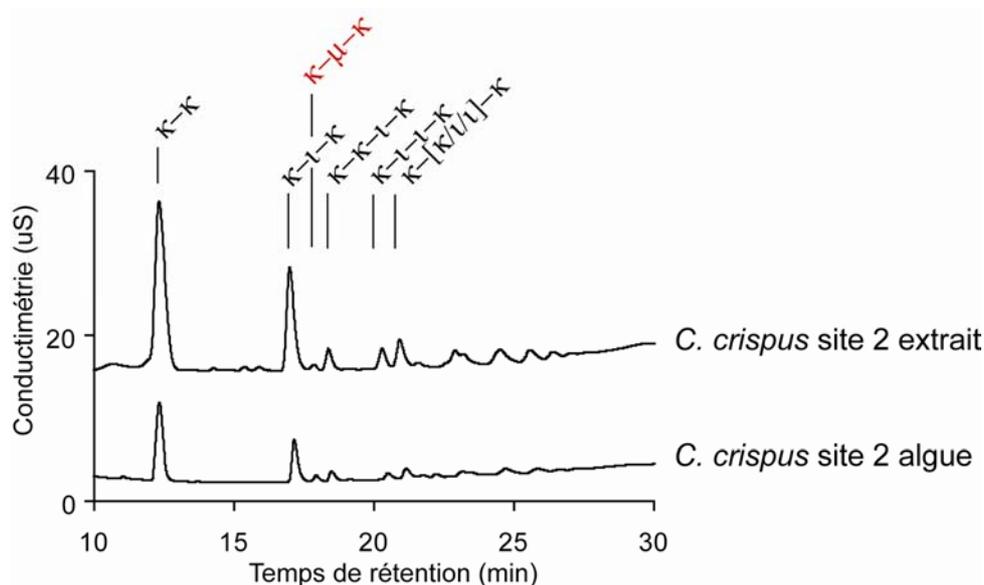


Figure 92 : Comparaison par analyse par HPAEC des produits d'hydrolyse obtenus par action de la κ -carraghénase sur le carraghénane extrait de *C. crispus* site 2 et directement sur la paroi de l'algue broyée.

III. Hydrolyse directe sur les algues

Il serait aussi possible d'utiliser les carraghénases directement sur l'algue et d'avoir des informations sur la composition et l'organisation de sa paroi sans procéder à une extraction préalable.

L'action de la κ -carraghénase directement sur la paroi de deux algues de l'espèce *K. alvarezii* a conduit à l'obtention majoritaire d'oligo- κ -carraghénanes et minoritaire d'oligo- κ/ι -carraghénanes et d'oligo- κ/μ -carraghénanes dans le milieu réactionnel (**Figure 91**). Les hydrolyses par les ι - et λ -carraghénases n'ont pas conduit à une formation mesurable d'oligo-carraghénanes. Ces analyses seraient représentatives de la composition en carraghénanes de la paroi, c'est-à-dire d'une composition kappa majoritaire avec une dispersion de motifs iota et de motifs précurseurs mu. Cette méthode d'hydrolyse directe sur les algues permettrait aussi de mettre en évidence des différences de taux de motifs mu dans les algues suivant leurs lieux de culture (sites 1 et 2), en mesurant la proportion relative d'oligo- κ/μ -carraghénanes parmi les produits d'hydrolyse (**Figure 91**).

L'analyse structurale des carraghénanes par hydrolyse enzymatique pourrait être menée indifféremment à partir de carraghénanes extraits d'une algue ou directement sur la paroi de l'algue elle-même. En effet, les produits de dégradation de l'algue *C. crispus* du site 2 par la κ -carraghénase sont identiques et dans des proportions similaires à ceux observés par dégradation du carraghénane extrait de cette algue (**Figure 92**). L'avantage d'utiliser l'hydrolyse enzymatique directement sur la paroi est d'obtenir des informations structurales sur le carraghénane réellement présent dans la paroi et qui n'a pas subi les divers procédés d'extraction industriels.

L'hydrolyse enzymatique sur les algues pourrait ainsi être utilisée pour découvrir de nouvelles algues carraghénophytes avec des structures particulières de carraghénanes. Un des avantages de ce type d'analyse est de nécessiter une faible quantité d'algues (environ 5 mg) et pouvoir donc être menée sur une algue individuellement. Des études statistiques de structure de paroi pourraient être ainsi menées sur des algues du même site de culture ou de sites différents. Cette technique peut aussi être exploitée pour connaître la composition en carraghénanes dans les différentes parties du thalle d'une algue, et ceci pour les formes gamétophytes et tétrasporophytes.

Conditions expérimentales

I. Purification des carraghénases

A. Purification de la λ -carraghénase

La bactérie marine *Pseudoalteromonas carrageenovora* a été obtenue de l'American Type Culture Collection (ATCC 43555). Afin d'induire la production de λ -carraghénase, la culture bactérienne a été réalisée dans un milieu W-Y modifié (5 x 1 L dans des erlens de 5 L) (Weigl *et al.*, 1966b; Johnston *et al.*, 1973) et en présence de λ -carraghénane extrait du tetrasporophyte de *G. skottsbergii* (X7055-CPKelco). L'incubation a été effectuée à 20 °C, avec une agitation de 250 rpm pendant 60 h (incubateur G-25 ; New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA).

Les opérations suivantes ont été effectuées à 4 °C. Les milieux de culture ont été centrifugés (9820 g, 30 min). Le surnageant recueilli a été concentré 5 fois, par ultrafiltration tangentielle (10 kDa, Système Pellicon, Millipore), avec un lavage final au tampon phosphate de sodium (tampon phosphate de sodium 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,7). Le rétentat a ensuite été fractionné par saturation à 30% en sulfate d'ammonium (16,4 g / 100 mL). Après une nuit, sous agitation lente, une centrifugation a été effectuée (23 700 g, 1 h). Le surnageant a alors été amené à 70% de saturation en sulfate d'ammonium (24,9 g / 100 mL). Après une nuit d'agitation, l'échantillon a été centrifugé (23 700 g, 45 min). Le culot obtenu a été remis en solution dans du tampon phosphate (tampon phosphate 20 mM, NaCl 1 M, 30% sulfate d'ammonium, pH 7,7), puis dialysé (pores 6-8000) contre ce tampon (2 fois 2 L pendant 10 h).

La λ -carraghénase a ensuite été chargée sur une colonne de Phényl Sépharose 6 Fast Flow (200 mL, Amersham) pré-équilibrée dans le même tampon phosphate que celui de la dialyse. L'élution a été réalisée par un gradient linéaire décroissant de sulfate d'ammonium (30-0%) sur 440 min à un débit de 1 mL/min. Les fractions contenant l'activité λ -carraghénase (dosage des sucres réducteurs) ont été éluées à 4,5% de sulfate d'ammonium (375 min). Les fractions actives et pures (gel SDS-PAGE) ont été réunies. La quantité totale d'enzyme purifiée a été mesurée par le dosage de Bradford (Biorad, Bradford, 1976) par référence à la BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma). L'enzyme a été conservée pendant

Conditions expérimentales

plusieurs mois sans perte notable d'activité, à 4 °C, dans le tampon d'éluion (tampon phosphate 20 mM, NaCl 1 M, 1% sulfate d'ammonium, pH 7,7). La présence d'une forte concentration en sel aiderait à la stabilité de la protéine au cours du temps (Greer, 1984).

L'activité enzymatique de la λ -carraghénase pure a été mesurée par dosage des extrémités réductrices. Une unité d'activité enzymatique a été définie comme la quantité de λ -carraghénase (mg) nécessaire à la production d'une μ mole de néo- λ -carratétraose par minute de réaction, durant les 30 premières minutes de l'hydrolyse.

B. Purification des κ - et ι -carraghénases

La ι -carraghénase de la souche bactérienne *Alteromonas fortis* et la κ -carraghénase de la souche bactérienne *Pseudoalteromonas carrageenovora* ont été surexprimées dans une souche d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) selon les protocoles décrits par Michel *et al* (Michel *et al.*, 1999; Michel *et al.*, 2000). Des culots de 2 L de culture ont été repris dans un tampon A (Tris-HCl 10 mM, NaCl 500 mM, Imidazole 60 mM, pH 7,2), puis passés à la presse de French afin de lyser les cellules et de libérer les protéines périplasmiques. Le milieu a ensuite été centrifugé (22 100 g, 90 min). Le surnageant a été chargé à 1 mL/min (système Akta Prime) sur une colonne de Chelating Fast Flow Sepharose (10 mL, Pharmacia), saturée avec du NiSO₄ et pré-équilibrée dans le tampon A. Les carraghénases recombinantes possédant une séquence peptidique hexahistidine à leur extrémité C-terminale ont été retenues par la colonne lors du chargement et du lavage avec le tampon A. Les protéines non sélectives ont été décrochées par un lavage avec de l'imidazole 100 mM. L'éluion des carraghénases a ensuite été réalisée par un gradient linéaire d'imidazole (100-300 mM) à un débit de 1mL/min sur 60 min. Le début de l'éluion des deux carraghénases a été observé par UV vers 150 mM d'imidazole. Les fractions actives et pures (SDS-PAGE) ont été réunies et la quantité d'enzyme a été estimée par dosage de Bradford.

Après cette première purification, dans le cas où plusieurs bandes étaient toujours visibles sur gel SDS-PAGE, une seconde purification a été effectuée sur colonne MonoS HR 5/5 (Amersham), échangeuse de cations, pré-équilibrée dans un tampon HEPES 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5. Avant d'être chargée sur la colonne, l'enzyme a été dialysée (pores 6-8000) contre le tampon HEPES (2 fois 3 L pendant 15 h). L'éluion a été effectuée avec un gradient de NaCl (50 mM-1 M) avec un débit de 1 mL/min sur 60 min. La κ -carraghénase a été élue vers 150 mM NaCl et la ι -carraghénase vers 350 mM NaCl.

II. Sources des carraghénanes étudiés.

Les λ -carraghénanes ont été extraits des tétrasporophytes de *G. skottsbergii* (CP-Kelco, GENU® 7055) et des algues *G. acicularis* (Cargill Texturizing Solutions), *G. pistillata* (Dr M. Lahaye, INRA Nantes) et *C. crispus* (Cargill Texturizing Solutions).

Tous les autres carraghénanes sont des extraits industriels fournis par Cargill Texturizing Solutions, Baupré. Les extraits ont été réalisés sur des espèces d'algues récoltées à un moment précis de l'année, dans un site donné. Du ι -carraghénane a été extrait d'*E. denticulatum* ("spinosum") et du κ -carraghénane de *K. alvarezii* ("cottonii"). Des κ/ι -carraghénanes ont été extraits des algues sauvages *C. chamissoi* (anciennement *Gigartina*), *G. skottsbergii* et *C. crispus* (sites de culture 1 et 2, non définis pour des raisons de confidentialité). Ces carraghénanes ont subi un traitement alcalin et après filtration à chaud et sous pression, ils ont été précipités à l'isopropanol, excepté pour le κ -carraghénane extrait de *K. alvarezii* précipité au KCl. Des carraghénanes ont aussi été extraits des algues *Gigartina* (Chili), *I. crispata*, *I. laminarioides* et d'un mélange de *I. crispata* et *laminarioides*. Seul le carraghénane extrait de *Iridaea crispata* a subi un traitement alcalin.

A l'échelle pilote, des carraghénanes ont été extraits de *K. alvarezii* de deux sites de culture 1 et 2. Deux types d'extraction ont été réalisés par source de *K. alvarezii*, une extraction à chaud et une extraction à chaud en milieu alcalin. Deux types de précipitation par chlorure de potassium (KCl) ou Isopropanol (IPA) ont ensuite été réalisés pour chacun des 4 extraits.

Tous ces carraghénanes ont été dialysés contre de l'eau mQ (6-8 000 MWCO, Spectra/Por®) puis lyophilisés.

III. Conditions des hydrolyses enzymatiques.

A. Hydrolyse enzymatique des λ -carraghénanes.

Des solutions, à 0,5% (p/v), de λ -carraghénanes extraits des algues *G. acicularis*, *G. pistillata* et *C. crispus*, et des solutions à 0,5, 0,3 et 0,1% (p/v) du λ -carraghénane extrait de *G. skottsbergii* ont été préparées dans une solution de NaNO₃ 0,1 M à un pH de 7,5. Les

Conditions expérimentales

hydrolyses ont été réalisées à 30 °C par ajout de 0,71 µg de λ-carraghénase par mL de ces différentes solutions. Des prélèvements ont été réalisés à différents temps de l'hydrolyse du λ-carraghénane extrait de *G. skottsbergii*. Après 24 h d'hydrolyse, 0,35 µg de λ-carraghénase ont de nouveau été ajoutés à ces solutions. L'arrêt de l'hydrolyse a été réalisé à 48 h d'hydrolyse par inactivation de l'enzyme par chauffage des échantillons à 100 °C pendant 15 min.

Ces hydrolysats ont ensuite été analysés par chromatographies d'exclusion de taille (SEC) et d'échange d'anions (HPAEC). Les prélèvements de l'hydrolyse du λ-carraghénane de *G. skottsbergii* ont été analysés par HPSEC, C-PAGE et par dosage des extrémités réductrices.

Production d'oligo-λ-carraghénanes pour la purification

Une hydrolyse a été réalisée sur 200 mL de solution de λ-carraghénane de *G. skottsbergii* à 0,5% (p/v) dans les mêmes conditions. Après 5 h d'hydrolyse, la moitié du mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 min, afin de purifier les produits intermédiaires de l'hydrolyse. Sur les 100 mL restants, l'hydrolyse a été poursuivie jusqu'à 48 h avec un nouvel ajout d'enzyme pour obtenir les produits limites de l'hydrolyse. Les deux hydrolysats (5 h et 48 h) ont été concentrés à environ 4% (p/v) avant d'être purifiés par chromatographie d'exclusion de taille.

B. Hydrolyse enzymatique des κ-carraghénane et ι-carraghénane.

Production d'oligo-κ-carraghénanes pour la purification.

Une hydrolyse a été réalisée à 40 °C sur 100 mL de solution, à 0,5% (p/v), de κ-carraghénane extrait de *K. alvarezii* transformé du site 1 (IPA), dans du tampon Tris HCl 0,15 M, pH 8. Un ajout de 0,6 µg de κ-carraghénase par mL de cette solution a été effectué et l'hydrolyse a été arrêtée après 48 h d'hydrolyse. L'hydrolysats a été reconcentré par évaporation rotative à environ 2% (p/v) avant d'être purifié par chromatographie d'exclusion de taille.

Production d'oligo-ι-carraghénanes pour la purification.

Une hydrolyse a été réalisée à 40 °C sur 100 mL de solution, à 0,5% (p/v), de ι-carraghénane extrait d'*E. denticulatum* dans du tampon Tris HCl 0,15 M, pH 8. Un ajout de

0,6 µg de ι-carraghénase par mL de cette solution a été effectué et l'hydrolyse a été arrêtée après 48 h d'hydrolyse. L'hydrolysate a été reconcentré par évaporation rotative à environ 2% (p/v) avant d'être purifié par chromatographie d'exclusion de taille.

C. Hydrolyse enzymatique des κ/ι-carraghénanes.

Des solutions à 0,5% (p/v) de κ/ι-carraghénanes extraits des algues *C. crispus* (sites 1 et 2), *G. chamissoi* et *G. skottsbergii* ont été préparées avec une solution de NaNO₃ 0,1 M, à un pH de 7,5. Une autre solution, à 0,5% (p/v), d'un mélange 50/50 de κ-carraghénane extrait de *K. alvarezii* et de ι-carraghénane extrait d'*E. denticulatum*, a été aussi préparée. Ces solutions ont ensuite été hydrolysées à 40 °C par ajout d'environ 0,3 µg de κ-carraghénase et d'ajout séparé de 0,3 µg de ι-carraghénase, par mL de solution. Après 24 h d'hydrolyse, un nouvel ajout de 0,15 µg de chaque enzyme a été effectué dans chacune des hydrolyses, qui ont été stoppées après 48 h. Une fraction de l'hydrolysate à la κ-carraghénase a ensuite été hydrolysée pendant 24 h par 0,3 µg/mL de ι-carraghénase et réciproquement une fraction de l'hydrolysate à la ι-carraghénase a été hydrolysée par 0,3 µg/mL de κ-carraghénase.

Les hydrolysats obtenus ont ensuite été analysés par les systèmes HPSEC-MALLS et HPAEC.

Production d'oligo-κ/ι-carraghénanes pour la purification.

Une hydrolyse a été réalisée sur 200 mL de solution du κ/ι-carraghénane extrait de *G. skottsbergii* à 0,5% (p/v), dans les mêmes conditions. Les oligo-κ/ι-carraghénanes ont ensuite été séparés de la fraction résistante par ultrafiltration sous pression de N₂ à 1,0 kg/cm² sur une membrane 10 000 MWCO, par des lavages successifs à l'H₂O mQ. Le filtrat a ensuite été reconcentré par évaporation rotative à environ 2% (p/v) avant d'être purifié par chromatographie d'exclusion de taille.

D. Hydrolyse enzymatique des κ-carraghénanes extraits de *K. alvarezii*.

Les hydrolyses ont été effectuées à 40 °C par ajout d'environ 0,3 µg de κ-carraghénase par mL de solution des huit lots de κ-carraghénanes à 0,25% (p/v) dans du tampon Tris HCl

Conditions expérimentales

0,15 M, pH 8. Après 28 h d'hydrolyse, un nouvel ajout de 0,15 µg/mL de κ-carraghénase a été réalisé. Des prélèvements ont été réalisés à différents temps de l'hydrolyse (inactivation 100 °C) et ont été analysés par dosage des sucres réducteurs, HPSEC-MALLS et HPAEC.

Production d'oligo-κ/μ-carraghénanes pour la purification.

Une hydrolyse a été réalisée, dans les mêmes conditions, sur 200 mL de solution à 0,5% (p/v) du κ-carraghénane extrait de *K. alvarezii* du site 1, non transformé et précipité à l'IPA. L'hydrolysats a été reconcentré à environ 2% (p/v) avant d'être purifié par chromatographie d'exclusion de taille.

E. Hydrolyse enzymatique du carraghénane extrait de *I. crispata*.

Afin de faire agir les trois enzymes sur le même substrat successivement ou conjointement, un tampon d'hydrolyse commun aux trois enzymes a été recherché. Plusieurs tampons ont été testés et il a été montré que les 3 enzymes étaient actives dans des milieux salins Tris-HCl, NaCl ou NaNO₃ 0.1 M à des pH autour de 7,5.

Les hydrolyses ont été effectuées sur une solution du carraghénane extrait de *I. crispata* à 0,5% (p/v) dans une solution de NaNO₃ 0,1 M, pH 7,5, à 40 °C, par l'ajout de 0,3 µg/mL de κ-carraghénase et de 0,3 µg/mL de ι-carraghénase, et à 30 °C, par l'ajout de 0,7 µg/mL de λ-carraghénase. L'ajout de ces enzymes a été effectué séparément et successivement dans différents ordres.

F. Hydrolyse enzymatique des algues.

Les algues *K. alvarezii* des sites 1 et 2 et *C. crispus* du site 2 ont été lavées à l'eau distillée, lyophilisées, puis broyées dans de l'azote liquide. A 10 mg de chaque broyat placés dans 5 mL de solution de NaNO₃ 0,1 M ont été ajoutés séparément à 40 °C, 0,6 µg/mL de κ-carraghénase, 0,6 µg/mL de ι-carraghénase, et à 30 °C 1 µg/mL de λ-carraghénase. Les hydrolysats ont été analysés par HPAEC.

G. Hydrolyse enzymatique des oligo-carraghénanes.

L'hydrolyse des oligo- λ -carraghénanes purifiés, DP4, DP6 et DP8, dissous dans NaNO_3 0,1 M à environ 0,1% (p/v), a été réalisée par ajout de λ -carraghénase en excès et a été suivie par HPAEC.

L'hydrolyse de l'oligo- κ/ι -carraghénane purifié κ - $[\kappa-\iota]$ - κ , dissous dans NaNO_3 0,1 M à environ 0,1% (p/v), a été réalisée par ajout de κ -carraghénase en excès et a été suivie par HPAEC.

IV. Purification des oligo-carraghénanes par chromatographie.

A. Purification des oligo-carraghénanes par chromatographie d'exclusion de taille (SEC)

Les hydrolysats reconcentrés (filtrés 0,22 μm) ont été injectés par une vanne manuelle (2mL) sur une colonne SuperdexTM 30 préparative (Amersham Biosciences, 600 x 26 mm) puis élués par 50 mM de carbonate d'ammonium à 20 °C à un débit de 102 mL/h (pompe P-500, Amersham Biosciences). Le logiciel Azur de Datalys a été utilisé pour l'acquisition et le traitement des données. Chaque pic d'oligosaccharides détecté par le réfractomètre (Spectra system RI-150, Thermo Separation Products) a été collecté séparément puis lyophilisé. L'utilisation de carbonate d'ammonium comme éluant a permis d'éviter l'étape de dialyse. La pureté des produits obtenus a été vérifiée par HPAEC.

Les oligo- λ -carraghénanes de DP8, DP6, DP4 (hydrolysat 5 h) et DP4, DP2 (hydrolysat 48 h) ont pu être séparés selon leur degré de polymérisation. Mais les oligosaccharides de DP4, DP6 et DP8 ont été co-élués avec des oligosaccharides minoritaires probablement avec un taux de sulfatation différent.

Les oligo- κ -carraghénanes de DP6, DP4 et DP2 et les oligo- ι -carraghénanes de DP6 et DP4 ont été obtenus à un degré de pureté supérieur à 95% (pureté mesurée par HPAEC).

Les oligo- κ/ι -carraghénanes κ - ι - κ , κ - κ - ι - κ , κ - ι - ι - κ et κ - $[\kappa/\iota/\iota]$ - κ ont été obtenus purs à 90-95%, après une seconde injection séparée de chacun des pics récoltés.

Conditions expérimentales

Les oligo- κ/μ -carraghénanes $\kappa-\mu-\kappa$, $\kappa-[\kappa/\mu]-\kappa$, $\kappa-\mu-\mu-\kappa$ et $\kappa-[\kappa/\mu/\mu]-\kappa$ ont été élués conjointement avec des oligo- κ/ι -carraghénanes minoritaires, par exemple les $\kappa-\kappa-\mu-\kappa$ ont été élués avec les $\kappa-\kappa-\iota-\kappa$.

Préparation de mélanges d'oligosaccharides

Des mélanges d'oligo- λ -carraghénanes (hydrolysats 5 h et 48 h), d'oligo- κ/ι -carraghénanes (hydrolysats 4 algues) et d'oligo- κ/μ -carraghénanes (hydrolysats *K. alvarezii* site 1 non transformé et transformé) ont aussi été purifiés sur Superdex 30 préparative. Cette purification de pool d'oligosaccharides permet d'éliminer la fraction résistante et les sels, étape préalable à l'analyse des oligosaccharides par spectrométrie de masse et/ou à leur marquage à l'AMAC.

B. Purification des oligo-carraghénanes par chromatographie échangeuse d'anions (HPAEC).

Les oligosaccharides impurs après l'étape de purification par SEC ont été repris dans de l' H_2O mQ (0,3% (p/v) environ, filtrés 0.22 μm), puis injectés (50 μL , injecteur automatique 100XR de Thermo Separation Products) sur une colonne échangeuse d'anions semi-préparative AS11 (9 x 250 mm, Ion Pac®, Dionex). L'élution des oligosaccharides a été réalisée par un gradient de soude, à partir de solutions d'eau mQ (éluant A) et de soude 280 mM (éluant B) suivant des programmes linéaires spécifiques de la nature de l'échantillon à purifier. Le logiciel utilisé pour l'acquisition et le traitement des données est le logiciel Chromeleon-Peak Net.

L'élution d'oligo- λ -carraghénanes a été réalisée à un débit de 1,5 mL/min (Pompe GP40 Gradient, Dionex) par les gradients de soude (éluant B) suivants. Pour la purification du DP4 : 0-11 min: 50-71,2% B ; 11-12 min: 71,2-100% B. Les DP4 et DP4+S ont été observés à un temps de rétention de 9 min (NaOH 190 mM) et 11,5 min (NaOH 210 mM). Dans le cas du DP6, le gradient utilisé était: 0-11 min: 50-78% B ; 11-20 min: 78-91,1% B ; 20-21 min: 91,1-100% B. Le DP6 a été élué après 14 min (NaOH 230 mM). Le gradient utilisé pour le DP8 était: 0-4 min: 50-70% B ; 4-7,9 min: 70-75% B ; 7,9-10 min: 75-79% B ; 10-15,5 min: 79-85% B ; 15,5-16 min: 85% B ; 16-16,5 min: 85-100% B et le DP8 a été observé à 15,5 min (NaOH 240 mM).

L'élution des oligo- κ/μ -carraghénanes a été réalisée à un débit de 1 mL/min par le gradient de soude suivant : 0-11 min: 25-43,5% B, 11-11.1 min: 43,5-25% B, 11,1-18,1 min: 25-25% B) et l'élution des oligosaccharides a été détectée par conductimétrie à 7,8 min : $\kappa-\mu-\kappa$, 9,8 min : $\kappa-\kappa-\mu-\kappa$, 12,5 min : $\kappa-\mu-\mu-\kappa$, 12,9 min: $\kappa-\kappa-\mu-\mu-\kappa$).

Les oligo-carraghénanes ont été détectés par conductimétrie avec un détecteur ED40 (Dionex) muni d'un supresseur ASRS ultraII-4mm (Dionex) fonctionnant à un courant de 300 mA. Le supresseur fonctionnait en mode interne lors de la purification des oligo- λ -carraghénanes et la suppression de la soude n'était pas totale. Une neutralisation des fractions collectées a donc été réalisée avec de l'acide acétique 0,4 M. Les oligo- λ -carraghénanes ont ensuite été dialysés (Spectra/Por® CE, MWCO 500), concentrés et lyophilisés. L'ajout de la suppression externe pour la purification des oligo- κ/μ -carraghénanes a permis de les collecter à la sortie du détecteur dans une solution neutre. Il a été nécessaire d'ajouter du sulfate d'ammonium pour éviter leur dégradation lors de la lyophilisation.

V. Purification des fractions résistantes.

Les fractions des κ/ι -carraghénanes résistantes aux κ - et ι -carraghénases ont été séparées des oligosaccharides par ultrafiltration sur cellule Amicon équipée d'une membrane de 50 kDa de seuil de coupure. Le retentat, contenant la fraction résistante, a été lavé avec 100 mL d'H₂O mQ puis lyophilisé.

La fraction résistante à la λ -carraghénase du λ -carraghénane de *G. skottsbergii* et les fractions résistantes à la κ -carraghénase des κ/μ -carraghénanes de *K. alvarezii*, ont été séparées des oligosaccharides lors des séparations par chromatographie d'exclusion de taille sur colonne Superdex 30.

VI. Techniques d'analyse des hydrolysats

A. Dosage colorimétrique des extrémités réductrices formées au cours de l'hydrolyse

Le dosage des extrémités réductrices générées par coupure enzymatique au cours du temps a été réalisé par réaction d'oxydo-réduction avec le réactif ferricyanide (Kidby *et al.*, 1973). La réactivité des extrémités réductrices des néo- λ -carratétraose, néo- λ -carrahexaose,

Conditions expérimentales

néo- κ -carratétraose, néo- ι -carratétraose et du glucose a été testée vis-à-vis de ce réactif. A 900 μL des solutions à différentes concentrations de ces 5 molécules ont été ajoutés 100 μL du réactif ferricyanide à 0,3% (p/v) (300 mg potassium hexacyanoferrate III, 2,4 g carbonate de sodium hydrate, 1 mL soude 5 M, 100 mL QSP eau). Les échantillons ont été chauffés à 100 °C pendant 15 min pour permettre la réaction d'oxydo-réduction des extrémités réductrices avec le ferricyanide. Après retour à la température ambiante, la décoloration a été lue à 420 nm au spectrophotomètre.

A 100 μL des prélèvements cinétiques à 0,25% (p/v) des hydrolyses des κ -carraghénanes de *K. alvarezii*, ont été ajoutés 900 μL du réactif ferricyanide de concentration 0,03% (p/v) (30 mg potassium hexacyanoferrate III, 2,4 g carbonate de sodium hydrate, 0,1 mL soude 5 M, 100 mL QSP eau).

Les extrémités réductrices du λ -carraghénane étant environ 10 fois moins réactives que celles du glucose et du néo- κ -carratétraose, la réaction a été effectuée en mélangeant 900 μL des hydrolysats des solutions de λ -carraghénanes de concentrations 0,5% (dilution 1/3), 0,3% (dilution 1/2) et 0,1% (p/v) avec 100 μL du réactif ferricyanide de concentration 0,3% (p/v). Les extrémités réductrices formées sont exprimées en équivalent néo- λ -carratétraose à partir de la droite d'étalonnage DO (densité optique) = f (concentration néo- λ -carratétraose). Cette droite d'étalonnage permet de remonter, de la lecture de la DO des échantillons de la cinétique, à la concentration en extrémités réductrices néo- λ -carratétraose dans le milieu à un moment donné. Les néo- λ -carrabioses étant des substrats disponibles en faible quantité, le glucose peut être utilisé pour la gamme étalon, une fois connu le rapport de réactivité des sucres réducteurs néo- λ -carratétraose/glucose.

B. Analyse des oligo-carraghénanes par électrophorèse

1. Analyse des oligo- λ -carraghénanes par « Carbohydrate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis » (C-PAGE)

Le gel de polyacrylamide utilisé (gel de concentration 6%, gel de séparation 27%) est d'une épaisseur de 0,75 mm et de dimension 160 x 180 mm (Miniprotean, Biolab). A 5 μL des hydrolysats du λ -carraghénane (0,5% p/v) ont été ajoutés 15 μL de tampon de charge (sucrose 10 % et rouge de phénol), et 5 μL de ce mélange ont ensuite été déposés sur le gel.

La migration a été effectuée à température ambiante pendant 30 min, à 40 mA, avec un tampon de migration composé de Tris-HCl 50 mM et d'EDTA 1 mM. Les oligo-carraghénanes, séparés selon leur taille et leur charge, ont été colorés au bleu d'Alcian 0,5 % (p/v), pendant 10 min, puis au nitrate d'argent 0,4% (p/v), pendant 10 min. La révélation a été réalisée par une solution de 7 g NaCO₃, 80 µL formaldéhyde, 100 mL H₂O mQ.

2. Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE)

Marquage des oligosaccharides

Le marquage par le 2-Aminoacridone (AMAC), selon le protocole de Goubet (Goubet *et al.*, 2002), a été effectué sur environ 1-2 mg des oligo-κ/ι-carraghénanes κ-ι-κ et κ-κ-ι-κ, 1-2 mg de néo-λ-carrabiose, et sur environ 20 mg d'un mélange d'oligo-λ-carraghénanes (DP4 et DP6 principalement, hydrolysats 5 h). Le protocole est donné pour 20 mg d'oligosaccharides auxquels ont été ajoutés 500 µL d'une solution NaCNBH₃ 1 M et 500 µL d'AMAC 0,1 M en solution dans de l'acide acétique/DMSO (3/17, v/v). Les réactifs mélangés ont été incubés à 37 °C sur la nuit. Le mélange réactionnel a ensuite été évaporé à 40 °C.

Purification des oligosaccharides marqués

L'oligo-λ-carraghénane de DP2 marqué a été purifié du mélange réactionnel par migration sur C-PAGE. Sa bande fluorescente a été excisée puis broyée et le DP2 fluorescent a été récupéré par diffusion dans de l'eau puis lyophilisé. La diffusion du gel dans l'eau des oligo-λ-carraghénanes marqués de plus haut DP est faible. Les 20 mg d'oligo-λ-carraghénanes de DP4 et DP6 marqués ont été séparés du mélange réactionnel sur colonne Superdex 30 préparative avec une élution au carbonate d'ammonium 50 mM à 102 mL/h. Les fractions collectées contenant les oligosaccharides DP4 et DP6 fluorescents ont été lyophilisées.

Hydrolyse des oligosaccharides marqués

Les oligo-λ-carraghénanes marqués DP4 et DP6 (environ 1mg) ont été dissous dans 50 µL de NaNO₃ 0,1M et l'hydrolyse a été effectuée pendant 6 h à 30 °C par ajout de λ-carraghénase en excès. L'oligo-κ/ι-carraghénane κ-κ-ι-κ marqué (1-2 mg), non purifié

Conditions expérimentales

(obtenu en quantité trop faible), a été dissous dans 50 μL de NaNO_3 0,1 M et l'hydrolyse a été effectuée pendant 12 h, à 40 °C, par ajout de la κ -carraghénase en excès.

Migration des oligosaccharides

Les oligosaccharides marqués, non-hydrolysés et hydrolysés, ont été analysés par migration sur gel C-PAGE (gel de concentration 6%, gel de séparation 27%, épaisseur 0,75 mm, dimension 8x8,5 cm) à 20 mA pendant 30 min. Les bandes d'oligosaccharides ont été visualisées sous UV à 302 nm (Système BioDoct-ItTM, UVP).

C. Analyse des hydrolysats par chromatographie

1. High Performance Size Exclusion Chromatography - Multi-Angle-Laser-Light-Scattering (HPSEC – MALLS)

Les échantillons (200 μL , filtrés 0,22 μm , Millipore) ont été injectés par un injecteur automatique Waters 717 Plus, contrôlé par un Waters 6005. Les prélèvements cinétiques de l'hydrolyse du λ -carraghénane de *G. skottsbergii* (0,25% p/v) ont été injectés sur une colonne Pharmacia Superdex S200 HR (300 x 10 mm i.d.) et l'élution a été réalisée à un débit de 0,5 mL/min. Les hydrolysats des autres carraghénanes étudiés (0,5 % p/v) ont été injectés sur une colonne Pharmacia Superdex S200 HR (300x10 mm i.d., séparation dextran : $1 \cdot 10^3$ - $1 \cdot 10^5$ Da) couplée à une colonne SuperdexTM peptide HR (300x10 mm i.d., séparation dextran : $1 \cdot 10^2$ - $7 \cdot 10^3$ Da) et l'élution a été réalisée à un débit de 0,3 mL/min. L'élution a été réalisée avec un éluant LiNO_3 0,1 M (RI : 1.327) à un débit contrôlé par la Pompe Waters 626, à 25 °C. Ce système HPSEC a été couplé à un réfractomètre Waters 2414, utilisé comme quantificateur massique, travaillant à une longueur d'onde de 890 nm à 35°C. Les mesures de diffraction ont été réalisées par un système MALLS DAWN EOS (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA) équipé d'un laser 30 mW Ga-As polarisé linéairement à une longueur d'onde de 690 nm. L'intensité de la lumière diffusée a été mesurée à 12 angles différents de 35° à 143°. Les données ont été collectées et analysées par le logiciel Astra 4 (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA). La méthode Zimm a été utilisée pour déterminer les poids moléculaires. L'albumine sérique bovine monodisperse (Sigma, St.Louis, MO) a été utilisée pour

normaliser les différents détecteurs par rapport à l'angle θ de 90° du détecteur. La valeur de dn/dc utilisée pour les calculs est de 0,115 (P. Boulenguer, communication personnelle).

2. Chromatographie d'exclusion de taille (SEC).

Les prélèvements cinétiques de l'hydrolyse du λ -carraghénane de *G. skottsbergii* (0,25% (p/v), filtré 0,22 μm) ont été injectés par une vanne manuelle (500 μL) sur une colonne SuperdexTM 30 semi-préparative (Amersham Biosciences, 600 x 16 mm, séparation dextran : 1.10^2 - 7.10^3 Da) et élués avec un tampon de carbonate d'ammonium 50 mM à 20 °C à un débit de 60 mL/h. Les produits élués ont été détectés par le détecteur à indice de réfraction. Le système utilisé est identique à celui décrit pour l'utilisation préparative de la SEC.

3. High Performance Anion Exchange Chromatography (HPAEC)

Le système utilisé est le même que celui décrit pour l'utilisation semi-préparative de l'HPAEC. Les échantillons (20 μl , filtré 0,22 μm) ont été injectés automatiquement sur une colonne analytique échangeuse d'anions AS11 (4 x 250 mm, Ion Pac®, Dionex) équipée d'une pré-colonne AG11 (4 x 50 mm, Ion Pac®, Dionex). L'élution des échantillons a été réalisée par un gradient de soude, à partir de solutions d'eau mQ (éluant A) et de soude 280 mM (éluant B), à un débit de 0,5 mL/min (Pompe GP40 Gradient, Dionex) suivant des programmes linéaires spécifiques de la nature de l'échantillon analysé.

La séparation des oligo- λ -carraghénanes (0,5 % p/v) a été réalisée en suivant le programme linéaire : 0-5 min : 3-5% B ; 5-6,5 min : 5-30% B ; 6,5-15 min : 30-57,5% B, 15-26 min : 57,5-100% B.

La séparation des oligo- κ -carraghénanes et oligo- ι -carraghénanes (0,5 % p/v) a été réalisée en suivant le programme linéaire : 0-3,5 min: 3-3% B, 3,5-4,1 min: 3-5% B, 4,1-6,5 min: 5-10% B, 6,5-22 min: 10-50% B, 22-28 min: 50-74,7% B, 28-28,1 min: 74,7-100% B).

Les oligo-carraghénanes ont été détectés par conductimétrie avec un détecteur ED40 (Dionex), muni d'un supresseur ASRS ultraII-4mm (Dionex) fonctionnant en mode externe sous un courant de 300 mA.

D. Analyse par spectrométrie de masse des oligo-carraghénanes.

1. Couplage LC-ESI/MS (Liquid Chromatography - Electrospray Ionisation - Mass Spectroscopy)

L'analyse des oligo-carraghénanes par LC-ESI/MS est réalisable depuis peu (Antonopoulos, 2005). L'inconvénient de cette méthode est que l'hydrolysats ne peut être injecté directement sur la colonne. Les oligosaccharides doivent être préalablement séparés de la fraction résistante et des sels, par chromatographie d'exclusion de taille par exemple.

Les mélanges purifiés d'oligo- λ -carraghénanes (hydrolysats 5 h et 48 h), d'oligo- κ/ι -carraghénanes (4 algues) et d'oligo- κ/μ -carraghénanes (*K. alvarezii* site 1 T et NT IPA), ont été dissous à 2000 ppm dans H₂O puis injectés manuellement (50 μ L, injecteur 7125 Rheodyne) sur une colonne Alltima C₁₈ 5U (150x4,6 mm i.d., taille particules 5 μ m, Alltech). La phase mobile est constituée d'eau (éluant A), du modificateur organique acétonitrile ou méthanol (éluant B) et d'heptylammonium formate 20 mM (pH 4) (éluant C). L'élution a été réalisée à un débit de 1mL/min avec une pompe à gradient Hitachi L7100 (Merck). Dans le cas des oligo- λ -carraghénanes, l'éluant B utilisé est l'acétonitrile et le programme de gradient : 0-20 min : 45-30% A, 30-45% B, 25%-25% C. Pour les oligo- κ -carraghénanes et oligo- ι -carraghénanes, l'éluant B est le méthanol et le programme de gradient : 0-15 min, 45-5% A, 35-55% B, 20% C, 15-30 min, 25-15% A, 55-65% B, 20% C, 30-50 min, 65% A, 15% B, 20% C.

Le volume mort est déterminé en injectant du NaNO₃ avec MeOH/H₂O (30/70) en tant que phase mobile. Il correspond au premier pic de chaque chromatogramme.

Le système chromatographique a été couplé, avec un split de 1/10, à un spectromètre de masse triple-quadrupôle Quattro Ultima (Micromass Ltd) avec une source electrospray d'ionisation Z-Jet. Le débit du gaz nébulisateur (N₂) était de 50 L/h et celui du gaz de désolvatation (N₂) de 500 L/h. Le Rf-Objectif 1 a été placé à 0.0, l'ouverture à 0.0 V et le Rf_Objectif 2 à 1,0 V. La température de la sonde a été maintenue à 250 °C et celle de la source d'ion à 130 °C. La tension capillaire de spray était de 2,75 kV et la tension de cône de 32 V. La LM-résolution 1 et la HM-résolution 1 étaient toutes les deux à 12,5, alors que l'énergie 1 d'ion était à 1,1 eV. L'entrée et la sortie de la cellule de collision étaient à 30 eV et l'énergie de collision à 0 eV sauf indication contraire. La LM-résolution 2 et la HM-résolution 2 étaient toutes les deux à 15,0 alors que l'énergie 2 d'ion était à 1,5 eV. Le

multiplicateur était à 650. La pression dans l'analyseur était de $8,5 \times 10^{-6}$ mbar et celle de la cellule de gaz de $1,0 \times 10^{-4}$ mbar.

Le full scan a été employé dans le mode d'ion négatif, la gamme 60-3000 m/z étant balayée en 3 s. Les acquisitions ont été enregistrées et analysées avec le logiciel MASSLYNX 4.0 (Micromass).

2. Analyse par infusion directe.

Les oligo- λ -carraghénanes de DP2, DP4, DP6, DP8, les oligo- κ/ι -carraghénanes et les oligo- κ/μ -carraghénanes purifiés, ont été injectés, à une concentration de 200 ppm ($H_2O/MeCN$, 1/4), par une infusion directe dans la sonde du ESI du spectromètre de masse avec une pompe 11 de Harvard apparatus à un débit de $5 \mu L/min$. L'entrée et la sortie de la cellule de collision ont été placées à -1 et 1 respectivement.

E. Analyse RMN

Les études ont été menées sur un spectromètre BRUKER Avance DRX 500 équipé d'une sonde inverse 5 mm triple résonance TXI $^1H/^{13}C/^{31}P$ avec gradient Z. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport à la référence externe TSP (trimethylsilylpropionic acid).

Les déplacements chimiques des carraghénanes ont été exprimés jusqu'en 2004 par rapport au TMS (tetramethylsilane), avant qu'il ne soit remplacé par le DSS (dimethylsilapentane-sulfonate), recommandé par IUPAC (van de Velde *et al.*, 2004). L'utilisation du DSS à la place du TMS provoque une variation des déplacements chimiques carbonés de + 2.1 ppm. Par comparaison à la référence DSS, le TSP a un déplacement chimique de $\delta = -0,18$ ppm (^{13}C) et $\delta = -0,017$ ppm (1H), ce qui permet l'utilisation du TSP comme alternative au DSS.

1. Suivi cinétique de l'hydrolyse du λ -carraghénane

La λ -carraghénase a été dialysée contre du $NaNO_3$ 0,1 M dans du D_2O à 99,97% à 10 °C. L'hydrolyse a été effectuée à 30 °C par ajout de 500 μL de λ -carraghénase dialysée à 5

Conditions expérimentales

mL de λ -carraghénane dissous dans NaNO_3 0,1 M dans du D_2O à 99,97%. A différents temps d'hydrolyse, 500 μL d'hydrolysats ont été transférés dans des tubes RMN de 5 mm. Les spectres ^1H -RMN ont été enregistrés à 70 °C en utilisant 32K points et les paramètres suivants: angle d'impulsion, 30°; fenêtre spectrale, 10 330 Hz; temps d'acquisition, 1,58 s; temps de relaxation, 2 s. Le nombre de scans était de 64 pour $t = 0$ et $t = 1$ min, et 128 pour les temps suivants, la résolution digitale était de 0,31 Hz/point.

2. Analyse ^1H -RMN des polysaccharides

Afin d'obtenir des spectres RMN mieux résolus, tous les polymères (1,5 g) ont été dépolymérisés par broyage pendant 15 h à 40% de la vitesse maximale d'un broyeur à billes MM200 (RETSCH). Les polysaccharides et les oligosaccharides ont été échangés deux fois dans du D_2O et redissous dans du D_2O à 99,97 % approximativement à 10 mg/mL.

Les spectres 500,13 MHz ^1H -RMN des polymères et des fractions résistantes ont été enregistrés avec un angle d'impulsion de 30°. Les spectres ont été enregistrés à 25 °C ou 70 °C, en utilisant 32K ou 64K points de données. Les expériences ont été menées avec les paramètres suivants : fenêtre spectrale, 10 330 Hz; temps d'acquisition, 1,58 s; temps de relaxation, 2 s; résolution digitale 0,31 Hz/point. Les nombres de scans ont varié de 32 à 128 selon les échantillons.

3. Analyses RMN 1D (^{13}C , ^1H) et 2D des oligosaccharides

Les analyses des oligo-carraghénanes ont été réalisées par des expériences RMN 1D ^1H , ^{13}C Jmod et 2D (COSYDQF, HMQC ^1H - ^{13}C , HMBC ^1H - ^{13}C , Jdelta) en utilisant des programmes standards de séquences BRUKER. Les expériences ont été effectuées à 25 °C avec des paramétrages similaires à ceux de l'oligosaccharide κ - μ - κ présentés ci-dessous.

Le spectre 500,13 MHz RMN ^1H a été enregistré avec un angle d'impulsion de 30 en utilisant 64K points de données avec les paramètres suivants : fenêtre spectrale, 7485 Hz; temps d'acquisition, 4,38 s; temps de relaxation, 2 s; nombre de scans, 16; résolution digitale 0,11 Hz/point.

Le spectre RMN 1D ^{13}C Jmod a été enregistré en utilisant 32K de points de données avec les paramètres suivants: fenêtre spectrale, 30 120 Hz; temps d'acquisition, 0,54 s; temps de relaxation, 2 s; nombre de scans, 41 092; résolution digitale 0,92 Hz/point.

Pour les expériences COSYDQF, un total de 48 fid, chacune consistant en 48 scans avec un temps de relaxation de 2 s et un temps d'acquisition de 0,37 s, a été enregistré. La fenêtre spectrale dans les deux dimensions était de 1398 Hz. Les données de la matrice ont été complétées à 1024*1024 avec une résolution digitale de 1,37 Hz/point.

Pour le spectre hétéronucléaire ^1H - ^{13}C HMQC, un total de 140 fid, chacune consistant en 64 scans avec un temps de relaxation de 1,8 s et un temps d'acquisition de 0,37 s, a été enregistré. La fenêtre spectrale dans les dimensions F2 and F1 était respectivement de 1398 et 17 608 Hz. Les données de la matrice ont été complétées à 1024*1024 avec une résolution digitale de 1,37 Hz/point dans F2 et 17,19 Hz/point dans F1.

Pour le spectre hétéronucléaire ^1H - ^{13}C HMBC, un total de 140 fid, chacune consistant en 96 scans avec un temps de relaxation de 2 s et un temps d'acquisition de 0,37 s, a été enregistré. La fenêtre spectrale dans les dimensions F2 and F1 était respectivement de 1398 et 17 608 Hz. Les données de la matrice ont été complétées à 1024*1024 avec une résolution digitale de 1,36 Hz/point dans F2 et 17,19 Hz/point dans F1.

Pour le spectre Jdelta, un total de 160 fid, chacune consistant en 96 scans avec un temps de relaxation de 1,8 s et un temps d'acquisition de 0,37 s, a été enregistré. La fenêtre spectrale dans les dimensions F2 and F1 était respectivement de 60 et 1398 Hz. Les données de la matrice ont été complétées à 1024*1024 avec une résolution digitale de 1,365 Hz/point dans F2 et 0,058 Hz/point dans F1.

Références bibliographiques

- Agrawal, P. K. (1992). "NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides." *Phytochemistry* **31**, 3307-3330.
- Amimi, A., Mouradi, A., Givernaud, T., Chiadmi, N. and Lahaye, M. (2001). "Structural analysis of *Gigartina pistillata* carrageenans (Gigartinaceae, Rhodophyta)." *Carbohydrate Research* **333**, 271-279.
- Anderson, N. S., Campbell, J. W., Harding, M. M., Rees, D. A. and Samuel, J. W. (1969). "X-Ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: double helix models for κ - and ι -carrageenans." *Journal of Molecular Biology* **45**, 85-99.
- Anderson, N. S., Dolan, T. C. and Rees, D. A. (1973). "Carrageenans. VII. Polysaccharides from *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottonii*. The covalent structure of iota-carrageenan." *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1* **19**, 2173-2176.
- Antonopoulos, A., Favetta, P., Lafosse, M. and Helbert, W. (2004a). "Characterisation of iota-carrageenans oligosaccharides with high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection." *Journal of Chromatography A* **1059**, 83-87.
- Antonopoulos, A., Herbreteau, B., Lafosse, M. and Helbert, W. (2004b). "Comparative analysis of enzymatically digested kappa-carrageenans, using liquid chromatography on ion-exchange and porous graphitic carbon columns coupled to an evaporative light scattering detector." *Journal of Chromatography A* **1023**, 231-238.
- Antonopoulos, A. (2005). "Caractérisation par chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse d'oligosaccharides sulfatés. Application à des hydrolysats de carraghénanes". Thèse de doctorat de l'Université d'Orléans, 253 pages.
- Antonopoulos, A., Favetta, P., Helbert, W. and Lafosse, M. (2005a). "On-line chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the characterisation of kappa- and iota-carrageenans. Application to the hybrid iota/nu-carrageenans." *Analytical Chemistry* **77**, 4125-4136.
- Antonopoulos, A., Hardouin, J., Favetta, P., Helbert, W., Delmas, A. and Lafosse, M. (2005b). "Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry for the direct analysis of enzymatically digested kappa- iota- and hybrid iota/nu-carrageenans." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**, 2217-2226.
- Baldauf, S. L. (2003). "The deep roots of eukaryotes." *Science* **300**, 1703-1706.
- Barbeyron, T. (1993). "Caractérisation moléculaire d'une sulfatase, d'une kappa-carraghénase, d'une iota-carraghénase chez deux bactéries marines : *Alteromonas carrageenovora* et *Cytophaga drobachiensis*." Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, 276 pages.
- Barbeyron, T., Henrissat, B. and Kloareg, B. (1994). "The gene encoding the kappa-carrageenase of *Alteromonas carrageenovora* is related to [beta]-1,3-1,4-glucanases." *Gene* **139**, 105-109.
- Barbeyron, T., Gerard, A., Potin, P., Henrissat, B. and Kloareg, B. (1998). "The kappa-carrageenase of the marine bacterium *Cytophaga drobachiensis*. Structural and phylogenetic relationships within family-16 glycoside hydrolases." *Molecular Biology and Evolution* **15**, 528-537.
- Barbeyron, T., Michel, G., Potin, P., Henrissat, B. and Kloareg, B. (2000). " ι -Carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of κ -carrageenases." *Journal of Biological Chemistry* **275**, 35499-35505.

Références bibliographiques

- Bellion, C., Hamer, G. and Yaphe, W. (1981). "Analysis of kappa-iota hybrid carrageenans with kappa-carrageenase, iota-carrageenase and ^{13}C NMR." *Xth international seaweed symposium*, 379-384.
- Bellion, C., Hamer, G. and Yaphe, W. (1982). "The degradation of *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottonii* carrageenans by ι -carrageenases and κ -carrageenases from marine bacteria." *Canadian Journal of Microbiology* **28**, 874-880.
- Bellion, C., Brigand, G., Prome, J.-C., Welti, D. and Bociek, S. (1983). "Identification et caractérisation des précurseurs biologiques des carraghénanes par spectroscopie de RMN- ^{13}C ." *Carbohydrate Research* **119**, 31-48.
- Bixler, H. (1996). "Recent development in manufacturing and marketing carrageenan." *Hydrobiologia* **326/327**, 35-37.
- Bixler, H., Johndro, K. and Falshaw, R. (2001). "Kappa-2 carrageenan: structure and performance of commercial extracts: II. Performance in two simulated dairy applications." *Food Hydrocolloids* **15**, 619-630.
- Bongaerts, K., Reynaers, H., Zanetti, F. and Paoletti, S. (1999). "Equilibrium and nonequilibrium association processes of kappa-carrageenan in aqueous salt solutions." *Macromolecules* **32**, 683-689.
- Bonnin, E., Dolo, E., Le Goff, A. and Thibault, J.-F. (2002). "Characterisation of pectin subunits released by an optimised combination of enzymes." *Carbohydrate Research* **337**, 1687-1696.
- Carlucci, M. J., Pujol, C. A., Ciancia, M., Nosedá, M. D., Matulewicz, M. C., Damonte, E. B. and Cerezo, A. S. (1997). "Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity." *International Journal of Biological Macromolecules* **20**, 97-105.
- Carlucci, M. J., Scolaro, L. A. and Damonte, E. B. (2002). "Herpes simplex virus type 1 variants arising after selection with an antiviral carrageenan: lack of correlation between drug susceptibility and syn phenotype." *Journal of Medical Virology* **68**, 92-98.
- Carlucci, M. J., Scolaro, L. A., Nosedá, M. D., Cerezo, A. S. and Damonte, E. B. (2004). "Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus infection in mice." *Antiviral Research* **64**, 137-141.
- Chen, L. and McLachlan, J. (1972). "The life history of *Chondrus crispus*." *Canadian Journal of Botany* **50**, 1055-1066.
- Chiovitti, A., Bacic, A., Craik, D. J., Kraft, G. T., Liao, M.-L., Falshaw, R. and Furneaux, R. H. (1998). "A pyruvated carrageenan from Australian specimens of the red alga *Sarconema filiforme*." *Carbohydrate Research* **310**, 77-83.
- Chopin, T. and Whalen, E. (1993). "A new and rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material." *Carbohydrate Research* **246**, 51-59.
- Ciancia, M., Matulewicz, M. C., Finch, P. and Cerezo, A. S. (1993a). "Determination of the structures of cystocarpic carrageenans from *Gigartina skottsbergii* by methylation analysis and NMR spectroscopy." *Carbohydrate Research* **238**, 241-248.
- Ciancia, M., Nosedá, M. D., Matulewicz, M. C. and Cerezo, A. S. (1993b). "Alkali-modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/nu- and lambda-series." *Carbohydrate Polymers* **20**, 95-98.
- Colin, S. (2005). "Développement d'enzymes recombinants issus des bactéries marines *P.carrageenovora* et SW5 pour la production d'oligo-fucoïdanes et d'oligo- λ -carraghénanes". Thèse de doctorat de l'Université de Technologie de Compiègne, 243 pages.

- Colin, S., Deniaud, E., Jam, M., Descamps, V., Chevolut, Y., Kervarec, N., Yvin, J. C., Barbeyron, T., Michel, G. and Kloareg, B. (2006). "Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans." *Glycobiology*, sous presse.
- Craigie, J. and Wong, K. (1979). "Carrageenan biosynthesis." *Proceeding in International Seaweed Symposium*, 369-377.
- Craigie, J., S. (1990). "Biology of the red algae". Cell Walls. K. Cole and R. Sheath, Cambridge university Press, Cambridge, 221-257.
- Cuppo, F., Reynaers, H. and Paoletti, S. (2002). "Association of kappa-carrageenan induced by Cs⁺ ions in iodide aqueous solution: A light scattering study." *Macromolecules* **35**, 539-547.
- Davies, G. and Henrissat, B. (1995). "Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases." *Structure* **3**, 853-859.
- Dawes, C., Stanley, N. and Standoff, D. (1977). "Seasonal and reproductive aspects of plant chemistry, and ι-carrageenan from Florideae *Eucheuma* (Rhodophyta, Gigartinales)." *Botanica Marina* **20**, 137-147.
- De Ruiter, G. A. and Rudolph, B. (1997). "Carrageenan biotechnology." *Trends in Food Science & Technology* **8**, 389-395.
- DiNinno, V., McCandless, E. and Bell, R. (1979). "Pyruvic acid derivative of carrageenan from a marine red algae (*Petrocelis* species)." *Carbohydrate Research* **71**, C1:C4.
- Doty, M. and Santos, G. (1978). "Carrageenans from tetrasporic and cystocarpic *Eucheuma* species." *Aquatic Botany* **4**, 143-149.
- Duarte, M. E. R., Nosedá, M. D., Cardoso, M. A., Tulio, S. and Cerezo, A. S. (2002). "The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*." *Carbohydrate Research* **337**, 1137-1144.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. and Smith, F. (1956). "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." *Analytical Chemistry* **28**, 350-356.
- Ekeberg, D., Knutsen, S. H. and Sletmoen, M. (2001). "Negative-ion electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS) as a tool for analysing structural heterogeneity in kappa-carrageenan oligosaccharides." *Carbohydrate Research* **334**, 49-59.
- Elias, C. J., Coggins, C., Alvarez, F., Brache, V., Fraser, I. S., Lacarra, M., Lahteenmaki, P., Massai, R. and Mishell, J., Daniel R. (1997). "Colposcopic evaluation of a vaginal gel formulation of iota-carrageenan." *Contraception* **56**, 387-389.
- Falshaw, R. and Furneaux, R. H. (1994). "Carrageenan from the tetrasporic stage of *Gigartina decipiens* (Gigartinales, Rhodophyta)." *Carbohydrate Research* **252**, 171-182.
- Falshaw, R. and Furneaux, R. H. (1995). "Carrageenans from the tetrasporic stages of *Gigartina clavifera* and *Gigartina alveata* (Gigartinales, Rhodophyta)." *Carbohydrate Research* **276**, 155-165.
- Falshaw, R., Furneaux, R. H., Wong, H., Liao, M.-L., Bacic, A. and Chandkrachang, S. (1996). "Structural analysis of carrageenans from Burmese and Thai samples of *Catenella nipae* Zanardini." *Carbohydrate Research* **285**, 81-98.
- Falshaw, R. and Furneaux, R. H. (1998). "Structural analysis of carrageenans from the tetrasporic stages of the red algae, *Gigartina lanceata* and *Gigartina chapmanii* (Gigartinales, Rhodophyta)." *Carbohydrate Research* **307**, 325-331.
- Falshaw, R., Bixler, H. J. and Johndro, K. (2001). "Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts: I. Structure analysis." *Food Hydrocolloids* **15**, 441-452.
- Falshaw, R., Bixler, H. J. and Johndro, K. (2003). "Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts. Part III. Structure analysis and performance in two dairy

Références bibliographiques

- applications of extracts from the New Zealand red seaweed, *Gigartina atropurpurea*." *Food Hydrocolloids* **17**, 129-139.
- Falshaw, R., Furneaux, R. H. and Stevenson, D. E. (2005). "Structural analysis of carrageenans from the red alga, *Callophyllis hombroniana* Mont. Kütz (Kallymeniaceae, Rhodophyta)." *Carbohydrate Research* **340**, 1149-1158.
- Farias, W., Valente, A.-P., Pereira, M. and Mourão, P. (2000). "Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates." *Journal of Biological Chemistry* **275**, 29299 - 29307.
- Frei, E. and Preston, R. (1961). "Variants in structural polysaccharides of algal cell walls." *Nature* **192**, 939-943.
- Fukuyama, Y., Ciancia, M., Nonami, H., Cerezo, A. S., Erra-Balsells, R. and Matulewicz, M. C. (2002). "Matrix-assisted ultraviolet laser-desorption ionization and electrospray-ionization time-of-flight mass spectrometry of sulfated neocarrabiose oligosaccharides." *Carbohydrate Research* **337**, 1553-1562.
- Furneaux, R. and Miller, I. (1985). "Water soluble polysaccharides from the New Zealand red algae in the family Phylloporaceae." *Botanica Marina* **28**, 419-425.
- Genicot, S., Kloareg, B., Potin, P., Rudolph, B., De Ruiter, G., Penninkhof, B. and Richard, O. (2004). "Sulfohydrolases, corresponding amino acid and nucleotide sequences, sulfohydrolase preparations, processes, and products thereof." Brevet, United States, N° 6,620,604.
- Goubet, F., Jackson, P., Deery, M. J. and Dupree, P. (2002). "Polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis: A method to study plant cell wall polysaccharides and polysaccharide hydrolases." *Analytical Biochemistry* **300**, 53-68.
- Greer, C. and Yaphe, W. (1984a). "Characterisation of hybrid (Beta-Kappa-Gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatinae* J. Agardh (Rhodophyta, Solieriaceae) using carrageenases, infrared and ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy." *Botanica Marina* **27**, 473-478.
- Greer, C. and Yaphe, W. (1984b). "Hybrid (Iota-Nu-kappa) carrageenan from *Eucheuma nudum* (Rhodophyta, Solieriaceae), identified using iota- and kappa-carrageenases and ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance." *Botanica Marina* **27**, 479-484.
- Greer, C. and Yaphe, W. (1984c). "Purification and properties of iota-carrageenase from a marine bacterium." *Canadian Journal of Microbiology* **30**, 1500-1506.
- Greer, C. and Yaphe, W. (1984d). "Enzymatic analysis of carrageenans: Structure of carrageenan from *Eucheuma nudum*." *Hydrobiologia* **116/117**, 563-567.
- Greer, C., Shomer, I., Goldstein, M. E. and Yaphe, W. (1984e). "Analysis of carrageenan from *Hypnea musciformis* by using kappa- and iota-carrageenases and ¹³C-NMR spectroscopy." *Carbohydrate Research* **129**, 189-196.
- Greer, C. (1984). "A study of carrageenases from marine bacteria". Thèse de doctorat de l'Université McGill, 207 pages.
- Greer, C., Rochas, C. and Yaphe, W. (1985). "Iota-carrageenan oligosaccharides as model compounds for structural analysis of iota-carrageenan by ¹³C-NMR spectroscopy." *Botanica Marina* **28**, 9-14.
- Harris, M. J. and Turvey, J. R. (1970). "Sulphates of monosaccharides and derivatives : Part IX. The conformations of glycoside sulphates in solution determined by N.M.R. spectroscopy." *Carbohydrate Research* **15**, 57-63.
- Henrissat, B. and Davies, G. (1997). "Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases." *Current Opinion in Structural Biology* **7**, 637-644.

- Heyraud, A., Gey, C., Leonard, C., Rochas, C., Girond, S. and Kloareg, B. (1996). "NMR spectroscopy analysis of oligogulonates and oligomannuronates prepared by acid or enzymatic hydrolysis of homopolymeric blocks of alginic acid. Application to the determination of the substrate specificity of *Haliotis tuberculata* alginate lyase." *Carbohydrate Research* **289**, 11-23.
- Hoffman, R. (1993). "Carrageenans inhibit growth-factor binding." *Biochemical Journal* **289**, 331-334.
- Hoffman, R., Burns, W. and Paper, D. (1995). "Selective inhibition in cell proliferation and DNA synthesis by the polysulfated carbohydrate λ -carrageenan." *Cancer Chemotherapy Pharmacology* **36**, 325-334.
- Jam, M., Flament, D., Allouch, J., Potin, P., Thion, L., Kloareg, B., Czjzek, M., Helbert, W., Michel, G. and Barbeyron, T. (2005). "The endo-beta-agarases AgaA and AgaB from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans*: two paralogous enzymes with different molecular organizations and catalytic behaviours." *Biochemical Journal* **385**, 703-713.
- Johnston, K. H. and McCandless, E. L. (1973). "Enzymatic hydrolysis of the potassium chloride soluble fraction of carrageenan: properties of "lambda carrageenases" from *Pseudomonas carrageenovora*." *Canadian Journal of Microbiology* **19**, 779-788.
- Kidby, D. K. and Davidson, D. J. (1973). "A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range." *Analytical Biochemistry* **55**, 321-325.
- Kloareg, B. and Quatrano, R. S. (1988). "Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides." *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **26**, 259-315.
- Knutsen, S. and Grasdalen, H. (1987). "Characterisation of water-extractable polysaccharides from Norwegian *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour. (Gigartinales, Rhodophyceae) by IR and NMR spectroscopy." *Botanica Marina* **30**, 497-505.
- Knutsen, S. and Grasdalen, H. (1992a). "Analysis of carrageenans by enzymatic degradation, gel filtration and ^1H NMR spectroscopy." *Carbohydrate Polymers* **19**, 199-210.
- Knutsen, S., Myslabodski, D., Larsen, B. and Usov, A. (1994). "A modified system of nomenclature for red algal galactans." *Botanica Marina* **37**, 163-169.
- Knutsen, S., Sletmoen, M., Kristensen, T., Barbeyron, T., Kloareg, B. and Potin, P. (2001). "A rapid method for the separation and analysis of carrageenan oligosaccharides released by iota- and kappa-carrageenase." *Carbohydrate Research* **331**, 101-106.
- Knutsen, S. H. and Grasdalen, H. (1992b). "The use of neocarrabiose oligosaccharides with different length and sulphate substitution as model compounds for ^1H -NMR spectroscopy." *Carbohydrate Research* **229**, 233-244.
- Kolender, A. A., Pujol, C. A., Damonte, E. B., Matulewicz, M. C. and Cerezo, A. S. (1997). "The system of sulfated from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: Structures, antihyperpetic and anticoagulant properties." *Carbohydrate Research* **304**, 53-60.
- La Claire, J. and Dawes, C. (1976). "An autoradiographic and histochemical localization of sulfated polysaccharides in *Eucheuma nudum* (Rhodophyta)." *Journal of Phycology* **12**, 368-375.
- Lahaye, M., Yaphe, W., Viet, M. T. P. and Rochas, C. (1989). " ^{13}C -NMR spectroscopic investigation of methylated and charged agarose oligosaccharides and polysaccharides." *Carbohydrate Research* **190**, 249-265.
- Lahaye, M., Brunel, M. and Bonnin, E. (1997). "Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva sp.* (Ulvales, Chlorophyta)." *Carbohydrate Research* **304**, 325-333.

Références bibliographiques

- Lahaye, M. (1998). "NMR spectroscopic characterisation of oligosaccharides from two *Ulva rigida* ulvan samples (Ulvales, Chlorophyta) degraded by a lyase." *Carbohydrate Research* **314**, 1-12.
- Lawson, C. J. and Rees, D. (1970). "An enzyme for the metabolic control of polysaccharide conformation and function." *Nature* **227**, 392-393.
- Liao, M.-L., Kraft, G., Munro, S. and Craik, D. (1993). "Beta/kappa-carrageenans as evidence for continued separation of the families Didranemataceae and Sarcodiaceae (Gigartinales, Rhodophyta)." *Journal of Phycology* **29**, 833-844.
- Masson, C. R. (1955). "The degradation of carrageenin : I. Kinetics in aqueous solution at pH 7." *Canadian Journal of Chemistry*, 597-603.
- Matulewicz, M. C., Ciancia, M., Nosedá, M. D. and Cerezo, A. S. (1990). "Methylation analysis of carrageenans from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*." *Phytochemistry* **29**, 3407-3410.
- McCandless, E., Craigie, J. and Walter, J. (1973). "Carrageenans in the gametophytic and sporophytic stages of *Chondrus Crispus*." *Planta* **112**, 201-212.
- McCandless, E. and Craigie, J. (1979). "Sulfated polysaccharides in red and brown algae." *Annual Review of Plant Physiology* **30**, 41-53.
- McCandless, E., West, J. and Guiry, M. (1983). "Carrageenan patterns in the Gigartinales." *Biochemical Systematics and Ecology* **11**, 175-182.
- McCarter, J. D. and Stephen Withers, G. (1994). "Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis." *Current Opinion in Structural Biology* **4**, 885-892.
- McLean, M. and Williamson, F. (1979a). "κ-carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora*." *European Journal of Biochemistry* **93**, 553-558.
- McLean, M. and Williamson, F. (1979b). "Glycosulphatase from *Pseudomonas carrageenovora*. Purification and some properties." *European Journal of Biochemistry* **101**, 497-505.
- McLean, M. and Williamson, F. (1981). "Neocarratetraose 4-O-monosulphate beta-hydrolase from *Pseudomonas carrageenovora*." *European Journal of Biochemistry* **113**, 447-456.
- Melo, F., Pereira, M., Foguel, D. and Mourao, P. (2004). "Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides : different mechanisms for heparin and sulfated galactans." *Journal of Biological Chemistry* **279**, 20824-20835.
- Michel, G., Barbeyron, T., Flament, D., Vernet, T., Kloareg, B. and Dideberg, O. (1999). "Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the κ-carrageenase from *Pseudoalteromonas carragenovora*." *Acta crystallographica* **D55**, 918-920.
- Michel, G., Flament, D., Barbeyron, T., Vernet, T., Kloareg, B. and Dideberg, O. (2000). "Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the ι-carrageenase from *Alteromonas fortis*." *Acta crystallographica* **D56**, 766-768.
- Michel, G., Chantalat, L., Fanchon, E., Henriessat, B., Kloareg, B. and Dideberg, O. (2001a). "The ι-carrageenase of *Alteromonas fortis*. A β-helix fold containing enzyme for the degradation of highly polyanionic polysaccharide." *Journal of Biological Chemistry* **276**, 40202-40209.
- Michel, G., Chantalat, L., Duee, E., Barbeyron, T., Henriessat, B., Kloareg, B. and Dideberg, O. (2001b). "The kappa-carrageenase of *P. carrageenovora* features a tunnel-shaped active site: A novel insight in the evolution of clan-B glycoside hydrolases." *Structure* **9**, 513-525.
- Michel, G., Helbert, W., Kahn, R., Dideberg, O. and Kloareg, B. (2003). "The structural bases of the processive degradation of iota-carrageenan, a main cell wall polysaccharide of red algae." *Journal of Molecular Biology* **334**, 421-433.

- Millard, P. and Evans, L. (1982). "The fate of sulphate within the capsular polysaccharide of the unicellular red alga *Rhodellia maculata*." *Journal of Experimental Botany* **33**, 854-864.
- Miller, I. (2003). "The chemical structure of galactans from some New Zealand red algae." *Botanica Marina* **46**, 572-577.
- Mollion, J. and Christianen, D. (1986). "Isolation of a new type of carrageenan from *Rissoella verruculosa* (Rhodophyta, Gigartinales)." *Botanica Marina* **29**, 549-552.
- Mori, J. (1939). "Carbohydrase acting on the mucilage from *Chondrus ocellatus* I." *Journal of the agricultural chemical society of Japan* **15**, 1070-1074.
- Mori, J. (1943). "Carbohydrase acting on the mucilage from *Chondrus ocellatus* II." *Journal of the agricultural chemical society of Japan* **19**, 740-742.
- Morrice, L. M., McLean, M. W., Long, W. F. and Williamson, F. B. (1983). "Porphyran primary structure. An investigation using beta-agarase I from *Pseudomonas atlantica* and ¹³C-NMR spectroscopy." *European Journal of Biochemistry* **133**, 673-684.
- Morris, E., Rees, D. and Robinson, G. (1980). "Cation-specific aggregation of carrageenan helices: Domain model of polymer gel structure." *Journal of Molecular Biology* **138**, 349-362.
- Nosedá, M. D. and Cerezo, A. S. (1993). "Room temperature, low-field ¹³C-NMR spectra of degraded carrageenans: Part III. Autohydrolysis of a lambda carrageenan and of its alkali-treated derivative." *International Journal of Biological Macromolecules* **15**, 177-181.
- Paoletti, S., Smidsrød, O. and Grasdalen, H. (1984). "Thermodynamic stability of the ordered conformation of carrageenan polyelectrolytes." *Biopolymers* **23**, 1771-1794.
- Parish, C., Coombe, D., Jakobsen, K., Bennet, F. and Underwood, P. (1987). "Evidences that sulfated polysaccharides inhibit tumor metastasis by blocking tumor-cell-derived heparanases." *International Journal of Cancer* **40**, 511-518.
- Penman, A. and Rees, D. A. (1973). "Carrageenans. IX. Methylation analysis of galactan sulphates from *Furcellaria fastigiata*, *Gigartina canaliculata*, *Gigartina chamissoi*, *Gigartina atropurpurea*, *Ahnfeltia durvillaei*, *Gymnogongrus furcellatus*, *Eucheuma isiforme*, *Eucheuma uncinatum*, *Aghardhiella tenera*, *Pachymenia hymantophora*, and *Gloiopeltis cervicornis*. Structure of xi-carrageenan." *Journal of Chemical Society* **19**, 2182-2187.
- Potin, P., Sanseau, A., Le Gall, Y., Rochas, C. and Kloareg, B. (1991). "Purification and characterization of a new kappa-carrageenase from a marine *Cytophaga*-like bacterium." *European Journal of Biochemistry* **201**, 241-247.
- Potin, P. (1992). "Recherche, production, purification et caractérisation de galactane-hydrolases pour la préparation d'oligosaccharides des parois des algues rouges." Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale, 245 pages.
- Potin, P., Richard, C., Rochas, C. and Kloareg, B. (1993). "Purification and characterisation of the alpha-agarase from *Alteromonas agarlyticus* (Cataldi) comb. nov., strain GJ1B." *European Journal of Biochemistry* **214**, 599-607.
- Potin, P., Richard, C., Barbeyron, T., Henrissat, B., Gey, C., Y., P., E., F., O., D., Rochas, C. and Kloareg, B. (1995). "Processing and hydrolytic mechanism of the cgkA-encoded kappa-carrageenase of *Alteromonas carrageenovora*." *European Journal of Biochemistry* **228**, 971-975.
- Prado-Fernandez, J., Rodriguez-Vazquez, J. A., Tojo, E. and Andrade, J. M. (2003). "Quantitation of kappa-, iota- and lambda-carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression." *Analytica Chimica Acta* **480**, 23-37.

Références bibliographiques

- Quemener, B. and Lahaye, M. (1998). "Comparative analysis of sulfated galactans from red algae by reductive hydrolysis and mild methanolysis coupled to two different HPLC techniques." *Journal of Applied Phycology* **10**, 75-81.
- Rees, D. (1969). "Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks." *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **24**, 267-332.
- Rees, D., Morris, E., Thom, D. and Madden, J. (1982). "The polysaccharides". G. O. Aspinall. New York, USA, Academic Press, 195-290.
- Reynaers, H. (2003). "Light scattering study of polyelectrolyte polysaccharides - the carrageenans." *Fibres et Textiles in Eastern Europe* **11**, 89-96.
- Ridout, M. J., Garza, S., Brownsey, G. J. and Morris, V. J. (1996). "Mixed iota-kappa carrageenan gels." *International Journal of Biological Macromolecules* **18**, 5-8.
- Rochas, C., Rinaudo, M. and Vincendon, M. (1983). "Spectroscopic characterization and conformation of oligo kappa carrageenans." *International Journal of Biological Macromolecules* **5**, 111-115.
- Rochas, C. and Rinaudo, M. (1984). "Mechanism of gel formation in κ -carrageenan." *Biopolymers* **23**, 735-745.
- Rochas, C., Lahaye, M. and Yaphe, W. (1986). "Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy." *Botanica Marina* **29**, 335-340.
- Rochas, C., Potin, P. and Kloareg, B. (1994). "NMR spectroscopic investigation of agarose oligomers produced by an α -agarase." *Carbohydrate Research* **253**, 69-77.
- Ross, A. (1953). "Some typical analyses of red seaweeds." *J. Sci. Food. Agric.* **4**, 333-335.
- Sekkal, M. and Legrand, P. (1993). "A spectroscopic investigation of the carrageenans and agar in the 1500-100 cm^{-1} spectral range." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **49**, 209-221.
- Sen, A., Das, A., Banerji, N., Siddhanta, A., Mody, K., Ramavat, B., Chauhan, V., Vedasiromoni, J. and Ganguly, D. (1994). "A new sulfated polysaccharide with potent blood anti-coagulant activity from the red seaweed *Grateloupia indica*." *International Journal of Biological Macromolecules* **16**, 279-280.
- Simha, R. (1941). "Kinetics of degradation and size distribution of long chain polymers." *Journal of Applied Physics* **12**, 569-578.
- Singh, S. K. and Jacobsson, S. P. (1994). "Kinetics of acid hydrolysis of κ -carrageenan as determined by molecular weight (SEC-MALLS, RI), gel breaking strength, and viscosity measurements." *Carbohydrate Polymers* **23**, 89-103.
- Slotmaekers, D., van Dijk, J. A. P. P., Varkevisser, F. A., van Treslong, C. J. B. and Reynaers, H. (1991). "Molecular characterisation of kappa- and lambda-carrageenan by gel permeation chromatography, light scattering, sedimentation analysis and osmometry." *Biophysical Chemistry* **41**, 51-59.
- Smidsrød, O. and Grasdalen, H. (1982). "Some physical properties of carrageenan in solution and gel state." *Carbohydrate Polymers* **2**, 270-272.
- Smith, D. and Cook, W. (1953). "Fractionation of carrageenin." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **45**, 232-233.
- Stancioff, D. (1981). "Reflections on the interrelationships between red seaweed source, chemistry and uses." *Xth Proceeding in International Seaweed Symposium* **10**, 113-121.
- Stanley, N. F. (1990). "Food Gel". Editeurs: P. Harris, 79-119
- Stevenson, T. T. and Furneaux, R. H. (1991). "Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae." *Carbohydrate Research* **210**, 277-298.

- Stortz, C. A. and Cerezo, A. S. (1993). "The systems of carrageenans from cystocarpic and tetrasporic stages from *Iridaea undulosa*: fractionation with potassium chloride and methylation analysis of the fractions." *Carbohydrate Research* **242**, 217-227.
- Stortz, C. A., Bacon, B. E., Cherniak, R. and Cerezo, A. S. (1994). "High-field NMR spectroscopy of cystocarpic and tetrasporic carrageenans from *Iridaea undulosa*." *Carbohydrate Research* **261**, 317-326.
- Strom, A. and Williams, M. A. K. (2004). "On the separation, detection and quantification of pectin derived oligosaccharides by capillary electrophoresis." *Carbohydrate Research* **339**, 1711-1716.
- Therkelsen, G. H. (1993). "Carrageenan". Industrial Gums. R. L. Whistler and J. N. BeMiller. San Diego, CA, Academic Press, 145-180.
- Turquois, T., Acquistapace, S., Vera, F. A. and Welti, D. H. (1996). "Composition of carrageenan blends inferred from ¹³C-NMR and infrared spectroscopic analysis." *Carbohydrate Polymers* **31**, 269-278.
- Tveter-Gallagher, E., Cheney, D. and Mathieson, A. (1981). "Uptake and incorporation of ³⁵S into carrageenan among different strains of *Chondrus crispus*." *Biochemical Journal* **81**, 347-352.
- Usov, A., Yarotsky, S. and Shashkov, A. (1980). "¹³C-NMR spectroscopy of red algal galactans." *Biopolymers* **19**, 977-990.
- Usov, A. and Arkhipova, V. (1981). "Polysaccharides of algae. 30. Methylation of κ-carrageenan-type polysaccharides of the red algae *Tichocarpus crinitus* (Gmel.) Rupr. *Furcellaria fostigiata* (Huds.) Lam. and *Phyllophora nevrosa* (de Cand.) Grev." *Bioorganicheskaya Khimiya (in Russian)* **7**, 839-848.
- Usov, A. (1984). "NMR spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carrageenans, and xylans." *Botanica Marina* **27**, 189-202.
- Usov, A. and Shashkov, A. (1985). "Polysaccharides of algae: detection of iota-carrageenan in *Phyllophora brodiaei* (Turn.) J. Ag. (Rhodophyta) using ¹³C-NMR spectroscopy." *Botanica Marina* **28**, 367-373.
- Usov, A. and Ivanova, E. (1987). "Polysaccharide of algae. Characterization of hybrid structure of substituted agarose from *Polysiphonia morrowii* (Rhodophyta, Rhodomelaceae) using β-agarase and ¹³C-NMR Spectroscopy." *Botanica Marina* **30**, 365-370.
- Usov, A., Bilan, M. I. and Shashkov, A. S. (1997). "Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae)." *Carbohydrate Research* **303**, 93-102.
- van de Velde, F., Peppelman, H. A., Rollema, H. S. and Tromp, R. H. (2001). "On the structure of kappa/iota-hybrid carrageenans." *Carbohydrate Research* **331**, 271-283.
- van de Velde, F., Rollema, H., Grinberg, N., Burova, T., Grinberg, V. and Tromp, R. (2002). "Coil-helix transition of ι-carrageenan as a function of chain regularity." *Biopolymers* **65**, 299-312.
- van de Velde, F., Pereira, L. and Rollema, H. S. (2004). "The revised NMR chemical shift data of carrageenans." *Carbohydrate Research* **339**, 2309-2313.
- van de Velde, F., Antipova, A. S., Rollema, H. S., Burova, T. V., Grinberg, N. V., Pereira, L., Gilsenan, P. M., Tromp, R. H., Rudolph, B. and Grinberg, V. Y. (2005). "The structure of kappa/iota-hybrid carrageenans II. Coil-helix transition as a function of chain composition." *Carbohydrate Research* **340**, 1113-1129.
- Vanneste, K., Sloommaekers, D. and Reynaers, H. (1996). "Light scattering studies of the dilute solution behaviour of κ-, ι- and λ-carrageenan." *Food Hydrocolloids* **10**, 99-107.

Références bibliographiques

- Viebke, C., Piculell, L. and Nilsson, S. (1994). "On the mechanism of gelation of helix forming biopolymers." *Macromolecules* **27**, 4160-4166.
- Viebke, C., Borgstrom, J. and Piculell, L. (1995). "Characterisation of kappa- and iota-carrageenan coils and helices by MALLS/GPC." *Carbohydrate Polymers* **27**, 145-154.
- Viebke, C. and Williams, P. A. (2000). "Determination of molecular mass distribution of kappa-carrageenan and xanthan using asymmetrical flow field-flow fractionation." *Food Hydrocolloids* **14**, 265-270.
- Villanueva, R. D., Mendoza, W. G., Rodriguez, M. R. C., Romero, J. B. and Montano, M. N. E. (2004). "Structure and functional performance of gigartinacean kappa-iota hybrid carrageenan and solieriacean kappa-iota carrageenan blends." *Food Hydrocolloids* **18**, 283-292.
- Voragen, A. (2003). "Advances in Pectin and Pectinase Research". Editeurs: H. Schols and R. Visser, 504
- Vreeland, V., Zablackis, E. and Laetsch, W. (1992). "Monoclonal antibodies as molecular markers for the intracellular and cell wall distribution of carrageenan epiopes in *Kappaphycus* (Rhodophyta) during tissue development." *Journal of Phycology* **28**, 328-342.
- Watt, D. K., O'Neill, S. A., Percy, A. E. and Brasch, D. J. (2002). "Isolation and characterisation of a partially methylated galacto-glucurono-xylo-glycan, a unique polysaccharide from the red seaweed *Apophloeae lyallii*." *Carbohydrate Polymers* **50**, 283-294.
- Weigl, J., Turvey, J. and Yaphe, W. (1966a). "The enzymatic hydrolysis of κ -carrageenan with κ -carrageenase from *pseudomonas carrageenovora*." *Fifth International Seaweed Symposium*, 329-331.
- Weigl, J. and Yaphe, W. (1966b). "The enzymic hydrolysis of carrageenan by *Pseudomonas carrageenovora* : purification of a kappa-carrageenase." *Canadian Journal of Microbiology* **12**, 939-947.
- Welti, D. (1977). "Carrageenans. Part XII. The 300 MHz proton magnetic resonance spectra of methyl β -D-galactopyranoside, methyl 3,6-anhydro- α -D-galactopyranoside, agarose, kappa-carrageenan and the segments of iota-carrageenan and agarose sulphate." *Journal of Chemical Research* **312-313**, 3566-3587.
- Wittgren, B., Borgstrom, J., Piculell, L. and Wahlund, K. (1998). "Conformational change and aggregation of κ -carrageenan studies by flow field-flow fractionation and multiangle light scattering." *Biopolymers* **45**, 85-96.
- Witvrouw, M., Desmyter, J. and De Clercq, E. (1994). "Antiviral portrait series : 4. Polysulfates as inhibitors of HIV and other enveloped viruses." *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **5**, 345-359.
- Wong, K. and Craigie, J. (1978). "Sulfohydrolase activity and carrageenan biosynthesis in *Chondrus Crispus* (Rhodophyceae)." *Plant Physiology* **61**, 663-666.
- Wong, T. Y., Preston, L. A. and Schiller, N. L. (2000). "Alginate Lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications." *Annual Review of Microbiology* **54**, 289-340.
- Yaphe, W. and Baxter, B. (1955). "The enzymic hydrolysis of carrageenin." **3**, 380-383.
- Yaphe, W. and Arsenault, G. (1965). "Improved resorcinol reagent for the determination of fructose, and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides." *Analytical Chemistry* **13**, 143-148.
- Zablackis, E. and Santos, G. (1986). "The carrageenan of *Catenella nipae* Zanard., a marine red algae." *Botanica Marina* **29**, 319-322.
- Zablackis, E., Vreeland, V., Doboszewski, B. and Laetsch, W. (1991). "Differential localization of carrageenan gelling sequences in *Kappaphycus alvarezii* var.

- Tambalang* (Rhodophyta) with FITC-conjugated carrageenan oligosaccharides." *Journal of Phycology* **27**, 241-248.
- Zhang, Z., Yu, G., Guan, H., Zhao, X., Du, Y. and Jiang, X. (2004). "Preparation and structure elucidation of alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase from *Vibrio* sp. 510." *Carbohydrate Research* **339**, 1475-1481.

Liste des figures

Figure 1 : Position des macro-algues et des plantes supérieures dans l'arbre phylogénétique des eucaryotes (Baldauf, 2003)	1
Figure 2 : Organisation de la paroi des algues rouges.....	3
Figure 3: Exemples d'espèces de carraghénophytes (Gigartinales).....	5
Figure 4 : Procédé d'extraction industriel des carraghénanes à partir des algues rouges.	7
Figure 5 : Motifs disaccharidiques de répétition G-D / G-DA des carraghénanes.	7
Figure 6 : Classification des carraghénanes en familles.	9
Figure 7 : Diagramme de Stancioff.	11
Figure 8 : Cycle de reproduction de l'algue rouge <i>C. crispus</i> (Gigartinaceae).....	13
Figure 9 : Voie de biosynthèse hypothétique des carraghénanes (Craigie <i>et al.</i> , 1979).	15
Figure 10 : Théories de la transition sol/gel du κ -carraghénane en présence d'ions K^+	17
Figure 11 : Analyse des carraghénanes par HPSEC-MALLS.....	23
Figure 12 : Réaction de perméthylation du κ -carraghénane.	25
Figure 13 : Analyse Infra-Rouge des trois principales structures de carraghénanes.	27
Figure 14 : Spectres (A) ^{13}C -RMN et (B) 1H -RMN d'un κ/ι -carraghénane.....	29
Figure 15 : Spectre 1H -RMN du néo- κ -carraghénane (Knutsen <i>et al.</i> , 1992b).	31
Figure 16 : Voie de dégradation du κ -carraghénane.	41
Figure 17 : Mécanisme de coupure des κ -carraghénanes.....	43
Figure 18 : Schématisation des modes d'action endo et processif des glycoside hydrolases. .	45
Figure 19 : Structure secondaire de la κ -carraghénase de <i>P. carrageenovora</i>	45
Figure 20 : Structure du site actif de la κ -carraghénase.....	47
Figure 21 : Mécanisme de coupure des ι -carraghénanes.....	49
Figure 22 : Structure secondaire de la ι -carraghénase de <i>A. fortis</i>	51
Figure 23 : Structure du site actif de la ι -carraghénase d' <i>A. fortis</i>	53
Figure 24 : Gel SDS-PAGE de la λ -carraghénase de <i>P. carrageenovora</i> purifiée.....	69
Figure 25 : Spectre Jmod à 25 °C du λ -carraghénane extrait de <i>G. skottsbergii</i>	69
Figure 26 : Analyse des hydrolysats obtenus par hydrolyse par la λ -carraghénase de λ -carraghénanes extraits de différentes algues	71
Figure 27 : Comparaison de la réactivité des extrémités réductrices des oligo- λ -carraghénanes (DP4, DP6), oligo- ι -carraghénane (DP4) et du glucose envers le réactif ferricyanide.....	73
Figure 28 : Cinétique d'hydrolyse du λ -carraghénane à des concentrations de 0,1% (o), 0,3% (Δ) et 0,5% (\square) par la λ -carraghénase.	73
Figure 29 : Etude par HPSEC-MALLS de l'évolution du poids moléculaire du λ -carraghénane au cours de l'hydrolyse.	75
Figure 30 : Séparation par chromatographie d'exclusion de taille sur Superdex 30 des oligo- λ -carraghénanes produits lors de l'hydrolyse du λ -carraghénane de <i>G. skottsbergii</i>	77
Figure 31 : Séparation par Carbohydrate-PAGE des oligo- λ -carraghénanes.	77
Figure 32 : Analyse par HPAEC analytique de la pureté des oligo- λ -carraghénanes DP6 et DP4, après chaque étape de purification.	78
Figure 33 : Chromatogramme LC-ESI-MS du DP4+S par appariement d'ions sur colonne C_{18} et spectre de masse obtenu pour ce pic.	79
Figure 34 : Analyse par LC-MS des produits obtenus après 5 h et 48 h d'hydrolyse, par la technique d'appariement d'ions sur colonne Altima C_{18}	79

Listes des figures et tableaux

Figure 35 : Spectre ^1H -RMN à 70 °C du néo- λ -carrabiose (DP2) sous ses formes anomériques α et β .	81
Figure 36: Spectre ^1H -RMN à 70 °C du polymère λ -carraghénane broyé et des oligosaccharides néo- λ -carraoctaose (DP8), néo- λ -carrahaose (DP6) et néo- λ -carraoctaose (DP4).	81
Figure 37 : Spectre 1H COSY à 25 °C du néo- λ -carrahaose.	83
Figure 38 : Spectre Jdelta à 25 °C du néo- λ -carrahaose.	83
Figure 39 : Spectre hétéronucléaire $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMQC à 25 °C du néo- λ -carrahaose.	85
Figure 40 : Spectre hétéronucléaire $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC à 25 °C du néo- λ -carrahaose.	85
Figure 41 : Spectre Jmod à 25 °C du néo- λ -carrahaose.	86
Figure 42 : Spectres ^1H -RMN à 25 °C des tétrasaccharides DP4 (D2S,6Snr-G2Snr'-D2S,6Sr'-G2Sr) et DP4+S (D2S,6Snr-G2S,4Snr'-D2S,6Sr'-G2Sr).	89
Figure 43: Spectre ^1H -RMN à 70 °C du pool d'oligosaccharides purifiés par SEC après 5h d'hydrolyse.	89
Figure 44 : Spectre ^1H -RMN à 25 °C de la fraction résistante à la λ -carraghénase du λ -carraghénane de <i>G. skottsbergii</i> .	91
Figure 45 : Suivi de l'hydrolyse enzymatique du λ -carraghénane par ^1H -RMN à 70 °C.	91
Figure 46 : Etude du site actif de la λ -carraghénase.	93
Figure 47 : Données obtenues sur la spécificité du site actif de la λ -carraghénase.	97
Figure 48 : Schématisation de la structure du λ -carraghénane extrait des tétrasporophytes de <i>G. skottsbergii</i> .	103
Figure 49 : Schémas d'organisations structurales possibles des κ/ι -carraghénanes.	109
Figure 50 : Analyse par gel SDS-PAGE de la pureté de la κ -carraghénase de <i>P. carrageenovora</i> et de la ι -carraghénase d' <i>A. fortis</i> , purifiées par chromatographie d'affinité.	111
Figure 51 : Spectres ^1H -RMN à 70 °C (A) de mélanges de κ -carraghénane et de ι -carraghénane, (B) de κ/ι -carraghénanes extraits de différentes algues.	113
Figure 52 : Produits des hydrolyses, par les κ - et ι -carraghénases, (A) d'un mélange d'homopolymères 50 ι /50 κ et (B) du κ/ι -carraghénane extrait de <i>G. skottsbergii</i> .	115
Figure 53 : Purification des oligo- κ/ι -carraghénanes, produits de l'hydrolyse par la κ -carraghénase du carraghénane de <i>G. skottsbergii</i> .	117
Figure 54 : Analyse par HPAEC de la pureté des oligo- κ/ι -carraghénanes purifiés par SEC à partir de l'hydrolysat du carraghénanes de <i>G. skottsbergii</i> .	117
Figure 55 : Spectres ^1H -RMN à 25 °C des oligo- κ/ι -carraghénanes purifiés.	119
Figure 56 : Spectre hétéronucléaire $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC à 25 °C de l'octasaccharide κ - ι - ι - κ .	121
Figure 57 : Spectre hétéronucléaire $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC à 25 °C de l'octasaccharide κ -[κ/ι]- κ .	121
Figure 58: Détermination de la séquence des motifs dans l'oligosaccharide κ -[κ/ι]- κ .	125
Figure 59: Produits des hydrolyses par (A) la ι -carraghénase et (B) la κ -carraghénase de différents κ/ι -carraghénanes.	127
Figure 60 : Analyse par HPAEC sur AS11 des produits de l'hydrolyse des κ/ι -carraghénanes par (A) la ι -carraghénase et (B) la κ -carraghénase.	129
Figure 61 : Chromatogrammes LC-ESI-MS des oligo- κ/ι -carraghénanes produits par hydrolyse par la κ -carraghénase des κ/ι -carraghénanes de différentes sources d'algues.	130
Figure 62 : Analyse par HPSEC-MALLS des fractions résistantes des κ/ι -carraghénanes aux hydrolyses par les carraghénases.	131
Figure 63 : Analyse par ^1H -RMN des fractions résistantes aux κ - et ι -carraghénases.	133
Figure 64 : Obtention des oligo- κ/ι -carraghénanes par action de la κ -carraghénase sur les chaînes de κ/ι -carraghénanes.	135

Figure 65 : Hydrolyse de l'oligosaccharide κ - κ - ι - κ par la κ -carraghénase.	135
Figure 66 : Données obtenues sur la spécificité du site actif de la κ -carraghénase.	137
Figure 67 : Nombre de motifs kappa consécutifs dans un κ/ι -carraghénane nécessaire à une fixation productive entraînant (A) une coupure de la chaîne, (B) la formation d'oligo- κ -carraghénanes.	137
Figure 68 : Spécificité du site actif de la ι -carraghénase.	139
Figure 69 : Proposition d'organisation structurale des chaînes de κ/ι -carraghénanes hydrolysées (A) par la κ -carraghénase et (B) par la ι -carraghénase.	141
Figure 70 : Composition des chaînes de κ/ι -carraghénanes non hydrolysables par les deux carraghénases.	143
Figure 71 : Préparation, à l'échelle pilote, de 8 lots de κ -carraghénanes à partir de deux sources de <i>K. alvarezii</i> , par deux procédés d'extraction et deux procédés de précipitation. ..	149
Figure 72 : Spectres ^1H -RMN de carraghénanes extraits des algues <i>K. alvarezii</i>	151
Figure 73 : Dosage des extrémités réductrices formées au cours de l'hydrolyse des κ -carraghénanes transformés et non transformés par la κ -carraghénase.	151
Figure 74 : Suivi cinétique par HPAEC de la formation des produits d'hydrolyse enzymatique des κ -carraghénanes extraits de <i>K. alvarezii</i>	153
Figure 75 : Analyse par HPAEC des produits obtenus après 48 h d'hydrolyse enzymatique des κ -carraghénanes extraits de <i>K. alvarezii</i>	155
Figure 76 : Analyse par HPSEC-MALLS des produits obtenus après 48 h d'hydrolyse par la κ -carraghénase des κ -carraghénanes extraits de <i>K. alvarezii</i>	155
Figure 77 : Spectre ^1H -RMN des fractions résistantes à la κ -carraghénase des κ -carraghénanes extraits de <i>K. alvarezii</i> à 25 °C.	157
Figure 78 : Purification par chromatographie d'exclusion de taille des oligo- κ/μ -carraghénanes.	157
Figure 79 : Analyse par HPAEC analytique de la pureté des oligo- κ/μ -carraghénanes purifiés par SEC préparative et HPAEC semi-préparative.	158
Figure 80 : Spectres ^1H -RMN à 25 °C des oligo- κ/μ -carraghénanes purifiés.	159
Figure 81 : Spectre hétéronucléaire $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC à 25 °C de l'hexasaccharide κ - μ - κ	161
Figure 82 : Spectre hétéronucléaire $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC à 25 °C de l'hexasaccharide κ - μ - κ	161
Figure 83 : Chromatogrammes LC-ESI-MS des hydrolysats des κ -carraghénanes de <i>K. alvarezii</i> sur une colonne Altima C ₁₈ en mode d'ionisation négative.	165
Figure 84 : Positionnement des motifs μ dans le site actif de la κ -carraghénase. Visualisation des sites de coupure de l'enzyme.	167
Figure 85 : Données obtenues sur la spécificité du site actif de la κ -carraghénase.	167
Figure 86 : Structure probable des κ/μ -carraghénanes avec une dispersion des motifs μ dans la chaîne majoritaire κ -carraghénane.	169
Figure 87 : Bilan des connaissances obtenues sur la spécificité du site actif de la κ -carraghénase.	177
Figure 88 : Spectres ^1H -RMN à 70 °C de carraghénanes extraits de différentes espèces de Gigartinaceae.	179
Figure 89 : Analyse par chromatographie d'exclusion de taille des hydrolysats obtenus par hydrolyse du carraghénane extrait de <i>I. crispata</i> avec chacune des carraghénases séparément et successivement.	179
Figure 90 : Analyse par HPAEC sur colonnes AS11 des produits des hydrolyses du carraghénane extrait de <i>I. crispata</i> par (A) la λ -carraghénase, (B) la ι -carraghénase et (C) la κ -carraghénase.	181

Listes des figures et tableaux

Figure 91 : Comparaison par analyse par HPAEC des produits d'hydrolyse obtenus par action de la κ -carraghénase directement sur la paroi des algues <i>K. alvarezii</i> des sites 1/2.	183
Figure 92 : Comparaison par analyse par HPAEC des produits d'hydrolyse obtenus par action de la κ -carraghénase sur le carraghénane extrait de <i>C. crispus</i> site 2 et directement sur la paroi de l'algue broyée.	183

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux polysaccharides rencontrés dans la paroi des macro-algues et des plantes supérieures.	3
Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques des carraghénanes.	19
Tableau 3 : Comparaison des différentes méthodes de mesure de diffusion de la lumière (Slootmaekers <i>et al.</i> , 1991).	21
Tableau 4 : Analyses chimiques de la composition des carraghénanes.	25
Tableau 5 : Produits de perméthylation de différentes structures de carraghénanes.	25
Tableau 6 : Déplacements chimiques carbones (ppm) des carraghénanes.	29
Tableau 7 : Déplacements chimiques protons (ppm) des carraghénanes dans du D ₂ O.	29
Tableau 8 : Déplacements chimiques carbones (ppm) des oligo-carraghénanes.	31
Tableau 9 : Déplacements chimiques protons (ppm) dans D ₂ O du néo- κ -carrahexaose à 30 °C (Knutsen <i>et al.</i> , 1992b).	31
Tableau 10 : Déplacements chimiques des principaux substituants des carraghénanes.	31
Tableau 11 : Constantes de couplages spin-spin des spectres ¹ H-RMN des carraghénanes.	33
Tableau 12 : Ions majoritaires des oligo-carraghénanes obtenus par spectrométrie de masse par ESI en mode d'ionisation négative (Ekeberg <i>et al.</i> , 2001).	35
Tableau 13 : Ions identifiés pour les oligo- κ -carraghénanes et oligo- ι -carraghénanes en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (colonne Alltima C ₁₈) en modes d'ionisation négative et positive.	37
Tableau 14 : Etat actuel des connaissances sur les carraghénases natives et surexprimées.	39
Tableau 15 : Utilisation des enzymes dans l'analyse structurale des polysaccharides.	57
Tableau 16 : Ions majoritaires des oligo- λ -carraghénanes obtenus par ESI en mode d'ionisation négative et ions obtenus après la LC-ESI-MS sur colonne Altima C ₁₈	79
Tableau 17 : Déplacements chimiques protons du λ -carraghénane et des oligo- λ -carraghénanes à 25 °C.	87
Tableau 18 : Déplacements chimiques protons du λ -carraghénane et des oligo- λ -carraghénanes à 25 °C.	88
Tableau 19 : Déplacements chimiques des protons des oligo- κ/ι -carraghénanes à 25°C.	123
Tableau 20 : Déplacements chimiques des carbones des oligo- κ/ι -carraghénanes à 25°C. ..	124
Tableau 21 : Ions majoritaires des oligo- κ/ι -carraghénanes obtenus par ESI en mode d'ionisation négative et ions obtenus après la LC-ESI-MS sur colonne Altima C ₁₈ et appariement avec les molécules d'heptilamide.	130
Tableau 22 : Déplacements chimiques des protons des oligo- κ/μ -carraghénanes à 25 °C.	163
Tableau 23 : Déplacements chimiques des carbones des oligo- κ/μ -carraghénanes à 25 °C. ..	164
Tableau 24 : Ions majoritaires des oligo- κ/μ -carraghénanes obtenus par ESI en mode d'ionisation négative et ions obtenus après la LC-ESI-MS sur colonne Altima C ₁₈ et appariement avec les molécules d'heptilamide.	165
Tableau 25 : Bilan des connaissances sur les carraghénases nécessaires à leur utilisation comme outils d'analyse structurale des carraghénanes.	175

Publications

Degradation of λ -carrageenan by *Pseudoalteromonas carrageenovora* λ -carrageenase: a new family of glycoside hydrolases unrelated to κ - and ι -carrageenases

Marion GUIBET¹, Sébastien COLIN¹, Tristan BARBEYRON, Sabine GENICOT, Bernard KLOAREG, Gurvan MICHEL and William HELBERT²

Centre National de la Recherche Scientifique, Université Pierre et Marie Curie-Paris6, Unité Mixte de Recherche 7139 'Marine Plants and Biomolecules', Station Biologique, F-29682 Roscoff Cedex, Bretagne, France

Carrageenans are sulfated galactans found in the cell walls of red seaweeds. They are classified according to the number and the position of sulfate ester groups. λ -Carrageenan is the most sulfated carrageenan and carries at least three sulfates per disaccharide unit. The sole known depolymerizing enzyme of λ -carrageenan, the λ -carrageenase from *Pseudoalteromonas carrageenovora*, has been purified, cloned and sequenced. Sequence analyses have revealed that the λ -carrageenase, referred to as CgIA, is the first member of a new family of GHs (glycoside hydrolases), which is unrelated to families GH16, that contains κ -carrageenases, and GH82, that contains ι -carrageenases. This large enzyme (105 kDa) features a low-complexity region, suggesting the presence of a linker connecting at least two independent modules. The N-terminal region is predicted to fold as a β -propeller. The main degradation products have been purified and characterized as neo- λ -carratetraose [DP (degree of polymerization) 4] and

neo- λ -carrhexaose (DP6), indicating that CgIA hydrolyses the β -(1 \rightarrow 4) linkage of λ -carrageenan. LC-MALLS (liquid chromatography-multi-angle laser light scattering) and ¹H-NMR monitoring of the enzymatic degradation of λ -carrageenan indicate that CgIA proceeds according to an endolytic mode of action and a mechanism of inversion of the anomeric configuration. Using 2-aminoacridone-labelled neo- λ -carrabiose oligosaccharides, in the present study we demonstrate that the active site of CgIA comprises at least 8 subsites (−4 to +4) and that a DP6 oligosaccharide binds in the subsites −4 to +2 and can be hydrolysed into DP4 and DP2.

Key words: λ -carrageenan, endo-galactanase, marine bacterium, multi-angle laser light scattering (MALLS), red algae, sulfated polysaccharide.

INTRODUCTION

Marine red algae (*Rhodophyta*) are characterized by an abundance of sulfated polysaccharides, which have no equivalent in land plants [1]. These anionic polymers, agars and carrageenans, are laid out in the cell wall at a high density and can constitute up to 50 % of the dry mass of a seaweed [2]. This large family of hydrocolloids are well-known for their gelling properties and are used in a variety of laboratory and industrial applications [3]. They are made up of linear chains of galactose with alternating α -(1 \rightarrow 3) and β -(1 \rightarrow 4) linkages. In all these galactans the β -linked galactose units are in the D-configuration (G unit), but the α -linked galactose units are in the L-configuration in agars (L unit), whereas they are in the D-configuration in carrageenans (D unit). Carrageenans are further classified according to the number and the position of sulfated ester (S) and by the occurrence of 3,6-anhydro-bridges in the α -linked residues (DA unit) found in gelling carrageenans [4]. The three most industrially exploited carrageenans, namely, κ - (DA-G4S), ι - (DA2S-G4S) and λ - (D2S,6S-G2S) carrageenan, are distinguished by the presence of one, two or three ester-sulfate groups per repeating disaccharide unit respectively.

κ - and ι -Carrageenans form thermoreversible gels in aqueous solutions, their rigidity decreasing strongly with the degree of

sulfation of the carrabiose unit. The gel properties of carrageenans are also strongly dependent on the presence of salts and on the ionic strength of the medium [5]. With three sulfate groups per carrabiose unit, λ -carrageenan is the most negatively charged galactan from red algae. Recently, it has been shown that some carrabiose units of the λ -carrageenan from *Gigartina skottsbergii* are even substituted with four sulfate groups (D2S,6S-G2S,4S) [6]. Since λ -carrageenans do not feature 3,6-anhydro-bridges, they are more hydrophilic than κ - and ι -carrageenans and do not make physical gels but highly viscous solutions. This unique viscosity is due to the semi-rigidity of the chain, which is likely conferred by the high density of sulfate groups along the polymer.

Carrageenans constitute a crucial carbon source for a number of marine bacteria. These micro-organisms, which belong mainly to the classes *Gammaproteobacteria*, *Flavobacteria* or *Sphingobacteria*, degrade the cell walls of marine red algae by secreting specific GHs (glycoside hydrolases), referred to as carrageenases [7]. κ -Carrageenases belong to GH16 (family 16 of the GHs) [8,9], a polyspecific family which encompasses at least eight different enzymatic activities, including β -agarases (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) [10,11]. Phylogenetic analysis and crystallographic investigations demonstrated that family GH16 enzymes have evolved from a common ancestor and that κ -carrageenases have likely emerged from the β -agarase branch

Abbreviations used: AMAC, 2-aminoacridone; C/PAGE, carbohydrate/PAGE; DP, degree of polymerization; GH, glycoside hydrolase; HPAEC, high-performance anion-exchange chromatography; i.d., internal diameter; IPTG, isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside; LB, Luria-Bertani; LC-MALLS, liquid chromatography-multi angle laser light scattering; ORF, open reading frame; R.I., refractive index.

¹ These authors have contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed (email helbert@sb-roscoff.fr).

The sequence of the *cglA* gene has been deposited in the EMBL Nucleotide Sequence Database under the accession number AM397269.

[9,12,13]. κ -Carrageenases hydrolyse β -(1 \rightarrow 4) glycosidic linkages with retention of the anomeric configuration [14]. The κ -carrageenase CgkA from *Pseudoalteromonas carrageenovora* adopts a jellyroll fold and displays a tunnel-shaped active site suggesting a processive mode of action [12]. The κ -carrageenan chain is composed of alternating neutral and negatively charged sugars (DA and G4S respectively). To accommodate the dual nature of its substrate, CgkA features in its active site both conserved aromatic and basic residues which are predicted to interact with DA and G4S moieties respectively [12]. ι -Carrageenases define a monospecific family of GHs (GH82) which is unrelated to that of κ -carrageenases [15]. The ι -carrageenase CgiA from *Alteromonas fortis* (ATCC 43554) folds as a right-handed β -helix and cleaves β -(1 \rightarrow 4) glycosidic bonds with an inverting mechanism [15,16]. Electron microscopy analysis demonstrated that CgiA degrade ι -carrageenan fibres according to a processive mode of action, which is consistent with the tunnel topology of its active site [17]. ι -Carrageenan, which consists of only negatively charged sugars (DA2S and G4S) is recognized by CgiA essentially through ionic interactions between its sulfate groups and several conserved arginine residues of the protein [17].

These studies on κ - and ι -carrageenases have provided some insight into sulfated polysaccharide–protein interactions; but the chemical complexity of sulfated polysaccharides is a patent obstacle to such analyses and we need better structural characterization of most of these biopolymers. In this context, carrageenans appear to be a relatively well-defined family of sulfated polysaccharides and they constitute an interesting model due to their linearly increasing degree of sulfation. Furthermore, we have recently described the complete structural characterization of λ -carrageenan [6]. Therefore to extend this study, we report here the cloning and mechanistic characterization of the first λ -carrageenase. Up to now, the marine bacterium *P. carrageenovora* is the only micro-organism known to degrade λ -carrageenan [18]. This activity was initially proposed to be due to an extracellular complex involving three hydrolases [19]. However, a single extracellular enzyme of 98 kDa has been purified and shown to degrade carrageenans of the λ family. This enzyme has no activity on agarose, κ - or ι -carrageenans [20]. Few details are available on this unique enzyme which is expected to largely differ from κ - and ι -carrageenases. Indeed the λ -carrageenase interacts with an oversulfated galactan, which is genuinely soluble in contrast with κ - and ι -carrageenans which form insoluble fibres. Sequence analysis reveals that the λ -carrageenase, referred to as CglA, is the first member of a new family of GHs, which is unrelated to families GH16 and GH82. The characterization of the hydrolysis products indicate that CglA cleaves the β -(1 \rightarrow 4) linkages of λ -carrageenan. LC-MALLS (liquid chromatography-multi-angle laser light scattering) and $^1\text{H-NMR}$ monitoring of the enzymatic degradation of λ -carrageenan demonstrate that CglA proceeds according to an endolytic mode of action and a mechanism of inversion of the anomeric configuration. Finally, we have mapped the subsite organization of the active site, using AMAC (2-aminoacridone)-labelled neo- λ -carrabiose oligosaccharides.

EXPERIMENTAL

λ -Carrageenase activity assay

λ -Carrageenase activity was determined by the reducing-sugar method adapted from Kidby and Davidson [21]. λ -Carrageenan purified from tetrasporophytic plants of *G. skottsbergii* (CP-Kelco, GENU[®] 7055) was used as the substrate. λ -Carrageenan [0.5% in 0.1 M NaNO₃ (pH 7.5)] was incubated with λ -carrageenase aliquots (0.7 μg , equivalent to 7 pmoles of enzyme

per ml of substrate, i.e. 7 nM) at 30°C. NaNO₃ solutions were not buffered, however, it was verified that a pH of 7.5 remained constant throughout the degradation reaction. Inactivation of the enzyme was achieved by heating the medium in boiling water for 10 min. Initially we attempted to measure the production of reducing sugar according to the ferricyanide method previously applied for the enzymatic digestion of κ - and ι -carrageenans [14,15]. However, the reducing ends of λ -carrageenan oligomers were less reactive than those of the κ - or ι -carrageenan oligosaccharides. By plotting a standard curve using various concentrations of glucose, neo- ι -carratetraose, neo- λ -carratetraose and neo- λ -carrahexaose, we found that the reactivity of neo- λ -oligocarrabiose reducing-ends toward the ferricyanide solution was about nine times lower than that of the other oligosaccharides. Consequently, we modified the protocol of the ferricyanide method by using ten times more concentrated ferricyanide solution and by reacting this with the reducing sugars for 10 min rather than 7 min. Aliquots (900 μl) of the reaction medium were mixed with 100 μl of ferricyanide agent (3 g potassium hexacyanoferrate III, 24 g of Na₂CO₃, 10 ml of 5 M NaOH and completed to 1 litre with water). The mixture was boiled for 10 min, cooled to room temperature (22°C) and the absorbance was read at 420 nm. The specific activity is expressed in μmol of reducing end neo- λ -carratetraose equivalent produced per min for 1 mg of protein.

Production and purification of λ -carrageenase from *P. carrageenovora*

P. carrageenovora was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC 43555). This marine bacterium was grown in the presence of 10 g of λ -carrageenan purified from the tetrasporophytic plant of *G. skottsbergii* at 20°C for 48 h in 5 litres of the Y-2 modified medium [18]. The culture medium was centrifuged (10000 g for 30 min) and the cell-free supernatant was concentrated five times by tangential ultrafiltration (Pellicon system, 10 kDa; Millipore). The proteins were fractionated by slowly adding ammonium sulfate. The precipitate obtained between 30 and 70% ammonium sulfate saturation was recovered by centrifugation (23700 g for 1 h at 4°C) and resuspended in 100 ml of sodium phosphate buffer [20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.7), 1 M NaCl and 30% ammonium sulfate]. The solution was loaded onto a Phenyl Sepharose 6 fast flow column (200 ml; GE Healthcare) previously equilibrated in the same sodium phosphate buffer. Elution of the sample was performed using a linear decreasing gradient of ammonium sulfate starting from 30% to 0% over 440 min at 1 ml/min. The λ -carrageenase activity was observed after 375 min elution which corresponded to a concentration of 4.5% ammonium sulfate. Fractions containing λ -carrageenase activity were pooled and concentrated using an Amicon cell 8050 under pressurized nitrogen gas (150 kPa) with a 10 kDa cut-off YM membrane (Millipore). The concentrate (4 ml) was loaded onto a preparative Superdex 200 column (GE Healthcare) and eluted at 1 ml/min with buffer A [20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.7), 1 M NaCl and 2% ammonium sulfate]. The Superdex 200 column was calibrated with the gel-filtration HMW kit (GE Healthcare). All of the protein fractions were analysed by SDS/PAGE under reducing conditions [in the presence of 1 mM DTT (dithiothreitol)] at 20 mA in a 0.75 mm gel stained with Coomassie Blue. The enzyme molecular mass was estimated using the SDS low-range standard from Bio-Rad. The fractions containing pure λ -carrageenase were pooled and stored at 4°C in buffer A for several months without noticeable loss of activity. The concentration of λ -carrageenase was estimated using

the Bradford assay (Bio-Rad) and BSA (Sigma) as a standard [22].

Isolation and analysis of λ -carrageenase clones

Pure λ -carrageenase was analysed by SDS/PAGE under reducing conditions and acrylamide gels were stained with 0.003 % (w/v) Amido Black. Protein bands containing pure enzyme were excised and microsequenced by Edman degradation at the Pasteur Institute. A single N-terminal and two internal peptide sequences were determined (A, B and C respectively). Genomic DNA from *P. carrageenovora* was prepared as previously described [23] and digested by the restriction endonuclease *Sau3AI*. DNA fragments of approximately 4–10 kb were purified using a 5–40 % sucrose gradient in 10 mM Tris/HCl (pH 8), 10 mM NaCl and 5 mM EDTA, after centrifugation at 85 000 g for 23 h. DNA fragments were ligated into the *Bam*HI site of plasmid pAT153 and used to transform *Escherichia coli* competent cells (strain DH5 α). The genomic library contained approximately 6000 clones. From the amino acid sequence of the peptides A and B, degenerate DNA primers were designed and used in PCR to obtain a 5' DNA probe of 943 nt. This probe was radioactively labelled (using the Megaprime DNA labelling systems kit; GE Healthcare) and used to screen the genomic library according to Sambrook and Russell [24]. Clones of interest were shown to be independent by restriction mapping. A Southern blot experiment was performed with the same labelled probe on genomic DNA from *P. carrageenovora* digested by several combinations of restriction endonuclease (*Sau3AI*, *Hin*DIII, *Hin*DIII/*Bam*HI, *Bam*HI, *Bam*HI/*Eco*RV, *Eco*RV, *Eco*RV/*Hin*DIII). Sequencing was carried out by gene walking using synthetic oligonucleotides as primers and a 3100 Genetic Analyser with BigDye Terminator v3.0 chemistry (Applied Biosystem). Sequences were verified at least five times and most of them more than ten times.

Sequence analysis

The nucleotide sequence was searched for ORFs (open reading frames) which were translated according to the universal genetic code. They were investigated for RBS (ribosomal-binding sequences), promoters and transcription terminator hairpins via the Mfold server [25]. A signal peptide was predicted with SignalP v3.0 [26]. Searches for protein sequence similarities were performed using BLASTp [27] on the UniProt Knowledgebase (trEMBL and SwissProt). Protein domains were searched with InterProScan [28]. Low complexity regions were identified using the SEG program [29].

Expression of recombinant λ -carrageenase

The construction of the expression vector was based on GATEWAY[®] cloning technology according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The coding region of *P. carrageenovora* λ -carrageenase was amplified by PCR with high-fidelity Platinum[®] Pfx DNA polymerase (Invitrogen). PCR products were inserted into the pDONR201 vector. The sequence was verified, and plasmids carrying unmutated inserts were used to create an in-phase protein fusion with an N-terminal His₆ tag under the control of a T7 promoter in the pDEST17 vector. These recombinant vectors were transformed in the BL21(DE3) and Rosetta (DE3) *E. coli* strains, with or without the pLysS plasmid (Novagen). Various culture conditions were tested to obtain soluble protein expression: the concentration of IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside) ranging from 0.1 mM to 1 mM, different culture media [LB (Luria–Bertani) and M9] and various induction temperatures (15, 20, 25, 30 and 37°C). After centrifugation

of the culture medium (15 000 g for 30 min), the cell pellets were disrupted using BugBuster[™] protein extraction reagent (Novagen). The cellular extracts were centrifuged (40 000 g for 10 min) and the resulting insoluble and soluble fractions were analysed by SDS/PAGE in reducing conditions with Coomassie Blue staining.

Inclusion bodies of recombinant λ -carrageenase were also obtained by expression in the BL21(DE3) *E. coli* strain incubated in LB medium at 37°C for 6 h induction with 1 mM IPTG. These inclusion bodies were purified using BugBuster[™] solution according to the manufacturer's protocol (Novagen) and were solubilized in 50 mM Tris buffer (pH 8) containing 8 M urea. The λ -carrageenase solution (500 μ g/ml) was diluted 50 times in a buffer containing 0.5 % λ -carrageenan in 0.1 M NaNO₃ (pH 7.5). The reaction medium was incubated for 96 h at 30°C or for 2 weeks at 20°C. The release of λ -oligosaccharides was visualized using C/PAGE (carbohydrate/PAGE) [30].

Size-exclusion chromatography of neo- λ -carrabiose oligosaccharides

Analysis and fractionation of digested and undigested λ -carrageenan samples were performed according to a modified version of the protocol of Knusten et al. [31]. After filtration through a 0.22 μ m membrane (Millipore), 500 μ l of the sample [0.25 % (w/v)] was injected on to a semi-preparative Superdex 30 column [600 \times 16 mm i.d. (internal diameter); GE Healthcare]. Elution was performed with 50 mM (NH₄)₂CO₃ at a flow rate of 1 ml/min. Detection was achieved by a differential refractometer (Spectra System RI-50) connected to a computer equipped with the Datalys acquisition software.

HPLC (high-performance anion-exchange chromatography)

Oligosaccharide mixtures [0.25 % (w/v)] were filtered through a 0.22 μ m membrane (Millipore) and injected on to an analytical AS11 column (20 μ l; 4 \times 250 mm Ion Pac[®]; Dionex) coupled with an AS11 guard column. The elution was conducted at a flow rate of 0.5 ml/min with a NaOH (280 mM) step gradient (0–4 min: 3–5 %, 4–6.5 min: 5–30 %, 6.5–15 min: 30–57.5 %, 15–26 min: 57.5–100 %) monitored by a GP40 gradient pump (Dionex). Oligosaccharides were detected by conductivity using an ASRS ultra-4 mm (Dionex). Acquisition of the chromatogram was achieved with Chromeleon Peak Net software.

LC-MALLS

Filtered hydrolysed samples (200 μ l; 0.25 % in 0.1 M NaNO₃) were injected (using a Waters 717 plus Autosampler, controlled by a Waters 6005 controller) on to a Superdex S200 HR column (300 \times 10 mm i.d.; GE Healthcare). Elution was performed with 0.1 M LiNO₃ [R.I. (refractive index) = 1.327]] at a flow rate of 0.5 ml/min (Waters 626 pump) at 25°C. This HPLC system was coupled to a Waters 2414 R.I. detector, used as a mass-sensitive detector, working at 890 nm at 35°C. MALLS measurements were performed at 690 nm with a DAWN EOS system (Wyatt Technology) equipped with a 30 mW gallium arsenide linearly polarized laser. The intensity of scattered light was measured at 12 different angles, from 35° to 143°. Chromatographic data were collected and processed using the Astra software (Wyatt Technology). The Zimm fit method was used for molecular mass determinations. The calculated dn/dc (refractive index increment) was 0.115 ml/g. BSA monomer (Sigma) was used to normalize the signals recorded at various angles of detection, with the signal measured at 90°.

¹H-NMR spectroscopy analysis of the hydrolysis mechanism

Experiments were performed with λ -carrageenan [0.5% (w/v)] and purified native λ -carrageenase (8.4 μ g/ml) dialysed against 0.1 M NaNO₃ in 99.97 atom% ²H₂O at 10°C. The enzyme (500 μ l) was added to 5 ml of substrate equilibrated at 30°C. At chosen times of hydrolysis, 500 μ l of hydrolysate was transferred into a 5 mm NMR tube and ¹H-NMR spectra were recorded at 70°C. NMR analyses were achieved with a BRUKER Advance DRX 500 spectrometer equipped with an indirect 5 mm gradient probehead TXI ¹H/¹³C/³¹P. Spectra were recorded using 32K data points and the parameters were as follows: pulse angle, 30°; sweep width, 10330 Hz; acquisition time, 1.58 s; relaxation delay, 2 s. The number of scans was 64 for $t = 0$ and $t = 1$ min and 128 for each subsequent point of the time course, digital resolution being of 0.31 Hz/point. Chemical shifts are expressed in p.p.m. based on the external reference TSP (trimethylsilylpropionic acid).

Synthesis and enzymatic digestion of fluorescent oligosaccharides

The protocol for the derivatization of sugar reducing ends using AMAC from Goubet et al. [32] was applied to the oligo- λ -carrageenan series. Mixtures of DP (degree of polymerization) 4 and DP6 oligo- λ -carrageenans obtained after overnight enzymatic digestion (see above) were labelled according to the protocol described by Goubet et al. [32]. After the grafting reaction had added the AMAC to the reducing ends, the samples were freeze-dried, dissolved in 50 mM (NH₄)₂CO₃, filtered and then purified by size-exclusion chromatography (Superdex 30 preparative grade column, 600 \times 26 mm i.d.; GE Healthcare). The elution was performed in 50 mM (NH₄)₂CO₃ running at 102 ml/h. The pure fluorescent oligosaccharides (DP4 and DP6) were collected, freeze-dried and stored at 4°C. Fluorescent oligo- λ -carrabiose (DP2) was obtained using the protocol of Goubet et al. [32] using purified DP2 as a substrate [6]. Since DP2 was eluted with salts and other small molecules, it could not be purified by size-exclusion chromatography. Therefore fluorescent DP2 was purified by C/PAGE [27% (w/v)] [30]. The fluorescent band corresponding to the labelled DP2 was excised, ground and allowed to diffuse in a small amount of water at 4°C. After 24 h, the fluorescent DP2 was recovered, freeze-dried and stored at 4°C.

Enzymatic digestion of fluorescent oligo- λ -carrageenans was achieved by incubating about 1 mg of pure oligosaccharide in 50 μ l of 0.1 M NaNO₃ with 3 pmole of λ -carrageenase overnight at 30°C. The AMAC grafted on to the oligosaccharides does not substantially alter the mode of binding of substrates to the enzyme. The time course of digestion was monitored by C/PAGE [27% (w/v)] running at 20 mA for 30 min [30]. The migration front of the fluorescent oligosaccharides was visualized using an UV transilluminator BioDoct-It™ system (UVP) emitting light at 302 nm. An equimolar mixture of purified fluorescent DP2, DP4 and DP6 in 0.1 M NaNO₃ was used as a standard.

RESULTS

Purification of the extracellular λ -carrageenase from *P. carrageenovora*

P. carrageenovora was grown in the presence of λ -carrageenan in order to induce production of the enzyme [19]. The λ -carrageenase was secreted into the extracellular medium. As previously reported by Greer [20], optimal protein production occurred at the early stationary phase (at 48 h). Purification to electrophoretic homogeneity of the enzyme from the concentrated culture supernatant (5 litres) was achieved in three

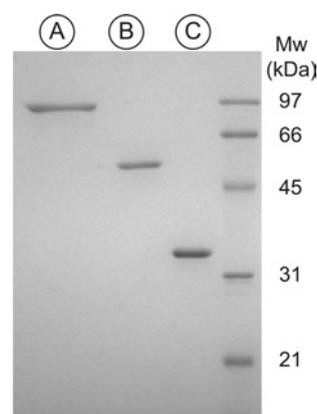


Figure 1 PAGE of carrageenases

SDS/PAGE analysis under reducing conditions of the purified native λ -carrageenase from *P. carrageenovora* (A). For comparison, the recombinant ι -carrageenase from *A. fortis* (B) and the recombinant κ -carrageenase from *P. carrageenovora* (C) were also loaded onto the gel.

steps: protein precipitation with ammonium sulfate at 30–70% saturation, followed by hydrophobic interaction chromatography on Phenyl Sepharose, and finally size-exclusion chromatography on Superdex 200 (total protein amount was 85 mg; initial specific activity was 1.75 μ mol/min/mg; pure protein amount was 0.5 mg; final specific activity was 30 μ mol/min/mg; recovery was 10%). During the last chromatography step, the enzyme eluted as a single peak, with an apparent molecular mass of 78 kDa. This protein fraction migrated as a single band in SDS/PAGE analysis, corresponding to a higher apparent molecular mass of 97 kDa (Figure 1). This protein band was excised and one N-terminal and two internal peptide sequences were determined by Edman degradation, SQSAIKSIETNRTITK, YSYDDMWK and LSAGYDNSDGIS. These are referred to as A, B and C respectively (see the Supplementary data at <http://www.BiochemJ.org/bj/404/bj4040105add.htm>).

The λ -carrageenase gene *cgIA*

A gene probe of 943 nt was synthesized by PCR using degenerate oligonucleotide primers designed from the peptide sequences A and B. Southern blot experiments with this probe showed that *P. carrageenovora* contained only one copy of the λ -carrageenase gene. The same probe was used to screen a genomic library prepared with *P. carrageenovora* total DNA. Of the 6000 clones in the library, 14 clones hybridized with the probe, with an insert size ranging from 4 to 20 kb. Among them, three clones, referred to as pAT153la38, pAT153la45 and pAT153la53, were chosen for the moderate size of their inserts (3.8, 6.1 and 5 kb respectively) and were subjected to physical mapping. Restriction analyses indicated that the three inserts corresponded to the same genomic DNA fragment, with a common region of 3.7 kb. The insert of plasmid pAT153la45 was completely sequenced, yielding a nucleotide sequence of 5665 nt. Three ORFs are predicted in this sequence, ORF1 and ORF2 on the direct strand and ORF3 on the reverse strand. Whereas ORF1 corresponded only to the 3'-end of a gene, ORF2 and ORF3 were complete (2826 and 891 nt respectively). The amino acid sequence deduced from ORF2 contains the peptide microsequences A, B and C, indicating that this ORF corresponds to the gene coding the λ -carrageenase (see Supplementary data at <http://www.BiochemJ.org/bj/404/bj4040105add.htm>). To be consistent with the κ - and ι -carrageenase gene names, *cgkA* and *cgIA* respectively [9,15], the λ -carrageenase gene is referred to as

cglA. Two hexamers separated by 17 nt, TTGACg and TAaAct, were found in the 5'-non-coding region of *cglA* (the capital letters correspond to the nucleotides found in the consensus promoter of *E. coli*). These sequences, located 68 nt upstream of the start codon (ATG²¹⁷), were reminiscent of the -35 and -10 consensus promoter sequences in *E. coli* [33]. The hexamer AGGAat located 5 nt upstream of the start codon is likely to be a Shine–Dalgarno ribosome-binding site [34]. In the 3'-non-coding region, two inverted-repeats were detected by the Mfold program. These repeats could constitute a transcription terminator hairpin (see Supplementary data at <http://www.BiochemJ.org/bj/404/bj4040105add.htm>). The stem region shows a high GC content and displays the main characteristics of *E. coli* rho-independent terminators [35].

Sequence analyses of the *CglA* gene product

Translation of the λ -carrageenase gene *cglA* yielded a pre-protein of 942 amino acids with a theoretical molecular mass of 105 kDa. The program SignalP v3.0 predicted a clear signal peptide with cleavage between Ala²⁵ and Ser²⁶, using both the Neural Networks and Hidden Markov Models algorithms [26]. This prediction was consistent with the N-terminal sequence of the extracellular λ -carrageenase.

A sequence similarity search using the program BLASTp [27] indicated that there was no protein in the UniProt database homologous to the full-length λ -carrageenase. About 75% of the sequence had no significant similarity with known proteins. Only the N-terminal part of CglA displayed low sequence similarity with conserved hypothetical proteins with various lengths and annotations, such as bacterial quinoprotein (trEMBL code: Q6M0H6; 282 residues), YxaL protein (P42111; 410 residues) or cell-surface protein MA_0850 (Q8TSE8; 2275 residues). The length of the matches with CglA varied between 100 and 260 residues, with 25–30% pairwise sequence identities. In all these proteins, the homologous region corresponds to several consecutive repeats belonging to various Pfam families (WD40, FG-GAP, BNR or PQQ repeats), which are included in the Pfam β -propeller clan [36]. A domain search with InterProScan [28] identified an N-terminal quinoprotein alcohol dehydrogenase-like domain (164 residues; E-value: 2.8 E-13), which adopts a 8-bladed β -propeller fold (SCOP classification, [37]).

Using the SEG program [29], a low-complexity region was identified in the middle of the CglA sequence, between Arg⁴⁶⁷ and Asn⁴⁷⁵. A hydrophobic cluster analysis [38] confirmed the absence of secondary structure in this region, which can even be extended to Ala⁴⁶¹–Asn⁴⁷⁵.

Attempts to overexpress the λ -carrageenase CglA

Despite the numerous conditions attempted to obtain a soluble λ -carrageenase in *E. coli*, the recombinant protein was systematically expressed as insoluble inclusion bodies (Figure 2A). These inclusion bodies were purified and solubilized in 8 M urea. The recombinant, unfolded λ -carrageenase (500 μ g/ml) was diluted 50-fold in the presence of its substrate [0.5% λ -carrageenan in 0.1 M NaNO₃ (pH 7.5)]. After 96 h incubation at 30°C, C/PAGE analysis revealed the release of λ -carrageenan oligosaccharides, including the main terminal products, neo- λ -carratetraose and neo- λ -carrahaexaose (Figure 2B, lane 3). The reaction appeared complete after 2 weeks incubation at 20°C (Figure 2B, lane 4). This pattern of degradation is identical with that obtained with pure, native λ -carrageenase (0.7 μ g/ml) after 24 h incubation at 30°C (Figure 2B, lane 1). Therefore this refolding experiment succeeded in restoring a fraction of active, recombinant λ -carrageenase, even though the yield was very low.

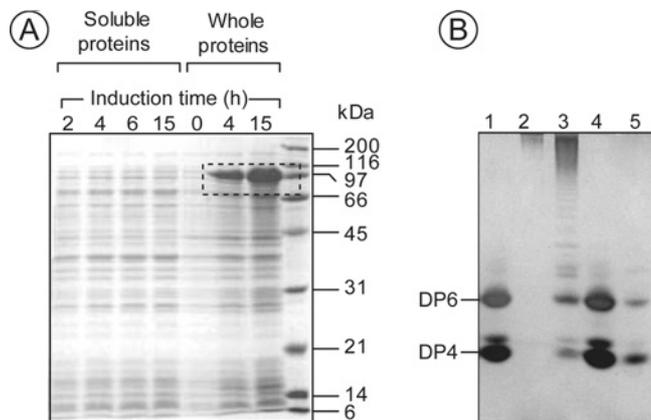


Figure 2 Analysis of the recombinant λ -carrageenase

(A) SDS/PAGE analysis under reducing conditions of λ -carrageenase expression in *E. coli* as a function of induction time. The same volume of each sample (15 μ l) was loaded on to the gel. (B) Analyses by C/PAGE of λ -carrageenase activities. λ -Carrageenan oligosaccharides released by the purified wild-type enzyme (lane 1), by the control, refolding buffer (lane 2), by the refolded recombinant enzyme after 96 h at 30°C (lane 3) and 2 weeks at 20°C (lane 4). The main final products, the purified neo- λ -carratetraose and neo- λ -carrahaexaose, were loaded on to lane 5 as references.

Kinetics of degradation of λ -carrageenan by CglA

Digestion kinetics were assayed by measuring the production of reducing ends occurring as a function of time. The curves had a classical shape, having a single exponential form with the asymptote proportional to the amount of substrate (results not shown). The kinetic parameters (K_m , k_{cat}) of the enzyme were tentatively estimated. However the low reactivity of the reducing ends prevented kinetic experiments at low substrate concentration, as did the high viscosity of the λ -carrageenan at high concentrations [above 1% (w/v)]. In addition, applying the test of Selwin [39], we found that the enzyme activity decreased during kinetic experiments. Therefore we were not able to unambiguously calculate the Michaelis constants.

The time course of λ -carrageenan depolymerization was monitored by LC-MALLS (Figure 3). As soon as the enzymatic digestion began, the molecular mass of λ -carrageenan rapidly decreased. The initial molecular mass, which was estimated to be 1430 kDa, diminished to about 180 kDa after 5% degradation (Figure 3A). For the same amount of cleaved linkages, the index of polydispersity increased more than three times (Figure 3B). Furthermore, a linear correlation was obtained between the reciprocal of the molecular mass ($1/M_n$) and the incubation time (Figure 3B). This corresponds to a first-order random depolymerization which can be described by the equation [40,41]:

$$1/M_t = 1/M_0 + kt$$

In this expression, M_t and M_0 are the molecular masses at time t and zero time respectively. This linear relation between inverse molecular mass and degradation time has also been used to describe the acid hydrolysis of carrageenans [41–43].

Analysis of the cleavage of glycosidic bonds

The oligo- λ -carrageenans produced by various degrees of enzymatic degradation were observed by size-exclusion chromatography. The high-molecular-mass polymeric fraction (60–70 min retention time) was converted into oligosaccharides (95–135 min) as the degradation proceeded (Figure 4). These

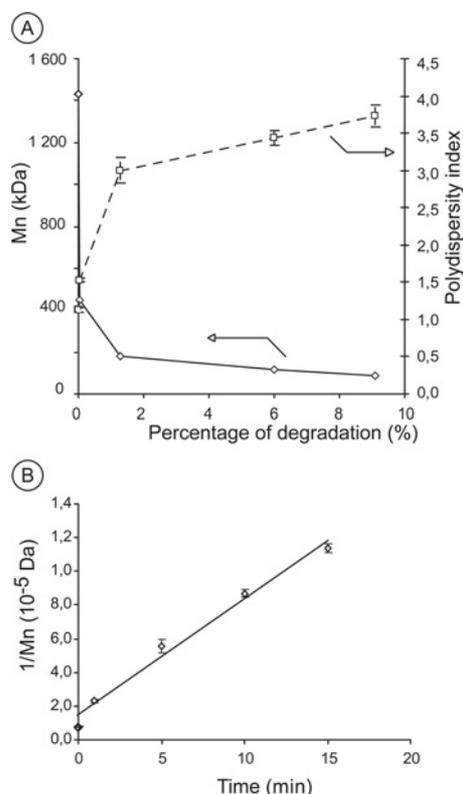


Figure 3 Kinetics of λ -carrageenan depolymerization

(A) Variation, determined by LC-MALLS, in the the molecular mass (M_n) and the polydispersity of the λ -carrageenan as a function of the percentage of degradation. (B) Linear increase of the reciprocal molecular mass ($1/M_n$) versus the time of hydrolysis.

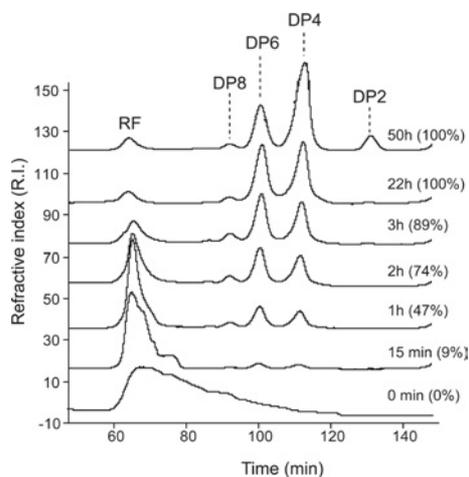


Figure 4 Size-exclusion chromatography of the digestion products of the λ -carrageenan following incubation with the λ -carrageenase CgIA

The profiles were recorded at several times of incubation which were correlated with percentages of degradation (in parentheses) determined by the reducing-sugar assay. DP2 to DP8 correspond to the peaks of the neo- λ -carrabiose to the neo- λ -carraoctaose respectively. RF, resistant fraction.

oligosaccharides, which were purified and analysed by ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy [6], belonged to the neo-carrabiose series. During the first period of digestion (0–3 h), only

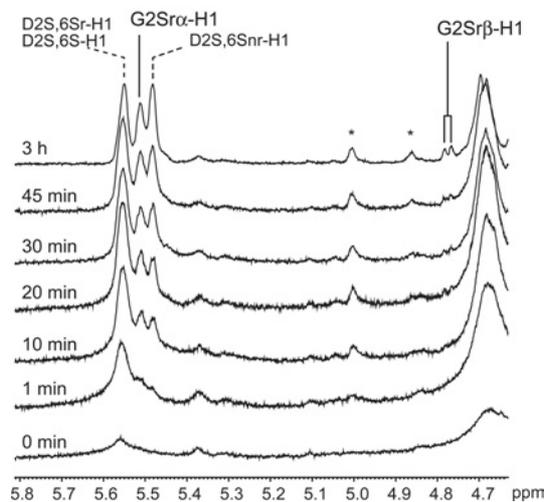
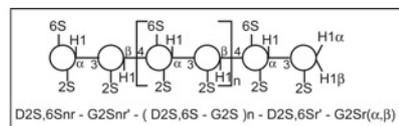


Figure 5 ^1H -NMR monitoring of the hydrolysis of λ -carrageenan by the λ -carrageenase CgIA

The region of the spectra containing the protons assigned to the α - and β -anomers is detailed. Note that the intensity of the $\text{G2Sr}\alpha\text{-H}_1$ and D2S,6Sr-H_1 increase with a similar rate at the beginning of the digestion until the peak assigned to $\text{G2Sr}\beta\text{-H}_1$ appears.

oligosaccharides ranging from the DP4 (G2S-D2S,6S)₂ to DP8 (G2S-D2S,6S)₄ were detected. Oligosaccharides of a higher degree of polymerization were detected only in very low amounts, when observed by SEC or by HPAEC. The main digestion products were DP6 and DP4, the signal of DP6 being the most intense throughout the depolymerization reaction. After digestion of the entire high-molecular-mass carrageenan fraction (22–50 h), the amount of DP4 continued to increase while the level of DP6 seemed to decrease in parallel with a slow production of DP2. This suggested that the enzyme can slowly cleave DP6 into DP4 and DP2.

The enzymatic hydrolysis of λ -carrageenan was also monitored by ^1H -NMR spectroscopy (Figure 5). ^1H -NMR spectrum of the undigested polysaccharide presented very broad signals attributed to the high viscosity of the macromolecules. After 10 min of enzymatic degradation the viscosity diminished, resulting in an improvement of the spectrum resolution. New signals appeared, assignable to the newly formed reducing and non-reducing ends. The broad peak assignable to undigested substrate (5.55 p.p.m.) was split into three distinct signals which were ascribed to the anomeric protons in α -configuration at the reducing end ($\text{G2Sr}\alpha\text{-H}_1$, 5.52 p.p.m.), non-reducing end (D2S,6Sr-H_1 , 5.48 p.p.m.) and internal (D2S,6S-H_1 , 5.56 p.p.m.). Integration of $\text{G2Sr}\alpha\text{-H}_1$ and D2S,6Sr-H_1 revealed that the intensity of these signals increased at the same rate for the first 20 min. The $\text{G2Sr}\alpha\text{-H}_1/\text{D2S,6Sr-H}_1$ ratio was displaced in favour of the non-reducing end signal, this being compensated by the appearance of the $\text{G2Sr}\beta\text{-H}_1$ signal. When the anomeric equilibrium was reached, the α/β -anomer ratio was about 75 %, as previously determined [6].

Characterization of the active site organization of CgIA

To identify the subsite architecture of the active site, the mode of cleavage of neo- λ -carrabiose oligosaccharides was investigated.

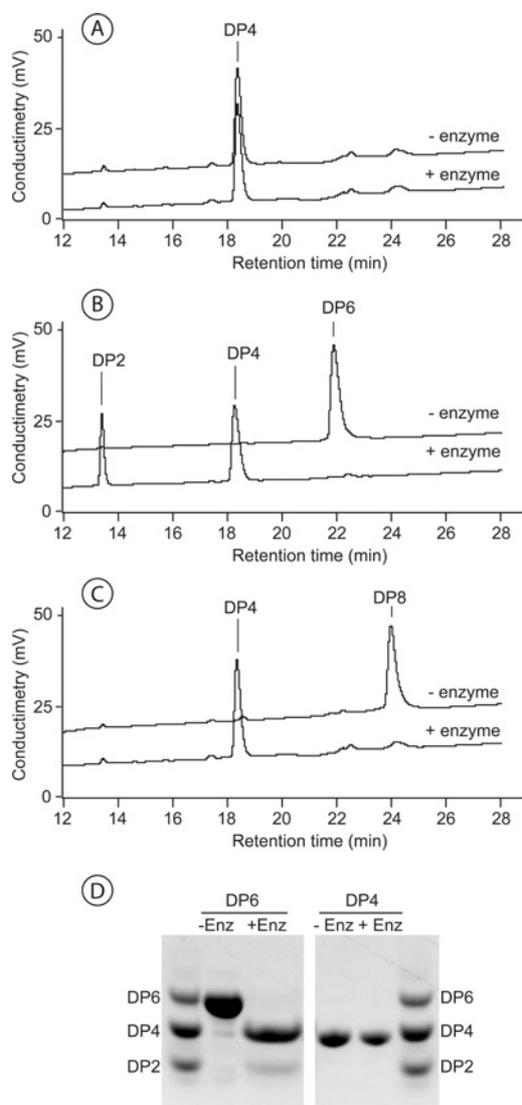


Figure 6 Modality of oligo- λ -carrageenan digestion by the λ -carrageenase

HPAEC of purified (A) neo- λ -carratetraose, (B) neo- λ -carraxaose and (C) neo- λ -carraxaose incubated with the λ -carrageenase. (D) FACE (fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis) experiment conducted on fluorescent neo- λ -carratetraose and neo- λ -carraxaose labelled at their reducing end with AMAC. A mixture of labelled DP2, DP4 and DP6 were used as a migration standard.

Purified DP4 (Figure 6A) and DP2 (results not shown) were not further degraded by λ -carrageenase demonstrating that these oligosaccharides were end-products of the enzyme. DP8 was only split into DP4 (Figure 6C), suggesting that the active site of CgIA consists of at least 8 subsites, numbered from -4 to $+4$ according to the nomenclature of Davies et al. [44] (Figure 7). As expected from size-exclusion chromatography analysis, DP6 was slowly converted into DP4 and DP2 (Figure 6B). The cleavage position was determined using fluorescent DP6 labelled with AMAC on its reducing end. Degradation of fluorescent DP6 gave rise to the production of fluorescent DP4 at the same concentration, indicating that the DP6 bound to subsites -2 to $+4$ leading to the cleavage of the glycosidic bond between the fourth and the fifth galactose moieties starting from the reducing end (Figure 7).

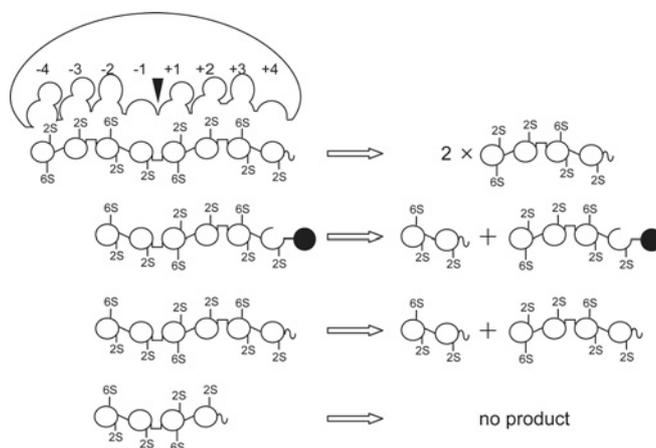


Figure 7 Subsite organization of the λ -carrageenase active site

The subsites are labelled from -4 to $+4$. The black arrowhead indicates the position of the glycosidic bond cleavage. The circles represent the β -galactose moieties. The black circle represents the AMAC labelling of the reducing ends.

DISCUSSION

The λ -carrageenase CgIA is the first representative of a new GH family

The λ -carrageenase from *P. carrageenovora* was purified to electrophoretic homogeneity. Size-exclusion chromatography indicated that this enzyme existed as a monomer in solution. The gene coding the λ -carrageenase was cloned and sequenced using information from the peptides A and B that were sequenced from the purified enzyme. Several lines of evidence indicate that the correct gene has been cloned: (i) the sequence of the *cglA* gene product features the peptide sequences found in the wild-type protein, including the peptide C which was not used for the cloning (peptide A, Ser²⁶–Lys⁴¹; peptide B, Tyr³³⁸–Lys³⁴⁵; peptide C, Leu⁴⁸⁷–Ser⁴⁹⁸); (ii) despite a low-refolding yield, λ -carrageenase activity was restored from the insoluble, recombinant protein CgIA; based on C/PAGE analysis, this fraction of active, recombinant enzyme released an oligosaccharide pattern identical with that of the wild-type λ -carrageenase. In the presence of λ -carrageenan, the Gram-negative bacterium *P. carrageenovora* exports the λ -carrageenase CgIA into the extracellular medium. The N-terminal sequencing of CgIA and the analysis of its sequence by SignalP v3.0 [26] are consistent with the cleavage of the precursor enzyme by the signal peptidase I and an initial targeting to the periplasm.

In the sequence databases, no proteins similar to CgIA were found. The low-complexity region Ala⁴⁶¹–Asn⁴⁷⁵ is likely to be a flexible linker connecting at least two independent structural domains. The C-terminal region of CgIA (Tyr⁴⁷⁶–Leu⁹⁴²) displays no significant similarity with any known protein. The N-terminal region exhibits low, but significant sequence similarities with numerous conserved proteins that adopt the β -propeller fold. These observations are consistent with the identification of a N-terminal β -propeller domain by the server InterProScan [28]. According to the number of blades (repeats of four-stranded anti-parallel β -sheets), the length of this domain in λ -carrageenase may vary between ~ 200 residues (4-bladed β -propeller) and ~ 400 residues (8-bladed β -propeller) [45]. Several families of GHs possess a β -propeller fold: the clan GH-E sialidases/neuraminidases (families GH33, 34 and 83), the xylanases and arabinases of the clan GH-F (families GH43 and 62) and the clan GH-J (families GH32 and 68)

which includes invertases and fructosidases (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>, [11]). However, proteins with a β -propeller fold are not limited to carbohydrate metabolism. Many are involved in other types of enzymatic reactions (proteolysis, oxido-reduction, etc.), but also in non-catalytic functions, such as ligand transport and protein–protein interactions [45]. Therefore it is difficult to predict whether this β -propeller domain is the catalytic domain of the λ -carrageenase. In order to define the limits of the domain, we have attempted mild proteolysis of the purified λ -carrageenase with trypsin and pepsin. Unfortunately, we did not succeed in isolating defined domains (results not shown).

Altogether, the λ -carrageenase from *P. carrageenovora* defines a new family of GHs, unrelated to the GH16 κ -carrageenase and the GH82 ι -carrageenase families. This enzyme most likely has a modular architecture with at least two domains connected by a linker, including a β -propeller domain at the N-terminus. Nevertheless, the catalytic domain of the λ -carrageenase remains to be identified.

The λ -carrageenase CglA is a β -(1 \rightarrow 4) endo-galactanase

As shown by NMR analyses [6], the oligosaccharides released by the λ -carrageenase belong to the neo-carrabiose series, indicating that this enzyme cleaves the β -(1 \rightarrow 4) linkages of λ -carrageenan. $^1\text{H-NMR}$ monitoring of the enzymatic degradation of λ -carrageenan revealed that α -anomeric signals were initially produced and progressively gave rise to β -anomers when mutarotation took place. Therefore the λ -carrageenase proceeds according to a mechanism of inversion of the anomeric configuration. The LC-MALLS experiments showed that CglA catalyses a rapid decrease in the molecular mass of λ -carrageenan, as well as an increase in the polydispersity. Furthermore, the linear decrease of the reciprocal M_n as a function of time strongly supports a reaction model involving random depolymerization of polysaccharide chains, as described for the acid hydrolysis of λ -carrageenan. Therefore the λ -carrageenase CglA follows a random, endolytic mode of action.

Size-exclusion chromatography revealed a high production of DP6 from the onset of hydrolysis. This production of DP6 is an indication of the non-processive character of CglA. Indeed, the alternation of β -(1 \rightarrow 4) and α -(1 \rightarrow 3) linkages in carrageenans results in two successive β -(1 \rightarrow 4) linkages alternatively pointing up and down. A processive carrageenase, which slides along the polysaccharide chain, would encounter a β -(1 \rightarrow 4) linkage in the correct orientation for the cleavage only every two disaccharide units. Therefore processive carrageenases should release neo-carratetraoses (DP4) or oligo-carrageenans multiples of DP4 [12]. This is reminiscent of processive cellulases which release only cellobioses, since the cellulose chain adopts a 2-fold screw axis which exposes cleavable β -(1 \rightarrow 4) linkages only every two glucose units. In this context, the release of DP6 by λ -carrageenase requires the dissociation of the enzyme and is necessarily produced by a strict, endolytic mode of action.

However, it was difficult to observe oligosaccharides with a DP higher than eight using SEC or HPAEC. We interpret the very low abundance of medium-size fragments of λ -carrageenan as being a result of the physicochemical properties of this biopolymer. λ -Carrageenan chains have a fairly rigid conformation, which is due to the repulsive interaction of the sulfate ester groups, thus forming a highly viscous solution. The smaller-size molecules are more flexible and more diffusible in viscous solution than higher molecular mass molecules. Therefore as soon as they are produced, intermediate or low-molecular-mass fragments are likely to be more accessible to the enzyme than larger chains. According to this scheme, the λ -carrageenase

would discriminate between the high- and low-molecular-mass carrageenan molecules on the basis of their ability to diffuse in to the medium.

Insights into the evolution of carrageenase families

Even if κ -, ι -, and λ -carrageenans are related sulfated galactans, our current knowledge indicates that the enzymes specific for their degradation are dissimilar and have emerged as three independent families of GHs. More generally, we now have six families of GHs encompassing enzymes degrading sulfated polysaccharides: families GH16 (κ -carrageenases, keratanases), GH79 (heparanases), GH82 (ι -carrageenases), a new GH family specific for the degradation of sulfated fucans [46] and two unclassified enzymes, *Bacillus circulans* keratanase II [47] and *P. carrageenovora* λ -carrageenase (the present study). With the exception of the GH16 family, all these families encompass enzymes that interact exclusively with anionic polysaccharides. In contrast, κ -carrageenases and keratan sulfate endo- β -(1 \rightarrow 4)-galactosidase [48] fall into the GH16 family, which mainly encompasses enzymes acting on neutral polysaccharides [11] with a common ancestor that is likely to be a laminarinase [9,12]. However, keratan sulfate galactosidase [49] and κ -carrageenases are specific for moderately negatively charged patterns, with one sulfate group only per disaccharide unit. Moreover in κ -carrageenase, the nucleophilic attack on the C1 anomeric carbon occurs on the neutral face of the G4S bound in subsite -1 [12]. Thus the catalytic machinery is not strongly influenced by the presence of the sulfate group of G4S. Altogether, the current data suggest that enzymes specific for sulfated polysaccharides could emerge from within GH families more adapted to neutral polysaccharides, if they degrade moderately sulfated polymers which do not affect the ancestral catalytic machinery. In contrast, enzymes acting on highly sulfated polysaccharides are more likely to define new GH families.

Like κ - and ι -carrageenases, λ -carrageenase cleaves the β -(1 \rightarrow 4) glycosidic linkage of its substrate. No enzyme hydrolysing the α -(1 \rightarrow 3) linkage of carrageenans has been found yet. This might be due to intrinsic properties of carrageenans; for instance, a lower energy is perhaps needed for the hydrolysis of the β -(1 \rightarrow 4) linkage in these sulfated galactans. Another possibility is that the sulfate groups which flank the α -(1 \rightarrow 3) linkage in κ -, ι - and λ -carrageenans are a steric obstacle to the hydrolysis of this glycosidic bond. In contrast with κ -carrageenases, ι - and λ -carrageenases proceed according to a mechanism of inversion of the anomeric configuration. Most likely these similar inverting mechanism are fortuitous. But, it is also possible that high density of sulfate groups constrains the catalysis, particularly the retaining mechanism. Indeed a retaining mechanism usually involves large conformational changes of the substrate between the relaxed state, the transition state and the covalent glycosyl-enzyme intermediate [50]. Such large conformational changes are unlikely to occur in highly sulfated polysaccharides. Indeed, these biopolymers are fairly rigid, as a result of the repulsive interactions between the sulfate groups and of the steric hindrance of these bulky substituents. A sulfate group in the vicinity of the glycosidic bond may also preclude the formation of a covalent intermediate with the nucleophile catalytic residue for steric reasons. This is likely the case for λ -carrageenan whose β -linked galactose moiety is 2-sulfated (D2S,6S-G2S). For all these reasons, the inverting mechanism might be more favourable for GHs acting on highly sulfated polysaccharides.

Finally, the mode of action of *P. carrageenovora* λ -carrageenase is not processive, in contrast with that already demonstrated for the *A. fortis* ι -carrageenase [17] and strongly suggested for the

P. carrageenovora κ -carrageenase on the basis of its tunnel-shaped active site topology [12]. Interestingly, the substrates of κ - and ι -carrageenase are gels made of crystalline fibres. These two enzymes seemed to have adopted a processive mode of action as an efficient strategy to digest solid fibres. In contrast, the endo-character of the λ -carrageenase seems more appropriate than a processive mode of action, in order to rapidly liquefy a viscous solution of polysaccharides.

This work was supported by the CNRS [Centre National de la Recherche Scientifique; ATIPE (Action Thématique et Incitative sur Programme et Equipes) programme] and the Région Bretagne [PRIR (Projet de Recherche d'Intérêt Régional)] BioFIN12 programme. M. G. acknowledges Degussa Texturant System and the CNRS, for the financial support of her doctoral thesis. S. C. was the recipient of a Ph.D. fellowship co-funded by the ANRT (Association Nationale de la Recherche Technique) and Laboratoires Goëmar, whose aid is gratefully acknowledged. We are grateful to Dr Mirjam Czjzek for helpful discussion.

REFERENCES

- Kloareg, B. and Quatrano, R. (1988) Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol.* **26**, 259–315
- Craigie, J. (1990) in *Biology of the Red Algae* (Cole, K. and Sheath, R., eds), pp. 221–257. Cambridge University Press, Cambridge
- McHugh, D. J. (2003) in *FAO Fisheries Technical Paper No 441* (FAO, ed.), FAO, Rome, Italy
- Knutsen, S., Myslabodski, D., Larsen, B. and Usov, A. (1994) A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Bot. Mar.* **37**, 163–169
- Morris, E. R., Rees, D. A. and Robinson, G. (1980) Cation-specific aggregation of carrageenan helices: domain model of polymer gel structure. *J. Mol. Biol.* **138**, 349–362
- Guibet, M., Kervarec, N., Genicot, S., Chevolut, Y. and Helbert, W. (2006) Complete assignment of (1)H and (13)C NMR spectra of *Gigartina skottsbergii* λ -carrageenan using carrabiose oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis. *Carbohydr. Res.* **341**, 1859–1869
- Michel, G., Nyval-Collen, P., Barbeyron, T., Czjzek, M. and Helbert, W. (2006) Bioconversion of red seaweed galactans: a focus on bacterial agarases and carrageenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 23–33
- Barbeyron, T., Henrissat, B. and Kloareg, B. (1994) The gene encoding the κ -carrageenase of *Alteromonas carrageenovora* is related to β -1,3-1,4-glucanases. *Gene* **139**, 105–109
- Barbeyron, T., Gerard, A., Potin, P., Henrissat, B. and Kloareg, B. (1998) The κ -carrageenase of the marine bacterium *Cytophaga drobachiensis*. Structural and phylogenetic relationships within family-16 glycoside hydrolases. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 528–537
- Henrissat, B. and Bairoch, A. (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**, 695–696
- Coutinho, P. M. and Henrissat, B. (1999) in *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering* (Gilbert, H. J., Davies, G., Henrissat, B. and Svensson, B., eds), pp. 3–12. The Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Michel, G., Chantalat, L., Duee, E., Barbeyron, T., Henrissat, B., Kloareg, B. and Dideberg, O. (2001) The κ -carrageenase of *P. carrageenovora* features a tunnel-shaped active site: a novel insight in the evolution of Clan-B glycoside hydrolases. *Structure* **9**, 513–525
- Jam, M., Flament, D., Allouch, J., Potin, P., Thion, L., Kloareg, B., Czjzek, M., Helbert, W., Michel, G. and Barbeyron, T. (2005) The endo- β -agarases AgaA and AgaB from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans*: two paralogous enzymes with different molecular organizations and catalytic behaviours. *Biochem. J.* **385**, 703–713
- Potin, P., Richard, C., Barbeyron, T., Henrissat, B., Gey, C., Petillot, Y., Forest, E., Dideberg, O., Rochas, C. and Kloareg, B. (1995) Processing and hydrolytic mechanism of the *cgkA*-encoded κ -carrageenase of *Alteromonas carrageenovora*. *Eur. J. Biochem.* **228**, 971–975
- Barbeyron, T., Michel, G., Potin, P., Henrissat, B. and Kloareg, B. (2000) ι -Carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of κ -carrageenases. *J. Biol. Chem.* **275**, 35499–35505
- Michel, G., Chantalat, L., Fanchon, E., Henrissat, B., Kloareg, B. and Dideberg, O. (2001) The ι -carrageenase of *Alteromonas fortis*. A β -helix fold-containing enzyme for the degradation of a highly polyanionic polysaccharide. *J. Biol. Chem.* **276**, 40202–40209
- Michel, G., Helbert, W., Kahn, R., Dideberg, O. and Kloareg, B. (2003) The structural bases of the processive degradation of ι -carrageenan, a main cell wall polysaccharide of red algae. *J. Mol. Biol.* **334**, 421–433
- Weigl, J. and Yaphe, W. (1966) The enzymic hydrolysis of carrageenan by *Pseudomonas carrageenovora*: purification of a κ -carrageenase. *Can. J. Microbiol.* **12**, 939–947
- Johnston, K. and McCandless, E. (1973) Enzymatic hydrolysis of potassium chloride soluble fraction of carrageenan: properties of ' λ -carrageenases' from *Pseudomonas carrageenovora*. *Can. J. Microbiol.* **19**, 779–788
- Greer, C. W. (1984) A study of carrageenases from marine bacteria. Ph.D. thesis at The Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, Canada
- Kidby, D. K. and Davidson, D. J. (1973) A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. *Anal. Biochem.* **55**, 321–325
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Barbeyron, T., Kean, K. and Forterre, P. (1984) DNA adenine methylation of GATC sequences appeared recently in the *Escherichia coli* lineage. *J. Bacteriol.* **160**, 586–590
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Zuker, M., Mathews, D. H. and Turner, D. H. (1999) *Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide*, pp. 11–43, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**, 783–795
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R. and Lopez, R. (2005) InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res.* **33**, 116–120
- Wootton, J. C. and Federhen, S. (1996) Analysis of compositionally biased regions in sequence databases. *Methods Enzymol.* **266**, 554–571
- Zablackis, E. and Perez, J. (1990) A partially pyruvated carrageenan from Hawaiian *Grateloupia filicina* (Cryptonemiales, Rhodophyta). *Bot. Mar.* **33**, 273–276
- Knutsen, S. H., Sletmoen, M., Kristensen, T., Barbeyron, T., Kloareg, B. and Potin, P. (2001) A rapid method for the separation and analysis of carrageenan oligosaccharides released by ι - and κ -carrageenase. *Carbohydr. Res.* **331**, 101–106
- Goubet, F., Jackson, P., Deery, M. J. and Dupree, P. (2002) Polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis: a method to study plant cell wall polysaccharides and polysaccharide hydrolases. *Anal. Biochem.* **300**, 53–68
- Busby, S. and Ebright, R. H. (1994) Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* **79**, 743–746
- Kozak, M. (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **234**, 187–208
- Washio, T., Sasayama, J. and Tomita, M. (1998) Analysis of complete genomes suggests that many prokaryotes do not rely on hairpin formation in transcription termination. *Nucleic Acids Res.* **26**, 5456–5463
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E. L. et al. (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **32**, 138–141
- Andreeva, A., Howorth, D., Brenner, S. E., Hubbard, T. J., Chothia, C. and Murzin, A. G. (2004) SCOP database in 2004: refinements integrate structure and sequence family data. *Nucleic Acids Res.* **32**, 226–229
- Gaboriaud, C., Bissery, V., Benchetrit, T. and Mornon, J. P. (1987) Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett.* **224**, 149–155
- Selwin, M. J. (1965) A simple test for inactivation of an enzyme during assay. *Biochim. Biophys. Acta* **105**, 193–195
- Simha, R. (1941) Kinetics of degradation and size distribution of long chain polymers. *J. Appl. Phys.* **12**, 569–578
- Masson, C. R. (1955) The degradation of carrageenin I. Kinetics in aqueous solution at pH 7. *Can. J. Chem.* **33**, 597–603
- Masson, C. R., Santry, D. and Caines, G. W. (1955) The degradation of Carrageenin II. Influence of further variables. *Can. J. Chem.* **33**, 1088–1096
- Singh, S. K. and Jacobsson, S. P. (1994) Kinetics of acid hydrolysis of κ -carrageenan as determined by molecular weight (SEC-MALLSRI), gel breaking strength, and viscosity measurements. *Carbohydr. Polym.* **23**, 89–103
- Davies, G. J., Wilson, K. S. and Henrissat, B. (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **321**, 557–559
- Paoli, M. (2001) Protein folds propelled by diversity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **76**, 103–130
- Colin, S., Deniaud, E., Jam, M., Descamps, V., Chevolut, Y., Kervarec, N., Yvin, J. C., Barbeyron, T., Michel, G. and Kloareg, B. (2006) Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans. *Glycobiology*, **16**, 1021–1032

- 47 Yamagishi, K., Suzuki, K., Imai, K., Mochizuki, H., Morikawa, K., Kyogashima, M., Kimata, K. and Watanabe, H. (2003) Purification, characterization, and molecular cloning of a novel keratan sulfate hydrolase, endo- β -N-acetylglucosaminidase, from *Bacillus circulans*. *J. Biol. Chem.* **278**, 25766–25772
- 48 Leng, L., Zhu, A., Zhang, Z., Hurst, R. and Goldstein, J. (1998) Cloning, functional expression and purification of endo- β -galactosidase from *Flavobacterium keratolyticus*. *Gene* **222**, 187–194
- 49 Kitamikado, M., Ito, M. and Li, Y. T. (1981) Isolation and characterization of a keratan sulfate-degrading endo- β -galactosidase from *Flavobacterium keratolyticus*. *J. Biol. Chem.* **256**, 3906–3909
- 50 Davies, G. J., Ducros, V. M., Varrot, A. and Zechel, D. L. (2003) Mapping the conformational itinerary of β -glycosidases by X-ray crystallography. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 523–527

Received 5 September 2006/29 January 2007; accepted 2 February 2007

Published as BJ Immediate Publication 2 February 2007, doi:10.1042/BJ20061359

Complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of *Gigartina skottsbergii* λ -carrageenan using carrabiose oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis

Marion Guibet,^a Nelly Kervarec,^b Sabine Génicot,^a Yann Chevolut^a
and William Helbert^{a,*}

^aVégétaux Marins et Biomolécules, UMR 7139 (CNRS/IUPMC), Station Biologique, F-29680 Roscoff, France

^bService Commun de Résonance Magnétique Nucléaire, Université de Bretagne Occidentale, F-29200 Brest, France

Received 1 February 2006; received in revised form 14 April 2006; accepted 18 April 2006

Available online 23 May 2006

Abstract— λ -Carrageenan extracted from *Gigartina skottsbergii* tetrasporophyte was completely digested by a purified *Pseudoalteromonas carrageenovora* λ -carrageenase. The main digestion products were fractionated and analysed by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. All the oligosaccharides observed belong to the neo-carrabiose oligosaccharide series indicating that the λ -carrageenase cleaves the β -(1 \rightarrow 4) glycosidic bonds. ^1H and ^{13}C NMR spectra recorded on oligomers from DP 2 to DP 8 were fully interpreted allowing unambiguous assignment of the λ -carrageenan spectra. Besides the typical oligo- λ -carrageenans, we have also characterised a heptasulfated tetrasaccharide which demonstrates the random over-sulfation along the chain of *G. skottsbergii* λ -carrageenan. © 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: λ -Carrageenan; Carrageenase; *Gigartina skottsbergii*; Hybrid structure

1. Introduction

Carrageenans are sulfated galactans occurring in the cell wall of marine red seaweeds (Rhodophyta). They are major components of the matrix involved in the construction of the cell-wall architecture.^{1,2} The exceptional physico-chemical properties of these polysaccharides are widely exploited as thickening and gelling agents in various structural and functional applications.^{3–5} This large family of hydrocolloids shares the same backbone structure, which consists of linear chains of 3-linked β -D-galactose (G-units) and 4-linked α -D-galactose (D-units). Carrageenans are classified according to the number and position of sulfated (S) groups, and by the occurrence of 3,6-anhydro-bridges in the α -linked residues (DA-units) found in gelling carrageenans.^{6–8} For example, the three most commercially exploited

carrageenans, namely kappa- (κ , DA-G4S), iota- (ι , DA2S-G4S) and lambda- (λ , D2S,6S-G2S) carrageenans, differ by the presence of one, two and three sulfate groups per repeating disaccharide unit, respectively.

It is now well accepted that carrageenans have very heterogeneous chemical structures, depending on the algal sources, the life stages (i.e., gametophyte vs tetrasporophyte) and the extraction procedures of the polysaccharides. This structural complexity is ascribed to the occurrence of a mixture of carrageenans in extracts as well as the combination of typical carrabiose units distributed along the polysaccharide chains giving rise to hybrid carrageenans.^{1,8,9} Consequently, the terms κ - and ι -carrageenan usually describe carrageenans composed essentially, but not only, of κ - and ι -carrabiose patterns. The amount and the chemical structure of carrabiose variants inserted in κ - and ι -carrageenan chains modulate their physico-chemical behaviour. One can mention, for example, that the occurrence of biosynthetic precursors, mu- (μ , D6S-G4S) and nu- (ν ,

* Corresponding author. Fax: +33 298 292 324; e-mail: helbert@sb-roscoff.fr

D2S,6S–G4S) carrabiose units in κ - and ι -carrageenan chain, respectively, hinders the gelification.^{10,11} Other carrabiose associations have been also recently highlighted such as the κ/ι -(DA–G4S/DA2S–G4S) carrageenan hybrids (or κ 2-carrageenan) in several species of the Gigartinales^{12–14} and the κ/β -(DA–G4S/DA–G) carrageenan copolymer found in *Furcellaria* sp. and *Euchema gelatinae*.^{15,16}

Unlike κ - and ι -carrageenans, fine structural analysis and, as a consequence, studies dealing with the relationship between structure and functional properties of the non-gelling λ -carrageenan are poorly documented. Nevertheless, it is assumed that λ -carrageenan also contains hybrid structures made of combinations of additional carrabiose units such as the ξ -, π - or θ -carrabioses.^{17–19} The difficulties encountered during chemical as well as spectroscopic investigations of this carrageenan are usually due to the high viscosity of the macromolecule. The state of the art concerning the analysis of carrageenan by NMR spectroscopy has been recently reviewed.²⁰ To summarize, for λ -carrageenan, only the chemical shift of the α -anomeric proton of the D2S,6S and the attribution of the ¹³C NMR spectra, without using 2D experiments, are currently available.^{20–22}

Carrageenases, the enzymes which cleave specifically the glycosidic linkage of carrageenans, are powerful tools for structural investigation of carrageenan; because: (i) they reduce drastically the viscosity of a concentrated solution of carrageenan and; (ii) the integrity of the native chemical structure is well preserved.^{9,23} Carrageenases κ - and ι - have been cloned and the pure recombinant enzymes are available in large amounts for structural investigations.^{24–26} λ -Carrageenase activity has also been identified and purified from the marine bacterium *Pseudoalteromonas carrageenovora*.^{27,28} Though a large amount of recombinant λ -carrageenase is not yet available,²⁹ the native pure enzyme can be prepared in amounts allowing fine biochemical investigations as well as structural analysis of λ -carrageenan.

In an attempt to assign precisely ¹H and ¹³C NMR spectra of λ -carrageenan, we have prepared λ -carrabiose oligosaccharides by digesting *Gigartina skottsbergii* λ -carrageenan with purified *P. carrageenovora* λ -carrageenase. The complete characterisation of oligo- λ -carrageenans allowed us to unambiguously assign all the ¹H and ¹³C NMR signals of the polymer and to demonstrate the hybrid nature of this λ -carrageenan.

2. Experimental

2.1. Production and purification of oligosaccharides

The λ -carrageenase was extracted from *P. carrageenovora* (strain ATCC 43555) and was purified according to a modified protocol of Greer.²⁷ Briefly, the bacterium

was grown (20 °C, 48 h) in the Y-2 modified medium (5 L) containing λ -carrageenan (86%, CP-Kelco, GENU® 7055, 10 g) according to Weigl and Yaphe.³⁰ After centrifugation, the cell-free supernatant was concentrated five times by tangential ultrafiltration (Pellicon system, 10 kDa, Millipore). The proteins were then fractionated by ammonium sulfate precipitation. The λ -carrageenase activity was recovered between 30% and 70% ammonium sulfate precipitate by centrifugation. Pure fractions of λ -carrageenase were obtained after elution of the sample on a Phenyl Sepharose 6 Fast Flow column (200 mL, Amersham) using a linear decreasing gradient of ammonium sulfate (30→0% during 440 min at 1 mL/min rate). Pure fractions as seen from SDS PAGE (98 kDa) were pooled and stored at 4 °C.

λ -Carrageenan (0.5% (w/v) in NaNO₃ 0.1 M, pH 7.5), purified from the tetrasporophytic plants of *G. skottsbergii* (86%, CP-Kelco, GENU®7055) was incubated at 30 °C with pure λ -carrageenase (17 μ L/mL substrate). The extent of degradation was monitored by high performance anion exchange chromatography (HPAEC Dionex) as illustrated in Figure 1. The hydrolysate (20 μ L) was injected on an AS11 analytical column (4 × 250 mm Ion Pac® Dionex) coupled with an AS11 guard column. The elution was conducted at a flow rate of 0.5 mL/min with a NaOH (280 mM) step gradient (0–5 min: 3–5%, 5–6.5 min: 5–30%, 6.5–15 min: 30–57.5%, 15–26 min: 57.5–100%) monitored by a GP40 Gradient Pump (Dionex). Oligosaccharide elution was detected by conductivity with an ED40 (Dionex) equipment after a 300 mA current suppression with an ASRS ultra II-4 mm (Dionex) equipment. A chromeleon-Peak Net software was used for data acquisitions. Complete degradation was reached after 24 h (unchanged chromatogram after new addition of enzyme).

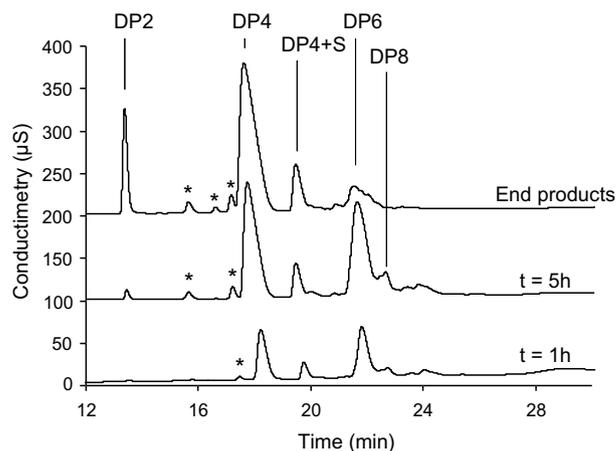


Figure 1. Time course extent of degradation of λ -carrageenan from *G. skottsbergii* incubated with the *P. carrageenovora* λ -carrageenase followed by HPAEC. Peaks marked with an asterisk correspond to oligosaccharides not investigated in this study.

DP 2 and DP 4 oligosaccharides were obtained after 24 h incubation, while in the case of DP 6 and DP 8, which are intermediate products of the λ -carrageenase digestion, the degradation was stopped after 5 h by boiling the medium (Fig. 1). The oligo- λ -carrageenans were size-fractionated by low-pressure gel-permeation chromatography. The digestion mixtures (80 mg/2 mL) were injected into a Pharmacia Superdex 30 prep grade (600 \times 26 mm i.d.) column and eluted with 50 mM NH_4HCO_3 at a flow rate of 102 mL/h (pump P-500, Amersham Biosciences) at 18 °C. Elution was followed with a refractive index detector (Spectra System RI-50, Thermo Separation products). Fractionated samples were concentrated by rotary-evaporation, freeze dried and stored at 4 °C. Because the ammonium carbonate salt was removed during the freeze-drying, no further desalting experiments were found necessary at this stage.

The DP 2 fraction was pure after a single gel-permeation fractionation. The DP 4, DP 6 and DP 8 oligosaccharides were co-eluted with minor amounts of oligosaccharides having probably the same DP and/or different sulfation patterns. The oligosaccharides were then successfully separated at semi-preparative scale by HPAEC as follows: The oligosaccharide fraction (10–50 mg/mL; 50 μL) was injected on an AS11 semi-preparative column (9 \times 250 mm, Ion Pac®, Dionex) coupled with an AS11 guard column. The sample was eluted at a flow rate of 1.5 mL/min with a NaOH (280 mM) step gradient monitored by a GP40 Gradient Pump (Dionex). For the DP 4 purification, the gradient was 0–11 min: 50–71.2%, 11–12 min: 71.2–100%. The DP 4 and the DP 4 + S were observed at a retention time of 9 and 11.5 min which corresponds to about 190 and 210 mM NaOH, respectively. In the case of the DP 6, the NaOH gradient used was: 0–11 min: 50–78%, 11–20 min: 78–91.1%, 20–21 min: 91.1–100%. The DP 6 fraction was eluted after 14 min corresponding to a NaOH concentration of 230 mM. For DP 8, the gradient was: 0–4 min: 50–70%, 4–7.9 min: 70–

75%, 7.9–10 min: 75–79%, 10–15.5 min: 79–85%, 15.5–16 min: 85%, 16–16.5 min: 85–100%. DP 8 was observed at 15.5 min, equivalent to 240 mM NaOH. During the collection, the samples were neutralised with AcOH (0.4 M), then dialysed (Spectra/Por® CE, MWCO 500), concentrated and freeze dried.

2.2. NMR spectroscopy

Prior to NMR analysis, the molecular weight of the polymer was reduced by grinding 1.5 g of λ -carrageenan for 24 h at 40% of the maximal speed with a MM200 ball miller (RETSCH). Polysaccharide and purified oligosaccharide samples were exchanged twice in D_2O , and redissolved in D_2O (~99.7%) at a 10 mg/mL concentration.

^1H NMR spectra were recorded with a BRUKER Avance DRX 500 spectrometer equipped with an indirect 5 mm gradient probehead TXI $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$, at a probe temperature of 25 and 70 °C. Chemical shifts are expressed in ppm with reference to the external standard trimethylsilylpropionic acid (TSP). By comparison to the DSS reference, recommended by IUPAC, TSP has a chemical shift of δ -0.18 (^{13}C) and δ -0.017 (^1H) which allows the use of TSP as an alternative for DSS. Use of TSP or DSS instead of tetramethylsilane (TMS), results in chemical shifts of 2.5 ppm larger for all common carrageenan types as reported by van de Velde et al.²⁰

Non-exchangeable proton and carbon assignments and sugar sequences of oligosaccharides were obtained from 1D (^1H , J mode) and 2D experiments (COSY-DQF, ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C HMBC, J delta) using the conventional pulse program provided by Bruker. ^1H NMR (500 MHz) spectra of the polymer and the oligomers of λ -carrageenan were recorded at 70 and 25 °C. At 70 °C (Figs. 2 and 3), spectra were recorded using 32 K data points and the parameters were as follows: pulse angle, 30°; sweep width, 10,330 Hz; acquisition

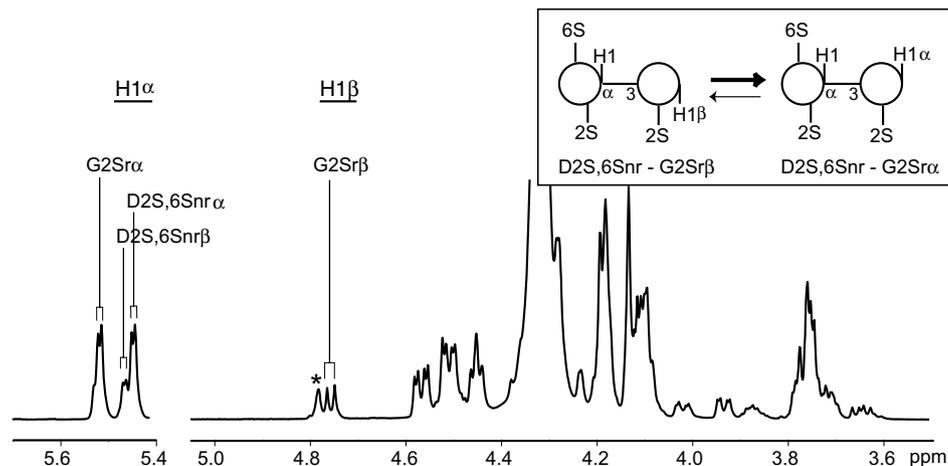


Figure 2. ^1H NMR spectra of neo- λ -carrabiose recorded at 70 °C. As inset: the schematic structure of neo- λ -carrabiose in its α - and β -form.

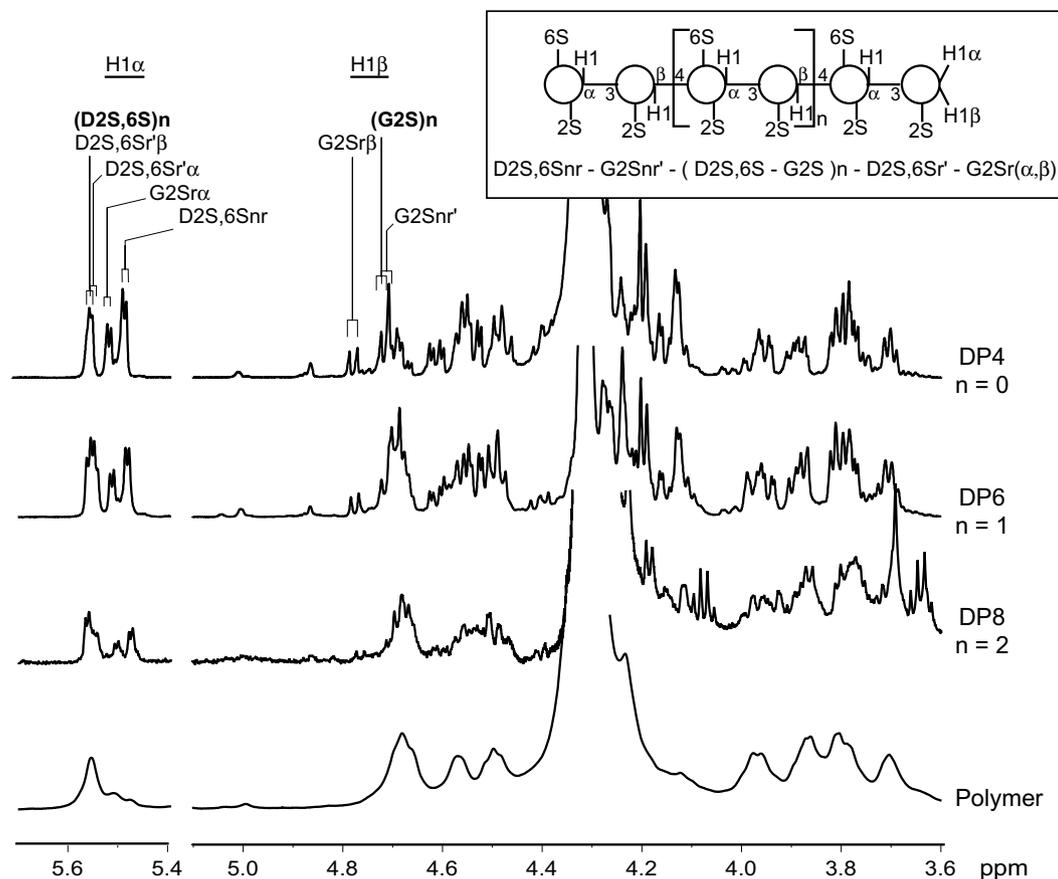


Figure 3. ^1H NMR (500 MHz) spectra of the lambda polymer and the neo- λ -carrabiose oligosaccharides (DP 4, DP 6, DP 8) recorded at 70 °C. As inset: schematic structure of the neo- λ -carrageenan oligosaccharides series showing H-1 protons.

time, 1.58 s; relaxation delay, 2 s. The number of scans was 256 for DP 8, 64 for the polymer and DP 6 and 32 for DP 4 and DP 2, digital resolution being 0.31 Hz/point.

At 25 °C (Fig. 6), spectra were recorded using 64 K data points and the parameters were: pulse angle, 30°; sweep width, 7485 Hz; acquisition time, 4.38 s; relaxation delay, 2 s; number of scans, 16; digital resolution 0.11 Hz/point.

^1H COSY (500 MHz) experiments were achieved at 25 °C. A total of 120 fid's, each consisting of 64 scans per fid with relaxation delay of 2 s and data acquisition time of 0.18 s, were collected. The sweep width in both dimensions was 2841 Hz. The data matrix was completed to a 1024 * 1024 real matrix with a digital resolution of 2.77 Hz/point. Heteronuclear (500 MHz) ^1H - ^{13}C chemical shift correlated spectra of the oligo-carrageenans were recorded also at 25 °C. A total of 128 fid's, each consisting of 96 scans per fid with relaxation delay of 2 s and data acquisition time of 0.18 s, were collected. The sweep width in the F2 and F1 dimensions were, respectively, 2841 and 22,646 Hz. The data matrix was completed to a 1024 * 1024 real matrix with a digital resolution of 2.77 Hz/point in F2 and 22.12 Hz/point in F1. A J mode NMR spectrum of the neo- λ -carrhexa-

ose (additional material) was recorded at 25 °C using 32 K data points. The parameters were as follows: sweep width, 31,446 Hz; acquisition time, 0.52 s; relaxation delay, 2 s; number of scans, 21,642; digital resolution 0.95 Hz/point. Zero filling of the fid was used.

Estimation of the over-sulfation of the λ -carrageenan was achieved at 70 °C on digested λ -carrageenan. The molar fraction of over-sulfated carrabiose diads was determined by dividing the integrations corresponding to the G2S,4S H-4 (4.99 ppm) and the D2S,6S H-1 (reducing, non-reducing and central) signals resonating between 5.5 and 5.6 ppm. We assumed that the sum of the three D2S,6S H-1 signal intensities is equal to the sum of G2S,4S H-4 and G2S H-4 peaks.

2.3. Nomenclature

We used the nomenclature established by Knutsen et al.⁸ for carrageenans and oligo-carrageenans. The 4-linked α -D-galactopyranosyl unit is designated as D-unit and the 3-linked β -D-galactopyranosyl unit as G-unit. The disaccharide repetitive unit of λ -carrageenan is described as D2S,6S-G2S (Figs. 2 and 3). For oligosaccharides of the neo-carrabiose series, the internal residues are described as D2S,6S-G2S without additional index.

Whereas the D2S,6S–G2S at the non-reducing end are designated as D2S,6Snr–G2Snr' and as D2S,6Sr'–G2Sr α,β then situated at the reducing end. The NMR resonance of the D2S,6Sr' residue can be affected by the α,β -equilibrium at the neighbouring reducing end G2Sr. These effects are designated by D2S,6Sr' α or D2S,6Sr' β when observed.

3. Results

The undigested tetrasporophyte λ -carrageenan of *G. skottsbergii* was analysed by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. The 500 MHz ^1H NMR spectrum presented in Figure 3 is poorly resolved but shares the same features as the spectrum of *Iridaea undulosa* λ -carrageenan²² with notably the D2S,6S anomeric proton resonating at 5.55 ppm at 70 °C. The ^{13}C NMR spectrum (not shown) exhibited essentially the twelve characteristic signals of λ -carrageenan.^{20–22} After prolonged incubation with the purified *P. carrageenovora* λ -carrageenase, the yield of degradation was estimated by gel-permeation chromatography. About 95% of the carrageenan was converted into low molecular weight oligosaccharides. The 5% resistant fraction was analysed by ^1H NMR spectroscopy (data not shown) and was found to be composed essentially of ν -, κ - and ι -carrageenans characterised by their α -anomeric protons resonating at 5.51, 5.26 and 5.1 ppm (25 °C), respectively. This indicated that the entire λ -carrageenan polymer has been fragmented and, consequently, the oligosaccharide mixture subsequently analysed by HPAEC (Fig. 1) was representative of the composition and the distribution of carrabiose units within the polysaccharide chain.

The work presented here deals only with the oligosaccharides that could be purified at about 10–15 mg scale required for the complete NMR characterisation. Their purification was successful from DP 2 to DP 8, with a final purity ranging from 90% to 100%. These neo-carrabioses were then fully characterised by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, and their molecular weight determined by mass spectrometry.³¹ The main end-products analysed were one disaccharide (DP 2) and two tetrasaccharides (DP 4 and DP 4 + S). For an intermediate time of degradation (t 5 h, Fig. 1), the most abundant oligosaccharides eluted after DP 4 were an hexasaccharide (DP 6) and an octasaccharide (DP 8).

The ^1H NMR spectra of these purified oligosaccharides were recorded at 25 and 70 °C. The coalescence of the spectra for high temperature was not observed as already mentioned for other carrageenans.^{23,33} We found that the 1D ^1H NMR spectra were better split at 70 °C than at 25 °C, more particularly for the H-1 signals. Consequently, for more clarity, the spectra recorded at 70 °C are shown in Figures 2 and 3. NMR data of carrageenan usually refer to experiments per-

formed at 25 °C; the complete assignments of the ^1H and ^{13}C NMR spectra recorded at 25 °C are reported in Tables 1 and 2, respectively.

3.1. Hydrolytic products are oligosaccharides belonging to the neo- λ -carrabiose series

The disaccharide DP 2 which represents the repeating sequence of λ -carrageenan was first characterised. In accordance with the $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ correlations and with integration ratio, all the signals corresponding to the anomeric protons of DP 2 were easily assigned (Fig. 2). The downfield signals observed between 5.4 and 5.6 ppm were assigned to the three anomeric protons in α -anomeric configuration. These signals were doublets corresponding to the typical axial-gauche conformation of H-1–H-2 of D-galactose resulting in a coupling constant of 3 Hz. The most downfield signal (5.508 ppm) was assigned to the α -anomeric proton of the reducing residue (G2Sr α H-1). The two other close doublets resonating at 5.455 and 5.436 ppm were assigned to H-1 of the non-reducing galactose unit which is affected by the neighbouring of the reducing residues either in β - or α -configuration, respectively (D2S,6Snr–(G2Sr β) H-1 and D2S,6Snr–(G2Sr α) H-1). The doublet at 4.747 ppm (8 Hz) was assigned to H-1 of the reducing residue in β -anomeric configuration (G2Sr β H-1). The intensities recorded for the H-1 signals revealed a displacement of the anomeric equilibrium (α/β 0.7/0.3) towards the α -anomeric configuration. This equilibrium influences the resonance of the six protons of the reducing residue as well as of the six protons of the non-reducing galactose unit with the consequence that the ^1H NMR spectra look like the superposition of the spectra of two distinguishable disaccharides (DP 2 α and DP 2 β) in a 0.7:0.3 ratio.

H-1 in the non-reducing galactose residue of DP 2 had the α -anomeric configuration suggesting that both galactose moieties were linked by an α -(1 \rightarrow 3) glycosidic bond. This was supported by the analysis of heteronuclear ^1H – ^{13}C chemical shift correlation (not shown). Indeed, H-3 (and not H-4) of the reducing galactose residue (G2Sr α H-3 and G2Sr β H-3) were coupled, respectively, with C-1 of the non-reducing sugar (D2S,6Snr–(G2Sr α) C-1 and D2S,6Snr–(G2Sr β) C-1). Inversely the two H-1 doublets of the non-reducing galactose unit (D2S,6Snr–(G2Sr α/β) H-1) were coupled with C-3 of the reducing galactose (G2Sr α/β C-3). The ^1H and ^{13}C NMR spectral assignments (see below) of the other λ -oligosaccharides (DP 4–DP 8) allowed to conclude that these oligosaccharides belong to the neo- λ -carrabiose series. Consequently, these results demonstrate that the λ -carrageenase of *P. carrageenovora* cleaves the β -(1 \rightarrow 4) linkage, as this has been previously shown for the κ -carrageenase of *P. carrageenovora* and the ι -carrageenase of *Alteromonas fortis*.³²

Table 1. ¹H NMR data (δ ppm) of neo-λ-carrabiose and DP 4 + S oligosaccharides and λ-carrageenan polymer at 25 °C (in brackets, 70 °C)

		λ-Carrageenan	(D2S,6S–G2S) ₃	(D2S,6S–G2S) ₂	D2S,6S–G2S,4S–D2S,6S–G2S	D2S,6S–G2S
G2Srα	H-1		5.548 (5.515)	5.518 (5.515)	5.520	5.549 (5.508)
G2Srβ	H-1		4.814 (4.772)	4.803 (4.776)	4.790	4.792 (4.747)
G2S	H-1	4.781* (4.740*)	4.781 (4.740)			
G2Snr'	H-1		4.746 (4.723)	4.760 (4.723)	4.780	
G2Srα	H-2		4.624	4.607	4.603	4.584
G2Srβ	H-2		4.426	4.406	4.408	4.385
G2S	H-2	4.503	4.533			
G2Snr'	H-2		4.502	4.480	4.461	
G2Srα	H-3		4.208	4.195	4.190	4.149
G2Srβ	H-3		4.036	4.025	4.013	3.997
G2S	H-3	3.965	4.036			
G2Snr'	H-3		4.012	4.005	4.102	
G2Srα	H-4		4.354	4.341	4.332	4.314
G2Srβ	H-4		4.304	4.295	4.281	4.272
G2S	H-4	4.319*	4.319			
G2Snr'	H-4		4.304	4.295	5.033	
G2Srα	H-5		4.158	4.147	4.140	4.139
G2Srβ	H-5		3.816	3.800	3.790	3.751
G2S	H-5	3.749	3.757			
G2Snr'	H-5		3.741	3.741	3.826	
G2Srα	H-6a		3.785	3.765	3.770	3.770
G2Srβ	H-6a		3.813	3.805	ND	3.817
G2S	H-6a	3.873	3.826			
G2Snr'	H-6a		3.826	3.807	3.852	
G2Srα	H-6b		3.813	3.795	3.794	3.789
G2Srβ	H-6b		3.898	3.885	ND	3.817
G2S	H-6b	3.822	3.922			
G2Snr'	H-6b		3.922	3.916	3.898	
D2S,6Sr'α	H-1		5.589 (5.543)	5.580 (5.555)	5.571	
D2S,6Sr'β	H-1		5.607 (5.558)	5.585 (5.560)	5.575	
D2S,6S	H-1	5.592 (5.554)	5.607 (5.558)			
D2S,6Snr	H-1		5.537 (5.481)	5.522 (5.483)	5.518	(β) 5.516 (5.455)/(α) 5.492 (5.436)
D2S,6Sr'α	H-2		4.740	4.733	4.702	
D2S,6Sr'β	H-2		4.711	4.705	ND	
D2S,6S	H-2	4.711*	4.711			
D2S,6Snr	H-2		4.550	4.537	4.527	(β/α) 4.522
D2S,6Sr'α	H-3		4.184	4.169	4.150	
D2S,6Sr'β	H-3		4.258	4.247	4.233	
D2S,6S	H-3	4.258*	4.258			
D2S,6Snr	H-3		4.247	4.234	4.392	(β) 4.225/(α) 4.153
D2S,6Sr'α	H-4		4.336	4.325	4.314	
D2S,6Sr'β	H-4		4.293	4.284	4.272	
D2S,6S	H-4	4.293*	4.293			
D2S,6Snr	H-4		4.149	4.136	4.134	(β) 4.134/(α) 4.153
D2S,6Sr'α	H-5		4.535	4.522	4.497	
D2S,6Sr'β	H-5		4.637	4.601	4.587	
D2S,6S	H-5	4.637*	4.637			
D2S,6Snr	H-5		4.607	4.589	4.429	(β) 4.584/(α) 4.503
D2S,6Sr'α	H-6a		4.349	4.334	4.335	
D2S,6Sr'β	H-6a		4.319	4.313	4.318	
D2S,6S	H-6a	4.367*	4.367			
D2S,6Snr	H-6a		4.223	4.208	4.208	(β) 4.210/(α) 4.210
D2S,6Sr'α	H-6b		4.349	4.334	4.335	
D2S,6Sr'β	H-6b		4.367	4.356	4.358	
D2S,6S	H-6b	4.367*	4.367			
D2S,6Snr	H-6b		4.223	4.208	4.208	(β) 4.210/(α) 4.210

¹H NMR chemical shifts ascribed to the polymer marked with an asterisk are deduced from the chemical shifts obtained for the central unit of DP 6.

3.2. Complete assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of neo- λ -carrabiose oligosaccharide series

The ^1H NMR of DP 2 exhibits characteristic features that differ from the NMR spectra recorded on the other λ -carrabiose oligosaccharides (Fig. 3) due to the close proximity of the non-reducing (D2S,6Snr) and the

reducing galactose residues (G2Sr).^{32,33} For higher molecular weight oligosaccharides, one can clearly distinguish on the NMR spectra, signals belonging to carrabiose units localised at the reducing end (D2S,6Sr' α / β -G2Sr α / β), at the non-reducing end (D2S,6Snr-G2Snr') and, for oligo- λ -carrageenan starting from DP 6, signals belonging to internal carrabiose sequences (D2S,6S-

Table 2. ^{13}C NMR shift data (δ in ppm) of neo- λ -carrabiose and DP 4 + S oligosaccharides and λ -carrageenan polymer at 25 °C

		λ -Carrageenan	(D2S,6S-G2S) ₃	(D2S,6S-G2S) ₂	D2S,6S-G2S,4S-D2S,6S-G2S	D2S,6S-G2S
G2Sr α	C-1		93.51	93.49	93.50	93.45
G2Sr β	C-1		98.04	98.03	98.00	98.05
G2S	C-1	105.76	105.72			
G2Snr'	C-1		105.79	105.68	105.80	
G2Sr α	C-2		76.76	76.74	76.68	76.58
G2Sr β	C-2		80.71	80.69	80.92	80.59
G2S	C-2	79.88	79.85			
G2Snr'	C-2		79.74	79.66	79.83	
G2Sr α	C-3		73.17	73.14	72.99	74.27
G2Sr β	C-3		76.23	76.21	76.27	76.89
G2S	C-3	76.51	76.59			
G2Snr'	C-3		77.37	77.34	77.36	
G2Sr α	C-4		67.83	67.79	67.66	68.44
G2Sr β	C-4		66.78	66.75	66.56	67.09
G2S	C-4	66.54	66.47			
G2Snr'	C-4		66.85	66.87	76.27	
G2Sr α	C-5		72.83	72.81	72.72	72.90
G2Sr β	C-5		77.60	77.59	77.50	77.67
G2S	C-5	77.27	77.20			
G2Snr'	C-5		77.26	77.34	77.09	
G2Sr α	C-6		64.01	63.99	63.97	63.93
G2Sr β	C-6		63.82	63.81	63.69	63.75
G2S	C-6	63.55	63.52			
G2Snr'	C-6		63.45	63.45	63.42	
D2S,6Sr' α	C-1		94.53	94.49	94.45	
D2S,6Sr' β	C-1		93.99	93.95	93.97	
D2S,6S	C-1	94.06	93.99			
D2S,6Snr	C-1		94.99	94.98	97.92	(β) 94.85/(α) 95.89
D2S,6Sr' α	C-2		78.11	78.09	77.91	
D2S,6Sr' β	C-2		78.11	78.09	77.91	
D2S,6S	C-2	78.11	78.11			
D2S,6Snr'	C-2		78.11	78.09	78.19	(β / α) 78.07
D2S,6Sr' α	C-3		70.50	70.50	70.26	
D2S,6Sr' β	C-3		70.41	70.42	ND	
D2S,6S	C-3	70.52	70.41			
D2S,6Snr'	C-3		69.62	69.60	69.57	(β / α) 69.67
D2S,6Sr' α	C-4		82.48	82.37	82.97	
D2S,6Sr' β	C-4		82.76	82.66	83.24	
D2S,6S	C-4	82.68	82.76			
D2S,6Snr'	C-4		72.26	72.25	71.97	(β) 72.28/(α) 72.07
D2S,6Sr' α	C-5		71.09	71.04	71.08	
D2S,6Sr' β	C-5		71.03	71.04	71.08	
D2S,6S	C-5	71.12	71.03			
D2S,6Snr'	C-5		71.30	71.30	71.62	(β) 71.36/(α) 71.20
D2S,6Sr' α	C-6		71.67	71.60	71.62	
D2S,6Sr' β	C-6		71.99	72.08	72.17	
D2S,6S	C-6	72.06	71.99			
D2S,6Snr'	C-6		70.23	70.23	69.71	(β) 70.40/(α) 69.79

G2S) which resonate like the polymer of λ -carrageenan. By a simple comparison of the ^1H NMR spectra of DP 2, DP 4, DP 6 and DP 8 the attribution of the anomeric protons was obvious. The most deshielded signal of the DP 6 spectrum resonating at 5.558 ppm was assigned to the α -anomeric proton of the internal D2S,6S sequence. This proton, absent in DP 4, resonates like the internal D2S,6S H-1 of the polymer (5.554 ppm). The D2S,6Sr' β H-1, common to DP 6 and DP 4, resonates also at 5.558 ppm because of its involvement in a α -(1 \rightarrow 3) linkage and of a very similar electronic environment. The D2S,6Sr' α H-1 signal is slightly displaced upfield at 5.543 ppm. The last signal corresponding to the D2S,6S α -anomer protons, common to DP 6 and DP 4, was the non-reducing end D2S,6Snr H-1, appearing at 5.481 ppm. The α -anomeric proton of the reducing G2Sr' α H-1 was measured at 5.515 ppm and its β -anomer counterpart was observed at 4.772 ppm. Finally, the internal G2S H-1 and the non-reducing β -anomer G2Snr' H-1 were measured upfield at about 4.740 and 4.723 ppm, respectively. One can notice that at 25 $^\circ\text{C}$, the anomeric protons of the G2S residues are hidden by the signal of water.

Assignment of the ring protons of each galactose residue was carried out successfully starting from H-1 to H-4 by using a COSY analysis which shows direct 3J -couplings (vicinal and geminal) (Fig. 4, coupling

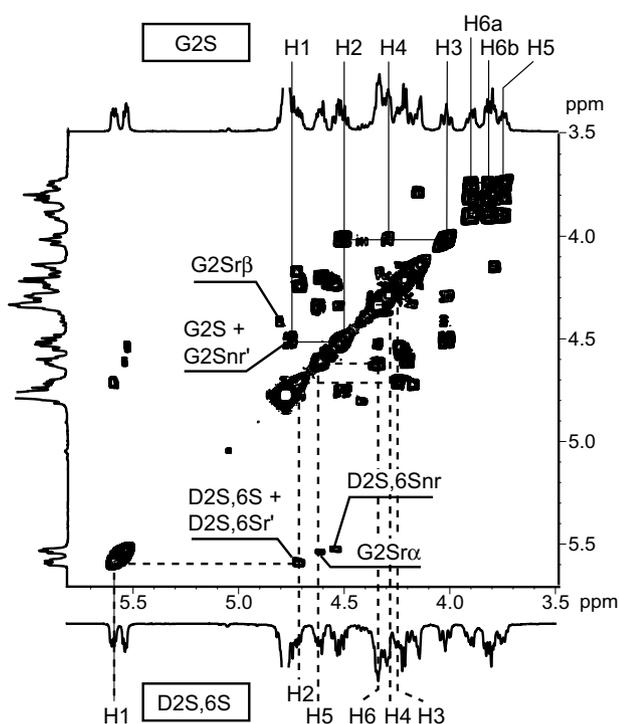


Figure 4. ^1H COSY (500 MHz) spectrum of neo- λ -carraxaose (D2S,6Snr–G2Snr'–D2S,6S–D2S–D2S,6Sr'–G2Sr' $_{(\alpha,\beta)}$) at 25 $^\circ\text{C}$. Correlation system of the protons belonging to the internal G2S (—) and D2S,6S unit (---) of the hexasaccharide are drawn.

values Table 3). For example, Figure 4 presents the COSY spectrum of the neo- λ -carraxaose on which, in contrast to the 1D spectrum, well resolved cross-peaks are observed. The H-1–H-4 correlation system of the protons belonging to the internal carraxaose units D2S,6S and G2S are reported. On the COSY spectrum, it was not possible to visualise the correlation between H-4 and H-5 because of the small coupling constant of the vicinal H-4eq and H-5ax of the galactose moieties^{33,34} (Table 3). The H-5–H-6 cross-peaks were visible on the COSY experiment but at this stage of analysis, it was not possible to discriminate H-5 from H-6. Figure 5 displays the heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ chemical shift correlation (HMQC) of DP 6 showing discrete splitting of the cross peaks. The chemical shifts of C-1–C-4 coupled with H-1–H-4 were clearly identified and reported in Table 2. Notably, we observed that the two anomeric carbons belonging to the internal galactose residues, G2S C-1 and D2S,6S C-1, were found at 105.72 and 93.99 ppm which corresponds closely to the previously reported attribution for the λ -carraxaose polymer.^{20–22} The final attributions for H-5–H-6 and

Table 3. Coupling constants (J Hz) for oligosaccharides of the neo- λ -carraxaose type

	D2S,6S α (Hz)	G2S β (Hz)
$^3J_{\text{H1,H2}}$	3.8	8
$^3J_{\text{H2,H3}}$	10.3	9.8
$^3J_{\text{H3,H4}}$	3.3	3
$^3J_{\text{H4,H5}}$	2	2
$^3J_{\text{H5,H6a}}$	NM	5.3
$^3J_{\text{H5,H6b}}$	NM	7
$^2J_{\text{H6a,H6b}}$	NM	–11.7

NM stands for not measured.

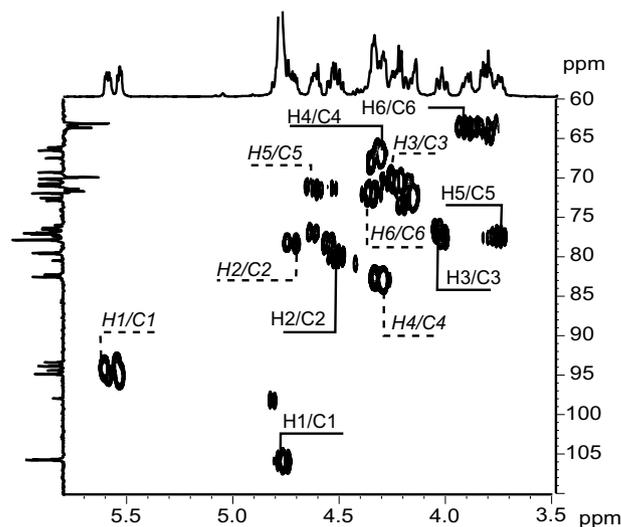


Figure 5. Heteronuclear ^1H – ^{13}C chemical shift correlated spectrum of neo- λ -carraxaose (D2S,6Snr–G2Snr'–D2S,6S–G2S–D2S,6Sr'–G2Sr' $_{(\alpha,\beta)}$) at 25 $^\circ\text{C}$. Cross-correlations between protons and carbons of the internal G2S (—) and D2S,6S unit (---) of the hexasaccharide are indicated.

C-5–C-6 were obtained on the basis of long range heteromolecular $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ chemical shift correlations (HMBC, not shown). The good quality of the splitting of the HMBC spectrum allowed to well discriminate the H-5/C-1 or H-1/C-5 cross-peak correlations. The attribution was confirmed by a J mode experiment (not shown) which allowed to unambiguously distinguish primary (C-6) and secondary (C-5) carbon atoms.

3.3. Evidence for a partial over-sulfation of the *G. skottsbergii* λ -carrageenan

The most abundant oligosaccharides produced after complete digestion of the *G. skottsbergii* λ -carrageenan belong to the neo- λ -carrabiose series. These 'standard' oligo- λ -carrageenans were found in admixture with less abundant fragments of unknown structure but clearly observable by HPAEC (Fig. 1). We successfully purified by semi-preparative HPAEC the minor product which was co-eluted by gel permeation chromatography with DP 4. Its molecular weight measured by mass spectrometry³¹ indicated that the structure corresponded to a tetrasaccharide bearing an additional sulfate (DP 4 + S). By analogy with the ^1H and ^{13}C NMR spectra of DP 4, the ^1H and ^{13}C NMR spectra of DP 4 + S were resolved and the data are summarised in Tables 1 and 2. Figure 6 presents the ^1H NMR spectra of the two tetrasaccharides highlighting the differences between the

spectra of the DP 4 and the DP 4 + S. The maximum downfield shifting of about 0.76 ppm was observed for H-4 of the non-reducing G2S'nr, the corresponding carbon (G2S'nr C-4) being also shifted downfield by 9.62 ppm. This displacement for the H-4 signal is very comparable, for example, to the 0.72 ppm proton chemical shift observed between G H-4 of β -carrageenan and G4S H-4 of the κ -tetrasaccharide.³³ Concerning the carbon NMR spectrum, we have observed a higher shifting for C-4 when compared to the +7.8 ppm chemical shift between the G and G4S of β - and κ -carrageenan, respectively.²⁰ The protons and the carbons spatially close to H-4 and C-4 were also affected by the additional sulfate leading to a small downfield chemical shift of their corresponding NMR signals. As previously reported in the case of the β - and κ -carrageenan, we have observed a slight downfield chemical shift of the systems G2S C-3/H-3 and G2S C-5/H-5. The protons of the galactose residue next to the G2S,4Snr' sequence at the non-reducing end, seem also to be influenced by the supplementary sulfate, as both D2S,6Snr H-3 and H-5 were slightly shifted.

4. Discussion

The study presented here is the first complete characterisation of the λ -oligosaccharide standards from DP 2

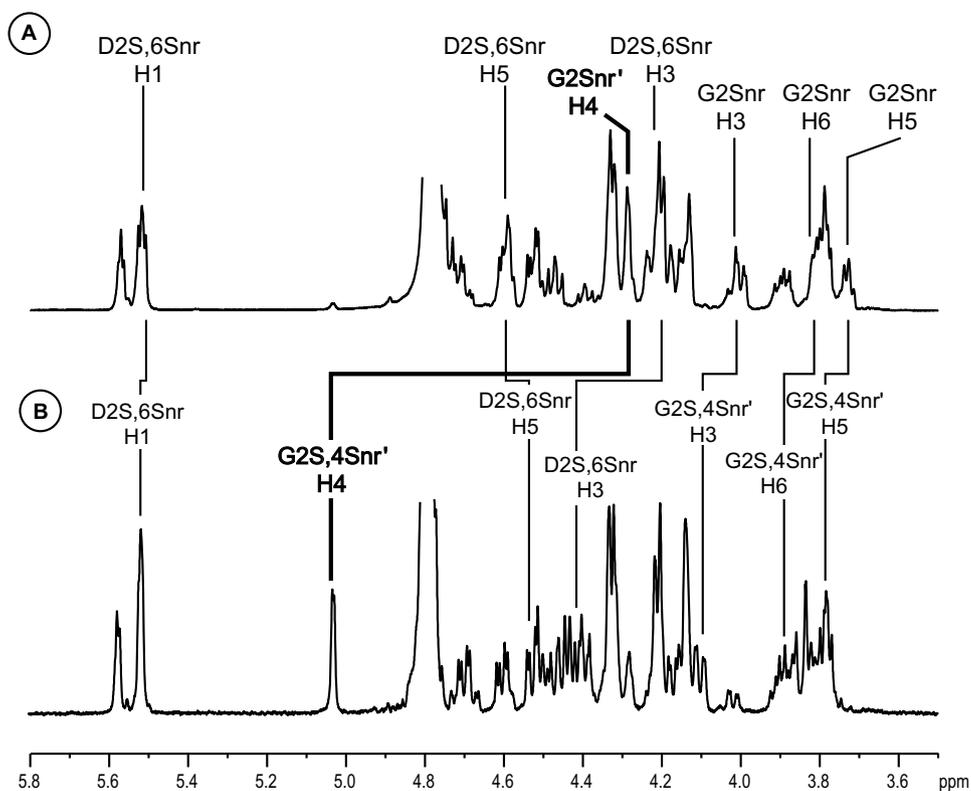


Figure 6. ^1H spectrum (500 MHz) of the tetrasaccharides ((A) D2S,6Snr–G2Snr'–D2S,6Sr'–G2Sr $_{(\alpha,\beta)}$) and ((B) D2S,6Snr–G2S,4Snr'–D2S,6Sr'–G2Sr $_{(\alpha,\beta)}$) recorded at 25 °C. The arrows indicate the shifts of the proton signals originating from the additional sulfate at C-4 of the G2Snr' unit.

to DP 8, allowing to assign unambiguously the ^1H NMR spectrum and to correct the previous tentative attribution of the ^{13}C NMR spectrum of λ -carrageenan. The main difficulty encountered for complete attribution of the spectra lies in the positioning of the galactose moieties occurring in the same chair conformation along the oligosaccharide fragments. Nevertheless, because of the good resolution of the homo- and heteronuclear 2D chemical shift correlation spectra, we were able to identify each galactose moiety and assign its surrounding and linkages. The λ -carrageenan NMR spectra showed strong differences with those reported for κ - and ι -carrageenan because anhydro-bridges are not found in ideal λ -carrageenan chains and because of its higher degree of sulfation. However, the protons assignment of the G2S unit of λ -carrageenan exhibits some similarities with those of the G4S of κ -carrageenan. Except for H-2 and H-4 signals of the λ - and κ -carrageenan, respectively, which are shifted downfield, the values reported for the other protons support our analysis.³³

Because we have worked with purified oligosaccharides and combined both ^1H and ^{13}C NMR data, we were able to more accurately interpret our results. The attribution of the ^{13}C NMR spectra of oligosaccharides allowed us to extrapolate our analysis to the λ -carrageenan polymer and to reconsider the previously proposed assignments of λ -carrageenan.^{20–22} Indeed, we have shown that the three very close signals of the ^{13}C NMR spectra appearing at 78.11, 77.27 and 76.51 ppm should be assigned to D2S,6S C-2, G2S C-5 and G2S C-3, respectively. Also, we have observed that the chemical shift previously assigned to D2S,6S C-3 and D2S,6S C-6 have to be exchanged.

λ -Carrageenase is a glycoside hydrolase which catalyses the cleavage of the glycosidic bond without modifying otherwise the chemical structure of the carrageenan. We have observed that *G. skottsbergii* λ -carrageenan was completely depolymerised by the *P. carrageenovora* λ -carrageenase while the chemical structure of the substrate is known to contain non- λ -carrabiose motives.³⁵ This indicates that the enzyme is able to accommodate in its active site substrates with a modified carrageenan structure (Guibet et al., in preparation). The plasticity of the recognition by λ -carrageenase has been already reported for other carrageenases and probably reflects the adaptation of these enzymes involved in the bioconversion of naturally complex substrates.^{13,15,36} The HPAEC chromatogram of the oligosaccharide mixtures presented in Figure 1 could be seen as representative of the heterogeneity of the polysaccharide, the neo- λ -carrabiose oligosaccharides presenting the typical repetitive unit of λ -carrageenan and the other oligosaccharides being seen as deviations from this polysaccharide framework. Consequently, to go further into the fine structure *G. skottsbergii* λ -carrageenan by such an approach, it seems essential to correlate a chemical structure to each

individual peak of the chromatogram. In an attempt to partially solve the chromatogram, we have analysed and purified the most abundant oligosaccharide carrying a non-ideal λ -carrageenan structure (DP 4 + S). We have shown that the most abundant structure irregularity found in the λ -carrageenan of *G. skottsbergii* is the addition of one sulfate group leading to a four times sulfated carrabiose unit: D2S,6S–G2S,4S. We have estimated the abundance of this over-sulfated pattern by integrating the characteristic G2S,4Snr' H-4 signal appearing at 5.033 ppm in the ^1H NMR spectra recorded on completely digested λ -carrageenan. We found that the polysaccharide contains about 8% of D2S,6S–G2S,4S diads. In spite of careful inspection of the ^1H NMR spectra of partly fractionated oligosaccharides and oligosaccharide mixtures, no other sulfation features or chemical modifications (i.e., pyruvate, methyl) were identified. Interestingly, the occurrence of G2S,4S (3-linked 2,4 disulfated galactose) and/or G2S,6S was suggested from chemical analysis of *G. skottsbergii* and *I. undulosa*.^{22,35,37} In *G. skottsbergii*, the amount of G2S,6S residue was measured as $\sim 4.9\%$ ³⁵ or 3% ³⁷ which represents 9.8% or 6% of D2S,6S–G2S,6S diads. Similarly, the concentration of G2S,4S residue was reported to be 5.9% ³⁵ and 3% ³⁷ (equivalent to 11.8% and 6% D2S,6S–G2S,4S diads). Our observations confirm the presence of non-negligible amounts of G2S,4S in a very similar ratio as previously reported, but, even after close inspection of the NMR spectra, we were not able to highlight a relevant over-sulfation at C-6. Nevertheless, the chromatogram in Figure 1 shows some less intense peaks marked by an asterisk that contain very low amounts of structures that might contain D2S,6S–G2S,6S diads. This supposes that the enzyme could accommodate both the G2S,4S and the G2S,6S residues in its active site. The non-negligible amount of undigested carrageenan (5%) may also contain a fraction of 3-linked unit of 2,6-disulfated galactose. Because we did not observe 4-linked units of 2,6-disulfated galactose in the undigested fraction, we infer that all the λ -type carrageenans were enzymatically depolymerised. Consequently, if the G2S,6S residue remains in the undigested fraction, it is probably linked within the carrageenan chain to an α -D-galactose residue that differs from the D2S,6S repetitive unit of the λ -carrageenan structure.

The structure and the amount of the end-product of the whole enzymatic digestion of the *G. skottsbergii* λ -carrageenan strongly suggests that this polysaccharide possess a hybrid structure built mainly of the characteristic λ -carrabiose D2S,6S–G2S pattern and 8% of the D2S,6S–G2S,4S disaccharide unit. The distribution of D2S,6S–G2S,4S along the chain is probably random since two contiguous over-sulfated residues were not found in the most abundant components. The occurrence of two neighbouring D2S,6S–G2S,4S units cannot be excluded, but according to our observations this

combination should represent only a very minor fraction of the digest.

5. Conclusion

The enzymatic digestion of λ -carrageenan allowed to recover low molecular weight oligosaccharides holding the chemical structure of the native substrate. Because *G. skottsbergii* λ -carrageenan was completely hydrolyzed, the enzymatic products are representative of the overall structure of the polymer. ^1H and ^{13}C NMR analysis of the oligosaccharides demonstrate that the *P. carrageenovora* λ -carrageenase cleaves the β -(1 \rightarrow 4) linkage giving rise to the neo- λ -carrabiose series. We observed that *G. skottsbergii* λ -carrageenan is mainly composed of the typical λ -carrabiose unit, D2S,6S–G2S, and a non-negligible amount of a tetrasulfated carrabiose, D2S,6S–G2S,4S.

Similarly to the gelling κ - and ι -carrageenans, NMR analysis combined with chromatographic analysis of enzymatically digested λ -carrageenan should give a better insight of the λ -carrageenan structure itself and its diversity among algae. Finally, the complete understanding of the λ -carrageenan implies also the analysis of the minor oligosaccharide fractions not investigated in this study because of their very low concentration. In this context, strategies allowing the characterization of minute amounts of oligosaccharides (such as mass spectrometry) should be encouraged.

Acknowledgements

The work was supported by CNRS (ATiPE program) and Région Bretagne (PRIR BioFiN12 program). M.G. acknowledges Degussa Texturant System and CNRS, for the financial support of her doctoral thesis. Special thanks to Dr. A. Antonopoulos and Professor M. Lafosse, for mass spectrometry analysis of carrageenan oligomers.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.carres.2006.04.018](https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.04.018).

References

- Craigie, J. S. Cell Walls. In *Biology of the Red Algae*; Cole, K. M., Sheath, R. G., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, 1990; pp 221–257.
- Kloareg, B.; Quatrano, R. S. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **1988**, *26*, 259–315.
- De Ruiter, G. A.; Rudolph, B. *Trends Food Sci. Technol.* **1997**, *8*, 389–395.
- Stanley, N. F. Carrageenan. In *Food Gel*; Harris, P., Ed.; Elsevier Applied Science: London, 1990; pp 79–119.
- Therkelsen, G. H. Carrageenan. In *Industrial Gums*; 3rd ed., Whistler, R. L., BeMiller, J. N., Eds., Academic Press: San Diego, CA, 1993; pp 145–180.
- Rees, D. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1969**, *24*, 267–332.
- Usov, A. *Food Hydrocoll.* **1992**, *6*, 9–23.
- Knutsen, S.; Myslabodski, D.; Larsen, B.; Usov, A. *Bot. Mar.* **1994**, *37*, 163–169.
- Usov, A. I. *Food Hydrocoll.* **1998**, *12*, 301–308.
- Bellion, C.; Brigand, G.; Promé, J.-C.; Welti, D.; Bociek, S. *Carbohydr. Res.* **1983**, *119*, 31–48.
- van de Velde, F.; Rollema, H.; Grinberg, N.; Burova, T.; Grinberg, V.; Tromp, R. *Biopolymers* **2002**, *65*, 299–312.
- van de Velde, F.; Peppelman, H. A.; Rollema, H. S.; Tromp, R. H. *Carbohydr. Res.* **2001**, *331*, 271–283.
- Greer, C.; Yaphe, W. *Bot. Mar.* **1984**, *27*, 479–484.
- Bixler, H. *Hydrobiologia* **1996**, *326/327*, 35–37.
- Greer, C.; Yaphe, W. *Bot. Mar.* **1984**, *27*, 473–478.
- Knutsen, S.; Grasdalen, H. *Bot. Mar.* **1987**, *30*, 497–505.
- Falshaw, R.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.* **1995**, *276*, 155–165.
- Falshaw, R.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.* **1998**, *307*, 325–331.
- Falshaw, R.; Furneaux, R. H.; Stevenson, D. E. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1149–1158.
- van de Velde, F.; Pereira, L.; Rollema, H. S. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2309–2313.
- Falshaw, R.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.* **1994**, *252*, 171–182.
- Stortz, C. A.; Bacon, B. E.; Cherniak, R.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.* **1994**, *261*, 317–326.
- van de Velde, F.; Knutsen, S. H.; Usov, A. I.; Rollema, H. S.; Cerezo, A. S. *Trends Food Sci. Technol.* **2002**, *13*, 73–92.
- Michel, G.; Chantalat, L.; Duee, E.; Barbeyron, T.; Henrissat, B.; Kloareg, B.; Dideberg, O. *Structure* **2001**, *9*, 513–525.
- Barbeyron, T.; Henrissat, B.; Kloareg, B. *Gene* **1994**, *139*, 105–109.
- Barbeyron, T.; Michel, G.; Potin, P.; Henrissat, B.; Kloareg, B. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 35499–35505.
- Greer, C. W. Ph.D. Thesis, McGill University, 1984.
- Johnston, K. H.; McCandless, E. L. *Can. J. Microbiol.* **1973**, *19*, 779–788.
- Colin, S. Ph.D. Thesis, Université de Technologie de Compiègne, 2005.
- Weigl, J.; Yaphe, W. *Can. J. Microbiol.* **1966**, *12*, 939–947.
- Antonopoulos, A. Ph.D. Thesis, Université d'Orléans, 2005.
- Bellion, C.; Hamer, G.; Yaphe, W. *Can. J. Microbiol.* **1982**, *28*, 874–880.
- Knutsen, S. H.; Grasdalen, H. *Carbohydr. Res.* **1992**, *229*, 233–244.
- Agrawal, P. K. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3307–3330.
- Matulewicz, M. C.; Ciancia, M.; Nosedá, M. D.; Cerezo, A. S. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3407–3410.
- Knutsen, S. H.; Grasdalen, H. *Carbohydr. Polym.* **1992**, *19*, 199–210.
- Falshaw, R.; Bixler, H. J.; Johndro, K. *Food Hydrocoll.* **2001**, *15*, 441–452.

ENZYMATIC ANALYSIS OF K/I-HYBRID CARRAGEENAN

M. Guibet¹, N. Kervarec², P. Boulenguer³, J. Mazoyer³, A. Critchley³, W. Helbert¹

¹Station Biologique de Roscoff, Place Georges Tessier, 29682 Roscoff, France

²Université de Bretagne Occidentale, 6, avenue Victor Le-Gorgeu, 29238 Brest, France

³Degussa Food Ingredients / BL Texturant Systems, Degussa Texturant Systems France SAS, 50500 Baupré, France

1 INTRODUCTION

Carrageenans are linear, sulphated galactans, extracted from the cell walls of red seaweeds. The chemical structures of these major texturing ingredients are based on the repetition of disaccharide sequences (carrabiose units) composed of 3-linked- β -D-galactopyranose (G) and 4-linked- α -D-galactopyranose (D). Carrageenans are classified according to their sulphating pattern (S) and the occurrence of 3,6-anhydro-D-galactose (DA) on the 1,4-linked residue. In the case of the most exploited carrageenans, carrabiose units are substituted by one (kappa **G4S-DA**), two (iota **G4S, DA2S**) or three (lambda **G2S, D2S,6S**) ester sulphate groups^{1,2} (figure1).

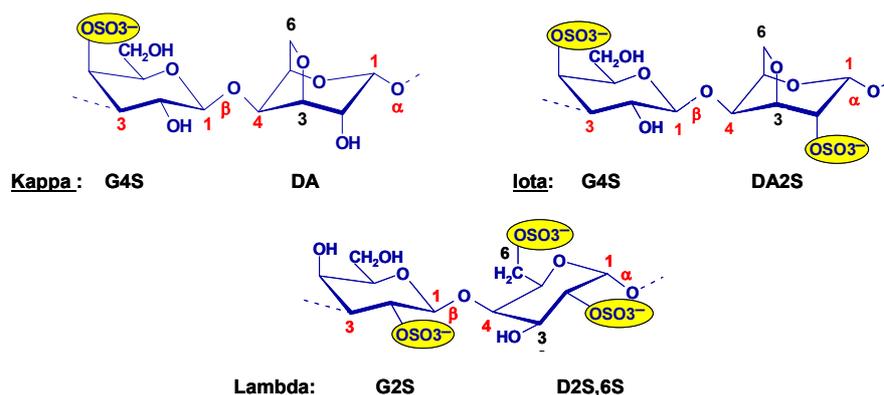


Figure 1: The most abundant carrabiose units occurring in the structure of commercial carrageenans

As carrageenans are the products of a complex biosynthetic pathway, their chemical structures are not simple; graphic presentation of their structures being often idealised. They are usually built up by a combination of several types of carrabiose units. Consequently, for example, the so-called κ -carrageenan designates a family of polysaccharides composed mainly, but not only, of κ -carrabioses. The most current irregularities found in κ -carrageenan are its biosynthetic precursors (β -, μ -carrabioses) and ι -carrabioses.

Gigartinacean algae are sources of 'kappa/iota-hybrid' carrageenans. κ/ι -hybrid carrageenans with a range of ι -carrabiose units representing about 20-45% of the carrageenan composition are also called κ -2-carrageenan³. These hybrid structures are exploited for their specific properties as gelling and binding agents in various dairy applications. It is now accepted that κ/ι -hybrid carrageenans are not simple mixtures of κ - and ι -carrageenan homopolymers, but structures made of κ - and ι -carrabiose units linked in a carrageenan heteropolymer. While chemical or spectroscopic analyses are unable to distinguish mixture of homopolymers from heteropolymers, analysis of their respective dairy^{3, 4} and physical⁵⁻⁷ properties strongly supports the heterogeneous structure of those κ/ι -carrageenans. In fact, only enzymatic hydrolysis performed on κ/ι -hybrid carrageenans have unambiguously supported these statements⁸⁻¹⁰.

The pioneering work by Yaphe's group¹¹ suggests that enzymes could be very helpful tools for a better understanding of carrabiose sequences in carrageenans. Indeed, carrageenan hydrolases or carrageenases offer the advantage of fragmenting carrageenan molecules by the specific disruption of the $\beta(1-4)$ glycosidic linkages without drastic chemical treatment that may interfere with the solving of the native structure. Carrageenases are also specific to a given class of carrageenan that is, κ -carrageenases degrade κ -carrageenans but are inactive on ι -carrageenans. Major end products of these κ - and ι -carrageenase degradations are respectively neo- κ -carrabioses of DP2 and DP4 and neo- ι -carrabioses of DP4 and DP6¹²⁻¹⁴. More recently, Knutsen and Grasdalen¹⁵ have observed that the κ -carrageenase of *Alteromonas carrageenovora* is able to accommodate, at its active site, some carrabiose units that differ from the κ -carrabiose sulphating patterns. Thus, we can suggest that carrageenases should be able to recognize and hydrolyse the hybrid structure of κ/ι -carrageenan. Chromatographic and NMR analysis of degradation products of κ/ι -hybrid carrageenan could lead to a description of the ι - and κ -carrabiose units distribution along the native carrageenan chains. We have undertaken these enzymatic experiments on κ/ι -carrageenans extracted from seaweed species collected at several sites. This study reveals that these κ/ι -hybrid carrageenans, even with a same κ/ι ratio, did not display the same ι - and κ -carrabiose distribution of units. Two principal modes of distribution can occur in the structure of κ/ι -hybrid carrageenans copolymers: i) a random distribution of ι -carrabioses in κ -chains ii) an alternating distribution of ι -carrabioses and κ -carrabioses

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Carrageenan Substrates

Carrageenans were provided by Degussa Texturant Systems. They were extracted under vigorous alkaline conditions from the algae *Kappaphycus alvarezii* (commercially known as "cottonii") and *Eucheuma denticulatum* (commercially known as "spinosum") commercially cultivated in the Philippines. All other materials were non-mechanically harvested from natural populations, *Chondracanthus* (formerly *Gigartina*) *chamissoi* (Chile), *Gigartina skottsbergii* (Chile) and two sources of *Chondrus crispus* (Eastern Canada, and France). After hot filtration under pressure, carrageenans were recovered by precipitation in isopropanol, except for the carrageenan extracted from *K. alvarezii* which was gelled by addition of KCl and recovered through pressing.

2.2 Carrageenases Production

Recombinant iota-carrageenase from *Alteromonas fortis* and kappa-carrageenase from *Pseudoalteromonas carrageenovora* were over-expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by affinity chromatography according to Michel *et al*^{16, 17}.

2.3 Enzymatic Hydrolysis of Carrageenans

Carrageenans (0.5% in 0.1 M NaNO₃) were digested for 48h at 40°C by addition of excess amount of carrageenase. Degradation advancement was followed by High Pressure Anion Exchange Chromatography (HPAEC) and by measuring the amount of reducing sugar produced using the ferricyanure method¹⁸.

2.4 Chromatographic Analysis of Hydrolysis Products

2.4.1 Size Exclusion Chromatography.

Size exclusion chromatography was performed according to the adapted method of Knutsen *et al.*¹⁹. Briefly, a 500 µL filtered sample (0.22 µm, Millipore) was injected on a semi-preparative Pharmacia Superdex 30 (600x16 mm i.d.) and eluted with 50 mM (NH₄)₂CO₃ at a rate of 60 mL/h and maintained at 20°C. Separation was followed with a refractive index detector (Spectra System RI-50, Thermo Separation products).

2.4.2 High Pressure Anion Exchange Chromatography (HPAEC).

20 µL of a filtered sample (0.22 µm, Millipore) was injected on to an analytical AS11 column (4 x 250 mm Ion Pac® Dionex), coupled with an AS11 guard column, equilibrated in NaOH 15 mM. Elution was performed at 20°C with a NaOH step gradient from 10 to 300 mM with a 0.5 mL/min flow rate (GP40 gradient pump, Dionex). Oligosaccharides were detected by conductivity using an ASRS ultra-4mm (Dionex). Acquisition of the chromatogram was achieved with Chromeleon Peak Net software.

2.5 Purification and Characterisation of Hydrolysis Products

2.5.1 Enzyme Resistant Fraction (ERF) Purification

ERF was separated from the oligo-carrageenan mixture by ultrafiltration on a 10.000 MWCO membrane, using a 50 mL stirred pressure-filtration cell maintained under a nitrogen gas pressure of 1.0 kg/cm². ERF was diluted in distilled water and washed free of oligosaccharides and salts by repeated ultrafiltration.

2.5.2 Neo-κ-carrabiose and Neo-ι-carrabiose Purification

The end products of *K. alvarezii* and *E. denticulatum* hydrolysis were purified on a Pharmacia Superdex 30 prep grade column (600x26 mm i.d.). Concentrated crude hydrolysate (2%, filtrated on 0.22 µm, Millipore) was injected (2 mL) on to the column and eluted with 50 mM (NH₄)₂CO₃ at 102 mL/h (pump P-500, Amersham Biosciences). Peaks detected by differential refractometry were pooled separately and freeze dried. The use of ammonium carbonate avoided a desalting step.

2.5.3 NMR Spectroscopy

Prior to analysis, the molecular weight of the carrageenans was reduced by grinding 1.5 g of polysaccharides for 24 hours at 40 % of the maximal speed with a MM200 ball miller

(RETSCH). ^1H NMR spectra were recorded with a BRUKER Advance DRX 500 spectrometer equipped with an indirect 5 mm gradient probehead $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$, at a probe temperature of 70°C . Prior to analysis, samples were exchanged twice in D_2O , and redissolved in 99.97 atom% D_2O . Chemical shifts are expressed in ppm by reference to an external standard (trimethylsilylpropionic acid). No suppression of HOD signal was performed.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Evaluation of κ - and ι -Carrabiose Ratio by ^1H NMR.

In attempt to increase the resolution of the ^1H NMR spectrum of texturising polysaccharides, several methods of depolymerisation (chemical, enzymatic and mechanical) were reported to lower the viscosity of solutions. We found that dry milling was an efficient, alternative method to lower the molecular weight of the carrageenans and, thus, to obtain well resolved ^1H NMR spectra (figure 2). In addition, this fragmentation process did not seem to induce a modification in the chemical structure of the carrageenan. No signals that could be assigned to degraded carrageenans were observed on ^1H NMR spectra of milled κ/ι -carrageenans.

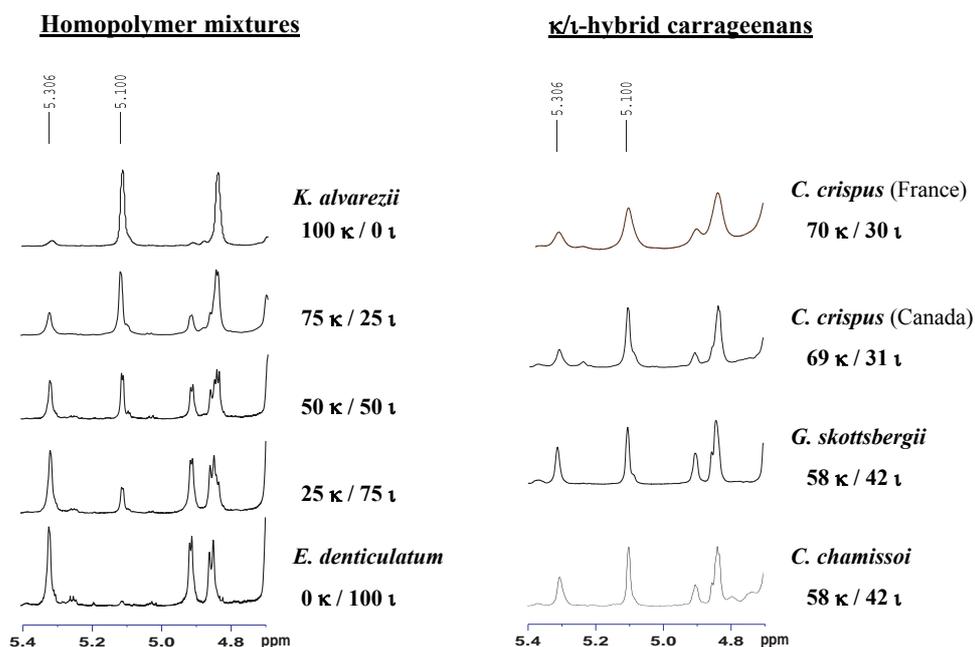


Figure 2 Comparison of ^1H -NMR spectra at 70°C of mixtures of homopolymers and κ/ι -hybrid carrageenans

As expected²⁰, chemical shifts of the κ - and ι - anomeric protons were found respectively at 5.10 and 5.30 ppm. κ - and ι -carrabiose ratio in κ -2-carrageenans extracted from various seaweeds was determined by integration of the anomeric signals. The κ/ι carrabiose ratios determined in the carrageenan of *C. chamissoi* and *G. skottsbergii* were very close and contained about 42 % of κ -carrabiose units and 58 % of ι -carrabiose units. Likewise, κ/ι -carrageenans from both *C. crispus* have a similar κ/ι ratio (about 69/31 κ/ι)

but they are richer in ι -carrabiose units than κ/ι -carrageenans from the *Gigartina* and *Chondracanthus* spp.. These κ/ι ratios corresponded to those usually reported for these species⁷. We also prepared mixtures of κ - and ι -carrageenan homopolymers as standards. As already reported⁴, ¹H NMR characterisation revealed no indications of structural differences between mixtures of homopolymers and the *Gigartina/Chondracanthus* and *Chondrus* κ/ι -hybrid carrageenan extracts (figure 2).

3.2 Enzymes are Tools to Distinguish Mixtures of Carrageenans from Hybrid Carrageenans

Action of carrageenases on mixtures of carrageenans is presented in figure 3. These are digestion profiles of the 50/50 mixtures of κ - and ι -carrageenans incubated with κ -carrageenase and ι -carrageenase separately or sequentially. One can see that digestion of the mixture by κ -carrageenase has led exclusively to the production of κ -carrabiose oligosaccharides. Similarly, incubation with ι -carrageenase has resulted in the release of ι -carrabiose oligosaccharides. The hydrolysis of the mixture performed by sequential incubation with the two carrageenases has given rise to κ - and ι -carrabiose oligosaccharides, the corresponding size exclusion chromatogram being the superimposition of those obtained with both enzymes separately (figure 3).

When *G. skottsbergii* κ/ι -carrageenan, which contains about 58% of ι -carrabiose units according to NMR experiments, was subjected to degradation by ι -carrageenase, no ι -carrabiose oligosaccharides were detected by size exclusion chromatography. In contrast, after incubation with κ -carrageenase, κ -carrabiose oligosaccharides were observed as well as oligosaccharides having retention times attributed neither to κ - nor ι -carrabiose oligosaccharides. When the two enzymes were applied together, digestion products were similar to those obtained by the action of κ -carrageenase alone. These results suggest that the κ/ι -carrageenan extracted from *G. skottsbergii* is not a simple mixture of κ - and ι -homopolymers but a κ/ι -heteropolymer.

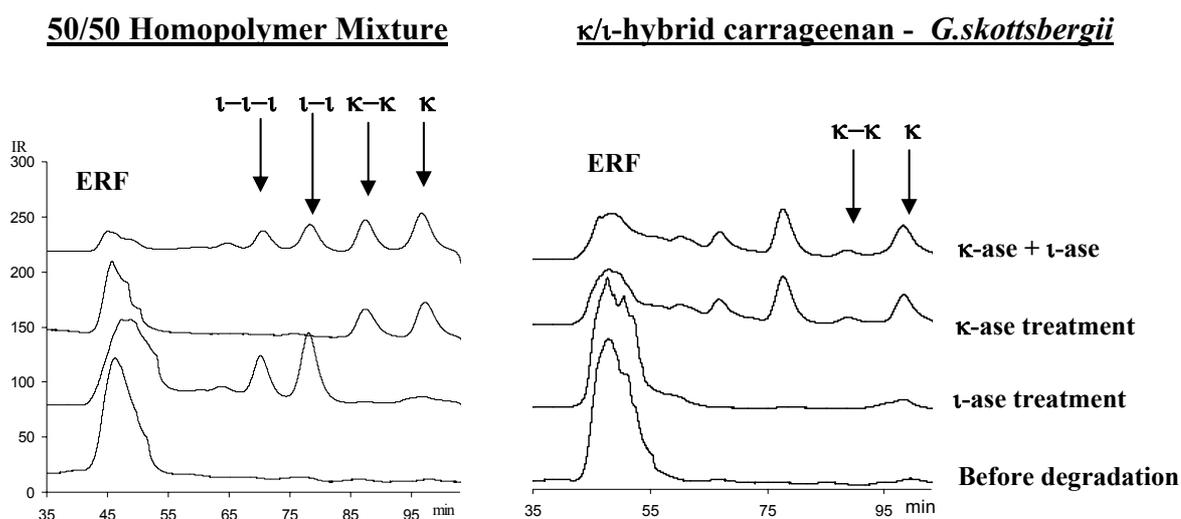


Figure 3 Comparison by Size exclusion Chromatography of hydrolysates after κ - and ι -carrageenase treatment on 50/50 homopolymer mixture and κ/ι -hybrid carrageenans.

Within this heteropolymer the ι -carrabiose units should not form ι -blocks as the ι -carrageenase is not able to accommodate in its active site the ι -carrabiose units of the *G. skottsbergii* carrageenan. This means that the ι -carrabiose units were probably distributed along the κ -carrageenan chains in a way that the ι -carrageenase cannot accept the ι -carrabiose pattern in its active site and performed the cleavage. On the other hand, the important degradation of the *G. skottsbergii* carrageenan by κ -carrageenase showed that κ -blocks, or long enough κ -fragments, were accessible to the enzyme. Hydrolysis with κ -carrageenase led also to the production of κ/ι hybrid oligosaccharides - not pure ι - nor κ -oligosaccharides - suggesting that ι -carrabiose units were released in the medium by the hydrolysis of the κ -carrageenan units. Similar observations were done with *C. chamissoi* and the *Chondrus* from Canada and France (data not shown). Consequently, according to the enzymatic degradation profiles, these κ/ι -hybrid carrageenans are not a mixture of homopolymers, but, more probably, heteropolymers of ι -carrabioses distributed along the κ -carrageenan chains.

3.3 Hypothesis for two Modes of Distribution of ι -Carrabiose Units along κ -Carrabiose Chains

3.3.1 Copolymers with a Random Distribution of ι -Carrabiose Units in κ -Carrabiose Chains

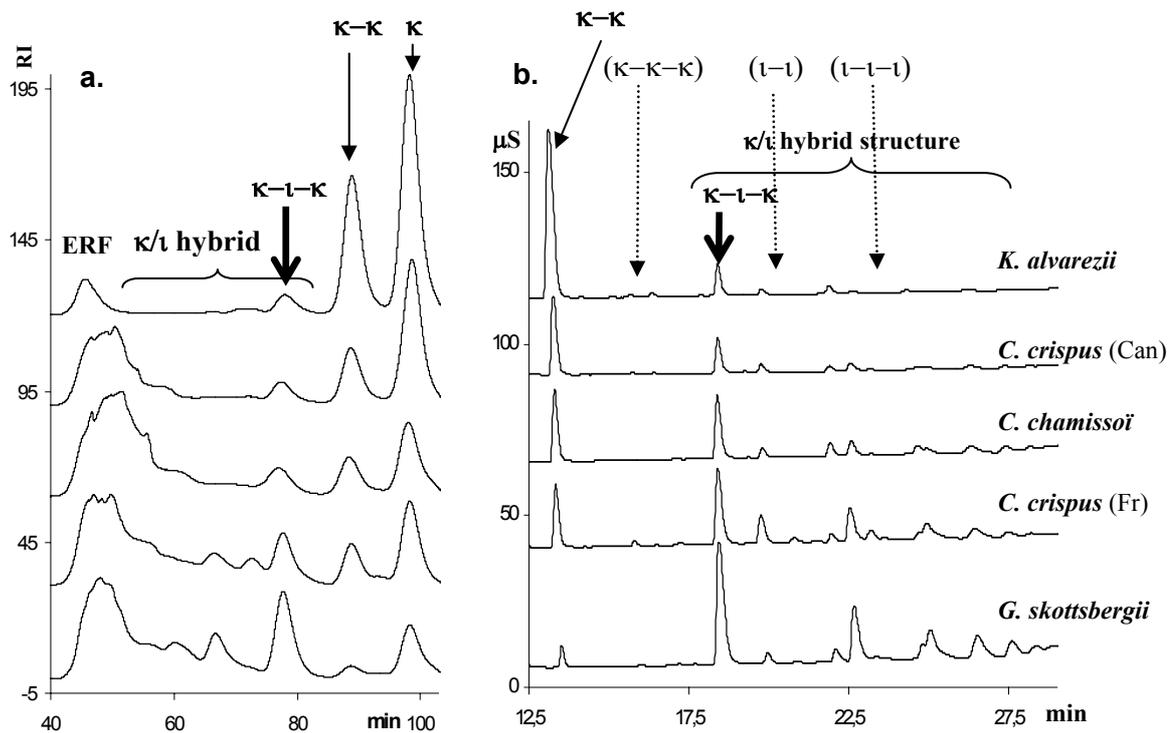


Figure 4 Analyses of κ -carrageenase hydrolysate a. by Size Exclusion Chromatography b. by High Pressure Anion Exchange Chromatography

In an attempt to describe the distribution of ι -carrabioses along the heteropolymer, we have undertaken the characterisation of the oligosaccharides released after hydrolysis of the four κ/ι -hybrid carrageenans by the κ -carrageenase.

In all cases, we observed the production of neo- κ -carrabiose and neo- κ -carratetraose as well as κ/ι -hybrid oligosaccharides of higher molecular weight as was demonstrated by

size exclusion chromatography in Figure 4a. We analysed this complex mixture of oligosaccharides by HPAEC to elucidate both the diversity and amount of κ/ι -hybrid oligosaccharides present. Figure 4b presents the HPAEC chromatograms recorded on the digestion products of the four κ/ι -hybrid carrageenans extracts as well as those of the *K. alvarezii* κ -carrageenan as standards. As expected, the digestion products of the κ -carrageenan of *K. alvarezii* are composed mainly of neo- κ -carrabiose oligosaccharides and in very low amount of oligosaccharides of hybrid structure. When considering the HPAEC profiles of the other seaweeds, the oligosaccharides formed are identical to *K. alvarezii*, but the relative abundance of each oligosaccharide depends strongly on the botanical origin of the carrageenan. We observed a gradient in the ratio between pure κ -oligosaccharides and hybrid oligosaccharides. Interestingly, in the case of *G. skottsbergii*, hybrid oligosaccharides are, so far, the main end product of the κ -carrageenase activity.

The purification and characterisation by ^1H - and ^{13}C -NMR of hybrid oligosaccharides have been undertaken. Our preliminary results revealed a *k-i-k* sequence (DA-G4S-DA2S-G4S-DA-G4S) which has been already been reported^{15, 21}. The evidence of hybrid oligosaccharides released after enzymatic digestion supports the idea of copolymer structures for these κ/ι -hybrid carrageenans. The structure of other hybrids which are now subjected to full NMR characterisation in the laboratory, suggest that the distribution of the ι -carrabiose units along the κ -carrageenan chain is probably random. This is consistent with the fact that the κ -carrageenase can only accommodate to some extent oligosaccharides having ι -carrabiose units in its activity site.

3.3.2 Copolymers with an Alternating Distribution of ι -Carrabiose and κ -Carrabiose Units

The enzyme resistant fraction corresponds to the fraction of carrageenan which was not converted into oligosaccharides by the combined action of κ - and ι -carrageenases. These resistant fractions were analysed by ^1H NMR and the κ/ι ratios observed are listed table 1.

When we compared the κ/ι ratios of the digested and undigested carrageenan extracts, we observed the enrichment of κ/ι -hybrid carrageenan in ι -carrabiose units. For all the seaweeds tested, the amount of ι -carrabiose was superior to that of the κ -carrabiose. The hydrolysis with the κ -carrageenase which removed κ -carrabiose blocks as well as κ -carrabiose chains containing dispersed ι -motives has lead to a κ/ι ratio close to 45/55. Since this fraction was not degraded by the carrageenases, the distribution of the carrabiose unit did not allow for the productive recognition of this substrate by the enzymes. Preliminary analysis of hybrid oligosaccharides suggests that κ -carrageenase requires at least a κ -carratetraose unit to achieve the disruption of the glycosidic linkage. Consequently, ι -carrabiose units must be inserted between κ -carrabiose units to hinder the action of the κ -carrageenase.

	Prior hydrolysis iota /kappa mol-%	ERF iotase/kappase iota /kappa mol-%
<i>C. crispus</i> (Canada)	31/69	56/44
<i>C. crispus</i> (France)	30/70	55/45
<i>G. skottsbergii</i>	42/58	55/45
<i>C. chamissoi</i>	42/58	58/42

Table 1 Composition in κ - and ι -carrabioses of the Resistant Fraction after κ - and ι -carrageenase hydrolysis. Comparison with the non-hydrolysed polymers.

Because the κ/ι ratio is close to 50/50, the probability is very strong that the ERF is composed of an alternate structure of κ - and ι -carrabiose units. According to this scheme these κ/ι -hybrid carrageenans seem also to have the characteristics of alternating copolymers.

4 CONCLUSIONS

Our investigations showed that the κ/ι -hybrid carrageenans have a copolymer structure which presents different possible organisations: i) κ -carrageenan segments that are readily hydrolysed by κ -carrageenase into neo- κ -carrabioses; ii) a random κ/ι -copolymer structure (i.e. dispersion of ι -carrabiose within κ -chains) which is hydrolysed in κ/ι hybrid oligosaccharides after κ -carrageenase hydrolysis and; iii) an alternating κ/ι -copolymer structure which is not digested by κ - and ι -carrageenases (ERF). These diverse organisations are found in all the κ/ι -carrageenans but in different proportions, depending on their seaweed origin. Hence, κ/ι -hybrid carrageenans with the same κ/ι composition can present a different κ/ι structure organisation. This could explain fine variability observed in the physico-chemical properties of extracts from different sources of raw material. We will now try to further characterise this heterogeneous copolymer structure by the identification of the κ/ι hybrid oligosaccharides formed after κ -carrageenase hydrolysis. This characterisation will also be a source of information about the mode of recognition of this hybrid substrate by these carrageenases.

References

- 1 D. Rees, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1969, **24**, 267.
- 2 S. Knutsen, D. Myslabodski, B. Larsen, and A. Usov, *Botanica Marina*, 1994, **37**, 163.
- 3 H. J. Bixler, K. Johndro, and R. Falshaw, *Food Hydrocolloids*, 2001, **15**, 619.
- 4 R. D. Villanueva, W. G. Mendoza, M. R. C. Rodriguez, J. B. Romero, and M. N. E. Montano, *Food Hydrocolloids*, 2004, **18**, 283.
- 5 M. J. Ridout, S. Garza, G. J. Brownsey, and V. J. Morris, *International Journal of Biological Macromolecules*, 1996, **18**, 5.
- 6 F. van de Velde, H. A. Peppelman, H. S. Rollema, and R. H. Tromp, *Carbohydrate Research*, 2001, **331**, 271.
- 7 F. van de Velde, A. S. Antipova, H. S. Rollema, T. V. Burova, N. V. Grinberg, L. Pereira, P. M. Gilsenan, R. H. Tromp, B. Rudolph, and V. Y. Grinberg, *Carbohydrate Research*, 2005, **340**, 1113.
- 8 C. Rochas, M. Rinaudo, and S. Landry, *Carbohydrate Polymers*, 1989, **10**, 115–127.
- 9 C. W. Greer, I. Shomer, M. E. Goldstein, and W. Yaphe, *Carbohydrate Research*, 1984, **129**, 189.
- 10 C. Bellion, G. Hamer, and W. Yaphe, *Xth international seaweed symposium*, 1981, 379.
- 11 W. Yaphe and B. Baxter, 1955, **3**, 380.
- 12 T. Barbeyron, G. Michel, P. Potin, B. Henrissat, and B. Kloareg, *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**, 35499.
- 13 P. Potin, A. Sanseau, Y. Le Gall, C. Rochas, and B. Kloareg, *European Journal of Biochemistry*, 1991, **201**, 241.

- ¹⁴ P. Potin, C. Richard, T. Barbeyron, B. Henrissat, C. Gey, P. Y., F. E., D. O., C. Rochas, and B. Kloareg, *European Journal of Biochemistry*, 1995, **228**, 971.
- ¹⁵ S. H. Knutsen and H. Grasdalen, *Carbohydrate Polymers*, 1992, **19**, 199.
- ¹⁶ G. Michel, D. Flament, T. Barbeyron, T. Vernet, B. Kloareg, and O. Dideberg, *Acta crystallographica*, 2000, **D56**, 766.
- ¹⁷ G. Michel, T. Barbeyron, D. Flament, T. Vernet, B. Kloareg, and O. Dideberg, *Acta crystallographica*, 1999, **D55**, 918.
- ¹⁸ D. K. Kidby and D. J. Davidson, *Analytical Biochemistry*, 1973, **55**, 321.
- ¹⁹ S. H. Knutsen, M. Sletmoen, T. Kristensen, T. Barbeyron, B. Kloareg, and P. Potin, *Carbohydrate Research*, 2001, **331**, 101.
- ²⁰ F. van de Velde, S. H. Knutsen, A. I. Usov, H. S. Rollema, and A. S. Cerezo, *Trends in Food Science & Technology*, 2002, **13**, 73.
- ²¹ D. Ekeberg, S. H. Knutsen, and M. Sletmoen, *Carbohydrate Research*, 2001, **334**, 49.