

SOMMAIRE

Avant-propos.....	7
Première partie : Introduction générale	9
1. Les algues rouges et les carraghénanes	9
1.1. La paroi des algues rouges	9
1.2. Structure chimique des carraghénanes	10
1.2.1. Nomenclature	11
1.2.2. Classification des carraghénanes.....	12
1.2.2.1. Famille beta	13
1.2.2.2. Famille lambda	14
1.2.2.3. Famille kappa	14
1.2.2.4. Famille oméga	15
1.2.3. Les carraghénanes : des hétéropolymères	15
1.3. Biosynthèse des carraghénanes	16
1.4. Diversité des algues rouges carraghénophytes.....	18
1.4.1. Diversité des espèces.....	18
1.4.2. Cycle de vie	20
1.5. Procédé d'extraction industrielle.....	21
1.6. Propriétés physico-chimiques des carraghénanes	23
1.7. Activités biologiques des carraghénanes.....	26
2. Méthodes d'analyse.....	28
2.1. Poids Moléculaire.....	28
2.2. Méthodes chimiques.....	30
2.3. Spectroscopie Infrarouge.....	32
2.4. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	34
2.5. Analyse par spectrométrie de masse des oligo-carraghénanes.....	39
2.5.1. MALDI-TOF	40
2.5.2. ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry (ESI-MS)	40
2.5.3. Couplage Chromatographie Liquide – Spectrométrie de Masse (LC-MS)..	41
2.6. Analyse de la distribution.....	41
2.6.1. Etudes des propriétés physico-chimiques.....	42

2.6.2. Etude de la distribution par séparation et analyse des produits de dépolymérisation enzymatique.....	43
3. Les carraghénases.....	44
3.1. Les κ -carraghénases	46
3.2. Les ι -carraghénases	51
3.3. La λ -carraghénase.....	55
4. Objectifs et présentation de l'étude.....	56
Deuxième partie : résultats	63
Chapitre 1 : Analyse structurale du κ-/μ-carraghénane de <i>K. alvarezii</i>	63
Chapitre 2 : Analyse structurale du ι-/ν-carraghénane d'<i>E. denticulatum</i>	93
Chapitre 3 : Analyse structurale de carraghénanes hybrides	127
Chapitre 4 : Etude de la conversion alcaline des précurseurs biosynthétiques des carraghénanes	155
Troisième partie : Discussion et perspectives	165
1. Utilisation de la RMN pour l'analyse structurale des carraghénanes	165
2. Les carraghénases dans l'analyse structurale	167
3. Longueur des blocs.....	171
4. Origines de la complexité des échantillons de carraghénanes	174
5. Conclusions et perspectives	174
Quatrième partie : Matériel et méthodes.....	179
1. Extraction des carraghénanes	179
1.1. Extraction en milieu neutre	179
1.2. Extraction alcaline.....	179
2. Purification des κ - et ι -carraghénases.....	180
3. Conditions d'hydrolyse	180
3.1. Pour l'analyse	180
3.2. Pour la purification d'oligo-carraghénanes	181
3.3. Hydrolyse enzymatique des oligo- κ / μ -carraghénanes	181

4.	Purification des oligo-carraghénanes	181
4.1.	HPSEC préparative	181
4.2.	HPAEC semi-préparative	182
5.	Purification des Fractions Résistantes aux enzymes	183
6.	Analyses des carraghénanes et des hydrolysats	183
6.1.	Dosage des extrémités réductrices	183
6.2.	HPAEC analytique	183
6.3.	FACE.....	184
6.4.	Résonance Magnétique Nucléaire.....	184
6.4.1.	Caractérisation par RMN des carraghénanes et des fractions résistantes aux enzymes	185
6.4.2.	Caractérisation par RMN des oligo-carraghénanes.....	185
7.	Conversion alcaline	186
7.1.	Carraghénanes de <i>K. alvarezii</i> et <i>E. denticulatum</i>	186
7.2.	Carraghénane de <i>M. laminarioides</i>	187
	Références bibliographiques.....	190

Première partie :

Introduction générale

Avant-propos

Sur les côtes de l'Europe occidentale, notamment en Bretagne, les algues *Chondrus crispus* et *Mastocarpus stellatus* ont été utilisées depuis très longtemps pour confectionner des flans et des gelées. Ces algues, abondantes sur les côtes irlandaises, étaient alors connues sous le nom d' « Irish moss ». Le terme « carrageenin » a été introduit en 1862 par Stanford, pour désigner le matériel gélatineux qu'il avait extrait de *Chondrus crispus*. Ce terme proviendrait du gaélique « carraigeen » signifiant « rocher moussu ». Cette substance, aujourd'hui appelée carraghénane, a commencé à faire l'objet d'une exploitation industrielle dans les années 1940. En 2007 et 2008, la production mondiale de carraghénanes s'élevait à 50 000 tonnes par an.

Les carraghénanes représentent une famille de galactanes linéaires sulfatés possédant des structures chimiques variées. Ces polysaccharides sont les constituants majoritaires de la paroi de nombreuses algues rouges, notamment dans l'ordre des Gigartinales.

Ces polysaccharides algaux sont incolores, inodores, sans saveur, et non digestibles, c'est pourquoi ils sont abondamment employés par l'industrie alimentaire pour épaissir, gélifier ou stabiliser des préparations. Autorisés par l'Union Européenne comme additifs alimentaires, ils portent le code E407. Dans les produits laitiers, ils peuvent être utilisés pour favoriser la gélification des flans, améliorer la texture des crèmes dessert et des crèmes glacées, ou stabiliser les laits chocolatés. Ils garantissent la cohésion des viandes et poissons reconstitués et peuvent être utilisés dans ces préparations comme substituants des graisses. Les propriétés texturantes des carraghénanes sont également appréciées en cosmétologie (crèmes, dentifrices) et dans l'industrie pharmaceutique (excipients).

Première partie : Introduction générale

1. Les algues rouges et les carraghénanes

1.1. La paroi des algues rouges

Les cellules végétales possèdent, en plus de leur membrane plasmique, une paroi polysaccharidique, dont le rôle est à la fois structural et protecteur. Sa structure semi-rigide forme une armature résistante qui permet de soutenir l'organisme, de résister à la pression osmotique, et de se protéger contre les agressions extérieures. La paroi joue aussi un rôle lors de la croissance et du développement de l'organisme.

Les cellules des algues, comme celles des plantes supérieures, possèdent une paroi, constituée d'une phase squelettique et d'une phase matricielle (**Figure 1**). La paroi des algues diffère de celle des plantes terrestres par l'importance relative de sa phase matricielle par rapport à la phase squelettique, et par la nature de cette phase matricielle.

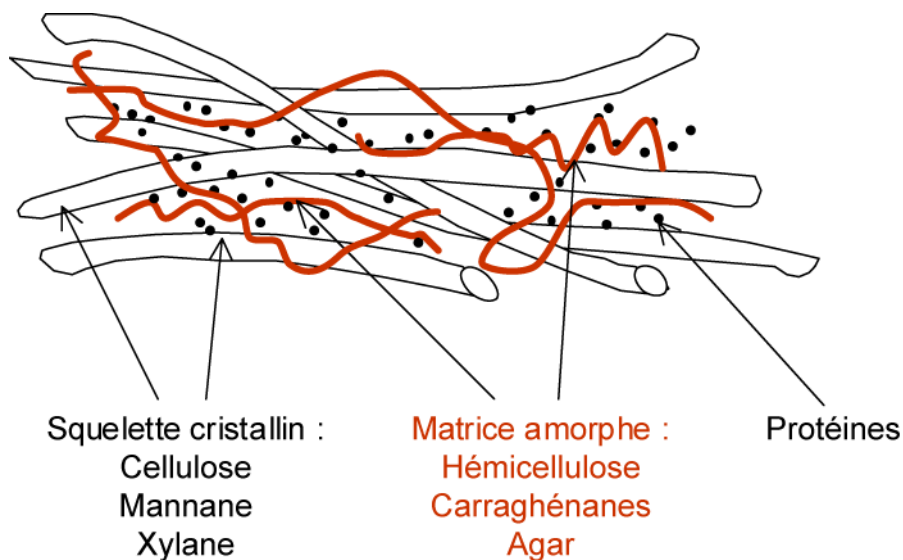


Figure 1 : Représentation schématique de la paroi des algues rouges.

La phase squelettique est composée de polysaccharides linéaires neutres et insolubles. La cellulose en est le polysaccharide majoritaire, elle est présente sous forme de microfibrilles cristallines, et représente de 1 à 9 % du poids sec de l'algue (Ross, 1953). Cette phase

squelettique peut également être constituée de mannanes ou de xylanes de structures diverses (Craigie, 1990).

La phase matricielle est composée d'un réseau de polysaccharides anioniques appelés phycocolloïdes. Les constituants majoritaires de la paroi de nombreuses algues rouges, de la classe des Florideophyceae, sont des galactanes linéaires sulfatés dont les unités galactopyranose sont alternativement liées en $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\beta(1\rightarrow4)$. Ces macromolécules sont classées en trois grandes familles : les carraghénanes, les agarocolloïdes et les carragars. Les unités liées en β sont toujours de configuration D, tandis que les unités liées en α sont de configuration D dans le cas des carraghénanes et L dans le cas des agarocolloïdes. Les carragars possèdent des structures intermédiaires entre les carraghénanes et les agarocolloïdes. Les carraghénanes sont beaucoup plus sulfatés (17 à 53% de sulfate), que les agarocolloïdes (0 à 8%) (Armisen, 2000). Ces polysaccharides composent également la matrice intercellulaire, qui joint les cellules entre elles, et qui est totalement dépourvue de squelette cellulosique insoluble. La paroi des algues contient également des protéines qui, bien que présentes en faible quantité, jouent un rôle important pour la biosynthèse (en particulier pour la maturation des carraghénanes) et le maintien de la structure de la paroi (Vreeland & Kloareg, 2000).

Grâce à sa composition chimique particulière et à son architecture, la paroi confère aux cellules d'algues rouges des propriétés particulièrement adaptées à la vie en milieu marin (Kloareg & Quatrano, 1988). Elle possède une souplesse et une élasticité qui lui permettent de résister à l'hydrodynamisme du milieu. Le caractère fortement hydrosoluble de ses constituants permettrait une rétention d'eau assurant la résistance à la dessiccation lors des longues périodes d'émersion. Sa concentration en groupements sulfate lui permet d'intervenir dans la régulation ionique et osmotique. La paroi agit aussi comme barrière vis-à-vis des agressions extérieures, tout en assurant les échanges avec le milieu, notamment les échanges ioniques et gazeux. Elle participe également aux phénomènes d'adhésion au support rocheux.

1.2. Structure chimique des carraghénanes

Les carraghénanes sont des galactanes linéaires sulfatés, de poids moléculaire compris entre 10^5 et 10^6 Da environ (Viebke *et al.*, 1995) dans lesquels les unités D-galactose sont alternativement liées par liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\beta(1\rightarrow4)$. Les unités de répétition sont donc des disaccharides, appelés carrabioses, qui se distinguent par la présence et la position de groupements tels que des groupements sulfate, O-méthyle ou pyruvate sous la forme de cétal

cyclique. Il arrive aussi que les carraghénanes soient substitués par des groupements glycosidiques tels que le β -D-xylopyranose (Craigie, 1990) (Stevenson & Furneaux, 1991). L'unité α -D-galactopyranose peut également exister sous la forme 3,6-anhydro-D-galactopyranose. Les unités β -D-galactopyranose et α -D-galactopyranose adoptent la conformation chaise 4C_1 qui permet de placer en position équatoriale les groupements les plus volumineux, comme le groupement CH_2OH , ainsi que les éventuels substituants. Pour les unités 3,6-anhydro-D-galactopyranose, la conformation en chaise 1C_4 est imposée par la présence du pont 3,6-anhydro (**Tableau 1**).

structure chimique		
nom systématique	(1→3) β -D-galactopyranose (1→4) α -D-galactopyranose	(1→3) β -D-galactopyranose (1→4) α -D-anhydro-galactopyranose
conformation	4C_1 4C_1	4C_1 1C_4
schématisation		

Tableau 1 : Motifs de répétition des gamma- (γ -) et beta- (β -) carraghénanes.

Dans la représentation schématique, en-dessous de chacune des unités galactose est indiqué le code correspondant dans la nomenclature de Knutsen (Knutsen *et al.*, 1994)

1.2.1. Nomenclature

Les différentes unités disaccharidiques ont tout d'abord été désignées par des lettres de l'alphabet grec (Rees, 1969). A chaque nouvelle unité disaccharidique découverte était attribuée une nouvelle lettre. Mais le nombre de motifs disaccharidiques augmentait rapidement et l'alphabet grec ne compte que 24 lettres.

Knutsen a donc proposé une nouvelle nomenclature (Knutsen *et al.*, 1994) basée sur un code alphabétique et numérique, qui permet de décrire n'importe quel motif. Avec cette nomenclature les unités liées en $\alpha(1\rightarrow3)$ sont notées **G**, les unités liées en $\beta(1\rightarrow4)$ sont notées **D**, et les unités 3,6-anhydro-D-galactopyranose sont notées **DA**. Les substituants sulfate sont notés **S**, les méthyles sont notés **M** et les pyruvates sont notés **P**. La position des substituants

est indiquée par le numéro des carbones qui les portent, sauf dans le cas du pyruvate, toujours lié aux carbones 4 et 6 de l'unité **D**. Un des avantages de cette nomenclature est qu'elle s'applique à la fois aux carraghénanes et aux agarocolloïdes. Dans ce dernier cas, les unités liées en $\beta(1\rightarrow4)$, qui sont de configuration L, sont simplement désignées par la lettre **L**, ou par **LA** lorsqu'elles comportent un pont 3,6-anhydro.

Ainsi, les principaux carraghénanes commerciaux, à savoir le kappa- (κ -), le iota- (ι -) et le lambda- (λ -) carraghénanes sont décrits respectivement par les codes (**G4S-DA**), (**G4S-DA2S**) et (**G2S-D2S,6S**).

Dans le cas des oligosaccharides, la position des différentes unités au sein de la molécule est indiquée par les suffixes suivants : **nr** pour l'unité située en extrémité non réductrice et **nr'** pour l'unité directement adjacente. Pour l'unité située en extrémité réductrice, on utilisera le suffixe **r**, et l'on précisera l'anométrie **r α** ou **r β** ; pour l'unité directement adjacente le suffixe sera donc **r' α** ou **r' β** . Ainsi la forme majoritaire du néo-tétra- κ -carraghénane peut s'écrire : DAnr-G4Snr'-DAr' β -G4Sr β .

Cette nomenclature est celle acceptée par l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Néanmoins, à l'heure actuelle les deux nomenclatures coexistent, les lettres grecques étant toujours très largement utilisées pour désigner et classer les différents carraghénanes commerciaux.

1.2.2. Classification des carraghénanes

La classification des carraghénanes a tout d'abord été basée sur leur solubilité dans le potassium (Smith & Cook, 1953). Les carraghénanes extraits de *Chondrus crispus* ont ainsi été séparés en deux fractions, l'une soluble, alors appelée λ -carraghénane, et l'autre insoluble, appelée κ -carraghénane.

Avec les avancées de l'analyse structurale, les carraghénanes ont été classés en différentes familles, en fonction de leur similarité de structure avec le λ - ou le κ -carraghénane (McCandless & Craigie, 1979). Ainsi on trouve dans la famille lambda tous les carraghénanes dont l'unité **G** est porteuse d'un groupement sulfate en position 2 (unité **G2S**), et la famille kappa est composée des carraghénanes dont l'unité **G** est sulfatée en position 4 (unités **G4S**). A ces deux familles se sont ensuite ajoutées la famille beta dont l'unité **G** n'est pas sulfatée (Greer & Yaphe, 1984a) et la famille oméga dont l'unité **G** est sulfatée en position 6 (Mollion *et al.*, 1986) (**Tableau 2**).

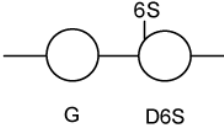
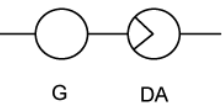
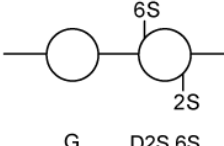
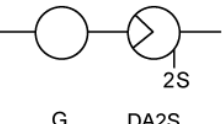
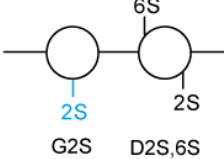
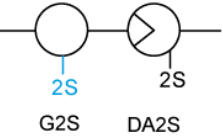
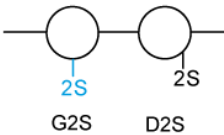
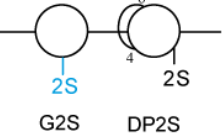
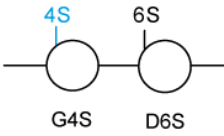
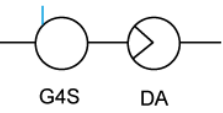
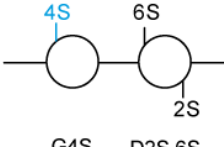
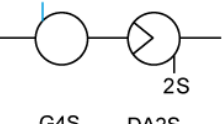
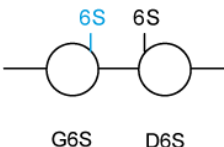

<p>Beta</p> <p>Unité G non sulfatée</p>	<p>Gamma : γ  $\xrightarrow{\text{OH}^-, \Delta}$ Beta : β </p> <p>Delta : δ  $\xrightarrow{\text{OH}^-, \Delta}$ Alpha : α </p>
<p>Lambda</p> <p>Sulfatation de l'unité G en 2</p>	<p>Lambda : λ  $\xrightarrow{\text{OH}^-, \Delta}$ Theta : θ </p> <p>Xi : ξ  Pi : π </p>
<p>Kappa</p> <p>Sulfatation de l'unité G en 4</p>	<p>Mu : μ  $\xrightarrow{\text{OH}^-, \Delta}$ Kappa : κ </p> <p>Nu : ν  $\xrightarrow{\text{OH}^-, \Delta}$ Iota : ι </p>
<p>Omega</p> <p>Sulfatation de l'unité G en 6</p>	<p>Psi : ψ  $\xrightarrow{\text{OH}^-, \Delta}$ Omega : ω </p>

Tableau 2 : Classification des carraghénanes en familles, basée sur la sulfatation de l'unité G.

Les réactions permettant de convertir simplement un motif en un autre motif de la même famille sont indiquées.

1.2.2.1. Famille beta

Elle est constituée de tous les carraghénanes qui ne portent pas de sulfatation sur leur unité G. Le β -carraghénane (beta, **G-DA**) et son précurseur biosynthétique, le γ -carraghénane

(gamma, **G-D6S**) sont présents dans la paroi des algues *Betaphycus gelatinum* (Greer & Yaphe, 1984a), *Furcellaria lumbricalis* (Knutsen & Grasdalen, 1987) et *Tichocarpus crinitus* (Yermak *et al.*, 1999). L' α -carraghénane (alpha, **G-DA2S**) et son précurseur, le δ -carraghénane (delta, **G-D2S,6S**) ont été observés chez *Catenella nipea* (Zablackis & Santos, 1986 ; Falshaw *et al.*, 1996).

1.2.2.2. Famille lambda

Cette famille se caractérise par une sulfatation en 2 de l'unité **G**. Ces carraghénanes se trouvent majoritairement dans les parois des tétrasporophytes de certaines espèces de Gigartinaceae et Phylloporaceae (McCandless *et al.*, 1982 ; McCandless *et al.*, 1983). Le motif le plus fréquemment rencontré est le motif λ (lambda, **G2S-D2S,6S**). La forme mature du λ -carraghénane, le θ -carraghénane (thêta, **G2S-DA2S**) a été rencontrée chez l'algue *Callophyllis hombroniana* (Miller, 2003). Elle peut également être obtenue par lente conversion à partir du λ -carraghénane chauffé en milieu alcalin. On rencontre également chez les formes tétrasporophytes de certaines Gigartinaceae des structures désulfatées comme le ξ -carraghénane (ksi, **G2S-D2S**) (Penman & Rees, 1973), pyruvatées comme le π -carraghénane (pi, **G2S-DP2S**) (DiNinno *et al.*, 1979) ou présentant une sulfatation supplémentaire (**G2S,4S-D2S,6S**) (Guibet *et al.*, 2006).

1.2.2.3. Famille kappa

Elle regroupe tous les carraghénanes qui portent une sulfatation en position 4 de leur unité **G**. Outre le κ -carraghénane (kappa, **G4S-DA**), elle contient le ι -carraghénane (iota, **G4S-DA2S**), ainsi que leurs précurseurs biosynthétiques respectifs : le μ -carraghénane (mu, **G4S-D6S**) et le ν -carraghénane (nu, **G4S-D2S,6S**) (Anderson *et al.*, 1973). Le μ -carraghénane et le ν -carraghénane peuvent être convertis respectivement en κ -carraghénane et en ι -carraghénane lors de la biosynthèse par l'action d'enzymes, les galactose-6-sulfurylases. Cette conversion est également réalisée par un traitement alcalin à chaud au cours du procédé industriel (Bellion *et al.*, 1983). Ces carraghénanes se retrouvent chez de nombreuses espèces d'algues rouges, soit sous la forme de quasi homopolymères, soit sous la forme d'hétéropolymères constitués d'au moins deux des quatre motifs présentés. Il est intéressant de noter que parmi les carraghénanes, le ι -carraghénane est celui qui porte le plus fréquemment des substituants méthyles. Il a par exemple été observé récemment un carraghénane de structure quasi idéale (**G4S,6M-DA2S**) (Chiovitti *et al.*, 2004).

1.2.2.4. Famille oméga

Cette dernière famille concerne les carraghénanes portant une sulfatation sur le carbone 6 de l'unité G. L' ω -carraghénane (oméga, **G6S-DA**) et son présumé précurseur, le ψ -carraghénane (psi, **G6S-D6S**) ont été découverts chez *Rissoella verruculosa* (Mollion *et al.*, 1986). Des motifs ω -carraghénanes avaient déjà été identifiés dans des structures κ chez *Furcellaria lumbricalis* et *Phyllophora nervosa* (Usov & Arkhipova, 1981).

1.2.3. Les carraghénanes : des hétéropolymères

Les carraghénanes diffèrent, nous l'avons vu, par la présence ou non des ponts 3,6-anhydro ainsi que par le type, le nombre et la position des substituants. Mais la grande diversité de cette famille de polysaccharide s'explique bien plus encore par leur nature hétéropolymérique. En effet, il est maintenant généralement admis, et même démontré dans certains cas, que les carraghénanes ne sont pas des homopolymères, mais sont composés de différentes unités dissaccharidiques, présentes sur une même molécule. Ainsi, la nature hybride des carraghénanes extraits de *Betaphycus gelatinum* (Greer & Yaphe, 1984a ; Knutsen *et al.*, 1990 ; Knutsen, 1992), *Kappaphycus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum* (Bellion *et al.*, 1981) *Eucheuma nudum*, et même *Hypnea musciformis* (Greer *et al.*, 1984 ; Greer & Yaphe, 1984b) a été démontrée. Chez *K. alvarezii*, des motifs ι minoritaires sont présents sur la chaîne de motifs κ , alors que chez *E. denticulatum*, à l'inverse, des motifs κ minoritaires sont présents sur la chaîne de motifs ι . Chez *E. nudum* on rencontre trois types de motifs, ι , ν et κ , ainsi que chez *B. gelatinum* chez qui l'on rencontre des motifs β , κ et γ .

L'hybridité de carraghénanes provenant de la famille des Gigartinaceae a été démontrée par l'étude de leurs propriétés physico-chimiques (van de Velde *et al.*, 2001). Ces carraghénanes, composés de motifs κ et ι , avaient en effet des propriétés rhéologiques différentes de celles d'un mélange physique de κ -carraghénane et de ι -carraghénane purs. Dans la plupart des cas cependant, l'hybridité a été révélée par l'analyse des produits d'hydrolyse enzymatique (Bellion *et al.*, 1981 ; Guibet *et al.*, 2008). Pour illustrer l'hétérogénéité des carraghénanes, il est commun de présenter un diagramme de Stancioff (Stancioff, 1981), qui classe les κ -/ ι -carraghénanes provenant de diverses algues en fonction de leur composition (**Figure 2**).

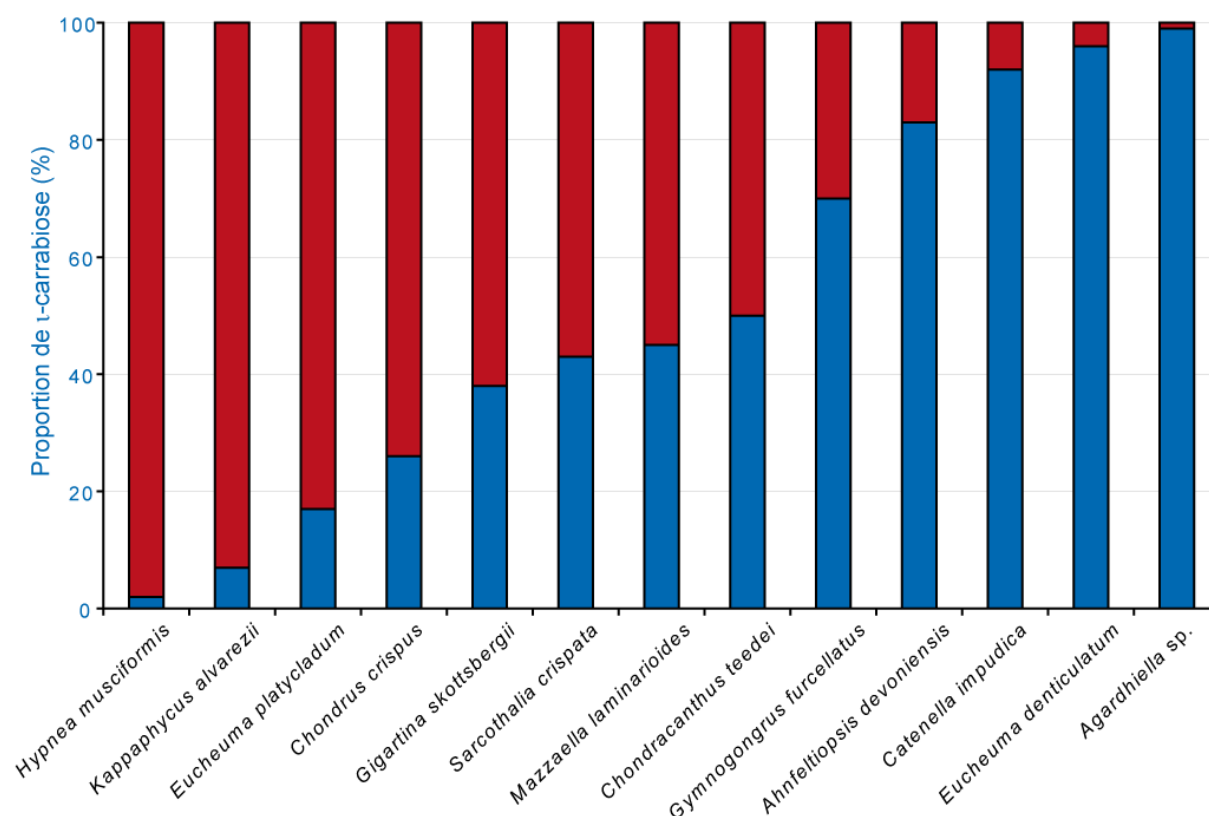


Figure 2 : Diagramme de Stancioff. Ce diagramme rassemble différentes espèces d'algues rouges produisant des κ - ι -carraghénanes, et les classe en fonction de leur teneur en motifs ι (Bixler *et al.*, 2001 ; van de Velde *et al.*, 2005).

De plus, on rencontre dans certaines algues rouges des galactanes dans lesquels les unités de configuration D et L sont présentes dans un rapport différent de 1 pour 1, c'est-à-dire que ces galactanes sont des hybrides agar-carraghénanes, appelés carragars. Parmi ces galactanes, certains sont les polysaccharides matriciels majoritaires de l'algue considérée, dans d'autres cas ils ne représentent qu'une très petite fraction de la phase matricielle (Estevez *et al.*, 2004).

1.3. Biosynthèse des carraghénanes

La biosynthèse des polysaccharides d'algues rouges est un processus complexe et encore très mal connu. Les études sont peu nombreuses et un seul schéma de biosynthèse des carraghénanes a été proposé (Craigie & Wong, 1978). Ce schéma hypothétique (**Figure 3**) se base, d'une part, sur la caractérisation de certaines enzymes du processus, notamment les galactose-6-sulfurylases, qui catalysent la formation des ponts 3,6-anhydro, et d'autre part sur la coexistence de différents motifs carrabiose dans les chaînes de carraghénane.

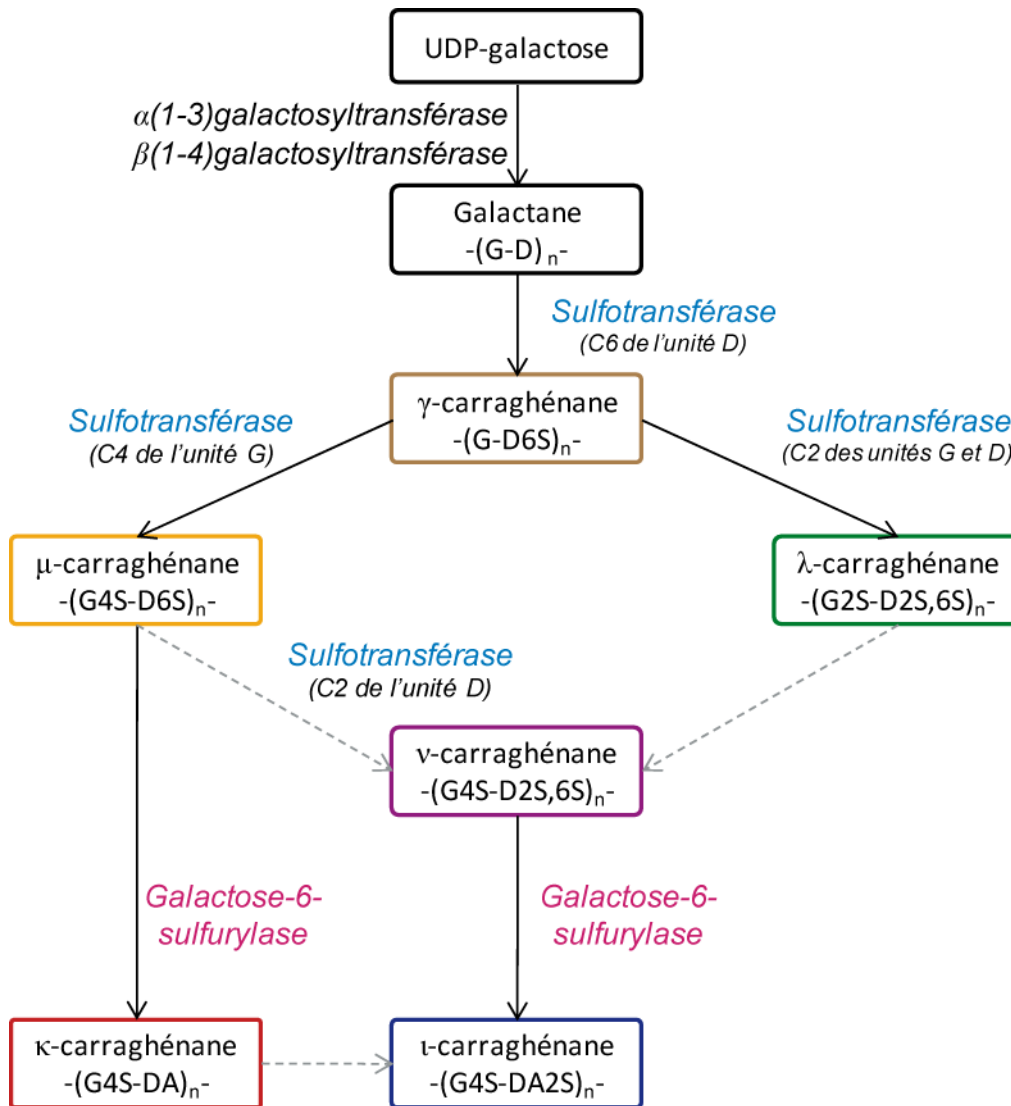


Figure 3 : Schéma hypothétique de biosynthèse des carraghénanes (Craigie & Wong, 1978).

Une activité galactose-6-sulfurylase a tout d'abord été détectée chez *Porphyra umbilicalis* (Rees, 1961), elle permet de convertir le porphyrane (**G-L6S**) en agarose (**G-LA**). Une activité similaire, permettant de convertir le μ -carraghénane en κ -carraghénane a ensuite été détectée chez *Mastocarpus stellatus* (Lawson & Rees, 1970) et chez les formes gamétophyte et sporophyte de *Chondrus crispus* (Wong & Craigie, 1978). Plus récemment, des enzymes catalysant la conversion du ν -carraghénane en ι -carraghénane ont été isolées chez *Chondrus crispus* (Genicot *et al.*, 2004 ; Genicot-Joncour *et al.*, 2009).

Sur la base de ces caractérisations, le schéma de biosynthèse communément admis suggère que la première étape serait la formation du polysaccharide neutre, le galactane, et interviendrait dans l'appareil de Golgi. Cette polymérisation se ferait, dans le cas des

carraghénanes, à partir d'UDP-D-galactose, lui-même obtenu par action de l'UDP-glucose-4-épipimérase sur l'UDP-glucose produit par la photosynthèse (Manley & Burns, 1991 ; Prosselkov *et al.*, 1996 ; Goulard *et al.*, 1999). L'alternance des liaisons $\alpha(1\rightarrow3)$ et $\beta(1\rightarrow4)$ suggère l'action de deux glycosyl-transférases différentes, qui n'ont, à ce jour, pas encore été caractérisées.

L'étape suivante serait la sulfatation du polymère, qui serait réalisée par des sulfo-transférases. Des études autoradiographiques et histochimiques semblaient montrer que cette étape avait lieu au sein des parois d'*Eucheuma nudum* (La Claire & Dawes, 1976). Plus récemment, un suivi de l'incorporation du sulfate marqué au ^{35}S , réalisé notamment sur *Chondrus crispus* semble montrer qu'au contraire, cette étape aurait lieu dans l'appareil de Golgi (Tveter-Gallagher *et al.*, 1981). Plusieurs sulfo-transférases, chacune spécifique d'une position particulière, seraient nécessaires à l'obtention des différents types de carraghénanes observés.

Les galactanes sulfatés seraient ensuite transportés vers la paroi, où aurait lieu la dernière étape : la formation des ponts 3,6-anhydro par les galactose-6-sulfurylases. Ainsi, les carraghénanes seraient transportés sous leur forme non mature, soluble, et leur gélification interviendrait *in situ*, dans la paroi. Il est probable que certaines sulfo-transférases agissent également au niveau de la paroi algale.

Aucune sulfo-transférase n'ayant été caractérisée, toutes les hypothèses sont permises quant à l'ordre d'action des différentes enzymes. Au-delà du schéma proposé par Craigie & Wong, on pourrait imaginer que le μ -carraghénane soit formé par élimination du sulfate en C2 du ν -carraghénane, ou encore que le κ -carraghénane soit formé à partir du ι -carraghénane.

1.4. Diversité des algues rouges carraghénophytes

1.4.1. Diversité des espèces

Les phycocolloïdes d'algues rouges proviennent de la classe des Florideophyceae. Les carraghénanes sont produits par des algues de l'ordre des Gigartinales, tandis que les agarocolloïdes sont produits par des algues des ordres des Gelidiales et Gracilariales. D'autres ordres, comme les Ceramiales, produisent de nombreux galactanes hybrides de type carragar.

Parmi les Gigartinales, les algues les plus employées pour l'extraction des carraghénanes sont des Solieriaceae et des Gigartinaceae. De manière plus anecdotique, des

Furcellariaceae, des Phyllophoraceae ou des Gigartinaceae sont également exploitées industriellement (**Figure 4**).

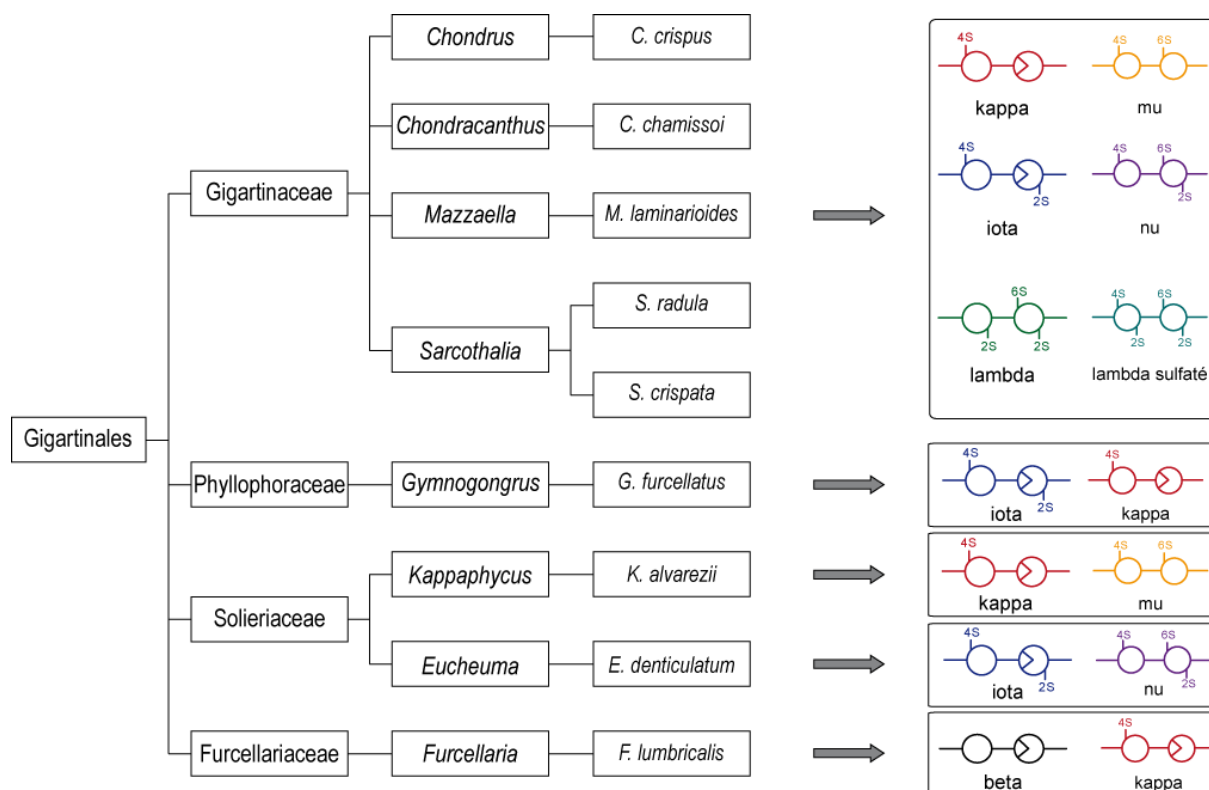


Figure 4 : Exemples d'espèces d'algues rouges carraghénophytes (Gigartinales, Florideophyceae) et structure des carraghénanes de leur paroi.

Des tentatives de classification des algues rouges basées sur la composition de leur paroi ont été réalisées (Fredericq *et al.*, 1996 ; Chopin *et al.*, 1999). Cependant il s'est avéré difficile de dégager des caractéristiques communes aux polysaccharides pariétaux des algues d'une même famille.

A l'heure actuelle, la production de carraghénanes est dominée par des espèces tropicales cultivées, *Kappaphycus alvarezii* et *Eucheuma denticulatum*. Ces deux espèces sont des Solieriaceae, qui produisent respectivement du κ - et du ι -carraghénane. Elles sont principalement cultivées dans les eaux chaudes des Philippines, d'Indonésie ou de Tanzanie.

Des Gigartinaceae comme *Gigartina skottsbergii*, *Sarcothalia radula*, *Sarcothalia crispata*, *Mazzaella laminarioides* ou *Chondracanthus chamissoi* sont de plus en plus utilisées par les industriels. Ces algues produisent des carraghénanes hybrides formés principalement de motifs κ et ι . Elles sont récoltées parmi des populations sauvages dans les eaux tempérées

d'Amérique du Sud (Chili, Argentine). *Chondrus crispus*, une autre Gigartinaceae, était la principale espèce exploitée jusque dans les années 1970. Elle provient des côtes de l'Atlantique Nord (Canada et France) et produit également du κ - ι -carraghénane.

Le β -carraghénane et sa forme hybride β - κ -carraghénane sont obtenus à partir d'une Solieriaceae, *Betaphycus gelatinum* (Chine), d'une Furcellariaceae, *Furcellaria lumbricalis* (Mer Baltique), ou d'une Tichocarpaceae, *Tichocarpus crinitus* (Pacifique Nord-Ouest).

1.4.2. Cycle de vie

Les algues rouges ont un cycle de reproduction complexe, de type haplodiplophasique trigénétiq. Les individus gamétophytes, mâles et femelles, produisent des gamètes haploïdes, mâles et femelles, qui vont fusionner lors de la fécondation pour former un carposporophyte diploïde. Celui-ci va se développer sur l'individu femelle et libérer des carpospores diploïdes, qui vont ensuite se développer en individus tétrasporophytes diploïdes. Par méiose, le tétrasporophyte va produire des tétraspores haploïdes, qui vont se développer en individus gamétophytes mâles et femelles (**Figure 5**).

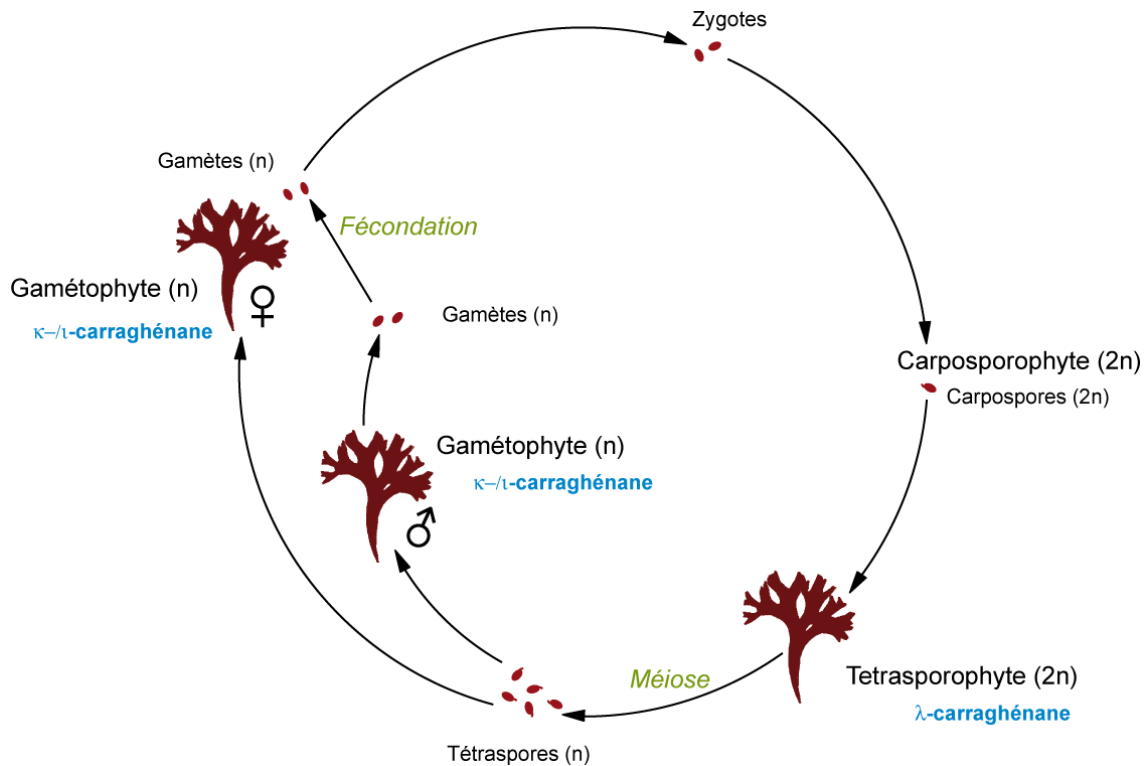


Figure 5 : Cycle de vie de *Chondrus crispus* (Gigartinaceae) et structure des carraghénanes correspondants.

Chez certaines espèces de Gigartinaceae et de Phyllophoraceae, les carraghénanes produits par les individus gamétophytes et sporophytes peuvent être de structures différentes, et ce même si ces deux générations sont similaires morphologiquement. Ainsi, chez les genres *Chondrus*, *Gigartina*, *Iridaea*, et *Sarcothalia*, les individus gamétophytes produisent des carraghénanes de la famille kappa (κ , μ , ι , ν) tandis que les individus sporophytes produisent des carraghénanes de la famille lambda (λ , θ , π , ξ) (McCandless *et al.*, 1973 ; Craigie, 1990 ; Stortz & Cerezo, 1993 ; Falshaw & Furneaux, 1994 ; Stortz *et al.*, 1994). Ainsi, dans le cas d'espèces isomorphes, les algues récoltées et utilisées pour l'extraction de carraghénanes sont souvent un mélange d'individus gamétophytes et sporophytes, et le produit industriel résultant est un mélange de carraghénanes de structures κ et λ .

En revanche, chez les Solieriaceae, qui sont les algues les plus utilisées par l'industrie, la structure des carraghénanes ne varie pas au cours du cycle de vie : *Kappaphycus alvarezii* produit majoritairement du κ -carraghénane et *Eucheuma denticulatum* produit essentiellement du ι -carraghénane (Bellion *et al.*, 1981).

1.5. Procédé d'extraction industrielle

Afin de conserver la qualité des carraghénanes, les opérations de séchage des algues et de nettoyage après la récolte doivent être réalisées avec soin. Il s'agit à la fois d'éliminer le sable et tous les matériaux non algaux pour conserver une valeur marchande acceptable, et de sécher les algues jusqu'à obtenir un pourcentage d'humidité compris entre 35 et 40 %, qui permet de préserver la qualité des carraghénanes tout en évitant que les algues ne se brisent. Pour cela les algues sont en général séchées au soleil, soit à même le sol, soit sur des claies qui permettent au sable de tomber au fur et à mesure du séchage. Aux Philippines et en Indonésie, 2 à 3 jours sont en général suffisants pour atteindre le bon taux d'humidité.

L'extraction en elle-même est réalisée sur des algues, lavées ou non, en milieu aqueux alcalin à chaud, sous agitation vigoureuse, et parfois sous pression (**Figure 6**). L'hydroxyde de sodium ou de calcium, ou encore le carbonate de sodium, sont utilisés comme agents alcalins. Ces conditions alcalines permettent d'éviter que l'auto-hydrolyse acide ne diminue le poids moléculaire des carraghénanes et donc leurs propriétés gélifiantes. Cela permet également d'induire la formation des ponts 3,6-anhydro et ainsi d'augmenter le pouvoir de gélification. Lors de cette étape les carraghénanes passent en solution. Tous les matériaux insolubles sont

ensuite éliminés, soit directement par filtration, soit par centrifugation suivie d'une filtration sur gel de silice. La solution clarifiée ainsi obtenue est parfois concentrée par évaporation ou ultrafiltration. Le carraghénane est ensuite récupéré sous forme solide (ou gélifiée) par précipitation dans l'alcool (le plus souvent l'isopropanol). Le chlorure de potassium est dans certains cas utilisé à la place de l'alcool, avec l'inconvénient que beaucoup d'ions potassium sont retrouvés dans le produit final. Le coagulum obtenu est pressé pour éliminer un maximum de liquide, il est parfois de nouveau lavé dans l'alcool pour éliminer toute l'eau. Le matériel ainsi obtenu est séché puis broyé pour former une poudre. Le rendement final est d'environ 25%, par rapport à la masse initiale d'algues sèches (Bixler, 1996).

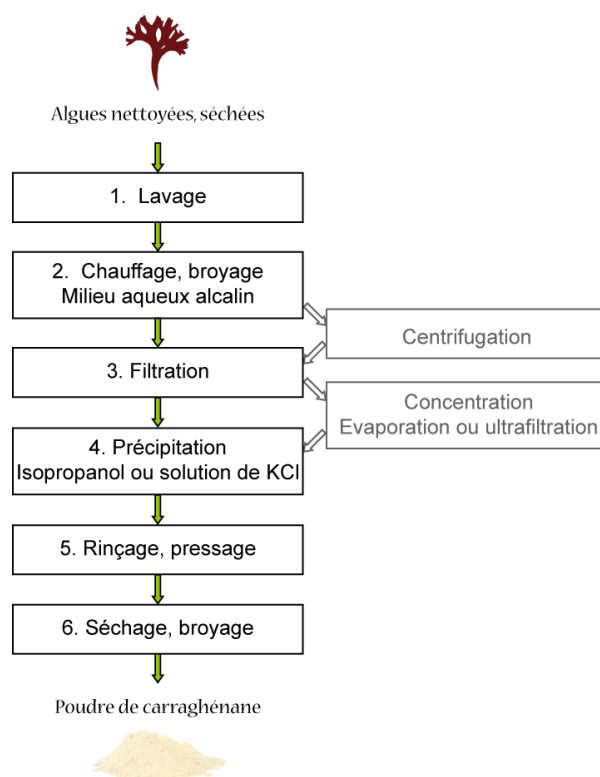


Figure 6 : Procédé d'extraction industrielle des carraghénanes.

Les étapes indiquées en gris sont facultatives.

La qualité des carraghénanes est extrêmement variable d'une production à l'autre, et de nombreux paramètres peuvent en être à l'origine, comme la qualité du séchage ou la durée de stockage. La solution la plus simple et la moins onéreuse consiste à réaliser des formulations permettant d'obtenir les propriétés rhéologiques recherchées, en mélangeant des carraghénanes provenant de différentes productions.

1.6. Propriétés physico-chimiques des carraghénanes

L'intérêt majeur des carraghénanes réside dans leur capacité à modifier la texture des préparations auxquelles ils sont mélangés. Ainsi l'ajout de carraghénane à une solution permet d'en augmenter drastiquement la viscosité, voire de former des gels. La présence des groupements sulfate et des unités anhydro-galactose est à l'origine de ces propriétés. Le κ -carraghénane forme ainsi des gels durs tandis que le ι -carraghénane forme des gels élastiques. Ces gels sont thermo- et iono-réversibles. A haute température, les polysaccharides sont en solution ; l'abaissement de la température provoque la transition sol/gel. La force ionique et la nature des ions présents dans la solution modulent également la solubilité des polysaccharides et l'élasticité des gels obtenus. Ainsi la gélification du κ -carraghénane est induite par l'ajout d'ions potassium tandis que celle du ι -carraghénane est induite par les ions calcium. Le retrait de ces ions, par exemple par dialyse, permet de revenir à un état non gélifié (**Tableau 3**).


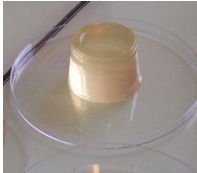
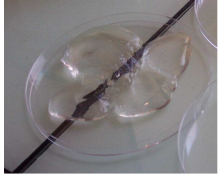
	λ -carraghénane	κ -carraghénane	ι -carraghénane
Préparations à 1 %			
Solubilité dans l'eau	A froid	A chaud (60°C)	
Gélification	Non	Oui	
Induction des gels	-	Diminution T° Augmentation [cations]	
Propriétés des gels	-	Thermoréversible Ionoréversible	
Cations promoteurs de gel	-	K ⁺ Gel cassant	Ca ²⁺ Gel élastique
Synérèse	-	Oui	Non
Thixotropie	-	Non	Oui

Tableau 3 : Propriétés des gels et solutions des principaux carraghénanes.

Les mécanismes de gélification du κ - et du ι -carraghénane ont fait l'objet de nombreuses études. Il est globalement admis que la transition d'un état conformationnel désordonné à un état ordonné serait la première étape, précédant la gélification. Les mécanismes macromoléculaires de cette transition font encore l'objet de nombreux débats (Piculell *et al.*, 1998 ; Bongaerts *et al.*, 1999). Dans leur état ordonné, les chaînes de carraghénanes s'arrangent en hélices. Deux théories s'opposent quant au nombre de chaînes impliquées dans ces hélices. La première supporte la formation de doubles hélices (Anderson *et al.*, 1969) tandis que la seconde théorie suggère la formation d'hélices simples (Smidsrød & Grasdalen, 1982) (**Figure 7**). La plupart des méthodes de caractérisation utilisées, telles la détermination du poids moléculaire, de l'activité optique, la RMN, la modélisation moléculaire ou encore la calorimétrie (Viebke *et al.*, 1998), ne permettent pas de lever l'ambiguïté entre une double hélice et un dimère d'hélices simples. L'analyse de la dépolymérisation, par voie chimique ou enzymatique, repose sur l'étude de la réactivité des hélices de carraghénane, et semble plus prometteuse (Hjerde *et al.*, 1998 ; Nyvall-Collen *et al.*, 2009). Toutefois, des conclusions contradictoires découlent de ces études, la première supportant l'idée d'une double hélice et la seconde celle d'une hélice simple.

Les hélices, simples ou doubles, s'associeraient ensuite en agrégats, en présence de cations, permettant ainsi la formation d'un réseau tridimensionnel. La formation d'hélices suppose une structure régulière des chaînes de carraghénane, que la présence d'unités anhydro-galactose tend à stabiliser. Dans les cas des κ - et ι -carraghénanes, cette structure régulière est obtenue par l'alternance des unités G4S et DA ou DA2S, de conformations chaises 4C_1 et 1C_4 respectivement. L'absence, sur les unités D, du pont 3,6-anhydro, impose un changement de conformation, de 1C_4 à 4C_1 , qui provoque un changement brusque de direction de la chaîne polysaccharidique, comme c'est le cas avec les unités μ et ν . Ces "kinks" limitent donc la longueur des hélices, mais permettent une réticulation des hélices entre elles, aboutissant à la formation d'un réseau tridimensionnel (Rees, 1969). En trop grand nombre ils bloquent la mise en place de ce réseau, mais leur absence limite la réticulation inter-chaîne, ce qui empêche également la gélification (van de Velde *et al.*, 2002).

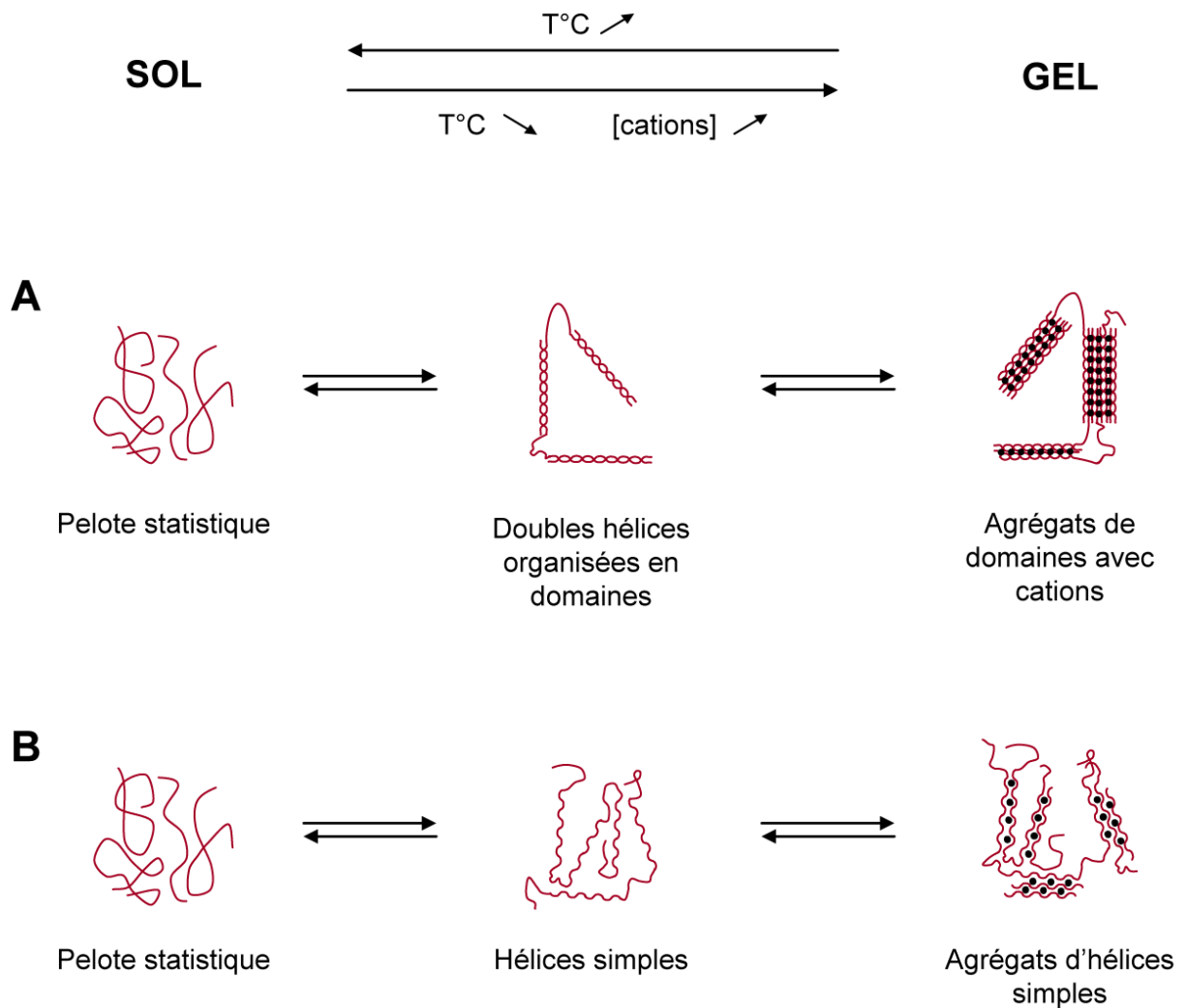


Figure 7 : Mécanismes de gélification du κ -carraghénane en présence d'ions K^+ .

(A) Théorie du « Domain model » (Morris *et al.*, 1980); (B) Théorie « nested helices model » (Smidsrød & Grasdalen, 1982). Les points noirs (•) représentent des ions K^+ .

Le λ -carraghénane, à l'inverse des κ - et ι -carraghénanes, ne forme pas de gels, mais permet d'augmenter considérablement la viscosité des solutions. Celle-ci augmente d'ailleurs avec la concentration en λ -carraghénane, et diminue en présence de sels et par augmentation de la température. Ces propriétés s'expliqueraient notamment par l'absence de pont 3,6-anhydro et la présence de nombreux groupements sulfate.

Le β -carraghénane pur semble avoir des propriétés semblables à celles de l'agarose. Ce carraghénane est capable de former des gels durs, qui ne sont pas affectés par la présence de sels (Renn *et al.*, 1993). Cependant un tel carraghénane n'est présent qu'en très faibles quantités dans des algues produisant du κ -/ β -carraghénane, ce qui limite son utilisation. Les κ -

β -carraghénanes ont des propriétés rhéologiques proches du κ -carraghénane, mais les gels formés sont moins durs et la présence de sels peut empêcher la gélification (Yermak *et al.*, 1999).

1.7. Activités biologiques des carraghénanes

Les activités biologiques connues des carraghénanes sont attribuées à leur ressemblance structurale avec les glycosaminoglycanes (GAGs). Cette famille de polysaccharides, dont les membres les plus importants sont l'héparine, les chondroïtines, le dermatane, est impliquée dans de nombreux mécanismes cruciaux pour les organismes animaux.

L'héparine est à l'heure actuelle l'anticoagulant le plus utilisé dans le traitement de la thrombose. Sa ressemblance structurale avec le carraghénane a fait de ce dernier un candidat tout naturellement désigné pour traiter la thrombose en évitant les effets secondaires associés à l'héparine. Aussi des essais *in vitro* ont démontré les propriétés anticoagulantes des carraghénanes (Sen *et al.*, 1994 ; Carlucci *et al.*, 1997 ; Farias *et al.*, 2000 ; Yamada *et al.*, 2000).

Les polysaccharides sulfatés sont connus pour avoir des propriétés antivirales. Les carraghénanes ne font pas exception, et il a été montré qu'ils pouvaient inhiber le développement de certaines infections virales sexuellement transmissibles, notamment le virus du SIDA (HIV), et le virus de l'hépatite A (Witvrouw & DeClercq, 1997). Une activité antivirale des carraghénanes vis-à-vis du virus de l'herpès (HSV) a également été démontrée (Carlucci *et al.*, 1997). Cette activité augmenterait avec le poids moléculaire et la sulfatation, faisant des λ -, μ - et ν -carraghénanes de bons candidats (Witvrouw *et al.*, 1994 ; Kolender *et al.*, 1997). Plus récemment, le ι -carraghénane a montré un pouvoir inhibiteur très important vis-à-vis d'infections aux papillomavirus (Buck *et al.*, 2006 ; Roberts *et al.*, 2007). Les activités antivirales des carraghénanes s'expliqueraient par un blocage de l'adsorption des virus à la surface des cellules (Carlucci *et al.*, 1997 ; Carlucci *et al.*, 2002 ; Carlucci *et al.*, 2004). Leur faible toxicité fait donc des carraghénanes des candidats sérieux pour le traitement d'infections virales, le ι -carraghénane est d'ailleurs passé en tests cliniques pour son aptitude à bloquer la transmission du virus HIV *via* les muqueuses (Elias *et al.*, 1997).

Certains carraghénanes peuvent également limiter le développement et la prolifération de cellules tumorales, notamment en inhibant sélectivement la fixation de certains facteurs de

croissance à leurs récepteurs membranaires (Parish *et al.*, 1987 ; Hoffman, 1993 ; Zhou *et al.*, 2004).

Les oligo-carraghénanes, natifs ou modifiés, ont également des activités biologiques démontrées, souvent du même type, mais amplifiées par rapport au polysaccharide natif. Ainsi des oligo-carraghénanes ont notamment montré des activités anti-virales (Yamada *et al.*, 2000) et anti-tumorales (Haijin *et al.*, 2003).

Les oligo-carraghénanes, comme d'autres oligosaccharides provenant de la dégradation des parois d'algues ou de plantes, peuvent également être impliqués dans les signaux de défense ou de virulence dans les interactions plante-pathogène (Patier *et al.*, 1995 ; Bouarab *et al.*, 1999 ; Lemonnier-Le Penhuizic *et al.*, 2001).

Bien que les carraghénanes soient autorisés pour l'alimentation humaine par la FAO (Food and Agriculture Organisation, Organisation des Nations-Unies pour l'alimentation et l'agriculture), des doutes subsistent quant à leur innocuité, relayés par Tobacman (Tobacman *et al.*, 2008). Il semblerait qu'une ingestion importante de carraghénanes de faible poids moléculaire puisse être à l'origine d'ulcères.

2. Méthodes d'analyse

La structure des carraghénanes révèle différents niveaux de complexité, dont dépendent les propriétés biologiques et physico-chimiques. Ainsi, la longueur des chaînes, leur composition, et la distribution des différents motifs disaccharidiques sont les paramètres que l'analyse structurale vise à caractériser. L'emploi de techniques variées est nécessaire pour une analyse structurale détaillée. Dans un premier temps l'on peut s'attacher à caractériser la longueur des chaînes de carraghénanes, par la mesure de leur poids moléculaire et de la polydispersité de la population de molécules. Ensuite la composition globale des chaînes peut être déterminée par des techniques chimiques ou spectroscopiques. Enfin, la distribution est en général déterminée par l'analyse des produits obtenus par dépolymérisation.

2.1. Poids Moléculaire

Les poids moléculaires des carraghénanes ont tout d'abord été déterminés par des expériences d'osmométrie et d'ultracentrifugation analytique (sédimentation). A l'heure actuelle la diffusion de la lumière, beaucoup plus précise et facile à mettre en œuvre, a largement supplanté les autres techniques.

L'osmométrie permet de mesurer la masse moléculaire moyenne en nombre (M_n) de polyélectrolytes. La pression osmotique mesurée, π , dépendant de la concentration c et de M_n , celui-ci est obtenu facilement en traçant π/c en fonction de c . Avec l'ultracentrifugation analytique on s'intéresse au coefficient de sédimentation s , qui dépend directement de la masse moléculaire moyenne en poids M_w .

La diffusion de la lumière permet de déterminer le poids moléculaire des carraghénanes avec des résultats comparables aux deux techniques précédentes (Slootmaekers *et al.*, 1991) (**Tableau 4**). Elle est le plus souvent utilisée en couplage avec des techniques de séparation, ce qui permet d'obtenir davantage d'informations, notamment en ce qui concerne la polydispersité. La chromatographie d'exclusion stérique (Size Exclusion Chromatography, SEC) permet de séparer les chaînes de carraghénane selon leur volume hydrodynamique. Cependant des interactions avec la matrice du gel peuvent conduire à une rétention ou une dégradation des carraghénanes, et aboutir à des résultats erronés (Viebke & Williams, 2000).

	Kappa	Lambda
LALS (M_w , kDa)	353 ± 25	614 ± 17
LS (M_w , kDa)	331 ± 26	600 ± 25
Sédimentation (M_w , kDa)	332 ± 25	500 ± 45
SEC-LALS (M_w , kDa)	323	664
SEC-LALS (M_n , kDa)	165 ± 25	123 ± 9
Osmométrie (M_n , kDa)	142	131

Tableau 4 : Comparaison des différentes méthodes de mesure du poids moléculaire (Slootmaekers *et al.*, 1991). LALS : Low-Angle Light Scattering ; LS : Static Light Scattering ; SEC : Size Exclusion Chromatography. M_w : poids moléculaire moyen en poids ; M_n : poids moléculaire moyen en nombre.

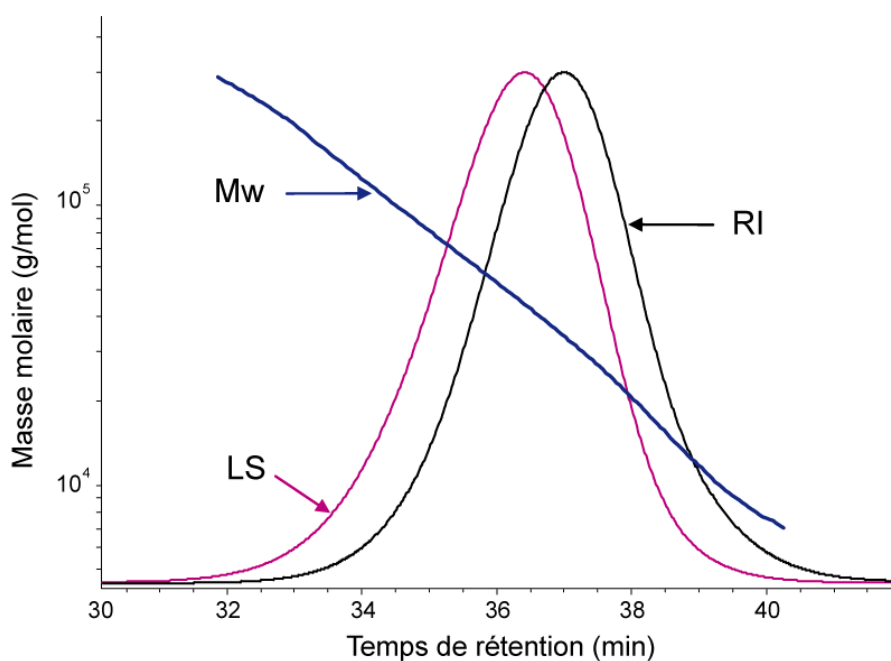


Figure 8 : Mesure de la masse moléculaire des polysaccharides par HPSEC-MALLS.

Analyse d'un échantillon de dextran d'environ 40 kDa. Les polysaccharides sont séparés selon leur masse moléculaire. A chaque instant, la mesure de l'indice de réfraction (RI) permet de calculer la concentration, et la combinaison de cette mesure avec celle de l'intensité de lumière diffusée (LS) permet de calculer la masse moléculaire (ici, masse moléculaire moyenne en poids M_w).

Une technique de séparation plus récente, la FFF (Field-Flow Fractionation), permet de s'affranchir de ces problèmes (Wittgren *et al.*, 1998 ; Viebke & Williams, 2000). En effet cette technique consiste à séparer, dans un capillaire, les macromolécules en fonction de leur coefficient de diffusion, et ce en absence de matrice, ce qui permet d'éviter les interactions indésirables. Cette technique possède également l'avantage de couvrir une plus grande gamme de tailles (10^4 à 10^9 g/mol) que dans le cas de la SEC (10^3 à 10^6 g/mol). La diffusion de la lumière d'une macromolécule dépend de son poids moléculaire, mais aussi de sa concentration, c'est pourquoi il est impératif de déterminer celle-ci de manière très précise à la sortie de la colonne de SEC ou du capillaire de FFF. Pour ce faire, l'utilisation d'un détecteur d'indice de réfraction est appropriée, car c'est une méthode universelle qui convient pour toutes les classes de macromolécules (**Figure 8**). Enfin, la diffusion de la lumière peut être mesurée selon différentes techniques : LALLS (Low-Angle Laser Light Scattering, (Vanneste *et al.*, 1996)), WALLS (Wide-Angle, (Cuppo *et al.*, 2002 ; Reynaers, 2003)) ou MALLS (Multi-Angle). Ces techniques permettent une détermination des poids moléculaires moyens en nombre et en poids, ce qui permet de calculer l'indice de polydispersité I_p , égal au rapport M_w/M_n et égal à 1 dans le cas de macromolécules monodisperses.

2.2. Méthodes chimiques

Pour caractériser les carraghénanes, les premières méthodes utilisées étaient chimiques. Bien que de nombreuses nouvelles techniques soient aujourd'hui disponibles, les méthodes chimiques restent très utilisées, notamment pour la mise en évidence de nouvelles unités de répétition. Ces techniques chimiques impliquent le plus souvent une première étape de dépolymérisation par hydrolyse acide. Il s'agit ensuite de déterminer la composition monosaccharidique, le taux de sulfate, les types de liaisons et les éventuelles substitutions.

Le dosage des oses totaux est réalisé par la méthode phénol/acide sulfurique (Dubois *et al.*, 1956). Le dosage est corrigé, pour la présence des 3,6-anhydrogalactoses, par un dosage indépendant, par la méthode au résorcinol (Yaphe & Arsenault, 1965).

Le taux de sulfate présent dans les carraghénanes est déterminé par dosage des sulfates libérés par hydrolyse acide (**Tableau 5**). Le dosage peut être réalisé de différentes façons, notamment par précipitation des sulfates avec du chlorure de baryum, puis dosage par turbidimétrie (Dodgson & Price, 1962). Le développement de la chromatographie a permis de mettre au point des techniques de dosage par échange d'anions (De Ruiter & Rudolph, 1997),

avec une détection conductimétrique. Les structures idéales de κ -, ι - et λ -carraghénanes possèdent respectivement un, deux et trois groupements sulfate par unité dissaccharidique, ce qui correspond à des taux de sulfate de 20%, 33% et 41% (p/p) (De Ruiter & Rudolph, 1997).

		Kappa	Iota	Lambda
Sulfate (% poids sec)		20	33	41
Monosaccharides (% mol)	Gal	50	50	100
	Anhydro-Gal	50	50	0

Tableau 5 : Composition théorique des carraghénanes.

Les dosages chimiques du sulfate, du galactose et de l'anhydro-galactose, comparés à ces valeurs, permettent de déterminer la structure des carraghénanes.

L'hydrolyse acide nécessaire au dosage des oses totaux et des sulfates présente l'inconvénient de rompre le pont 3,6-anhydro des unités DA. Des méthodes chimiques spécifiques ont donc du être mises au point pour identifier et quantifier les monosaccharides des galactanes d'algues rouges (Stevenson & Furneaux, 1991). Deux méthodes, l'hydrolyse par double réduction ou l'hydrolyse réductrice, permettent de stabiliser les unités DA lors de l'hydrolyse acide. Les produits d'hydrolyse peuvent ensuite être analysés directement par chromatographie en phase inverse (Quemener & Lahaye, 1998), ou être acétylés pour former des alditols acétates volatils, analysables par chromatographie en phase gazeuse. L'identification des différents monosaccharides est effectuée par comparaison à des standards. En revanche, la présence et la position de substituants ne peuvent être déterminées par cette méthode, car ils sont tous éliminés lors de l'hydrolyse. Il est alors nécessaire d'opérer une étape supplémentaire, la perméthylation (**Figure 9**). Les hydroxyles libres de carraghénanes sont méthylés avant l'hydrolyse réductive et l'acétylation. Les dérivés ainsi obtenus, les PMAA (Partially Methylated Alditol Acetate), sont analysés par couplage chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse par impact électronique (GC-EIMS). Les positions méthylées représentent les hydroxyles non substitués, tandis que les positions acétylées représentent les hydroxyles substitués ou impliqués dans les liaisons glycosidiques. Ainsi, les méthodes chimiques permettent d'obtenir de nombreuses et précieuses informations sur la composition des carraghénanes.

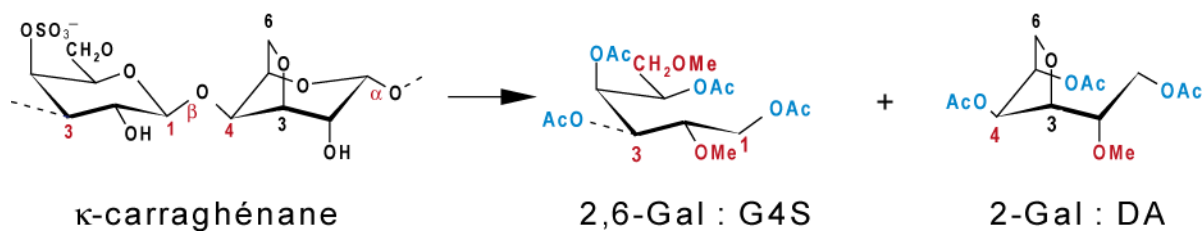


Figure 9 : Réaction de perméthylation du κ -carraghénane (Stevenson & Furneaux, 1991).

Le polysaccharide est méthylié puis hydrolysé, réduit et acétylé. Les PMAA (Partially Methylated Alditol Acetates) ainsi produits sont analysés par GC-MS, ce qui permet de connaître la position des substituants et des liaisons glycosidiques.

2.3. Spectroscopie Infrarouge

La spectroscopie infrarouge, et plus précisément l'infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) est une technique très utilisée pour l'analyse des carraghénanes, car rapide et non-destructive. Dans un premier temps, elle s'est limitée à la caractérisation (McCandless *et al.*, 1973 ; Dawes *et al.*, 1977 ; Whyte *et al.*, 1985), puis Rochas a établi une méthode permettant de quantifier les différents motifs à partir de spectres infrarouges (Rochas *et al.*, 1986).

Les groupements sulfate se caractérisent par deux bandes, à 1240 cm^{-1} et à 1370 cm^{-1} . Le pont 3,6-anhydro est caractérisé par une bande à 930 cm^{-1} . Le signal correspondant aux liaisons carbone-sulfate dépend de la position du sulfate en question : les signaux à 845 , 830 et 820 cm^{-1} correspondent à des sulfates en position 4, 2 et 6 respectivement, d'une unité galactose ; un signal à 805 cm^{-1} correspond à un sulfate en position 2 d'une unité anhydro-galactose (**Figure 10**). Ce sont ces derniers signaux qui permettent de déterminer, de manière qualitative tout d'abord, les différentes unités constitutives du polysaccharide. La bande à 2920 cm^{-1} , correspondant aux liaisons C – H, est commune à tous les sucres, et peut servir de référence. Ainsi, par calcul des intensités relatives de ces différents signaux, il est possible de déterminer le taux de sulfate (signal à 1250 / signal à 2920) ainsi que les proportions relatives des différents motifs (signal correspondant au motif / signal à 1250).

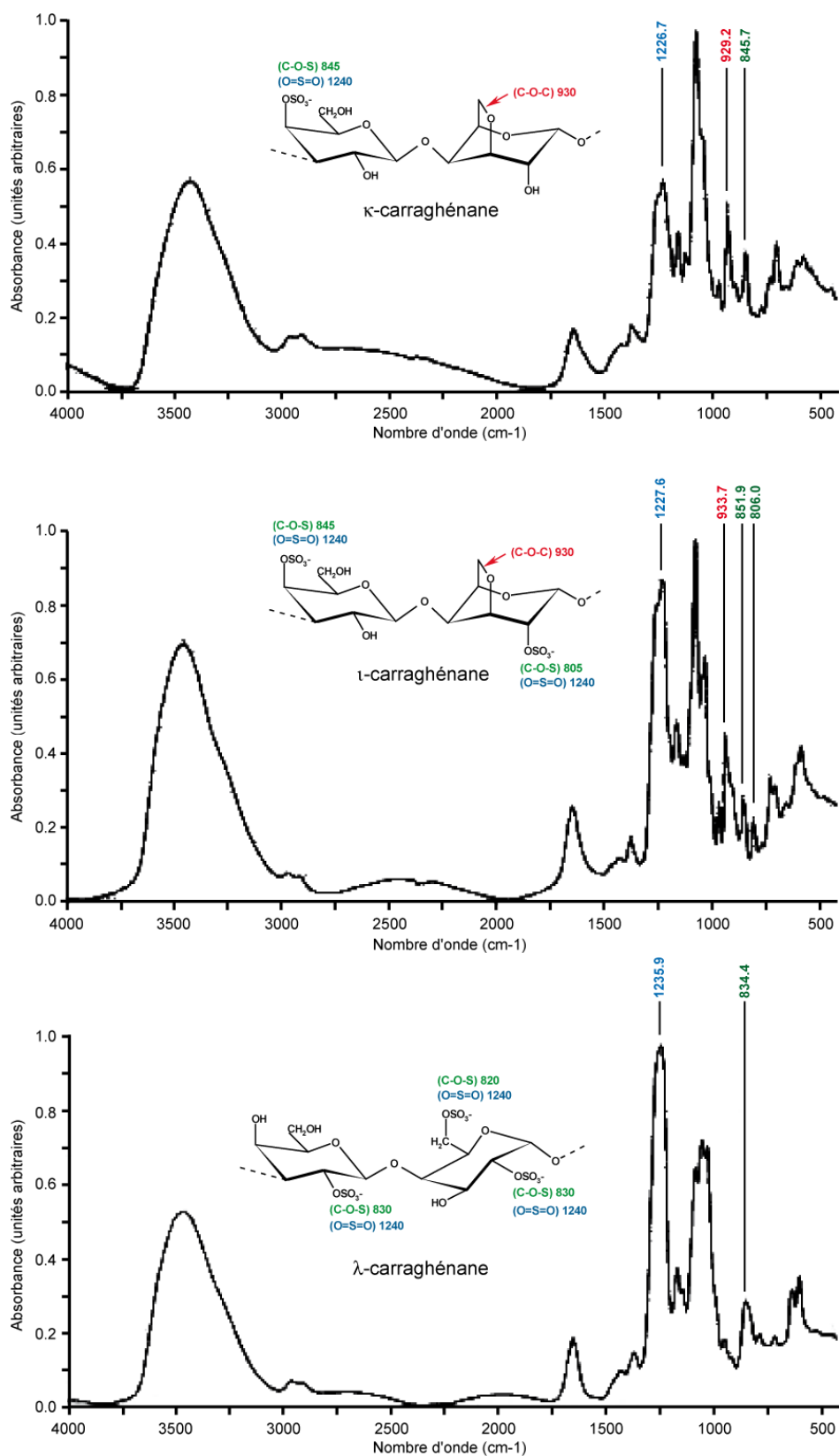


Figure 10 : Analyse Infrarouge des principaux carraghénanes (Prado-Fernández *et al.*, 2003). Les bandes d'absorption caractéristiques sont indiquées. Les valeurs théoriques sont indiquées sur la structure chimique, les valeurs expérimentales sont indiquées sur le spectre.

2.4. *Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)*

L'utilisation de la RMN pour l'analyse des galactanes d'algues rouges, agars et carraghénanes, a été introduite vers la fin des années 1970. Hamer (Hamer *et al.*, 1977) et Bhattacharjee (Bhattacharjee *et al.*, 1978) ont tout d'abord réalisé l'attribution des déplacements chimiques ^{13}C d'oligosaccharides produits par dégradation enzymatique à partir d'agarose, de κ - et de ι -carraghénane. Ils en ont ensuite déduit les déplacements chimiques ^{13}C de ces trois galactanes. Au même moment, Welti (Welti, 1977) s'est intéressé à la RMN du proton, et a donné l'attribution des déplacements chimiques de l'agarose, du κ - et du ι -carraghénane.

Par la suite, la RMN du ^{13}C s'est largement développée et est devenue une méthode de référence pour analyser la composition des agars et des carraghénanes. En effet, elle présente l'avantage d'être rapide et non destructive. De plus, elle permet de discriminer facilement les unités D-galactose des unités L-galactose (caractéristiques des agarocolloïdes) car ces dernières présentent un signal anomérique déblindé de 3 ppm par rapport au D-galactose (Usov *et al.*, 1980). Par rapport à la RMN du proton, elle présente également l'avantage de mieux séparer les différents signaux, notamment anomériques, rendant les attributions plus faciles. Cependant cette méthode est peu sensible, elle ne permet pas de détecter les composants ou contaminants minoritaires, et nécessite une concentration importante (jusqu'à 10 mg/mL). Même à température élevée, cette forte concentration impose une forte viscosité des échantillons, qui se traduit par un élargissement important des signaux. La viscosité des échantillons peut néanmoins être réduite par dépolymérisation (sonication, hydrolyse acide, broyage mécanique) et par acquisition des données à haute température. Ceci a notamment permis d'attribuer les déplacements chimiques du λ -carraghénane (Falshaw & Furneaux, 1994), ce qui était auparavant impossible étant donné la largeur des signaux.

La RMN du proton est plus sensible que celle du ^{13}C , et nécessite une concentration moins importante (jusqu'à 1 mg/mL) et un temps d'acquisition plus court. Cette méthode est plus adaptée pour la quantification, et également pour la détection des composés minoritaires. Elle permet également de résoudre dans le détail la structure d'oligosaccharides complexes.

La spectroscopie de RMN permet de déterminer les différentes unités galactopyranoses qui composent la chaîne de carraghénane, mais elle permet également de

déterminer les unités voisines. En effet, dans le cas des unités G4S par exemple, les déplacements chimiques ne sont pas les mêmes si l'unité G4S est entourée de deux unités DA comme dans le cas du κ -carraghénane, ou de deux unités DA2S comme dans le cas du ι -carraghénane.

En spectroscopie de RMN, chaque motif carrabiose peut être caractérisé facilement par les signaux des carbones et protons anomériques, C1 et H1 (**Figure 11**). En effet, ceux-ci se trouvent déblindés par la proximité des deux atomes d'oxygène liés au C1. Les C1 des unités D et G sont donc isolés dans la zone comprise entre 90 et 110 ppm, tandis que les protons H1 α des unités D se retrouvent dans la zone comprise entre 5,0 et 5,7 ppm (Agrawal, 1992). La quantification s'effectue par intégration de ces différents signaux, et la caractérisation de nouveaux motifs carrabiose par comparaison avec les signaux anomériques des motifs déjà caractérisés.

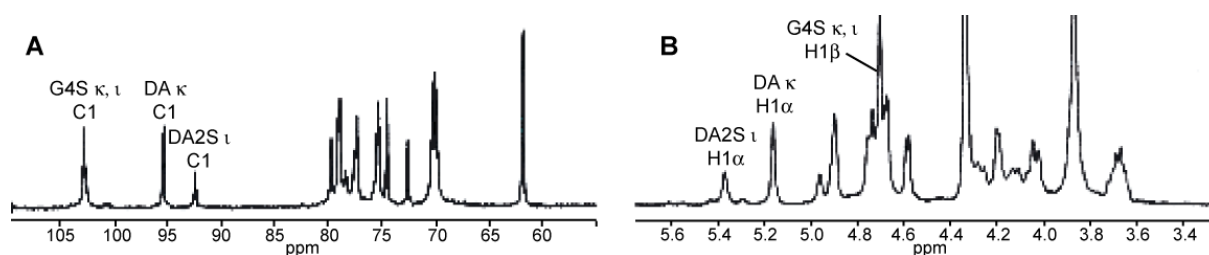


Figure 11 : Spectres ^{13}C -RMN (A) et ^1H -RMN (B) d'un κ / ι -carraghénane, réalisés à 60°C sur un échantillon préalablement soniqué.

Sont indiqués les carbones et protons anomériques (van de Velde *et al.*, 2001).

		H1	H2	H3	H4	H5	H6a	H6b		H1	H2	H3	H4	H5	H6a	H6b
ι^1	G4S	4.64	3.62	3.99	4.90	3.77	3.83	3.81	DA2S	5.30	4.67	4.84	4.69	4.67	4.25	4.10
κ^1	G4S	4.61	3.60	3.95	4.81	3.77	3.81	3.79	DA	5.09	4.13	4.51	4.63	4.61	4.19	4.05
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^4	G2S	4.78	4.50	3.97	4.32	3.75	3.87	3.82	D2S,6S	5.59	4.71	4.26	4.29	4.64	4.37	4.37
β^3	G	-	-	-	-	-	-	-	DA	5.07	-	-	-	-	-	-
μ^3	G4S	-	-	-	-	-	-	-	D6S	5.24	-	-	-	-	-	-
ν^3	G4S	-	-	-	-	-	-	-	D2S,6S	5.50	-	-	-	-	-	-

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

(1) 80°C (Welti, 1977), (2) 50°C (Falshaw *et al.*, 1996), (3) 65°C (van de Velde *et al.*, 2004), (4) 70°C (Guibet *et al.*, 2006).

Les **tableaux 6 et 7** présentent une synthèse des déplacements chimiques protons et carbones des unités carrabiose déjà caractérisées. Les valeurs sont exprimées en référence au DSS (diméthyl-silapentane-sulfonate), selon les recommandations de l'IUPAC. En RMN du proton, les attributions ne sont complètes que dans le cas des κ -, ι -, α - et λ -carraghénanes. Les autres motifs ne sont présents que de manière minoritaire dans l'une de ces structures, aussi leurs signaux ne sont pas assez intenses pour être totalement attribués. Ceci explique que seuls les déplacements chimiques des protons anomériques H1 α soient connus.

		C1	C2	C3	C4	C5	C6		C1	C2	C3	C4	C5	C6
μ^1	G4S	107.0	72.7	80.5	76.3	77.1	63.5	D6S	100.3	70.7	72.8	81.4	70.5	69.9
ν^1	G4S	106.7	72.4	82.4	73.4	77.2	63.6	D2S,6S	100.5	78.6	70.4	82.1	70.4	70.0
κ^1	G4S	104.7	71.7	81.0	76.3	77.0	63.5	DA	97.3	72.1	81.4	80.5	79.1	71.7
ι^1	G4S	104.4	71.5	79.1	74.3	77.0	63.5	DA2S	94.3	77.2	80.0	80.6	79.29	72.0
λ^8	G2S	105.8	79.9	76.5	66.5	77.3	63.6	D2S,6S	94.1	78.1	70.5	82.7	71.1	72.1
θ^1	G2S	102.6	79.8	79.4	70.0	77.1	63.4	DA2S	97.8	77.1	79.6	81.8	79.2	72.4
ξ^1	G2S	105.4	-	-	66.9	-	-	D2S	94.9	-	-	-	-	-
ζ^7	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	104.8	71.7	82.6	68.6	77.55	63.5	DA	96.8	72.4	81.6	80.3	79.3	71.7
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
ξ^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 7 : Déplacements chimiques carbones (ppm) des carraghénanes.

Les déplacements sont exprimés en référence au DSS (diméthyl-silapentane-sulfonate) dans du D₂O. Les valeurs issues des références 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 ont été corrigées de 2.1 ppm pour être exprimées en référence au DSS au lieu du TMS (tetraméthylsilane). (1) (van de Velde *et al.*, 2004), (2) (Greer & Yaphe, 1984a), (3) 50°C (Falshaw *et al.*, 1996), (4) (Usov *et al.*, 1985), (5) (Chiovitti *et al.*, 1998), (6) (Noseda & Cerezo, 1993), (7) 80°C (Usov *et al.*, 1980), (8) (Guibet *et al.*, 2006).

Les travaux d'Izumi (Izumi, 1973) et de Harris (Harris & Turvey, 1970) sur des 3,6-anhydro-D-galactose et sur des galactopyranoses substitués ont servi de point de départ pour l'analyse des agars et des carraghénanes. Par la suite, la résolution des structures et l'attribution des différents signaux a été faite par comparaison avec les spectres déjà résolus, notamment ceux de l'agarose, du κ - et du ι -carraghénane. La position des substituants sulfates et méthyles est notamment déterminée par comparaison avec le galactane non substitué correspondant. Par exemple, la position du sulfate dans le κ -carraghénane (**DA-G4S**) a pu être déterminée par comparaison avec le β -carraghénane (**DA-G**) (Usov *et al.*, 1980). La substitution par un groupement sulfate, méthyle ou glycosyle, induit un déblindage (8-11

ppm) du carbone auquel ils sont liés (effet α du substituant) alors que les 2 carbones voisins sont légèrement blindés (2-4 ppm) (effet β) (Usov, 1984). La sulfatation provoque aussi un déblindage du proton géminale de 0,6 ppm, et son effet sur les protons vicinaux dépend de l'orientation axiale ou équatoriale des deux groupements (Harris & Turvey, 1970). La présence de groupements méthyles est caractérisée par le signal singulet du CH_3 , vers 61 ppm en ^{13}C -RMN et dans la zone 3,40-3,65 ppm en ^1H -RMN. La présence de groupements pyruvate est caractérisée par le signal des protons du CH_3 à 1,44 ppm, et en ^{13}C -RMN par le signal du CH_3 à 27,61 ppm, celui de l'acétal à 103,55 ppm et celui du carboxyle à 177,96 ppm.

La configuration, α ou β , des liaisons glycosidiques peut être déterminée par la mesure du couplage scalaire 3J des protons anomériques. En effet, la valeur de ce couplage dépend de l'angle dièdre H1-C1-C2-H2 (loi de Karplus). Les unités D ou DA, qui ont une conformation α , présentent un angle dièdre H1-C1-C2-H2 d'environ 60° , ce qui correspond à une constante de couplage $^3J_{\text{H1-H2}}$ relativement faible, d'environ 2 à 4 Hz. A l'inverse, les unités G ont une conformation β , soit un angle dièdre d'environ 180° , ce qui correspond à une constante de couplage plus importante, de 7 à 9 Hz environ. Le **tableau 8** présente les constantes de couplage 3J mesurées pour les κ -, ι - et λ -carraghénanes.

	κ -carraghénane		ι -carraghénane		λ -carraghénane		κ - κ - κ		
	G4S $_{\beta}$	DA $_{\alpha}$	G4S $_{\beta}$	DA2S $_{\alpha}$	G2S $_{\beta}$	D2S,6S $_{\alpha}$	G4S	G4Sr $_{\alpha}$	DA
$^3J_{\text{H1-H2}}$	7.8	2.0	9.5	1.5	8	3.8	7.9	3.9	2.4
$^3J_{\text{H2-H3}}$	9.5	5.1	8.5	6.0	9.8	10.3	9.9	10.3	5.4
$^3J_{\text{H3-H4}}$	3.0	0.4	3.0	1.0	3	3.3	3.3	3.1	ts
$^3J_{\text{H4-H5}}$	1.25	2.1	1.0	3.0	2	2	0.95	ts	1.9
$^3J_{\text{H5-H6a}}$	8.0	3.0	8.0	2.0	5.3	nm	8.2	4.4	3.1
$^3J_{\text{H5-H6b}}$	4.3	3.0	4.25	3.0	7	nm	4.3	8.1	ts
$^3J_{\text{H6a-H6b}}$	-12.0	-9.5	-12.0	-10.5	-11.7	nm	-12.0	-11.9	-10.6

Tableau 8 : Constantes de couplage spin-spin des carraghénanes (^1H -RMN)

Constantes de couplage caractéristiques des κ -, ι - et λ -carraghénanes (Wolti, 1977 ; Guibet *et al.*, 2006), et du néo- κ -carrahexaose (Knutsen & Grasdalen, 1992b). ts : constante trop petite pour être mesurée ; nm : constante non mesurée.

L'enchaînement des différentes unités peut être déterminé par des expériences de RMN à 2 dimensions. Les expériences HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) permettent d'observer, à travers les couplages 2J et 3J , des protons et carbones séparés de 2 à 3 liaisons. Ainsi, des taches de corrélation entre le H1 (C1) de l'unité G et le C4 (H4) de l'unité D confirment la nature de cette liaison $\beta(1\rightarrow4)$. De même, des taches de corrélation seront observées entre le H1 (C1) de l'unité D et le C3 (H3) de l'unité G, confirmant la nature de cette liaison $\alpha(1\rightarrow3)$. Les expériences HMBC ne doivent pas être confondues avec les expériences HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), qui permettent d'observer, à travers les couplages 1J , des taches de corrélation entre les protons et les carbones qui les portent (par exemple entre H1 et C1).

Dès les premiers travaux d'analyse des carraghénanes par RMN, les oligosaccharides produits par hydrolyse enzymatique ont aidé à attribuer les signaux dans les spectres des carraghénanes correspondants (Bhattacharjee *et al.*, 1978). Les spectres d'oligo-carraghénanes sont en effet mieux résolus que ceux des carraghénanes, notamment pour des questions de viscosité, mais également de pureté des échantillons. Cependant les spectres d'oligo-carraghénanes sont plus complexes car les déplacements chimiques des protons et carbones diffèrent selon leur position dans l'oligosaccharide : extrémité réductrice (r), interne ou non réductrice (nr). 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 pyranose. Cette anomérie influence les déplacements chimiques de l'unité positionnée à l'extrémité réductrice, mais parfois également ceux de l'unité voisine (r') (Knutsen & Grasdalen, 1992b).

Les premières analyses RMN d'oligo-carraghénanes étaient des spectres de ^{13}C -RMN et concernaient la série néo- κ -carrabiose. L'attribution complète de signaux des protons et carbones n'a été réalisée que plus tard, par Knutsen (Knutsen & Grasdalen, 1992b) (**Figure 12**). Des oligo-carraghénanes de la série néo- ι -carrabiose ont aussi été purifiés et analysés, par ^{13}C -RMN (Bellion *et al.*, 1982 ; Greer *et al.*, 1985) mais les données ^1H -RMN n'ont pas été publiées. Plus récemment, Guibet (Guibet *et al.*, 2006) a proposé une attribution complète des protons et carbones de 4 oligo-carraghénanes de la série néo- λ -carrabiose. Une étape supplémentaire a été franchie, par l'analyse et l'attribution complète d'oligo-carraghénanes hybrides κ - ι (Guibet *et al.*, 2008).

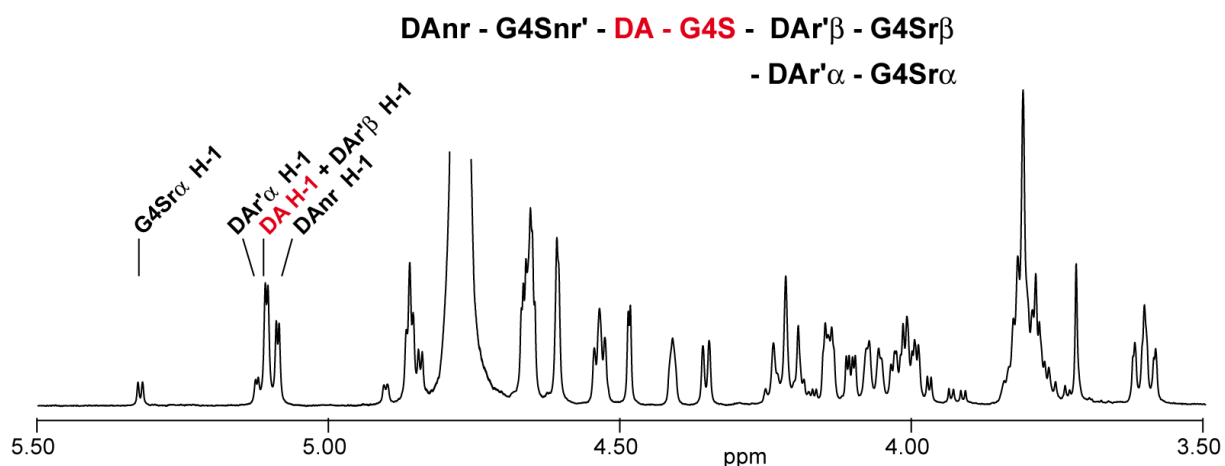


Figure 12 : Spectre ^1H -RMN du néo- κ -carrageaose (Knutsen & Grasdalen, 1992b).

Sont indiqués les déplacements chimiques des protons anomériques de configuration α .

La spectroscopie de RMN est donc une méthode extrêmement puissante pour la caractérisation structurale des carraghénanes et surtout des oligo-carraghénanes. Cependant l'observation des constituants mineurs (< 5%) reste difficile, même en ^1H -RMN à haute température. De plus il reste impossible de déterminer si les différents constituants sont présents sur les mêmes chaînes de carraghénane ou sur des chaînes différentes.

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

L'analyse par RMN des oligo-carraghénanes nécessite des quantités relativement importantes de produits, qui doivent être d'une grande pureté. Aussi l'étude des produits d'hydrolyse des carraghénanes implique le recours à d'autres méthodes d'analyse structurale, permettant d'analyser des produits peu abondants et éventuellement en mélanges. La spectrométrie de masse et ses différents développements apparaissent donc très prometteurs. Cependant l'analyse d'oligosaccharides sulfatés s'avère difficile, en raison de la présence même de ces groupements sulfates, qui sont fortement labiles. Il a donc fallu développer des méthodes spécifiques pour ces types de molécules. Les recherches concernant les héparines et les chondroïtines ont fortement contribué à ces développements.

2.5.1. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight (MALDI-TOF)

S'ils ne sont pas stabilisés, les oligosaccharides sulfatés se fragmentent facilement dans l'ioniseur, libérant ainsi les groupements sulfates. Un nombre important de matrices, ainsi que des contre-ions spécifiques, ont été testés, pour obtenir une ionisation satisfaisante des oligosaccharides sulfatés. Juhasz (Juhasz & Biemann, 1994), le premier, a utilisé des peptides basiques comme contre-ions pour stabiliser les groupements sulfates d'oligo-héparines, et a utilisé des matrices classiques comme l'acide sinapinique. Concernant les carraghénanes, Nonami (Nonami *et al.*, 1997) a obtenu de très bons résultats en mode négatif avec des matrices de la famille des pyridoindoles, sans utiliser de contre-ion particulier. Les meilleurs résultats pour les oligo-carraghénanes ont été obtenus avec une matrice *nor*-harmane (Fukuyama *et al.*, 2002 ; Antonopoulos *et al.*, 2005). Cependant, ces méthodes présentent l'inconvénient de former très majoritairement des ions monosulfatés, ce qui ne permet pas de distinguer des structures comme le tétra- κ -carraghénane et le tétra- ι -carraghénane, qui ne diffèrent que par le nombre (ou la position) des groupements sulfates. Depuis, des essais probants de matrices liquides ioniques ont été réalisés (Fukuyama *et al.*, 2008), permettant d'empêcher la désulfatation, en mode négatif comme en positif.

2.5.2. ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry (ESI-MS)

Les premières analyses d'oligosaccharides sulfatés par electrospray ont toutes conduit à des spectres complexes, dûs à la formation de nombreux ions désulfatés, ainsi que de nombreux adduits sodium (Zaia, 2004). Comme dans le cas du MALDI, une stabilisation de ces oligosaccharides sulfatés a donc paru nécessaire, pour obtenir des spectres plus simples. Cette stabilisation a pu être réalisée par la formation de complexes avec des espèces cationiques, notamment des peptides basiques (Siegel *et al.*, 1997) ou des ions ammonium (Chai *et al.*, 1998). Concernant les oligo-carraghénanes, bien que des phénomènes de désulfatation aient été observés (Ackloo *et al.*, 2001 ; Ekeberg *et al.*, 2001), les analyses en electrospray ont permis de résoudre les structures d'oligosaccharides de différentes tailles et différents taux de sulfatation. De très bons résultats ont par la suite été obtenus en utilisant l'heptylamine comme contre-ion stabilisant (Antonopoulos *et al.*, 2004) permettant d'envisager un couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse.

2.5.3. Couplage Chromatographie Liquide – Spectrométrie de Masse (LC-MS)

La plupart du temps, la séparation d'oligosaccharides sulfatés est réalisée par chromatographie d'échange d'ions, qui nécessite des éluants très concentrés en sels, peu compatibles avec la spectrométrie de masse. Aussi, d'autres méthodes de chromatographie liquide ont dû être envisagées pour s'affranchir de ce problème. Ainsi, pour séparer des glycosaminoglycanes, Zaia (Zaia & Costello, 2001) a utilisé avec succès la chromatographie d'exclusion stérique. Cependant la résolution était assez limitée et ne convenait pas à tous les types d'oligosaccharides sulfatés. L'utilisation de colonnes de graphite poreux semble un bon compromis (Kawasaki *et al.*, 2001 ; Antonopoulos *et al.*, 2007), puisqu'elle permet une séparation en fonction de la charge, en évitant toutefois l'utilisation d'éluants trop chargés en sels. Enfin, les meilleurs résultats ont été obtenus en tirant parti de l'utilisation de l'heptylamine comme agent d'appariement (Antonopoulos *et al.*, 2005). En effet, une fois complexés avec l'heptylamine, les oligosaccharides peuvent être séparés en phase inverse, sur colonne C-18, avec des éluants organiques qui ne gênent pas l'ionisation. Ainsi le couplage RP-HPLC-ESI-MS en mode négatif, semble une technique de choix pour l'analyse d'oligosaccharides purs ou en mélanges, et peut même être utilisée pour l'analyse structurale, par fragmentation par CID-MS/MS (Collision Induced Dissociation).

2.6. *Analyse de la distribution*

Les méthodes d'analyse détaillées précédemment permettent de déterminer la taille des chaînes de carraghénanes, ainsi que leur composition globale. En revanche, aucune ne permet de déterminer la distribution des différentes unités carrabiose dans les chaînes de carraghénanes. Dans de nombreux cas en effet, les carraghénanes sont composés de différentes unités carrabiose. Une analyse détaillée doit permettre de déterminer si ces unités sont présentes sur des chaînes différentes (mélange d'homopolymères) ou sur les mêmes chaînes de carraghénanes (copolymères). Dans ce cas, l'analyse doit également permettre de préciser s'il s'agit d'un copolymère à blocs, statistique ou alterné (**Figure 13**).

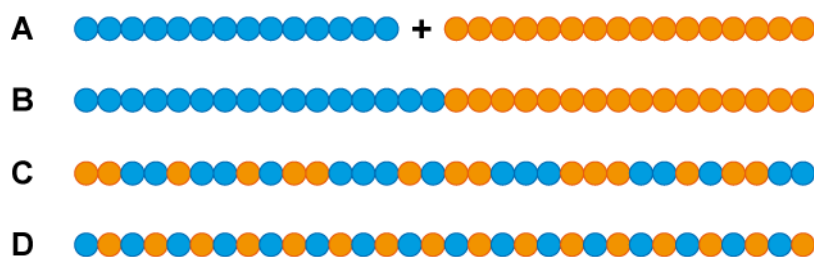


Figure 13 : Représentation des distributions possibles de polysaccharides contenant deux types de monomères.

(A) Mélange d'homopolymères ; (B) copolymère à blocs ; (C) copolymère statistique ; (D) copolymère alterné.

2.6.1. Etudes des propriétés physico-chimiques

La distribution des unités carrabiose dans les carraghénanes peut être déduite de la comparaison des propriétés physico-chimiques de carraghénanes dits « purs », seuls ou en mélanges, à celles des présumés carraghénanes hybrides. En effet, certaines propriétés physico-chimiques des carraghénanes sont directement reliées à leur structure chimique. Ainsi, nous l'avons vu dans la première partie de cette introduction, les gels de κ - et de ι -carraghénanes purs ont des propriétés très différentes. Une étude menée sur des carraghénanes hybrides κ -/ ι - a montré que ceux-ci avaient des propriétés (viscosité spécifique, activité optique) très différentes d'un mélange de κ - et de ι -carraghénanes purs, de même composition globale (van de Velde *et al.*, 2001). Ceci écarte directement l'hypothèse d'un mélange d'homopolymères dans le cas de ces carraghénanes hybrides. En revanche, ces études ne permettent pas de déterminer le type d'organisation de ces hétéropolysaccharides. Pour ce faire, il est possible de recourir à la modélisation de certaines propriétés physico-chimiques. Ainsi, la modélisation a permis de déterminer les températures de transition conformationnelle théoriques de furcellaranes (κ -/ β -carraghénanes) possédant différents types d'organisation : mélanges d'homopolymères et copolymères à blocs (Zhang *et al.*, 1991). Les transitions conformationnelles expérimentales de ces carraghénanes se sont avérées très différentes, excluant ainsi ces types d'organisation. Il s'ensuit que la distribution est plutôt de type copolymère statistique ou alterné.

2.6.2. Etude de la distribution par séparation et analyse des produits de dépolymérisation enzymatique

Malgré ces tentatives, il n'existe pas de méthode permettant d'étudier directement la distribution des motifs disaccharidiques dans la chaîne de carraghénane. Une étape de dépolymérisation est presque toujours nécessaire. L'hydrolyse acide provoque très souvent une désulfatation aléatoire, qui empêche l'étude de la distribution des groupements sulfate sur la chaîne de carraghénane. Aussi l'hydrolyse enzymatique est la plus adaptée, car elle permet d'éviter la désulfatation, et est en général très spécifique. Les carraghénases ont été étudiées dans le but de décrypter l'hétérogénéité des carraghénanes (Weigl *et al.*, 1966 ; Bellion *et al.*, 1982). L'étude de la distribution nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques. Après hydrolyse du polysaccharide, les produits obtenus sont séparés, en général selon leur taille par chromatographie d'exclusion stérique. D'autres techniques de séparation sont parfois employées, comme la chromatographie ionique ou l'électrophorèse capillaire. Les produits d'hydrolyse ainsi purifiés sont ensuite caractérisés, notamment par RMN ou spectrométrie de masse. La caractérisation des produits d'hydrolyse permet en général de déterminer la distribution des motifs disaccharidiques dans le carraghénane étudié. Ainsi, le λ -carraghénane a été hydrolysé à 95 % par la λ -carraghénase de *P. carrageenovora* et l'étude des produits d'hydrolyse a permis de mettre en évidence une distribution aléatoire de motifs (**G2S,4S-D2S,6S**) au sein d'une chaîne composée majoritairement de motifs λ -carrabiose (**G2S-D2S,6S**) (Guibet *et al.*, 2006). L'analyse structurale de κ -/ ι -carraghénanes a été réalisée à l'aide de deux enzymes, la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* et la ι -carraghénase d'*A. fortis*. Dans ce cas l'hydrolyse n'était pas totale, aussi une analyse des fractions résistantes aux enzymes (ERF) par RMN s'est avérée nécessaire. Les carraghénanes étudiés présentent des segments formés de blocs de motifs identiques, κ ou ι , et également des segments dans lesquels la répartition de ces deux types de motifs est aléatoire (Guibet *et al.*, 2008).

3. Les carraghénases

La première activité carraghénolytique a été identifiée dans l'appareil digestif d'invertébrés marins herbivores (Mori, 1939 ; Mori, 1943). Son origine reste incertaine, pouvant être endogène ou associée à la flore microbienne de l'appareil digestif. Par la suite toutes les activités carraghénolytiques observées provenaient de bactéries marines, bien connues pour leur rôle écologique dans la dégradation de la biomasse algale. La première espèce bactérienne isolée fut *Pseudoalteromonas carrageenovora* (Yaphe & Baxter, 1955). Cette bactérie produit une κ -carraghénase (Weigl *et al.*, 1966 ; McLean & Williamson, 1979b) et une λ -carraghénase (Johnston & McCandless, 1973). D'autres bactéries carraghénolytiques ont été isolées depuis : *Alteromonas fortis* a été isolée de l'algue *Eucheuma spinosum* et produit une ι -carraghénase et une κ -carraghénase (Greer & Yaphe, 1984c). Plus récemment, *Zobellia galactanivorans* a été isolée de l'algue *Delesseria sanguinea*, et produit également une ι -carraghénase et une κ -carraghénase (Potin *et al.*, 1991 ; Barbeyron *et al.*, 1998 ; Barbeyron *et al.*, 2000).

Les carraghénases catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques, ce sont des glycoside hydrolases (GH). Dans la classification de l'IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology), ces enzymes sont identifiées par un numéro EC : les κ -carraghénases portent le numéro EC 3.2.1.83, les ι -carraghénases le numéro EC 3.2.1.157 et la λ -carraghénase le numéro EC 3.2.1.162. La classification CAZY (Carbohydrate Active enZYme, (Henrissat & Davies, 1997)) se base sur les similitudes de séquences des protéines et classe la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* dans la famille GH16 et la ι -carraghénase d'*A. fortis* dans la famille GH82. La λ -carraghénase de *P. carrageenovora* appartient à une famille de glycoside hydrolases différente, à laquelle aucun numéro n'a encore été attribué.

Les carraghénases ne sont pas les seules enzymes impliquées dans le processus de dégradation des carraghénanes. Un seul système carraghénolytique a fait l'objet d'études détaillées. Il s'agit de celui de *P. carrageenovora* et concerne la dégradation du κ -carraghénane (**Figure 14**). Cette bactérie possède une κ -carraghénase qui coupe les liaisons $\beta(1-4)$ et libère des oligosaccharides de la série néo-carrabiose : le disaccharide DA-G4S et le tétrasaccharide DA-G4S-DA-G4S. Ces deux produits sont ensuite pris en charge par une glycosulfatase, localisée dans le périplaste, qui les désulfate et libère le disaccharide DA-G et le tétrasaccharide DA-G-DA-G4S (McLean & Williamson, 1979a). Ce tétrasaccharide est

ensuite hydrolysé en deux disaccharides, DA-G et DA-G4S, par une néocarratétraose-4-sulfate hydrolase (McLean & Williamson, 1981). Le DA-G4S est ensuite désulfaté par la glycosulfatase en DA-G, qui est le produit limite identifié de cette voie de dégradation. Les enzymes qui décomposent ensuite ce disaccharide, et notamment celle qui provoque la rupture du pont 3,6-anhydro, n'ont pas encore été identifiées. De même, les autres systèmes enzymatiques qui permettent de dégrader les carraghénanes n'ont pas été identifiés et l'on ignore s'ils sont semblables à celui présenté ici.

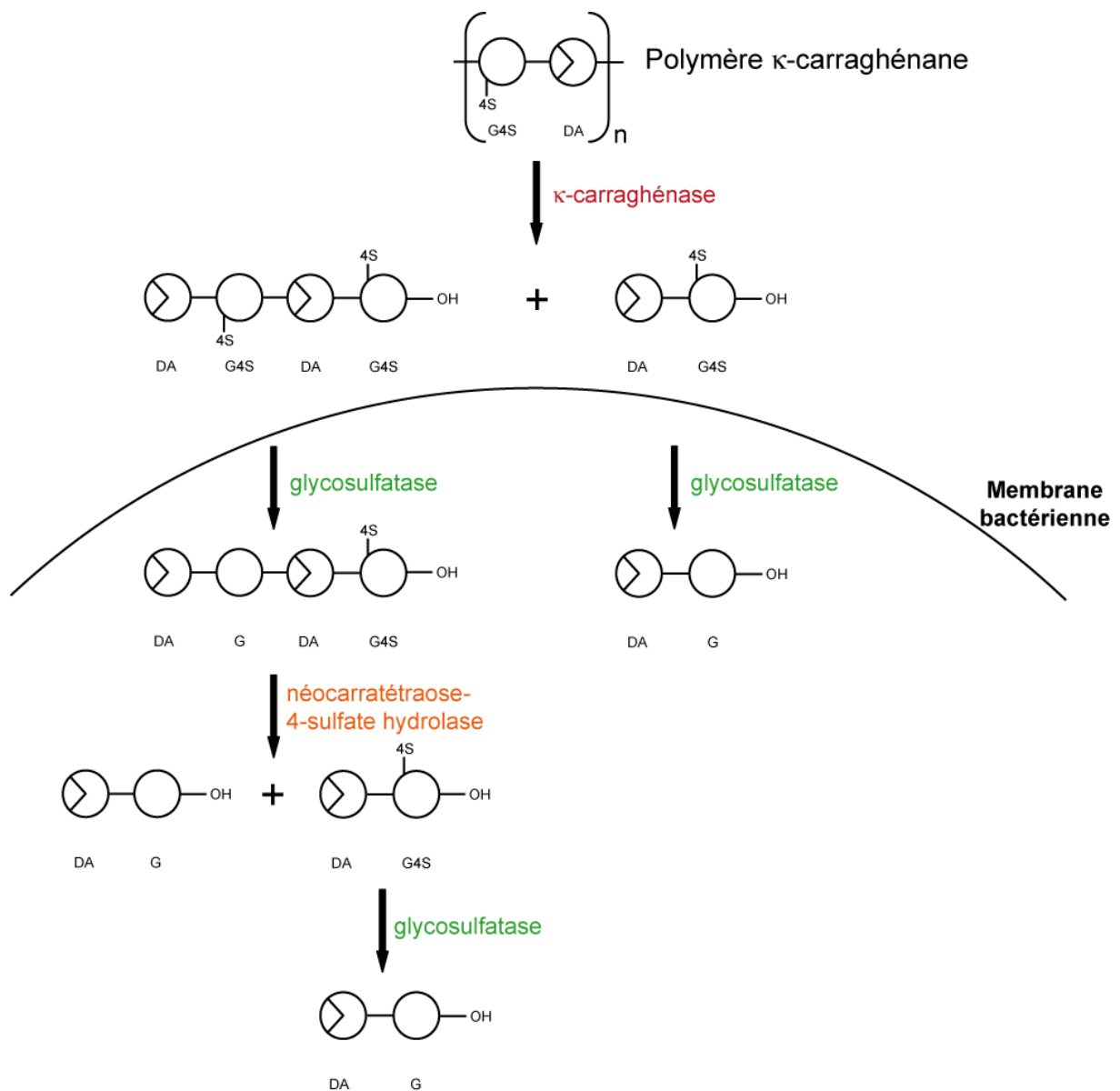


Figure 14 : Voie de dégradation du κ -carraghénane par *P. carrageenovora* (McLean & Williamson, 1981).

3.1. Les κ -carraghénases

Les κ -carraghénases de *P. carrageenovora* et de *Z. galactanivorans* sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. Ainsi, elles peuvent être purifiées facilement à partir des surnageants de culture. La κ -carraghénase de *P. carrageenovora* est induite en présence de κ -carraghénane, tandis que celle de *Z. galactanivorans* est induite en présence de λ -carraghénane. Elles montrent un maximum d'activité à pH 8 (McLean & Williamson, 1979b) et pH 7,2 (Potin *et al.*, 1991) respectivement, et à une température de 40°C. Les poids moléculaires des κ -carraghénases de *P. carrageenovora* et de *Z. galactanivorans* ont été estimés à 35 et 40 kDa respectivement. Ces deux enzymes ont été séquencées et présentent une forte similitude de séquence. Elles appartiennent toutes deux à la famille 16 des glycoside hydrolases. Le gène correspondant à la forme mature de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* a été cloné et la protéine surexprimée chez *E. coli*. La masse molaire de cette protéine recombinante est de 32,9 kDa, déterminée par ESI-MS (Michel *et al.*, 1999).

Ces deux κ -carraghénases coupent spécifiquement les liaisons $\beta(1-4)$ du κ -carraghénane, libérant des produits de la série néo- κ -carrabiose. Les produits limites de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* sont le disaccharide DA-G4S et le tétrasaccharide DA-G4S-DA-G4S (Weigl *et al.*, 1966 ; McLean & Williamson, 1979b ; Bellion *et al.*, 1982 ; Rochas *et al.*, 1983), alors que les produits limites de la κ -carraghénase de *Z. galactanivorans* sont le tétrasaccharide DA-G4S-DA-G4S et l'hexasaccharide DA-G4S-DA-G4S-DA-G4S (Potin *et al.*, 1991). Pour les κ -carraghénases de *P. carrageenovora* et de *Z. galactanivorans*, les substrats minimaux conduisant à une fixation productive semblent être le néo- κ -carrahexaose et le néo- κ -carraoctaose respectivement.

Le mécanisme d'hydrolyse de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* a été déterminé par suivi cinétique, en ^{13}C -RMN, de l'hydrolyse du néo- κ -carrahexaose réduit. L'apparition rapide de néo- κ -carratétraose d'anomérie β a été observée, démontrant un mécanisme de rétention de configuration (Potin *et al.*, 1995). Ce résultat suggère un mécanisme de substitution nucléophile de type $\text{S}_{\text{N}}1$ (McCarter & Withers, 1994 ; Davies & Henrissat, 1995). La première étape de ce mécanisme (**Figure 15**) est l'attaque du groupement carboxyle nucléophile sur le carbone anomérique et l'attaque simultanée de l'oxygène de la liaison glycosidique sur le proton du groupement carboxylique acide, se traduisant par la coupure de la liaison glycosidique et la formation d'un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme. Ensuite,

le groupement carboxyle devenu basique attaque une molécule d'eau, qui attaque le carbone anomérique, induisant l'hydrolyse de l'intermédiaire glycosyl-enzyme. Ce mécanisme permet la transglycosylation, quand, lors de la deuxième étape, le groupement carboxyle basique n'attaque pas une molécule d'eau mais un galactopyranose. Ce mécanisme implique que les acides aminés catalytiques soient au nombre de deux, et qu'il s'agisse d'acides aminés carboxyliques. Ceci a été confirmé par la résolution de la structure de la κ -carraghénase (Michel *et al.*, 2001a). Les deux acides aminés catalytiques ont été identifiés : le nucléophile est le glutamate E163 et l'acide/base est le glutamate E168.

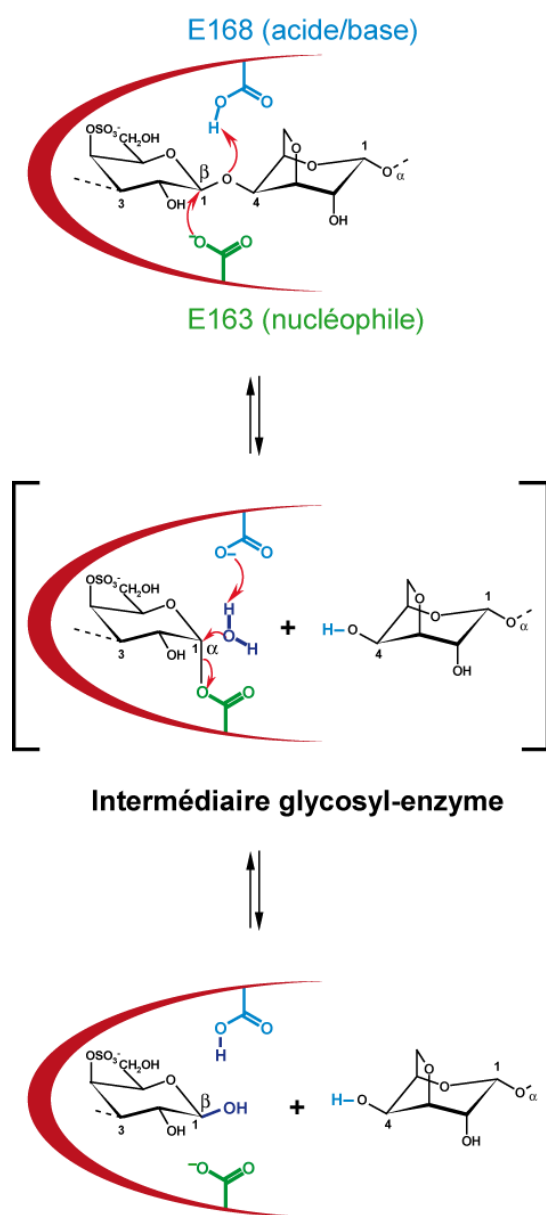


Figure 15 : Mécanisme d'hydrolyse de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora*, de type SN1 avec rétention de configuration (McCarter & Withers, 1994).

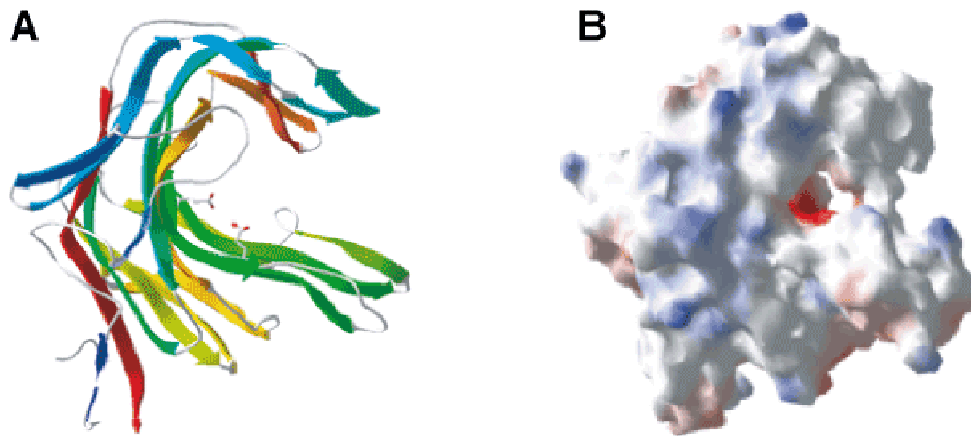


Figure 16 : Structure secondaire de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora*.

(A) Représentation en ruban du repliement en 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.*, 2001a).

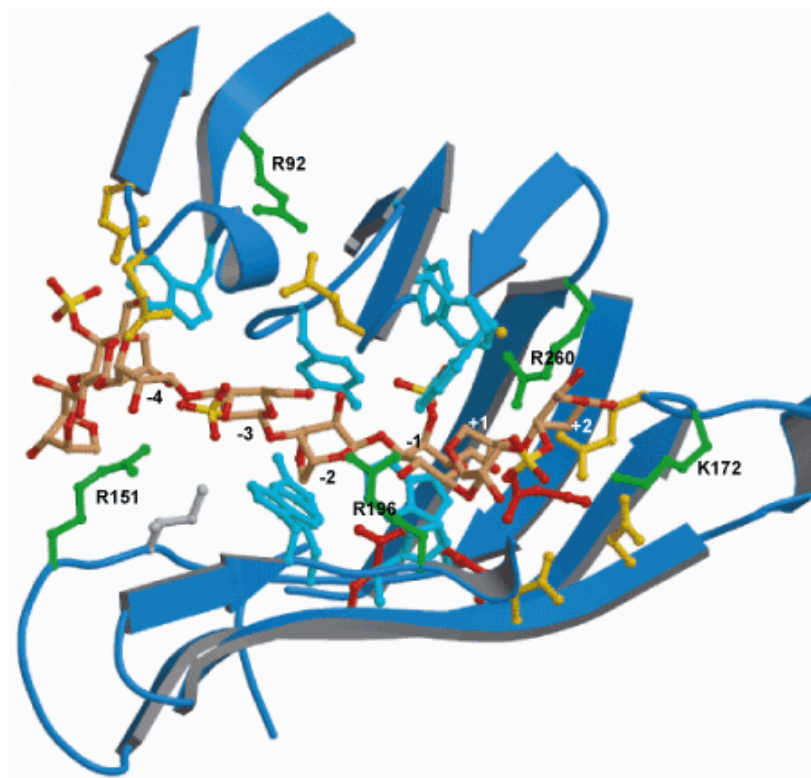


Figure 17 : Structure du site actif de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora*.

Visualisation du néo- κ -carrageenose co-cristallisé dans le site actif. Les unités positionnées dans les sous-sites +1 et +2 ainsi que les deux unités ajoutées à l'extrémité non réductrice ont été modélisées (Mirjam Czjzek, communication personnelle).

La structure de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* a été résolue par diffraction des rayons X (Michel *et al.*, 2001a). Cette enzyme adopte un repliement en sandwich, constitué de 2 feuillets β antiparallèles de 6 et 7 brins, formant un profond sillon dont le rôle est de fixer la chaîne de carraghénane. Ce sillon est recouvert par deux feuillets β antiparallèles qui referment ce sillon en une sorte de tunnel (**Figure 16**). Par modélisation, une chaîne de κ -carraghénane a été replacée dans ce sillon, ce qui a permis d'identifier les sites de fixation de l'enzyme sur son substrat. Ainsi, sept sous-sites ont été observés (de -5 à +2). La fixation des unités G4S se ferait par interaction entre le sulfate porté par le galactopyranose et des acides aminés basiques, les lysine et arginines K191, R151, R260, R196, situées au niveau des sous-sites -5, -3, -1 et +2. La fixation des unités DA se ferait par des interactions hydrophobes avec les résidus Y64, W266, F271, situés au niveau des sous-sites -4, -2 et +1 (**Figure 17**).

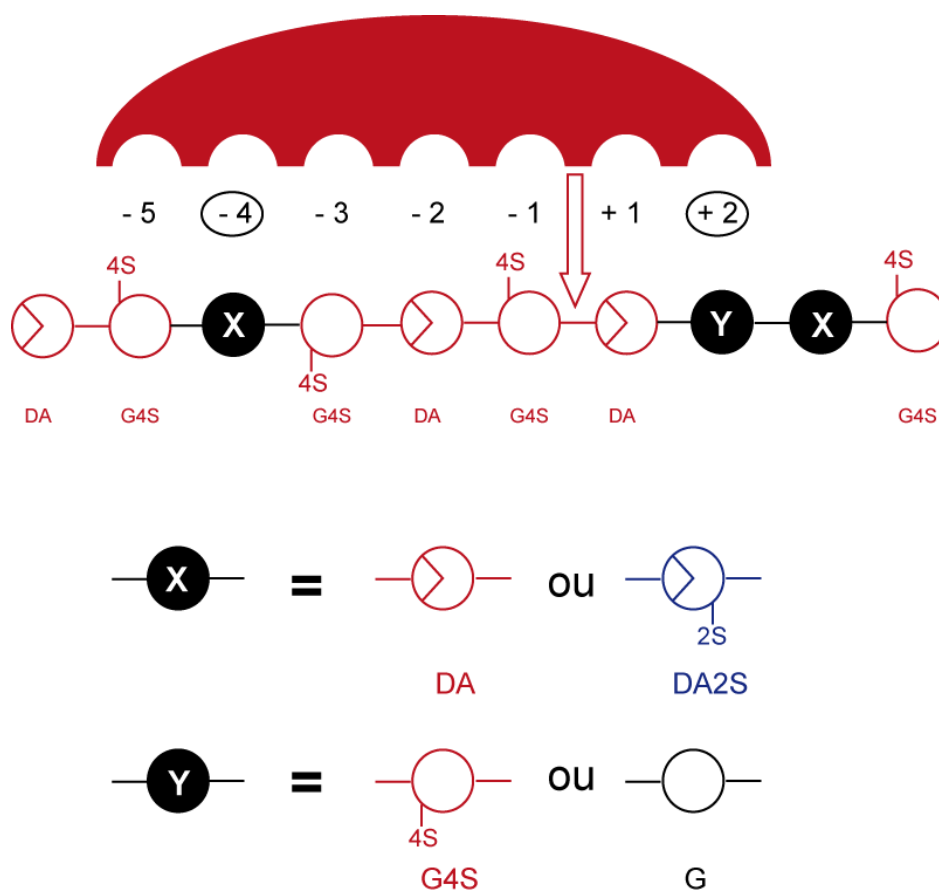


Figure 18 : Spécificité du site actif de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora*.

La κ -carraghénase de *P. carrageenovora* a été utilisée pour l'analyse structurale de carraghénanes hybrides κ - β - et κ - ι - (Knutsen & Grasdalen, 1992a ; Guibet *et al.*, 2008). La caractérisation d'oligosaccharides hybrides a permis de détailler la spécificité du site actif de cette enzyme. Le sous-site +2 peut accueillir une unité G à la place d'un G4S, et le sous-site -4 ainsi que la position +3 peuvent accueillir des unités DA2S à la place des unités DA (**Figure 18**).

Les premiers travaux concernant la caractérisation de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* suggèrent un mode d'action endo, c'est-à-dire que l'enzyme peut se fixer et réaliser la coupure à n'importe quelle position sur la chaîne, de manière aléatoire (**Figure 19 A**). En effet, Weigl (Weigl *et al.*, 1966) et McLean (McLean & Williamson, 1979b) ont observé, au cours de l'hydrolyse, une forte augmentation du pouvoir réducteur, ainsi qu'une diminution rapide de la viscosité de la solution. Ceci indique que les plus longues chaînes sont rapidement coupées en chaînes significativement plus courtes, qui ont un pouvoir gélifiant très inférieur. Ce mode d'action a été confirmé par un suivi des tailles des produits libérés au cours de l'hydrolyse. Il a en effet été montré (Knutsen *et al.*, 2001) que des produits d'hydrolyse de toutes les tailles étaient libérés très rapidement, ce qui est caractéristique d'une attaque aléatoire de l'enzyme, et donc d'un mode d'action endo. Cependant la résolution de la structure tridimensionnelle de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* a fait apparaître une topologie en tunnel, caractéristique d'un mode d'action processif ou endo-processif (Michel *et al.*, 2001a) (**Figure 19 B**). Lorsqu'une enzyme agit selon ce mode d'action, elle se fixe sur son substrat, réalise la coupure, libère l'une des chaînes produites par la coupure, reste fixée sur la seconde et se déplace le long de celle-ci jusqu'à trouver une nouvelle liaison hydrolysable. Dans le cas d'un mode d'action endo-processif la première attaque se produit de manière aléatoire sur la chaîne de carraghénane, puis réalise les coupures suivantes par un mécanisme processif.

Plus récemment, des précisions ont été apportées quant au caractère endo-processif de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* (Lemoine *et al.*, 2009). Cette enzyme agit selon un mode d'action endo lorsque son substrat est soluble, et selon un mode d'action processif lorsque son substrat est à l'état solide.

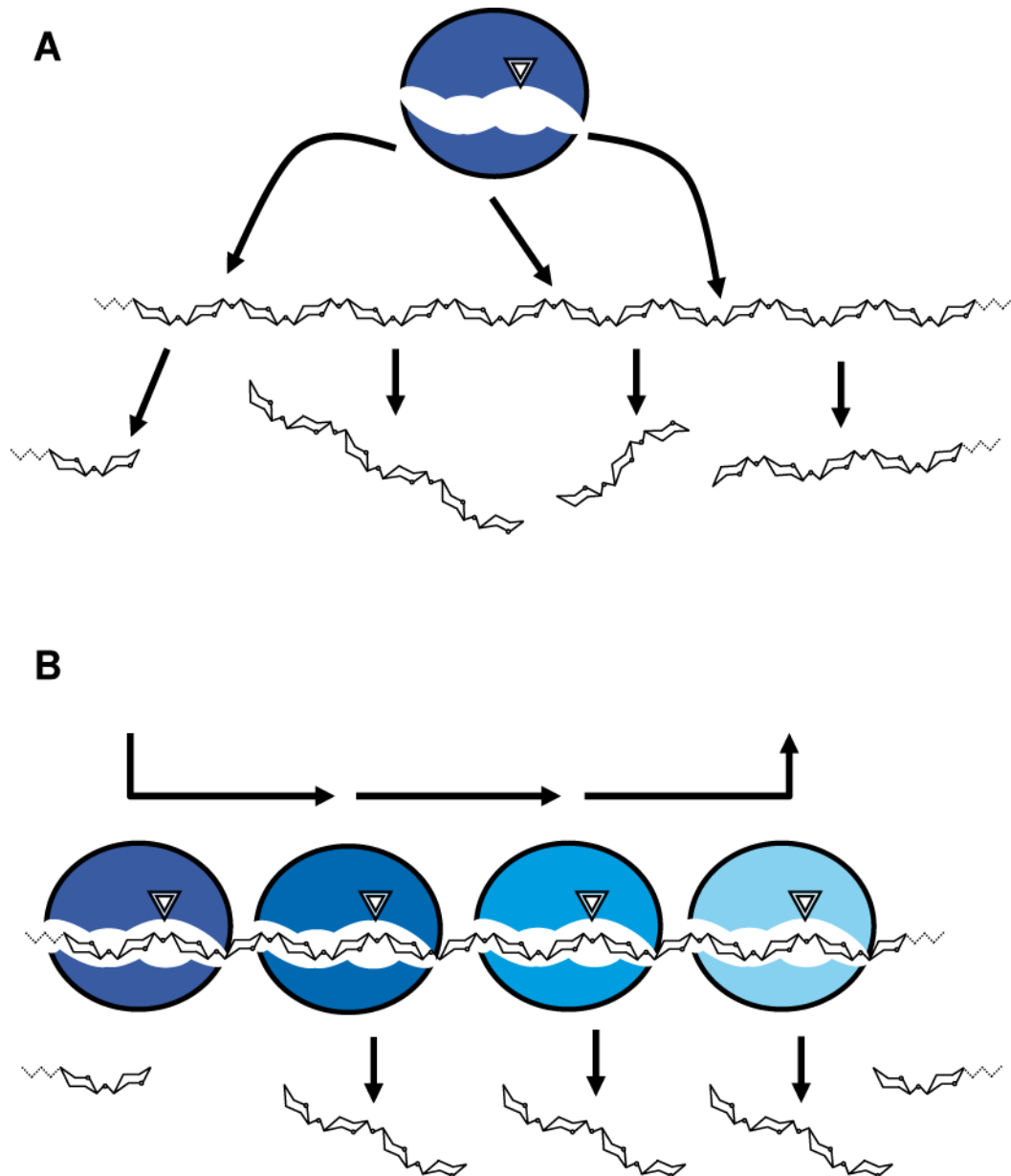


Figure 19 : Modes d'action de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora*.

(A) Mode d'action endo, (B) Mode d'action processif

3.2. Les ι -carraghénases

La production de ι -carraghénase est induite par le ι -carraghénane, aussi bien dans le cas d'*A. fortis* que dans celui de *Z. galactanivorans*. Ces deux enzymes sont purifiées à partir des surnageants de culture (Greer & Yaphe, 1984c). A l'heure actuelle, seule la ι -carraghénase d'*A. fortis* a fait l'objet d'études biochimiques. Son activité est maximale à 40°C, pH 8 et en présence de 0,1 M d'ions Na^+ (Greer & Yaphe, 1984c). Ces deux enzymes

sont pour le moment les deux uniques représentantes de la famille 82 des glycoside hydrolases. Le gène correspondant à la forme mature de la ι -carraghénase d'*A. fortis* a été cloné et la protéine a été surexprimée chez *E. coli*. La masse moléculaire de cette protéine recombinante est de 53,3 kDa, déterminée par ESI-MS (Michel *et al.*, 2000).

Ces deux enzymes coupent spécifiquement les liaisons $\beta(1-4)$ du ι -carraghénane, libérant des produits de la série néo- ι -carrabiose (Bellion *et al.*, 1982 ; Barbeyron *et al.*, 2000). Les produits limites de ces deux enzymes sont identiques, il s'agit du néo- ι -carratétraose (DP4) et du néo- ι -carrahexaose (DP6). Différentes souches bactériennes ont démontré des activités ι -carraghénase conduisant à la formation de néo- ι -carratétraose et de néo- ι -carrabiose, mais ces souches n'ont pas été caractérisées et les enzymes correspondantes n'ont pas été purifiées (Bellion *et al.*, 1982).

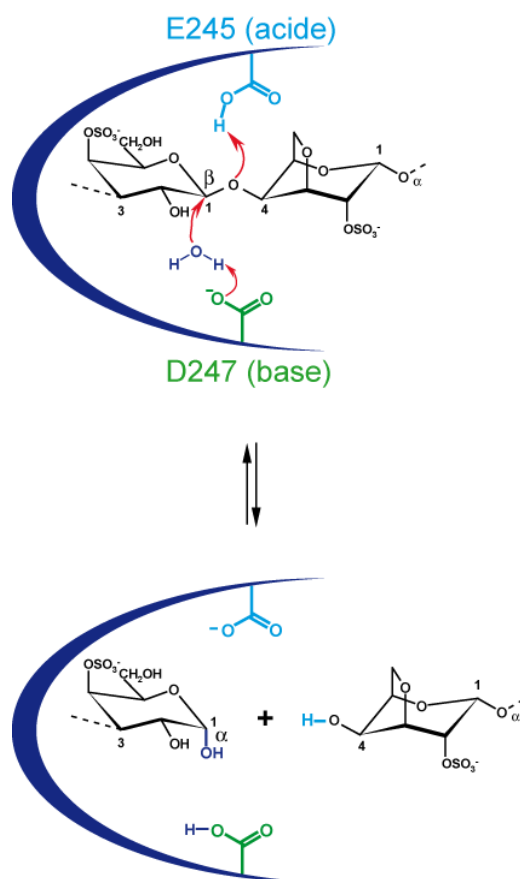


Figure 20 : Mécanisme d'hydrolyse de la ι -carraghénase d'*A. fortis*, de type SN2 avec inversion de configuration (McCarter & Withers, 1994).

Le mécanisme d'hydrolyse de la ι -carraghénase d'*A. fortis* a été déterminé par suivi cinétique en ^1H -RMN. Dans les premières minutes de l'hydrolyse, l'apparition de nouveaux signaux, correspondant à des extrémités réductrices de configuration α , a permis de démontrer que cette enzyme agit selon un mécanisme d'inversion de configuration (Barbeyron *et al.*, 2000). Cette inversion de configuration est la conséquence d'un mécanisme de type substitution nucléophile concertée ($\text{S}_{\text{N}}2$) (McCarter & Withers, 1994 ; Davies & Henrissat, 1995). Au cours de ce mécanisme, un acide aminé carboxylique sous sa forme basique capte un proton d'une molécule d'eau, libérant l'ion HO^- , qui va attaquer le carbone anomérique, provoquant la rupture de la liaison glycosidique. L'oxygène de cette liaison se neutralise en captant un proton d'un acide aminé carboxylique sous sa forme acide (**Figure 20**). Les acides aminés catalytiques supposés de la ι -carraghénase d'*A. fortis* sont l'acide glutamique E245 et l'aspartate D247 (Michel *et al.*, 2001b).

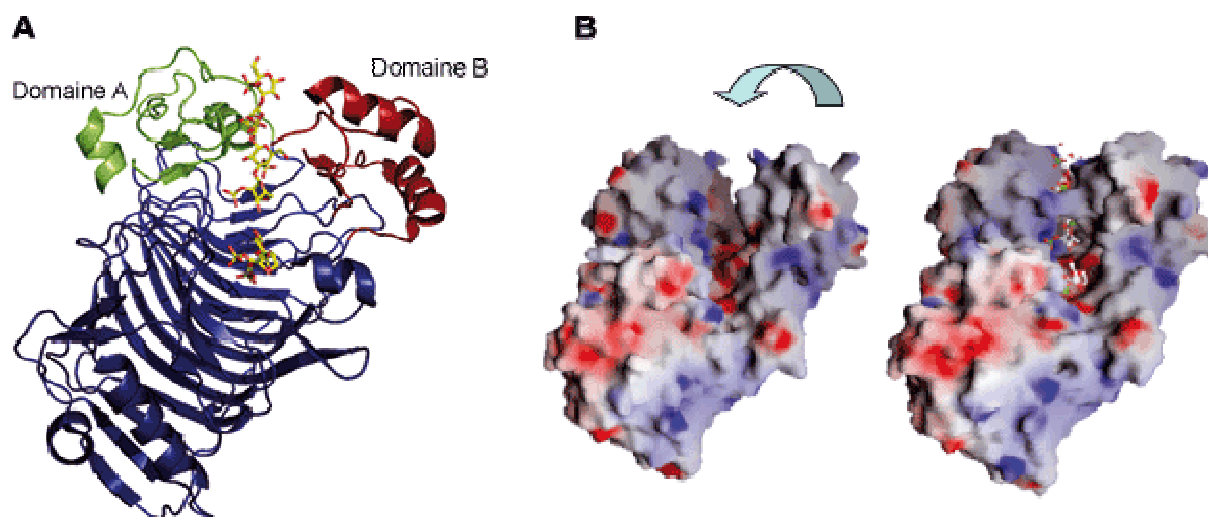


Figure 21 : Structure secondaire de la ι -carraghénase d'*A. fortis*.

(A) Repliement en hélice β . (B) Surface moléculaire colorée suivant les potentiels électrostatiques du bleu foncé (+) au rouge (-). Visualisation de la fermeture du site actif par basculement du domaine quand le substrat est fixé.

La structure de la ι -carraghénase d'*A. fortis* a été résolue par diffraction des rayons X (Michel *et al.*, 2001b). Cette enzyme adopte un repliement en hélice β droite de 10 tours, composée de quatre feuillets β parallèles. Elle possède également deux domaines additionnels A et B dans la région C-terminale (**Figure 21**). Enfin, elle présente une grande crevasse, encadrée par les domaines A et B, qui constitue la zone de fixation de la chaîne de ι -

carraghénane. La structure de cette enzyme en complexe avec un néo- ι -carrabiose et un néo- ι -carratétraose a également été résolue (Michel *et al.*, 2003). Le tétrasaccharide DA2S-G4S-DA2S-G4S était fixé dans les sous-sites +1 à +4, et le disaccharide DA2S-G4S dans les sous-sites -4 et -3, les sous-sites -2 et -1 étant restés vides. La reconnaissance et la fixation des chaînes de ι -carraghénane seraient réalisées par des interactions entre les groupements sulfates des unités G4S et DA2S et des résidus basiques lysine et arginines (K394, R125, R243, R303, R353, R321) (**Figure 22**).

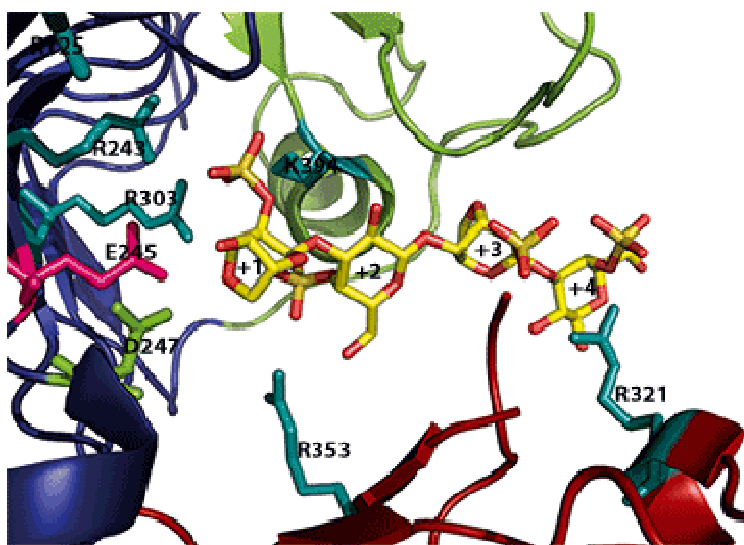


Figure 22 : Structure du site actif de la ι -carraghénase d'*A. fortis*.

Visualisation du néo- ι -carratétraose co-cristallisé dans le site actif.

Dans un premier temps, des expériences menées en phase liquide ont suggéré que les ι -carraghénases d'*A. fortis* et de *Z. galactanivorans* agiraient selon un mode d'action endo, (Barbeyron *et al.*, 2000 ; Knutsen *et al.*, 2001). Cependant il a été montré qu'en phase solide, c'est-à-dire lorsque le carraghénane forme un gel, la ι -carraghénase d'*A. fortis* agit selon un mode d'action processif. En effet la dégradation de gels de ι -carraghénane par cette enzyme a été observée par microscopie électronique à transmission, et a montré un affinement progressif des fibres de ι -carraghénane, sans destruction du réseau de fibres (Michel *et al.*, 2003). De plus, la résolution de la structure de la ι -carraghénase d'*A. fortis* en complexe a montré que le domaine A était stabilisé par la présence des substrats, dans une position refermée formant un tunnel. Cette topologie est caractéristique d'un mode d'action processif. La ι -carraghénase d'*A. fortis* est donc capable d'adopter deux conformations : la première, ouverte, permet la fixation endo d'une chaîne de carraghénane, et la seconde, en tunnel,

permet à l'enzyme de rester fixée à son substrat et d'agir de manière processive. Ainsi la ι -carraghénase d'*A. fortis* est une enzyme endo-processive. La structure de cette enzyme a également révélé une surface externe, non catalytique, fortement basique. Cette propriété pourrait être impliquée dans la dissociation des fibres et hélices de carraghénane.

3.3. La λ -carraghénase

La production de la λ -carraghénase de *P. carrageenovora* est induite par le λ -carraghénane. L'enzyme a été purifiée à l'homogénéité à partir du surnageant de culture (Greer, 1984), et a fait l'objet d'études biochimiques. Son poids moléculaire a été estimé à 98 kDa et ses conditions optimales d'activité sont à pH 6,5 et à 30°C.

Le séquençage de cette protéine n'a révélé aucune similarité avec les κ - et ι -carraghénases, elle appartient à une nouvelle famille de glycoside hydrolases, dont elle est pour le moment l'unique représentant. Le séquençage révèle que la λ -carraghénase a un poids moléculaire de 105 kDa, et suggère qu'elle est formée d'au moins deux modules et que la région N-terminale pourrait avoir un repliement en β -propeller (Colin, 1995).

A l'inverse des κ - et ι -carraghénases, la λ -carraghénase n'est pas disponible sous forme recombinante. Toutes les études biochimiques ont donc été réalisées à partir de la λ -carraghénase native (Guibet *et al.*, 2007). Cette enzyme hydrolyse les liaisons $\beta(1\rightarrow4)$ selon un mécanisme d'inversion de configuration. Ses produits limites ont été purifiés et caractérisés par RMN, il s'agit du tétra- et de l'hexa- λ -carraghénane. Au cours de l'hydrolyse, une chute rapide du poids moléculaire a été observée, ainsi qu'une apparition rapide de produits d'hydrolyse de toutes les tailles. Ceci indique que la λ -carraghénase agit selon un mode d'action endo. Enfin, l'étude de l'hydrolyse de l'hexa- λ -carraghénane et de l'octa- λ -carraghénane a montré que la λ -carraghénase possède 8 sous-sites de fixation.

4. Objectifs et présentation de l'étude

Les propriétés physico-chimiques des carraghénanes dépendent non seulement de leur composition, mais également de la distribution des différentes unités carrabiose qui les composent. En effet des propriétés physico-chimiques différentes peuvent être obtenues à partir de carraghénanes de même composition. Dans ce cas, la distribution est le paramètre clé. De nombreuses méthodes d'analyse, décrites précédemment, sont utilisées en routine pour déterminer la composition des carraghénanes. En revanche, à l'heure actuelle, aucune technique ne permet, seule, de déterminer la distribution des unités carrabiose. La combinaison de plusieurs techniques est nécessaire.

Des méthodes associant la dépolymérisation enzymatique à des techniques chromatographiques ont été employées avec succès pour étudier la distribution des différents motifs de répétition dans plusieurs polysaccharides abondants, comme les glycosaminoglycanes, les alginates ou les pectines. La découverte et la caractérisation d'enzymes spécifiques, les carraghénases, a déjà permis d'aborder l'étude de la distribution de différents carraghénanes hybrides, notamment de type λ - (Guibet *et al.*, 2007), κ - ι - (Guibet *et al.*, 2008) et κ - β - (Knutsen, 1992).

Mon travail de thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux, avec pour objectif de mieux caractériser la ressource en algues carraghénophytes. Nous avons particulièrement porté notre attention sur des carraghénanes extraits des algues sans traitement chimique, qui sont plus représentatifs de la paroi algale que les carraghénanes industriels. Ceci implique de caractériser les précurseurs biosynthétiques des carraghénanes, à savoir les unités μ - et ν -carrabiose, dans des structures hybrides.

Les deux premiers chapitres de cette thèse portent sur l'analyse structurale de deux carraghénanes hybrides binaires, les κ - μ - et ι - ν -carraghénanes, extraits respectivement de *K. alvarezii* et *E. denticulatum*, sans traitement alcalin. Dans ces deux chapitres, sont notamment décrites la purification et la caractérisation d'oligo-carraghénanes idéaux et hybrides libérés par la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* et la ι -carraghénase d'*A. fortis*. Les temps de rétentions spécifiques de ces oligo-carraghénanes en chromatographie ionique ont été relevés, ce qui a permis d'aborder le chapitre 3.

Ce troisième chapitre traite de l'analyse structurale de carraghénanes hybrides de plus grande complexité, de type κ - ι - et riches en précurseurs biosynthétiques μ - et ν -carrabiose.

Grâce aux résultats obtenus dans les deux précédents chapitres, des différences de distribution de ces précurseurs ont pu être mises en évidence.

Lors de l'extraction, les carraghénanes subissent un traitement alcalin qui convertit les unités μ - et ν -carrabiose en κ - et ι -carrabiose respectivement. Nous nous sommes appuyés sur les nouvelles données structurales, obtenues au cours des précédents chapitres, pour étudier la cinétique de cette réaction, qui fait l'objet du quatrième chapitre.

Deuxième partie :

Résultats

Deuxième partie

Chapitre 1

Analyse structurale du κ -/ μ -carraghénane de *K. alvarezii*

Article 1 : D. Jouanneau, M. Guibet, P. Boulenger, J. Mazoyer, M. Smietana and W. Helbert. New insights into the structure of hybrid κ -/ μ -carrageenan and its alkaline conversion. **Food Hydrocolloids**, accepté.

Deuxième partie : résultats

Chapitre 1 : Analyse structurale du κ -/ μ -carraghénane de *K. alvarezii*

Le μ -carraghénane (**D6S-G4S**) est le précurseur biosynthétique du κ -carraghénane. Il a notamment été détecté dans les parois de *Kappaphycus alvarezii* (Bellion *et al.*, 1983) et d'*Hypnea musciformis* (Knutsen *et al.*, 1995). Dans ces deux algues, il apparaissait comme un composant minoritaire des carraghénanes, ceux-ci étant très majoritairement composés de motifs κ -carrabiose. La proportion de motifs μ -carrabiose dans les carraghénanes est en général faible, de l'ordre de quelques pourcents (jusqu'à 10% environ). L'analyse structurale de κ -/ μ -carraghénanes réalisée par Guibet (Guibet, 2007) suggérait une distribution aléatoire des différents motifs carrabiose. Les données spectroscopiques du μ -carraghénane ne sont que partielles, notamment en ce qui concerne la RMN du proton, car celui-ci n'a jamais été observé pur.

Le μ -carraghénane, comme le ν -carraghénane, à cause de sa structure chimique particulière avec l'unité **D** en conformation chaise 4C_1 , est connu pour empêcher la gélification du κ -carraghénane (van de Velde *et al.*, 2002). En effet la chaîne de κ -carraghénane possède une structure régulière, formée par l'alternance d'unités en conformation 4C_1 et 1C_4 , qui permet la formation d'hélices et, par conséquent, la gélification. La présence de motifs μ -carrabiose vient rompre la régularité des chaînes en créant des « kinks », qui empêchent la formation des hélices, et donc la gélification. Aussi la présence de μ -carrabiose est-elle à éviter si l'on souhaite améliorer les propriétés physico-chimiques des carraghénanes. *In vitro*, la conversion du μ -carraghénane en κ -carraghénane peut être réalisée par traitement alcalin à chaud. Industriellement l'extraction des carraghénanes est réalisée en milieu alcalin à haute température, et donc la conversion du μ - en κ -carraghénane a lieu en même temps que l'extraction elle-même.

Au cours de la biosynthèse, le μ -carraghénane est converti en κ -carraghénane par l'action d'une enzyme originale : une galactose-6-sulfurylase (Lawson & Rees, 1970). Tout comme le traitement alcalin, l'action de cette enzyme favorise la gélification. Cependant le mécanisme de cyclisation et le mode d'action de cette enzyme sont encore inconnus.

Nous avons entrepris d'étudier la structure du κ -/ μ -carraghénane, en termes de composition mais également de distribution. Le modèle choisi pour cette étude est le carraghénane de *Kappaphycus alvarezii*, principale ressource pour l'extraction industrielle de κ -carraghénane. Notre étude avait notamment pour objectif de déterminer la structure des carraghénanes tels qu'ils se présentent dans l'algue, c'est-à-dire avant tout traitement chimique (alcalin). La méthodologie employée est celle qui a permis d'élucider la distribution des κ -/ μ -carraghénanes (Guibet *et al.*, 2008). Le carraghénane, dont la composition a été déterminée par ^1H -RMN, a été hydrolysé par la κ -carraghénase de *P. carrageenovora*. Les produits d'hydrolyse ont été séparés et analysés par chromatographie, puis caractérisés par RMN. La dégradation de ce carraghénane par la κ -carraghénase était presque totale, les 5% de fraction résistante à l'enzyme contenaient majoritairement de l'amidon floridéen contaminant. Par conséquent l'analyse fine des oligosaccharides produits par l'hydrolyse (composition, distribution, proportions relatives) donne une bonne représentation de la structure du polysaccharide initial. Ainsi cinq oligo- κ -/ μ -carraghénanes hybrides, de l'hexa- au décacaccharide, ont été purifiés et caractérisés. Ils mettent en évidence trois types de distributions possibles des unités μ -carrabiose : $-\mu-$, $-\mu\mu-$, $-\mu\mu\mu-$. La caractérisation de ces oligosaccharides par RMN nous a permis d'observer des déplacements chimiques spécifiques à chaque type de distribution. Ainsi le signal anomérique des unités μ -carrabiose, à 5.25 ppm, préalablement attribué au μ -carraghénane correspond en fait aux unités μ -carrabiose encadrées par des unités κ -carrabiose. Le signal anomérique du μ -carraghénane serait celui correspondant à des unités μ -carrabiose encadrées par d'autres unités μ -carrabiose, à 5.28 ppm. Le signal asymétrique du proton anomérique du μ -carrabiose, dans les spectres de polymères, est en fait la somme de ces différents types de signaux. L'observation méticuleuse de la forme de ce signal donne une indication sur la distribution de ces unités au sein de la chaîne de carraghénane. Une importante distribution en blocs des unités μ se traduirait par un signal important vers 5.28 ppm.

New insights into the structure of hybrid κ -/ μ -carrageenan and its alkaline conversion

Diane Jouanneau[§], Marion Guibet[§], Patrick Boulenguer[†], Jacques Mazoyer[†], Michael Smietana[#] and William Helbert[§]

[§] Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, CNRS, Marine plants and biomolecules, UMR 7139, Station Biologique, BP 74, F-29680 Roscoff Cedex, France

[#] Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247 CNRS, Université Montpellier 1 and Université Montpellier 2, Montpellier, F-34000 France

[†] Cargill Texturizing Solutions, F-50500 Baupte, France

ABSTRACT

Hybrid κ -/ μ -carrageenan, water-extracted from *Kappaphycus alvarezzi*, was incubated with *Pseudoalteromonas carrageenovora* κ -carrageenase. The five most abundant hybrid κ -/ μ -carrageenan oligosaccharides were purified and their structure was determined by NMR and mass spectrometry. Since the enzyme-resistant fraction was small, these five oligosaccharides were representative of the distribution of the μ -carrabiose moieties along the carrageenan chain. Three main distributions of μ -carrabiose were found: $-\mu-$, $-\mu-\mu-$ and $-\mu-\mu-\mu-$. Interestingly, the chemical shifts of the anomeric proton and carbon were strongly influenced by the identity of the adjacent carrabiose, which explains the asymmetrical D6S-H1 NMR signal that we observed. Although μ -carrabiose chemical shifts are usually attributed to blocks of μ -carrabiose as expected in ideal μ -carrageenan, we demonstrate that they are in fact due to μ -carrabiose units positioned between κ -carrabiose units. Using NMR and chromatography to monitor the alkaline conversion of μ - to κ -carrabiose, we found that the μ -carrabiose distribution ($-\mu-$, $-\mu-\mu-$, $-\mu-\mu-\mu-$) did not influence the conversion rate.

KEYWORDS: κ -/ μ -carrageenan, alkaline conversion, distribution, composition

INTRODUCTION

Carrageenans are a class of sulfated galactans occurring exclusively in the cell walls of red algae. This very diverse family of polysaccharides shares a common galactan backbone of alternating 3-linked- β -D-galactopyranose (G) and 4-linked- α -D-galactopyranose (D). The disaccharide repetition moieties or carrabiose units are classified according to the number and position of sulfate ester groups (S), as well as the occurrence of 3,6-anhydro-D-galactose (DA) obtained after the cyclization of the D units. Important representatives of this family of polysaccharides are the carrageenans that are widely used in industrial applications. These include κ -carrageenan (kappa, G4S-DA) and ι -carrageenan (iota, G4S-DA2S), which are employed for their gelling properties, and λ -carrageenan (G2S-D2S6S) used as a thickening agent. Other substitutions such as methyl (M) or pyruvate (P) groups have been also observed, thereby increasing the number of possible carrabiose structures.

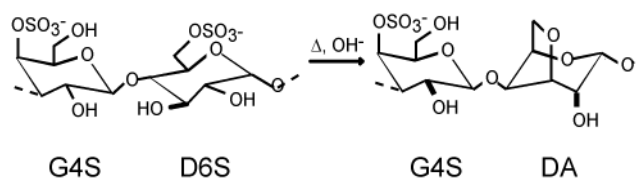


Figure 1. Structure of κ - and μ -carrabiose occurring in hybrid κ -/ μ -carrageenan. The cyclization of the anhydro ring is obtained *in vitro* by hot alkaline treatment.

Carrageenan structure varies with algal species, life stage and extraction procedures (Craigie, 1990; Usov, 1998). This diversity in carrageenan structure reflects, in part, the great number of carrabiose structures. However, a second level of carrageenan diversity arises from the co-occurrence of ideal carrabiose units in purified hybrid or copolymer chains (Craigie, 1990; Greer and Yaphe, 1984a,b; Bixler, 1996; Guibet et al. 2008). Some carrageenans, such as the alkali-treated κ -carrageenan of *Hypnea musciformis*, may contain primarily one type of carrabiose unit (e.g. 95% of κ -carrabiose units van de Velde et al. 2005; Bixler et al., 2001). However, carrageenans usually contain several types of carrabiose units whose proportion and distribution reflect the particularities of the carrageenan biosynthetic pathway. Classical hybrid structures of carrageenan are found in native or unprocessed κ - and ι -carrageenan chains. They usually contain fractions of their biosynthetic precursors named μ - (μ , D6S-

G4S) and ν - (nu, D2S6S-G4S) carrageenans, respectively (Bellion et al., 1983; van de Velde et al., 2002) (Figure 1).

The occurrence of μ - and ν -carrabioses in carrageenan chains is known to reduce gelation ability (Rees, 1969; van de Velde, 2002). In order to improve their performance for industrial applications, carrageenans are subjected to hot alkaline treatment which leads to the cyclization of the 3,6 anhydro rings. The anhydro ring is probably the result of a nucleophilic substitution where the ester sulfate located at position 6 is replaced by the hydroxyl group on position 3 (Ciancia et al., 1993; Viana et al., 2004). The conversion of the α -D-galactose-6-sulfate (μ -carrabiose) and 2,6-disulfate (ν -carrabiose) to their corresponding 3,6 anhydro derivatives greatly reduces the hydrophilic nature of the galactose residues, inverses the chair conformation of the pyranose rings from 4C_1 to 1C_4 and, as a result, allows the carrageenans to take on the helical conformation required for sol/gel transition (Rees, 1969; Lawson and Rees, 1970). In algal cells, similar reactions are catalyzed by so-called “sulfohydrolases” (Wong and Craigie, 1978; Zinoun et al., 1997) or galactose-6-sulfurylases (Genicot et al., 2003).

The concept of hybridity has emerged from the comparison of the physico-chemical properties of different carrageenans and from the analysis of enzymatic degradation products. The production of hybrid fragments obtained after incubation with enzymes likely arises from the cleavage of hybrid substrates (Greer and Yaphe, 1984a,b; Bellion et al., 1983). The use of carrageenan-degrading enzymes, known as carrageenases, has made it possible to address not only the composition, but also the distribution of the carrabiose units in hybrid carrageenans (Guibet et al. 2006; Guibet et al. 2008). Carrageenases are glycoside hydrolases found in marine bacteria involved in recycling algal biomass Michel et al., 2006). The κ -, ι -, and λ -carrageenases, specifically catalyze the cleavage of the $\beta(1-4)$ glycosidic bonds of their respective carrageenan substrates. *P. carrageenovora* κ -carrageenase has been purified (32 kDa) and shown to yield neo- κ -carrabiose and neo- κ -carratetraose as end products (Potin et al., 1995). This enzyme belongs to the glycoside hydrolase family GH 16, along with some β -agarases, and proceeds according to a mechanism that retains the anomeric configuration. *P. carrageenovora* κ -carrageenase has an endo-processive mode of action, whose processive character depends on whether the substrate is in a soluble or gel state (Michel et al., 2001; Lemoine et al., 2009). This enzyme can accommodate not only κ -carrabiose moieties in its active site but also, to some extent, ι - and β -carrabiose moieties. This property led to the

purification and characterization of hybrid oligo- κ -/ ι - and κ -/ β - carrageenans (Knutsen, 1992; Guibet et al., 2008).

The physical properties of carrageenan utilized in the food industry are linked to their chemical structures which are significantly affected by the production processes. With the goal of developing analytical tools to facilitate the monitoring of anhydro ring cyclization, we analyzed the composition and, more especially, the distribution of carrabiose moieties in carrageenans as they occur in red algal cell walls (prior to alkaline treatment). We carried out investigations on untreated κ -carrabiose-rich carrageenan extracted from *Kappaphycus alvarezii* which contains low amounts of μ - and ι -carrabiose moieties. The study was conducted using the same strategy previously implemented for hybrid κ -/ ι -carrageenan: chromatographic analysis of enzymatic degradation products (Guibet et al., 2008). Interestingly, our analyses revealed two possible distributions of μ -carrabiose which could be distinguished by ^1H NMR. The μ -carrabiose unit was either localized between two κ -carrabiose units or had at least one μ -carrabiose neighbor. Based on our in-depth analysis of the composition and distribution of hybrid κ -/ μ -carrageenan, we explored the reactivity of the two types of μ -carrabiose fractions during hot alkaline treatment.

EXPERIMENTAL

Preparation of carrageenan samples:

Carrageenans were provided by Cargill Texturizing Solutions (Baupre, France). They were hot-extracted with water (κ -/ μ -carrageenan) or with NaOH (κ -carrageenan) from the cultivated red alga *Kappaphycus alvarezii* (Philippines). Prior to use, the carrageenans were dialyzed (6-8 kDa MWDO Spectra/Pore®) against distilled water to remove excess salt and non-polymeric materials. The polysaccharides were then freeze-dried and stored at room temperature in dry conditions.

Alkaline conversion of κ -/ μ -carrageenan:

The protocol of carrageenan conversion was adapted from Matulewicz *et al.* (1989). Briefly, 100 mg of carrageenans were dissolved in 5 mL water containing 5 mg of NaBH₄. After 24 h at room temperature, 5 mL of 2M NaOH and 2.5 mg of NaBH₄ were added to the carrageenan solution. The resulting solution (1% carrageenan in 1 M NaOH) was divided into 1 mL aliquots, which were placed in sealed tubes and heated to 80°C. Samples were taken at regular

intervals and the reaction was stopped by cooling the specimen in an ice bath before neutralizing the solution with drop-wise additions of 1M hydrochloric acid. Before NMR analysis, the samples were extensively dialyzed (6-8 kDa MWDO Spectra/Pore ®) against distilled water and freeze-dried.

Enzymatic degradation:

Enzymatic degradations were carried out using recombinant *P. carrageenovora* κ -carrageenase which was over-expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by affinity chromatography according to Michel *et al* 2001. Carrageenans (0.5% w/v, in 0.1 M NaNO₃ pH 7.5) were incubated with an aliquot of κ -carrageenase (0.3 μ g/mL) for 24 h at 40°C. These incubation conditions led to the complete degradation of κ -carrageenan, which was characterized by the lack of signal corresponding to neo- κ -carrhexaose in HPAEC chromatograms and the absence of measurable reducing ends after a second addition of fresh enzyme.

Enzymatic degradation of alkali-treated carrageenan was adapted as follows: 1 mL of 0.1 M Tris/HCl buffer (pH 8) was added to the neutralized alkali-treated carrageenan solution (about 1 mL). The solution was adjusted to 5 mL with distilled water and the carrageenan was then incubated with a κ -carrageenase aliquot (0.3 μ g/mL) for 24 h at 40°C.

Size Exclusion Chromatography:

Filtered samples (200 μ L, 0.22 μ m) were injected on analytical Superdex 200 and Superdex peptide columns connected in series. The elution was conducted in 0.1 M LiNO₃ at 20°C using isocratic Dionex Ultimate 3000 pump working at a flow rate of 0.3 mL min⁻¹. The chromatography experiments were monitored using a Wyatt Optilab Rex refractive index detector. Chromeleon-Peak Net software (Dionex) was used for data acquisition.

High-Pressure Anion Exchange Chromatography (HPAEC):

Filtered samples (20 μ L, 0.22 μ m, Millipore) were injected on analytical AS11 columns (4 x 250 mm Ion Pac® Dionex), coupled with an AS11 guard column and equilibrated in 15 mM NaOH. The elution was conducted at 20°C at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ with a NaOH (280 mM) step gradient (0-3.5 min: 3-3%; 3.5-4.1 min: 3-5%; 4.1-6.5 min: 5-10%; 6.5-22 min: 10-50%, 22-28 min: 50-74.7%; 28-28.1 min: 74.7-100%) monitored by a GP40 gradient pump (Dionex). Oligosaccharide elution was detected by conductivity with an ED40 (Dionex) after

a 300 mA current suppression with an ASRS ultra II-4mm (Dionex). Chromeleon-Peak Net software (Dionex) was used for data acquisition. Using this method, the neo- κ -carratetraose and neo- κ -carrahexaose were detected at 11.7 min and 13.8 min, respectively. Integration of signal intensity was performed using PeakFit 4.12 software (Seasolve Software Inc.).

Reducing sugar analysis:

The amount of reducing sugars produced during enzymatic incubation was determined by the reducing sugar method adapted from Kidby and Davidson (1973). Briefly, aliquots (100 μ L) of the reaction medium were mixed with 900 μ L of ferricyanide solution (300 mg potassium hexacyanoferrate III, 24 g Na₂CO₃, 1 mL NaOH 5M, completed to 1 L). The mixture was maintained in boiling water for 10 min, cooled to room temperature and absorbance was read at 420 nm.

Purification of the enzyme resistant fraction (ERF):

The ERF was separated from the oligosaccharide fraction by ultrafiltration using 50 kDa MWCO membrane (Amicon). Fifty milliliters of sample was gently stirred in a pressure-filtration cell (Amicon) maintained under a nitrogen gas pressure of 1.0 kg cm⁻². The ERF was diluted in distilled water and washed free of oligosaccharides and salts by repeated ultrafiltration. The ERF was then freeze-dried and stored at room temperature in dry conditions.

Purification of hybrid oligo- κ / μ -carrageenans:

The degradation products of native *Kappaphycus alvarezii* carrageenan were used to isolate pure hybrid oligo- κ / μ -carrageenans. At first, enriched fractions of hybrid oligosaccharides were prepared by size-exclusion chromatography. Filtered solutions (0.22 μ m, Millipore) of oligosaccharide mixtures (2 mL, 2% w/v) were injected on a Pharmacia Superdex 30 prep grade column (600 x 26 mm i.d.). The elution was conducted in 50 mM (NH₄)₂CO₃ at 20°C using an isocratic Gilson 306 pump working at a flow rate of 1.7 mL min⁻¹. Oligosaccharides were detected by differential refractometry (Spectra System RI-50, Thermo Separation products) and fractions were collected with a Gilson 215 Liquid Handler. Using this procedure, the neo- κ -carrabiose and neo- κ -carratetraose were detected at 153 min and 138 min respectively. Enriched fractions oligo- κ / μ -carrageenans were collected at elution times of 122 min (κ - μ - κ), 113 min (κ - κ - μ - κ), 110 min (κ - μ - μ - κ) and 103 min (κ - μ - κ - μ - κ and κ - μ - μ - μ - κ). The oligosaccharide fractions were then freeze-dried and stored in dry conditions.

Pure hybrid oligosaccharides were then successfully obtained at the mg scale by HPAEC. The same equipment was used as in analytical chromatography, described above. The freeze-dried oligosaccharides were dissolved in water (0.3% w/v), filtered (0.22 μ m, Millipore), and injected (200 μ L) on a semi-preparative AS11 column (9 x 250 mm, Ion Pac®, Dionex). The samples were eluted at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ with a NaOH (280 mM) step gradient which was adapted to each oligosaccharide. For purification of κ - μ - κ , κ - κ - μ - κ and κ - μ - μ - κ , the gradient was 0–11 min: 25–43.4%; 11–11.1 min: 43.4–25%; 11.1–16.1 min: 25%. According to this gradient, the κ - μ - κ , κ - κ - μ - κ and κ - μ - μ - κ fractions were observed at retention times of 8 min, 11.4 min and 12.3 min, respectively. In the case of the κ - μ - κ - μ - κ and κ - μ - μ - μ - κ fractions, the NaOH gradient used was: 0–11 min: 25–43.4%; 11–11.1 min: 43.4–25%; 11.1–18.1 min: 25%. The κ - μ - κ - μ - κ and κ - μ - μ - μ - κ fractions were eluted after 10.5 min and 14.4 min. The purified oligosaccharides were then freeze-dried and stored in dry conditions.

Preparation and enzymatic hydrolysis of fluorescent oligosaccharides:

The protocol for derivatization of sugar reducing ends with 2-aminoacridone (AMAC) was applied to the purified oligo- κ -/ μ -carrageenans (Goubet et al., 2002). Two-milligram portions of each oligosaccharide were mixed with 100 μ L of 1 M NaCNBH₃ and 100 μ L of 0.1 M AMAC in acetic acid/DMSO (3/17, v/v). Labeling with AMAC was conducted overnight at 37°C. The samples were then freeze-dried and stored at 4°C in the dark. Fluorescent oligo- κ -/ μ -carrageenans (0.5 mg) in 50 μ L of 0.1 M NaNO₃, pH 7.5 were incubated with excess of κ -carrageenase for 36 h at 35°C. Digestion time courses were monitored by 27% (w/v) carbohydrate polyacrylamide gel electrophoresis (C-PAGE) running at 20 mA for 30 min. The migration front of the fluorescent oligosaccharides was visualized using a UV Transilluminator Biovision+ 1000/26M (Vilber Lourmat).

¹H and ¹³C NMR analyses:

NMR spectra were recorded with a BRUKER Advance DRX 500 spectrometer equipped with an indirect 5 mm gradient probehead ¹H/¹³C/³¹P. Samples were exchanged twice in D₂O, and re-dissolved at a concentration of about 5 mg mL⁻¹ in 99.97 % atom D₂O. Chemical shifts are expressed in ppm in reference to an external standard (trimethylsilylpropionic acid)²⁷.

Prior to analysis, undigested high-molecular-weight carrageenan was ground with a MM200 ball mill (Retsch). The low depolymerization of the polysaccharides obtained after 24 h at 40% of the maximal speed led to a noticeable increase in the quality of the NMR spectra. 500

MHz ^1H NMR spectra of high-molecular-weight material (ground carrageenans, enzyme resistant fraction) were recorded at 70°C using 32K data points and the following parameters: pulse angle, 30°; sweep width, 10330 Hz; acquisition time, 1.58 s; relaxation delay, 5 s; digital resolution 0.31 Hz per point; scan number, 128.

^1H NMR (500 MHz) spectra of oligosaccharides were recorded at 25°C, using 64K data points. The parameters were as follows: pulse angle, 30°; sweep width, 7485 Hz; acquisition time, 4.38 s; relaxation delay, 2 s; scan number, 32; digital resolution, 0.11 Hz per point. Non-exchangeable proton and carbon assignments and sugar sequences of oligosaccharides were determined from 1D (^1H , Jmode (0.92 Hz per point)) and 2D experiments (COSY-DQF, ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C HMBC) using the conventional pulse program provided by Bruker.

Oligosaccharide nomenclature:

We used the nomenclature established by Knutsen et al. (1994) for carrageenans and oligo-carrageenans. The 4-linked α -D-galactopyranosyl unit is designated as a D-unit and the 3-linked β -D-galactopyranosyl unit as a G-unit. The disaccharide repetitive unit of κ -carrageenan, ι -carrageenan and μ -carrageenan are DA-G4S, DA2S-G4S and D6S-G4S, respectively. For oligosaccharides of the neo-carrabiose series, the internal κ - and μ -carrabiose units are written as DA-G4S and D6S-G4S without additional indices. When a κ -carrabiose moiety (DA-G4S) was positioned at a reducing end, it was symbolized by DAr'-G4Sr α or DAr'-G4Sr β , according to the anomeric configuration. At the non-reducing end, it was designated as DANr-G4Snr'. Similar rules were applied to μ -carrabiose units. The NMR resonance of the galactose (DAr' or D6Sr') neighboring a G4Sr reducing end can be affected by the α/β anomer equilibrium. Consequently, it is possible to distinguish between DAr' α (or D6Sr' α) and DAr' β (D6Sr' β), when observed.

RESULTS

Enzymatic digestion of κ - and κ -/ μ -carrageenan

The ^1H NMR spectra of κ -carrageenan extracted in hot water from *K. alvarezii* (Figure 2A) presented typical deshielded signals corresponding to the anomeric hydrogens (DA-H1) resonating at 5.1 ppm. Based on the close similarity with values found in the literature (van de Velde et al., 2004), two other anomeric signals observed at 5.3 and 5.25 ppm were respectively assigned to DA2S-H1 and D6S-H1 of the ι - and μ -carrabiose units. The fractions of the various carrabiose units were estimated by integration of the anomeric signals and the κ -: μ -: ι -carrabiose ratio was estimated at 83:11:6. The alkali-extracted carrageenan was devoid of μ -carrabiose and contained mainly κ -carrabiose units with a κ -: ι -carrabiose ratio of about 94:6. The higher amounts of κ -carrabiose in the alkali-extracted carrageenan can be attributed to the alkaline conversion of the μ -carrabiose into κ -carrabiose units¹². Although ι -carrabiose units occurred in both types of κ -rich carrageenan, for simplicity, in what follows, we have named them κ - (alkali-extracted) and κ -/ μ -carrageenan (water-extracted).

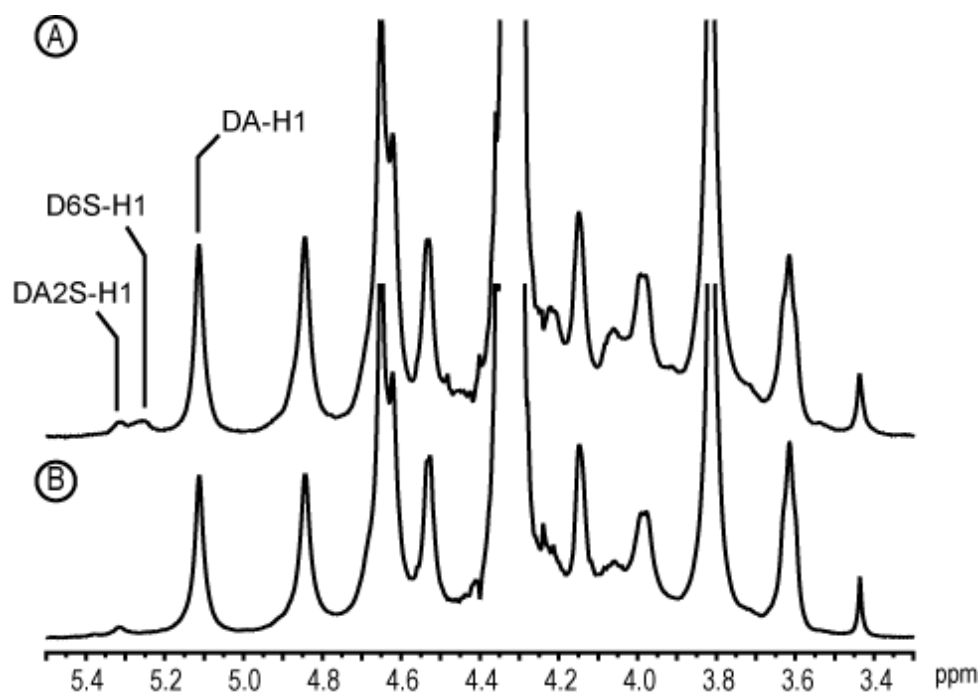


Figure 2. ^1H NMR spectra of water- (A) and alkali- (B) extracted *Kappaphycus alvarezii* carrageenan. The characteristic anomeric protons of the ι - (DA2S-H1), μ - (D6S-H1) and κ - (DA-H1) carrabiose moieties are indicated.

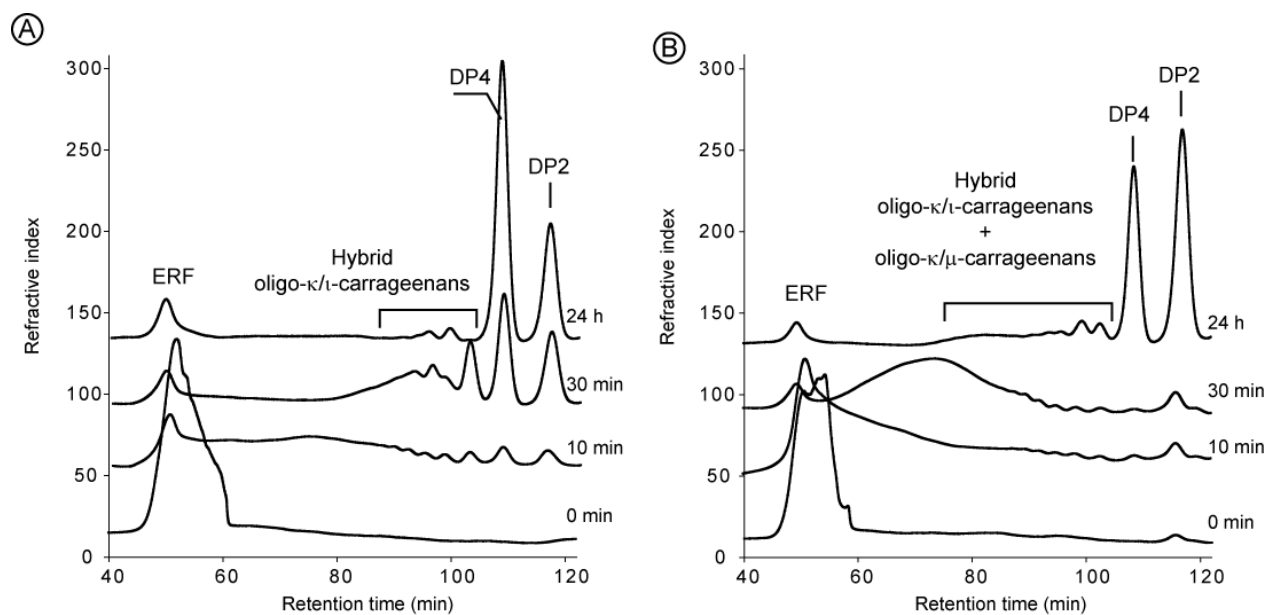


Figure 3. Degradation kinetics of alkali- (A) and water- (B) extracted carrageenan incubated with the recombinant *P. carrageenovora* κ -carrageenase. DP2 and DP4 designate neo- κ -carrabiose and neo- κ -carratetraose, respectively. ERF: enzyme resistant fraction.

As previously reported (Guibet et al., 2008), the degradation products of κ -carrageenan incubated with *P. carrageenovora* κ -carrageenase were essentially oligosaccharides eluting between 90 and 120 min (Figure 3). The oligosaccharides were the neo- κ -carrabiose (DP2, 117 min) and the neo- κ -carratetraose (DP4, 109 min) as well as minor amounts of hybrid oligo- κ -/ ι -carrageenans (eluting at 97 and 100 min). The degradation of κ -/ μ -carrageenan also resulted mainly in oligosaccharides which again included the standard oligo- κ -carrabiose (DP2 and DP4) and hybrid oligosaccharides eluting between 90 and 105 min. The amount of the hybrid oligosaccharides was higher for κ -/ μ -carrageenan than for κ -carrageenan suggesting that κ -/ μ -carrageenan was composed of not only oligo- κ -/ ι -carrageenans but also non-negligible quantities of oligo- κ -/ μ -carrageenans. This was confirmed by further analysis of the oligosaccharide fraction by HPAEC, presented Figure 4. Indeed, in addition to the hybrid oligo- κ -/ ι -carrageenans whose structures have been elucidated (Guibet et al., 2008), new oligosaccharides corresponding to κ -/ μ -oligosaccharides were clearly visible. The high-molecular-weight fraction eluting at about 50 min (Figure 3) represented less than 10% of the carrageenan substrate. ^1H NMR analysis has shown that this fraction resistant to κ -carrageenase was composed mainly of floridean starch and traces of ι -carrabiose-rich carrageenan.

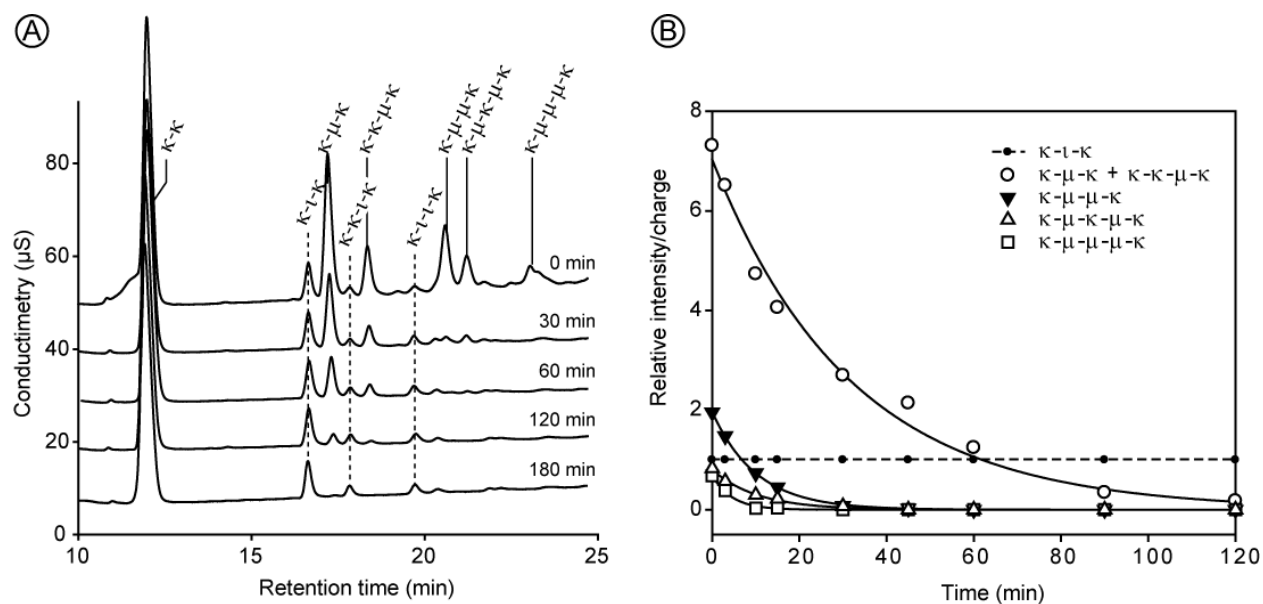


Figure 4. Conversion kinetics of μ - to κ -carrabiose monitored by HPAEC. (A) Series of anion exchange chromatograms obtained after enzymatic degradation of κ -/ μ -carrageenan subjected to hot alkaline treatments. The starting material (0 min) corresponds to the water-extracted carrageenan. (B) Signal intensity of the hybrid oligosaccharides divided by the corresponding number of charges as a function of time. The intensity decays of the oligosaccharides were fitted to an exponential curve.

Structural analysis of hybrid oligo- κ -/ μ -carrageenan

Five oligo- κ -/ μ -carrageenans were purified from DP6 to DP10 by size exclusion followed by semi-preparative HPAEC. These oligosaccharides, whose purities were estimated by HPAEC to be at least 95%, were analyzed by NMR and mass spectrometry. Figure 5 shows the ^1H NMR spectra of the purified hybrid oligosaccharides which shared common features. The analysis of the signals corresponding to the α -anomeric protons resonating between 5.0 and 5.4 ppm helped determine the position of the κ - and μ -carrabiose units within the hybrid oligo- κ -/ μ -carrageenan fragments. The non-reducing end residue was systematically an anhydro-galactose (DAnr-H1, 5.09 ppm). Similarly, the reducing end was always ascribed to a G4S residue (G4Sr α -H1, 5.33 ppm; G4Sr β -H1, 4.66 ppm). The anomeric protons of the anhydro-galactose of the κ -carrabiose localized at the reducing end (DAr' α -H1 and DAr' β -H1) resonated at 5.11 and 5.13 ppm, as previously determined (Guibet et al., 2008). These observations unambiguously indicated that hybrid oligo- κ -/ μ -carrageenans were

always terminated by a κ -carrabiose moiety at both their non-reducing and reducing ends and that the μ -carrabiose units were positioned exclusively within the oligosaccharide fragments. The number of internal κ - and μ -carrabiose moieties was determined by integrating the signal intensities of the α -anomeric protons that resonated at 5.11 ppm (DA-H1) and 5.25 ppm (D6S-H1).

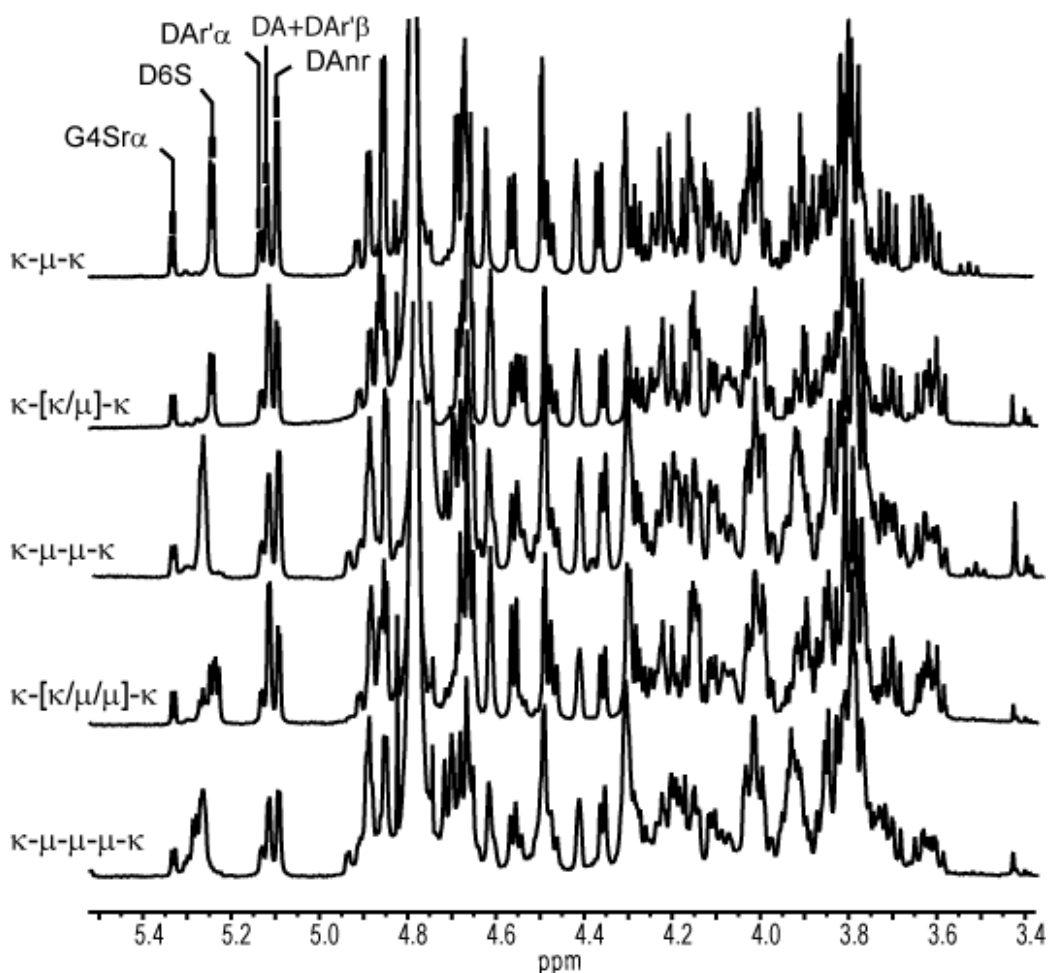


Figure 5. ^1H NMR of the purified hybrid κ -/ μ -oligo-carrageenans (κ - μ - κ , κ - κ - μ - κ , κ - μ - μ - κ , κ - μ - κ - μ - κ , κ - μ - μ - μ - κ) recorded at 25°C. The signals corresponding to the α - and β -anomeric protons are indicated on the spectra.

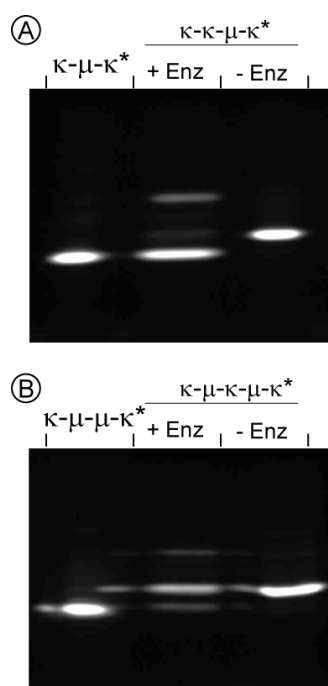


Figure 6. (A) Gel electrophoresis of fluorescently labeled κ - $[\kappa/\mu]$ - κ oligosaccharides with AMAC before (-Enz) and after (+Enz) incubation with κ -carrageenase. The fluorescent digestion product migrated the same distance as the labeled κ - μ - κ used as a standard. (B) Similar experiments were conducted with labeled κ - $[\mu/\kappa/\mu]$ - κ , however, no degradation was observed.

The composition of the hybrid oligosaccharides was confirmed by determining their molecular mass by mass spectrometry. Using this procedure, the structures of the hybrid oligosaccharides containing only μ -carrabiose as internal moieties (no internal κ -carrabiose) were determined without ambiguity. They included one hexasaccharide (κ - μ - κ , DA-G4S-D6S-G4S-DA-G4S, $M= 1274.1$), one octasaccharide (κ - μ - μ - κ , DA-G4S-D6S-G4S-D6S-G4S-DA-G4S, $M= 1758.2$) and one deca-saccharide (κ - μ - μ - μ - κ , DA-G4S-D6S-G4S-D6S-G4S-D6S-G4S-DA-G4S) (Ohara et al., 2009). For the two other oligosaccharides, κ - $[\kappa/\mu]$ - κ and κ - $[\kappa/\mu/\mu]$ - κ ($M = 2144.2$), ^1H NMR helped determine the composition of the internal residues, but not their relative distribution (symbolized by brackets). The sequences of these two oligosaccharides were finally determined by enzymatic degradation. Indeed, using HPAEC (not shown), we found that the κ - $[\kappa/\mu]$ - κ oligosaccharide could be cleaved into neo- κ -carrabiose and κ - μ - κ . Similar experiments conducted with fluorescently labeled oligosaccharides reported in Figure 6 demonstrate that the μ -carrabiose was adjacent to the reducing κ -carrabiose moiety (κ - κ - μ - κ). The oligosaccharide κ - $[\kappa/\mu/\mu]$ - κ was not degraded

after prolonged incubation with enzyme, suggesting that the minimum of two contiguous κ -carrabiose units required for degradation was absent. Consequently, we assumed that the structure of this decasaccharide has the alternating κ - μ - κ - μ - κ structure.

D6S	H1	H2	H3	H4	H5	H6a	H6b
van de Velde	5,24						
κ - μ - κ	5,24	3,89	4,00	4,30	4,47	4,15	4,28
κ - μ - μ - κ	5,26	3,91	4,02	4,31	4,48	4,17	4,29
κ - μ - μ - μ - κ	5,28	3,92	4,03	4,30	nd	nd	nd

G4S	H1	H2	H3	H4	H5	H6a	H6b
van de Velde							
DA- G4S -D6S (κ - μ - κ)	4,67	3,63	3,90	4,88	nd	nd	nd
D6S- G4S -DA (κ - μ - κ)	4,67	3,70	4,00	4,85	3,77	3,84	3,84
D6S- G4S -D6S (κ - μ - μ - κ)	4,71	3,72	3,93	4,89	nd	nd	nd

Table 1. ^1H NMR data (δ) ppm of the D6S and G4S residues at 25°C of the μ -carrabiose moieties as a function of their neighbouring. The chemical shifts were those corresponding to the μ -carrabiose in bold.

The five hybrid κ -/ μ -oligo-carrageenans were analyzed in depth by 2D NMR experiments (COSY, HMQC, HMBC, and JMode). The proton and carbon signals were ascribed and are reported in Table 1 and as Supporting Information. Interestingly, we observed that the chemical shift of the internal D6S was strongly affected by its environment. We found that when the μ -carrabiose unit was positioned between two κ -carrabiose moieties (κ - μ - κ , κ - κ - μ - κ , κ - μ - κ - μ - κ) the D6S-H1 chemical shift was always at 5.24 ppm. In contrast, when the μ -carrabiose had at least one neighboring μ -carrabiose unit at the reducing or non-reducing end, the D6S-H1 signal was shifted to about 0.02 ppm in the lower field. In addition, the chemical shift of the D6S-H1 signal was correlated with the position of the neighboring μ -carrabiose (κ - μ - μ - κ or κ - μ - μ - κ). We hypothesized that the most deshielded signal at 5.268 ppm corresponded to the μ -carrabiose unit having a μ -carrabiose unit bound at its reducing end (κ - μ - μ - κ). When the μ -carrabiose was bound at the non-reducing end (κ - μ - μ - κ), the signal was measured at 5.262 ppm. As reported in Table 1, the other protons were also affected by neighboring D6S unit, for example the D6S-H2 and H3 units were shifted 0.02 ppm towards the lower field. The deshielding of the D6S protons was the strongest when the μ -carrabiose unit was localized between two μ -carrabiose moieties (μ - μ - μ). The D6S-H1 signal was then deshielded by 0.04 ppm; the G6S-H2 and H3 were deshielded by 0.03 ppm

and the others, between 0.01 and 0.02 ppm (Table 1). All these observations help explain the asymmetrical D6S-H1 signal of μ -carrabiose in the polymer (Figure 7). This pattern can be interpreted as three overlapping, distinct signals corresponding to a single μ -carrabiose ($-\mu$ -) positioned between κ -carrabiose units, two contiguous μ -carrabiose units (κ - $\underline{\mu}$ - μ or μ - $\underline{\mu}$ - κ) or μ -carrabiose localized between two other μ -carrabiose units (μ - $\underline{\mu}$ - μ).

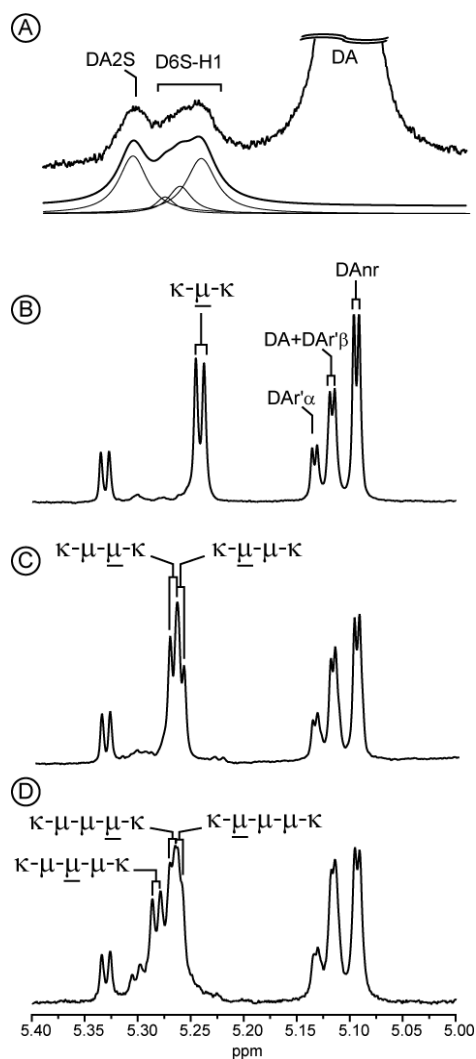


Figure 7. (A) Anomeric region of the ^1H NMR spectra of the water-extracted carrageenans. The asymmetrical D6S-H1 signal was fitted with three Lorentzian functions centered at 5.24, 5.26 and 5.28 ppm which correspond to the D6S-H1 signal encountered in κ - μ - κ (B), κ - μ - μ - κ (C) and κ - μ - μ - μ - κ (D) oligosaccharides. The ascribed signals were the underlined μ -carrabiose moieties.

As for the protons, the chemical shifts of carbon signals were affected by the immediate environment of the D6S unit. Notably, when two μ -carrabioses were adjacent, we observed two distinct D6S-C1 signals. We assumed that the more shielded signal should be attributed to the μ -carrabiose closest to the reducing end. In the case of three adjacent μ -carrabioses,

three D6S-C1 signals could be distinguished. The D6S-C1 signal corresponding to the μ -carrabiose positioned between the two other μ -carrabiose units (κ - μ - μ - μ - κ) has a chemical shift of 0.8 ppm lower (see Supporting Information).

The κ - and μ -carrabiose moieties have the G4S unit in common. However, the chemical shifts of this residue were strongly influenced by its neighbor (DA or D6S). For example, in the case of the hybrid κ - μ - κ (DA-G4S-D6S-G4S-DA-G4S) hexasaccharide, we recorded two different sets of carbon and proton chemical shifts corresponding to the G4S residues linked either to the D6S at its reducing or at its non reducing end. When the G4S was localized between two D6S, as in the case of the octasaccharide κ - μ - μ - κ (DA-G4S-D6S-G4S-D6S-G4S-DA-G4S), another set of NMR signals was recorded (see Supporting Information).

Alkaline conversion of μ -carrabiose monitored by chromatography

Based on the full characterization of the HPAEC chromatogram and on detailed information gleaned from the NMR of κ -/ μ -carrageenan, we analyzed the alkaline conversion of μ - to κ -carrabiose. Conversion kinetics were first followed by ^1H NMR and are presented in Figure 8. The asymmetrical signal of the D6S-H1 decreased with the progression of the alkaline treatment. The most deshielded fraction corresponding to contiguous $-\mu$ - μ - and $-\mu$ - μ - μ - carrabioses disappeared first (60 min) at a rate that seemed faster than the signal corresponding to the single $-\mu$ - moiety. This apparent lower rate of conversion of the $-\mu$ - moiety can be explained by the fact that the decrease of $-\mu$ - signal was partly compensated by the conversion of $-\mu$ - μ - moieties into $-\kappa$ - μ - or $-\mu$ - κ - moieties.

Preliminary conversion kinetic experiments followed by chromatography were conducted using citrate as internal standard (not shown). We noticed that the signal intensity of the hybrid κ -/ ι -carrageenan oligosaccharides (κ - ι - κ , κ - κ - ι - κ and κ - ι - ι - κ) remained constant whatever the duration of the alkaline treatment. This contrasted strongly with the signal intensity of the hybrid κ -/ μ -carrageenan and the neo- κ -tetracarrabiose, which decreased or increased, respectively. In this context, variation in signal intensity of the hybrid κ -/ μ -carrageenan oligosaccharides was measured using κ - ι - κ as an internal standard and is reported in Figure 4B. Because we have used conductimetry as a detection method, we assumed that the signal intensity was proportional to the number of charges carried by the corresponding oligo-carrageenan. Consequently, in Figure 4B, the signal intensity was divided by the number of charges which give a value that should be proportional to

oligosaccharide concentration. We are aware that the distribution of charges and oligosaccharide sizes may affect the response of the detector and that the estimation of oligosaccharide concentration using this procedure was probably only a rough approximation. However, we found that the decrease in signal intensity of all hybrid κ - μ -oligosaccharides could be fitted to an exponential curve and made it possible to estimate the rate of conversion of μ -carrabiose as a function of its neighboring moiety. The conversion rate of μ -carrabiose was very similar for the κ - μ - κ and κ - κ - μ - κ oligosaccharides: $5.9 \times 10^{-4} \pm 0.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and $6.2 \times 10^{-4} \pm 0.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($n=4$), respectively. These values were slightly lower than those reported by Ciancia et al. (1993) ($k= 26 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

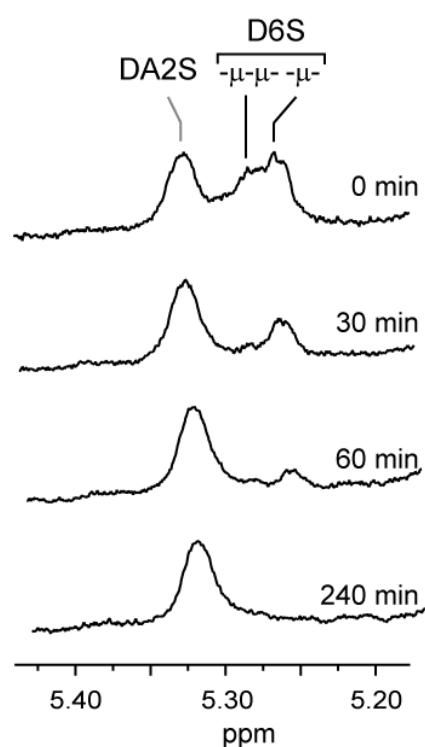


Figure 8. Kinetics of the conversion of μ - to κ -carrabiose as monitored by ^1H NMR.

In the case of oligosaccharides containing two μ -carrabiose moieties, we found that the conversion rates were again very similar: $19.3 \times 10^{-4} \pm 0.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and $12.2 \times 10^{-4} \pm 0.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ for κ - μ - μ - κ and κ - μ - κ - μ - κ , respectively. As expected, one should notice that because these oligosaccharides contained two μ -carrabiose moieties, their rate of decrease was roughly two times higher than those of oligo-carrageenans that had a single μ -carrabiose moiety. Although the rate of decrease of κ - μ - μ - κ seemed slightly higher than that of κ - μ - κ - μ - κ , given our

approximation method, our results suggested that the identity of the neighboring moiety did not strongly influence the rate of conversion for the μ -carrabiose moiety.

DISCUSSION

Comparison of hybrid κ -/ μ - and κ -/ ι - oligosaccharides

The structures of five oligo- κ -/ μ -carrageenans were unambiguously resolved using by combining NMR, mass spectrometry and enzyme degradation experiments. The structure of this oligosaccharide series strongly resembles that of the hybrid oligo- κ -/ ι -carrageenan (Guibet et al., 2008) ⁶. This hybrid carrageenan was also produced after incubation of κ -/ ι -carrageenan with the *P. carrageenovora* κ -carrageenase. In both hybrid oligo-carrageenan series, the internal ι - and μ -carrabioses moieties were always positioned at the same location within the oligosaccharides. The ι - and μ -carrabiose both have G4S residues; however, the 4-linked- α -D-galactopyranose residues (DA2S or D6S) are very different. The DA2S in ι -carrabiose adopts the 4C_1 chair conformation and the sulfate ester group is on position 2, which contrasts with the 1C_4 chair conformation and the sulfate group on position 6 in D6S. These differences drastically affect the overall conformation of the hybrid oligosaccharides. In the κ -/ ι - and standard κ -carrageenan oligosaccharides series, the neutral backbone consists of a regular alternation of 3-linked- β -D-galactopyranose and 4-linked- α -D-anhydro-galactopyranose. The difference between hybrid and standard oligo-carrageenan lies in the additional sulfate group on position 2 of the anhydro-galactose (DA or DA2S). One can easily distinguish κ - and κ -/ ι -oligosaccharides by chromatography owing to the additional charge in the hybrid oligosaccharides.

Regarding the κ -/ μ -oligosaccharides, the conformation of the 4-linked- α -D-galactopyranose is either 4C_1 or 1C_4 (DA or D6S), which induces irregularities, called “kinks” (Rees, 1969). Although ι - and μ -carrabioses carry the same number of sulfates, the differences in terms of conformation can explain their different interaction properties on an anionic exchange column. With equal numbers of galactose residues and equal charge, κ -/ μ -oligo-carrageenans are eluted later than κ -/ ι -carrageenans. This pattern suggests that the κ -/ μ -series interacts with the column more strongly than the κ -/ ι - series. As a result,

oligosaccharides having similar structures appear to elute in pairs, meaning that κ - μ - κ elutes just after κ - ι - κ , κ - κ - μ - κ elutes soon after κ - κ - ι - κ , and so on.

The κ -/ ι - and κ -/ μ -oligocarrageenan series were produced using the same κ -carrageenase which requires that the substrate accommodate the active site prior to catalysis. Because κ -/ ι - and κ -/ μ -oligocarrageenan series were very similar, it seems that, at first glance, that the conformation the 4-linked- α -D- galactopyranose (DA2S or D6S) encountered in the oligosaccharides only had a low impact on enzyme efficiency. Crystallography and enzymology experiments have shown that the active site of *P. carrageenovora* κ -carrageenase is divided into six sub-sites (Potin et al., 1995; Michel et al., 2001) The enzyme cleaves the β (1,4) linkage between two κ -carrabiose units which occupy four sub-sites (+1, +2, -1 and -2). This situation is required for enzyme binding because κ -carrabiose is always found at the reducing and non-reducing end of the oligosaccharides. The other two sub-sites (-3 and -4) can be occupied by one ι - or μ -carrabiose moiety, as demonstrated by the occurrence of ι - and μ -units neighboring the κ -carrabiose at the reducing end (as for example in κ - ι - ι - κ and κ - μ - μ - κ). The G4S unit which is common to ι - and μ -carrabiose must be located at the -3 sub-site and the -4 sub-site has to accommodate either DA2S or D6S. Because the -4 sub-site is the most external sub-site of the enzyme active site and of the site of cleavage, we hypothesized that efficient binding of carrageenan does not require occupation of the -4 sub-site. Consequently, because the rules of cleavage of hybrid κ -/ ι - and κ -/ μ -carrageenan are the same, this explains why the distribution of carrabiose moieties in hybrid oligosaccharides is identical. Thus, the active site topology of κ -carrageenase that we previously proposed remains unchanged (Guibet et al., 2008).

Distribution of μ -carrabiose in κ -/ μ -carrageenan

The small fraction resistant to enzymatic degradation was composed mainly of non-carrageenan material and was not enriched, for example, with μ -carrageenan suggesting the absence of long stretches of μ -carrageenan in the undigested *K. alvarezzi* carrageenan. Consequently, the oligosaccharide profile observed by chromatography accurately depicted the composition and distribution of κ -, μ - and ι -carrabiose moieties of the overall structure of the undigested polysaccharides (Figure 3, 4). NMR analyses of these hybrid oligosaccharides revealed different combinations, where μ -carrabiose moieties were either localized between

two κ -carrabiose moieties or had one or two adjacent μ -carrabiose moieties. These three situations (- μ -, - $\mu\mu$ - and - $\mu\mu\mu$ -) corresponded to characteristic D6S-H1 chemical shifts that explained the asymmetrical D6S-H1 signal recorded from the polymer. Consequently, this asymmetrical D6S-H1 signal reflected the distribution of μ -carrabiose in the carrageenan chain. This means that fitting the asymmetrical signal using the three independent signals centered at 5.24 (- μ -) 5.26 (- $\mu\mu$ -) and 5.28 (- $\mu\mu\mu$ -) should provide a quick overview of the μ -carrabiose distribution. Figure 7A illustrates an example of this approach. However, because of the low intensity of the D6S-H1 signal and the proximity of the DA2S-H1 (ι -carrabiose) signal, quantitative analysis could only be approximate. The fractions of - μ -, - $\mu\mu$ - and - $\mu\mu\mu$ - were better quantified by HPAEC following the same procedure as for kinetic analysis. We estimated that the fraction of - μ -, - $\mu\mu$ - and - $\mu\mu\mu$ - combinations were 58%, 27% and 15%, respectively. The κ -/ μ -carrageenan contained about 11% of μ -carrabiose units as determined by ^1H NMR. Therefore, one can calculate the probability of encountering - μ -, - $\mu\mu$ - and - $\mu\mu\mu$ - in the carrageenan chain, which were 79%, 19% and 1%, respectively. These values do not concur with the shape of the D6S-H1 ^1H NMR signal which revealed a non-negligible frequency of - $\mu\mu\mu$ - moieties. The calculated fractions are also very different from what was estimated by chromatography. This strongly suggests that μ -carrabiose moieties are distributed in a non-random fashion along the polysaccharide chain. μ -carrabiose distribution should be correlated with the biosynthetic process that leads to hybrid κ -/ μ -carrageenan. As for the conversion of ν -carrabiose into ι -carrabiose (Genicot-Joncour et al., 2009)¹⁷, several galactose-6-sulfurylases catalyzing the formation of anhydro rings are probably involved to convert μ - to κ -carrabiose. These enzymes probably catalyze the cyclization of the anhydro ring using a non-random mode of action (i.e. processive); it is therefore not surprising to observe a non-random distribution of μ -carrabiose.

The ^{13}C NMR spectrum of the μ -carrabiose carbon atoms has been previously ascribed (Bellion et al. 1983). Only the chemical shifts of the anomeric protons have been reported and we have now fully assigned the ^1H NMR spectra of μ -carrabiose (van de Velde et al., 2002). Our analysis revealed the influence of adjacent μ -carrabioses. We thus deduce that NMR data reported in the literature correspond in fact to μ -carrabioses positioned between two κ -carrabioses: κ - μ - κ , κ - κ - μ - κ and κ - μ - κ - μ - κ (Table 1). Due to of the strong deshielding of the chemical shifts of adjacent μ -carrabioses, we expect that the chemical shifts of protons and carbons of blocks of μ -carrabiose or in pure μ -carrageenan strongly resemble those reported

for κ - μ - μ - μ - κ oligosaccharides. This means that the D6S-H1 of pure μ -carrageenan should resonate at least at 5.28 ppm, which is closer to the signal of the DA2S-H1 of ι -carrabiose than to the 5.24 ppm chemical shift of D6S-H1 usually used for μ -carrabiose.

Routine monitoring of alkaline conversion of μ -carrabiose

Several strategies have been undertaken in order to analyze carrageenan (Roberts and Quemener, 1999). These include colorimetric methods, immunoassays, chromatography of depolymerized carrageenan and spectroscopy such as FT-IR and NMR. None of these approaches used alone can fully characterize carrageenan and need to be used in combination. Carrabiose composition can be determined after chemical analysis (i.e. methylation analysis) of the monosaccharide content and the linkage encountered in the carrageenan chain. This method provides the relative carrabiose content in the carrageenan specimen and has helped determine the rate of conversion of μ - and ν -carrageenan (Cianca et al., 1993; Viana et al., 2004). FT-IR is also extensively used to, at least, identify carrabiose composition. Minor components such as μ - and ν -carrabiose can be detected, but no attempt has been made to correlate their relative concentration with FT-IR signal intensity. NMR is now one of the standard methods that provide quick insight into the composition and structure of carrageenan samples. Quantification of different carrageenan types in a sample using ^1H -NMR spectroscopy is usually based on the signal integration of the resonances of the α -anomeric protons (D and DA-units) in the region from 5.1 to 5.7 ppm (van de Velde et al., 2002).

We have been developing the use of enzyme degradation combined with chromatographic analysis of the digestion products in order to depict the structure; i.e. composition and distribution, of hybrid carrageenan (Antonopoulos et al., 2005; Guibet et al., 2006; Antonopoulos et al., 2007; Guibet et al., 2008). This approach is very sensitive and has been successfully applied to monitor the alkaline conversion of *K. alvarezzi* carrageenan. Because of the asymmetrical D6S-H1 signal and its overlap with the DA2S-H1 of ι -carrabiose, ^1H NMR cannot be used for quantitative analysis of μ -carrabiose conversion. While monitoring the conversion by assaying carrageenan composition with a chemical analysis seems adequate (Cianca et al., 1993; Viana et al., 2004), enzyme degradation chromatography presents the advantage of discriminating the various distributions of μ -carrabiose and is easily applicable in any laboratory that has chromatography equipment.

CONCLUSION

The alkaline conversion of carrageenan precursors (μ - and ν -carrageenan) is an industrial process that leads to a substantial increase in the gelling properties of carrageenan. This process is usually carried out in very concentrated conditions (about 5 to 10% w/v) directly on raw seaweeds along with carrageenan extraction. This suggests that parameters other than pH and temperature may affect conversion rates and yields. For example, proteins, lipids and other substances occurring in seaweeds may affect industrial production processes. Other parameters such as carrageenan concentration, which affects chain mobility (i.e. viscosity), may hinder to some extent the efficiency of the alkali treatment. Our work was very different from the procedures used in industrial processes. However, we have demonstrated that the rate of μ -carrabiose was not affected by its neighboring moiety or, therefore, by local chain mobility. Consequently, monitoring the carrageenan concentration probably does not provide information on the efficiency of alkaline conversion, but more likely on the ability of the alkali (NaOH, Ca(OH)₂) to diffuse into cells to catalyze anhydro-galactose cyclization. Our chromatographic approach only requires minute amounts of carrageenan and enzyme degradation can be performed directly on seaweed fragments. We recommend that the topology of carrageenan conversion in seaweed, as it occurs in industrial processes, should be monitored using a combination of enzyme degradation and chromatography.

ACKNOWLEDGMENTS. ANRT (CIFRE), French National Center for Scientific Research (CNRS) and Pierre and Marie Curie University (Paris VI).

REFERENCES

- Antonopoulos, A., Favetta, P., Helbert, W., & Lafosse, M. (2005) On-line liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of κ - and ι -carrageenans. Application to the hybrid ι -/ ν -carrageenans. *Anal. Chem.*, 77, 4125-4136
- Antonopoulos, A., Favetta, P., Helbert, W., & Lafosse, M.J. (2007) On-line liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry for kappa-carrageenan oligosaccharides with a porous graphitic carbon column. *Chrom. A.*, 1147, 37-41
- Bellion, C., Brigand, G., Prome, J.-C., Welti, D., & Bociek, S. (1983) Identification and characterization of biological precursors of carrageenans by C-13 NMR-spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, 119, 31-48.
- Bixler, H. (1996) Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan. *Hydrobiologia*, 326/327, 35-37.
- Bixler, H., Johndro, K., & Falshaw, R. (2001) Kappa-2 carrageenan: structure and performance of commercial extracts II. Performance in two simulated dairy applications. *Food Hydrocoll.*, 619-630
- Ciancia, M., Nosedà, M. D., Matulewicz, M. C., & Cerezo, A. S. (1993) Alkali-modification of carrageenans - mechanism and kinetics in the kappa-iota-series, mu-nu-series and lambda-series. *Carbohydr. Polym.* 20, 95-98.
- Craigie, J. S. (1990) Cell Walls. In *Biology of the Red Algae*, Cole, K. M., Sheath, R. G., Eds., Cambridge University Press, Cambridge, pp 221-257.
- Genicot-Joncour, S., Poinas, A., Richard, O., Potin, P., Rudolph, B., Kloareg, B. & Helbert, W. (2009) The cyclization of the 3,6-anhydro-galactose ring of ι -carrageenan is catalyzed by two D-galactose-2,6-sulfurylases in the red alga *Chondrus crispus*. *Plant. Physiol.* accepted
- Goubet, F., Jackson, P., Deery, M. J., & 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

- Greer, C., & Yaphe, W. (1984a) Characterization of hybrid (beta-kappa-gamma) carrageenan from *eucheuma-gelatinae* agardh.j. (rhodophyta, solieriaceae) using carrageenases, infrared and ^{13}C -nuclear magnetic-resonance spectroscopy. *Bot. Mar.* 27, 473–478.
- Greer, C., & Yaphe, W. (1984b) Hybrid (iota-nu-kappa) carrageenan from *eucheuma-nudum* (rhodophyta, solieriaceae), identified using iota-carrageenases and kappa-carrageenases and ^{13}C -nuclear magnetic-resonance spectroscopy. *Bot. Mar.*, 27, 479–484.
- Guibet, M., Boulenguer, P., Mazoyer, J., Kervarec, N., Antonopoulos, A., Lafosse, M. & Helbert, W. (2008) Composition and distribution of carrabiose moieties in hybrid kappa-/iota-carrageenans using carrageenases. *Biomacromolecules*, 9, 408-415
- Guibet, M., Kervarec, N., Génicot, S., Chevolut, Y., & Helbert, W. (2006) Complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of *Gigartina skottsbergii* λ -carrageenan using carrabiose oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis. *Carbohydr. res.* 341, 1859-1869
- Kidby, D. K., & Davidson, D. J. (1973) A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. *Anal. Biochem.* 55, 321–325
- Knutsen, S. PhD Thesis, University of Trondheim, 1992.
- Knutsen, S., Myslabodski, D., Larsen, B., & Usov, A. (1994) A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Bot. Mar.*, 37, 163-169
- Lawson C.J. and Rees D.A. (1970) An enzyme for metabolic control of polysaccharide conformation and function. *Nature*, 227, 392-393
- Lemoine, M., Nyvall-Collen, P., & Helbert, W. (2009) Physical state of kappa-carrageenan modulates the mode of action of kappa-carrageenase from *Pseudoalteromonas carrageenovora*. *Biochem. J.*, 419, 545-553
- Matulewicz, M.C., Ciancia, M., Nosedá, M.D., & Cerezo, A.S. (1989) Carrageenan systems from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina-skottsbergii*. *Phytochemistry*, 28, 2937-2941.
- Michel, G., Chantalat, L., Duee, E., Barbeyron, T., Henrissat, B., Kloareg, B., & 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.

- Michel, G., Nyvall-Collen, P., Barbeyron, T., Czjzek, M., & Helbert, W. (2006) Bioconversion of red seaweed galactans: a focus on bacterial agarases and carrageenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 23–33
- Ohara, K., Jacquinet, J.-C., Jouanneau, J., Helbert, W., Smietana, M., & Vasseur, J.-J. (2009) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of polysulfated-derived oligosaccharides using pyrenemethylguanidine. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 20, 131–137
- Potin, P., Richard, C., Barbeyron, T., Henrissat, B., Gey, C., Petillot, Y., Forest, E., Dideberg, O., Rochas, C., & Kloareg, B. (1995) Processing and hydrolytic mechanism of the cgkA - encoded κ -carrageenase of *Alteromonas carrageenovora*. *Eur. J. Biochem.* 228, 971–975
- Rees, D. (1969) Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 24, 267–332.
- Roberts, M.A., & Quemener, B. (1999) Measurement of carrageenans in food: challenges, progress, and trends in analysis. *Trends Food Sci. Technol.*, 10, 169-181
- Usov, A. I. (1998) Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. *Food Hydrocoll.* 12, 301–308.
- van de Velde, F., Antipova, A.S., Rollema, H.S., Burova, T.V., Grinberg, N.V., Pereira, L., Gilseman, P.M, Tromp, R.H., Rudolphe, B., & Grinberg, V.Y. (2005) The structure of kappa/iota-hybrid carrageenans II. Coil-helix transition as a function of chain composition. *Carbohydr. Res.*, 340 1113–1129
- van de Velde, F., Knutsen, S. H., Usov, A.I., Rollema, H.S., & Cerezo, A.S. (2002) H-1 and C-13 high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends Food Sci. Technol.*, 13, 73-92
- van de Velde, F., Pereira, L., & Rollema, H.S. (2004) The revised NMR chemical shift data of carrageenans. *Carbohydr. Res.*, 339, 2309-2313
- van de Velde, F., Rollema, H., Grinberg, N., Burova, T., Grinberg, V., & Tromp, R. (2002) Coil-helix transition of iota-carrageenan as a function of chain regularity. *Biopolymers*, 65, 299–312.
- Viana, A.G., Nosedá, M.D., Duarte, M.E.R., & Cerezo A.S. (2004) Alkali modification of carrageenans. Part V. The iota- ν hybrid carrageenan from *Eucheuma denticulatum* and its cyclization to iota-carrageenan. *Carbohydr. Polym.* 58, 455-460.

Wong, K.F., & Craigie, J.S. (1978) Sulfohydrolase activity and carrageenan biosynthesis in *Chondrus-crispus* (Rhodophyceae). *Plant Physiol.*, 61, 663-666.

Zinoun, M., Diouris, M., Potin, P., Floc'h, J.Y., & Deslandes E. (1997) Evidence of sulfohydrolase activity in the red alga *Calliblepharis jubata* . *Bot. Mar.*, 40, 49-53.

Deuxième partie

Chapitre 2

Analyse structurale du ι-/ν- carraghénane d'*E. denticulatum*

Article 2 : D. Jouanneau, P. Boulenguer, J. Mazoyer and W. Helbert. Complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of standard neo-ι-carrabiose oligosaccharides. Soumis à Carbohydrate Research.

Article 3 : D. Jouanneau, P. Boulenguer, J. Mazoyer and W. Helbert. Enzymatic degradation of hybrid ι-/ν-carrageenan by *Alteromonas fortis* ι-carrageenase. En préparation.

Chapitre 2 : Analyse structurale du ι-ν-carraghénane d'*E. denticulatum*

Le ι-carraghénane, comme le κ-carraghénane, n'existe pas sous forme « pure ». Il s'agit, comme les autres carraghénanes, d'un hétéropolymère. Il est composé majoritairement, mais non exclusivement, d'unités ι-carrabiose. En général il contient d'autres motifs de la famille kappa : κ-, ν- et μ-carrabiose.

La présence de ces motifs module les propriétés physico-chimiques des carraghénanes riches en ι-carrabiose. Par exemple, les ι-κ-carraghénanes ont des propriétés différentes de celles du κ- et du ι-carraghénane. Ces ι-κ-carraghénanes ont notamment des propriétés physico-chimiques particulières en interaction avec des produits lactés (Falshaw *et al.*, 2003). La présence d'unités ν-carrabiose peut altérer fortement les propriétés de gélification du ι-carraghénane (van de Velde *et al.*, 2002) tout comme les unités μ-carrabiose pour le κ-carraghénane.

In vivo, les motifs ν-carrabiose sont transformés en ι-carrabiose par action de galactose-6-sulfurylases, qui provoquent la gélification du ι-carraghénane. Deux de ces enzymes ont été récemment découvertes chez *Chondrus crispus* et purifiées (Genicot-Joncour *et al.*, 2009). Il semble que ces deux enzymes agissent selon des modes d'action différents, conduisant à des gels dont les propriétés sont différentes. *In vitro*, cette réaction de cyclisation a lieu en milieu alcalin à chaud, comme dans le cas du μ-carraghénane (G4S-D6S), du λ-carraghénane (G2S-D2S,6S) et du porphyrane (G-L6S). Les vitesses de cyclisation de ces différentes unités ont été comparées et celle du ν-carraghénane semble la plus importante (Ciancia *et al.*, 1993b ; Viana *et al.*, 2004).

A l'inverse du κ- et du λ-carraghénane, le ι-carraghénane n'a que peu fait l'objet d'analyses structurales. Pourtant, les différentes études de la composition des carraghénanes ont mis en évidence le fort caractère hybride des ι-carraghénanes. En effet, le carraghénane industriel contenant la plus forte proportion de motifs ι provient de l'algue cultivée *Eucheuma denticulatum*, et ne contient au maximum que 88% de motifs ι-carrabiose.

Nous avons entrepris l'étude de l'hybridité des carraghénanes riches en ι-carrabiose. Pour cela, nous avons dans un premier temps purifié et caractérisé par RMN les produits limites de l'hydrolyse par la ι-carraghénase d'*Alteromonas fortis* du ι-carraghénane d'*E. denticulatum*. Les déplacements chimiques et carbones de ces deux oligosaccharides, le néo-ι-

carratétraose et le néo- ι -carrahaose, ont été intégralement attribués. Ainsi, dans la suite de ce travail, la caractérisation des oligo- ι -carraghénanes hybrides a été facilitée.

Dans un second temps nous avons entrepris l'analyse structurale des ι - ν -carraghénanes, en utilisant la même méthodologie que pour l'étude des κ - μ -carraghénanes (*cf* chapitre 1). Ainsi le ι - ν -carraghénane extrait d'*E. denticulatum* a été hydrolysé par la ι -carraghénase d'*A. fortis*. Parmi les produits d'hydrolyse, trois oligo- ι - ν -carraghénanes ont été purifiés et caractérisés par RMN. Cependant, contrairement aux oligo- κ / μ -carraghénanes, la distribution des unités carrabiose internes n'a pas pu être déterminée pour tous les oligosaccharides purifiés. Néanmoins la caractérisation du plus petit des ces oligo-carraghénanes, un octasaccharide de structure ι - ι - ν - ι , a permis pour la première fois l'attribution complète de tous les signaux protons et carbones correspondant aux unités ν -carrabiose.

La ι -carraghénase n'a pas permis de dégrader l'intégralité du polysaccharide, la fraction résistante à l'enzyme était assez importante et contenait une quantité non négligeable de motifs ι - et ν -carrabiose. Il n'a donc pas été possible dans ce cas de déterminer avec précision l'organisation des différentes unités au sein du polymère de départ.

Note

Complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of standard neo- ι -carrabiose oligosaccharides

Diane Jouanneau[§], Patrick Boulenguer[†], Jacques Mazoyer[†] and William Helbert^{§}*

[§] Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, CNRS, Marine plants and biomolecules, UMR 7139, Station Biologique, BP 74, F29680 Roscoff Cedex, France

[†] Cargill Texturising Solutions, F-50500 Baupte, France

1. Article outline

Carrageenan represents a class of sulphated galactans extracted from numerous red algae (Rhodophyta). They have a linear backbone built up of alternating 3-linked β -D-galactopyranose (G-unit) and 4-linked α -D-galactopyranose residues (D-unit). The repetition moieties of carrageenans are classified according to the number and the position of ester sulphate groups (S), and the occurrence of cyclized α -linked residue under the form of 3,6-anhydro derivatives (DA). Usually, carrageenans are described as a function of the composition of their carrabiose repetition moieties. For example, the galactan sulphated extracted from *Kappaphycus alvarezii* is called κ -carrageenan because it contains mainly but not exclusively κ -carrabiose moieties (G4S-DA). Other carrabiose such as μ - (G4S-D6S) and ι -carrabiose (G4S-DA2S) are co-occurring in this κ -carrageenan ^{1, 2, 3}. Similarly, the *Eucheuma denticulatum* ι -carrageenan (Figure 1) is composed with not negligible amount of ν - (G4S-D2S,6S) and κ -carrabiose ^{1, 2}.

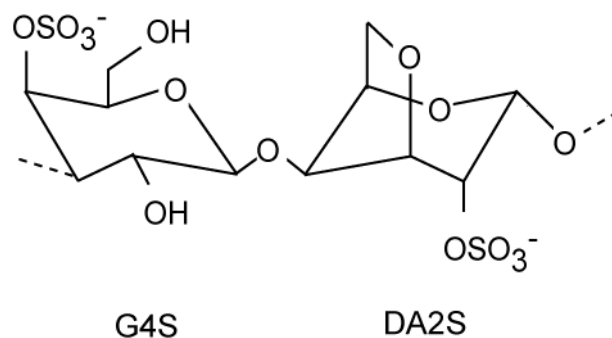


Figure 1. Chemical structure of ι -carrageenan

From the analysis of physico-chemical properties of carrageenan as well as their enzymatic degradation, has emerged the concept of hybrid or copolymer structure suggesting implicitly that the composition but also the carrabiose distribution along the polysaccharides are key parameters in the control their properties^{4,5}. The determination of carrageenan composition is usually carried out by chemical analysis, Infra-red and NMR spectroscopy, and variability in carrabiose unit content has been reviewed^{6,7}. Carrabiose distribution represents another level of complexity which can explain that, at equivalent κ - ι -carrabiose composition, carrageenans may have different properties. Indeed, as observed for hybrid κ - ι -carrageenan, κ - and ι -carrabiose may occurs as block, or randomly distributed, or in alternate distribution⁸.

Enzymatic degradation of hybrid carrageenan coupled with chromatographic and spectroscopic analysis of the degradation products allow giving insight in the distribution of the carrabiose moieties. However, in attempt to solve the structure of all hybrid oligosaccharides obtained after enzymatic incubation, complete data set of well-characterized standard oligosaccharides is required. In this context, the complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR spectra of standard κ - and λ -carrabiose^{9,10} were very useful data because they had allowed going further in the characterization of hybrid oligosaccharides obtained by enzyme degradation^{8,11}. In contrast to κ - and λ -carrabiose, only incomplete NMR data recorded on oligo- ι -carrageenans are available. One can cite the partly ascribed ^1H NMR of neo- ι -carratetraose¹² and data recorded on hybrid κ - ι -oligosaccharides⁸. In this context, we have purified and characterized oligo- ι -carrageenan by ^1H and ^{13}C NMR.

Standard *E. spinosum* ι -carrageenan was degraded with the *Alteromonas fortis* ι -carrageenase¹³ and the most abundant products: the neo- ι -carratetraose (DP4) and neo- ι -carrahexaose (DP6) were purified by permeation gel chromatography¹². The purity of the oligosaccharides was estimated by HPAEC to be at least 95%. In Figure 2 are presented ^1H

NMR spectra recorded at 25°C of the purified oligosaccharides and, for comparison, the undigested polymer.

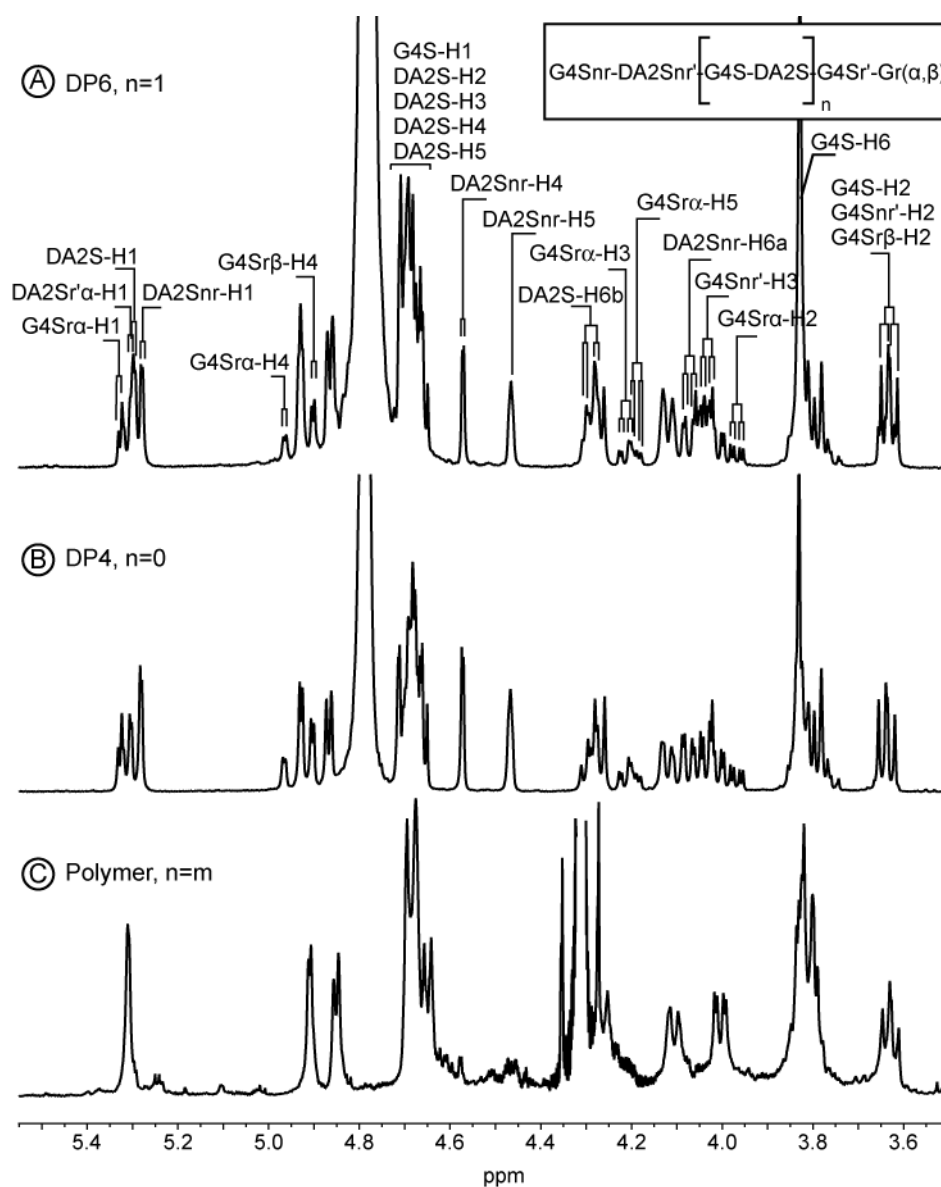


Figure 2. ^1H NMR (500 Mhz) spectra of neo- ι -carragehexaose (DP6, A), neo- ι -carratetraose (DP4, B) and ι -carrageenan polymer. The spectra of the oligosaccharides and the polysaccharides were recorded at 25°C and 70°C respectively. As inset: schematic structure of neo- ι -carrageenan oligosaccharides series showing H1 protons.

In accordance with the $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ correlations and with integration ratio, all the signals corresponding to the anomeric protons were easily assigned. The downfield signals observed between 5.25 and 5.35 were assigned to the four anomeric protons in α -anomeric

configuration. The most downfield signal (5.33 ppm) was assigned to the α -anomeric proton of the reducing residue (G4Sr α -H1). The three other close doublets resonating at 5.31, 5.30 and 5.28 ppm were assigned to H-1 of the DA2S residues. The most downfield signal (5.31 ppm) was ascribed to the DA2Sr'-H1 residues which is affected by the neighboring of the reducing end. The signals common to the oligosaccharides and the polymer corresponded to the internal DA2S-H1 (5.30 ppm). The last α -anomeric proton resonating at 5.28 was ascribed to the non reducing end DA2Snr. The β -anomeric protons of the G4S residues were found in the complex region of the spectra between 4.6 and 4.7 ppm. Analysis of the heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ chemical shift correlation (HMQC, not shown) had allowed to ascribe the G4Sr β (H1=4.66ppm, C1=98.9 ppm). The chemical shift of β -anomeric proton and carbon signals of the internal G4S (G4S β -H1=4.67 ppm and G4S β -C1=104.6), occurring in both oligomer and polymer, were very similar to those of the non-reducing end residues (G4Snr-H1=4.67, G4Snr-C1=104.7ppm).

Assignment of the ring protons of the G4S was carried out starting from H-1 to H-4 using a COSY analysis (Figure 3) which shows direct 3J -couplings (vicinal and geminal). The H4/H5 connectivity was not visible because of the small coupling constant of the vicinal H-4eq and H-5ax of the galactose moieties. The H-5–H-6 cross-peaks were identified on the COSY spectrum but at this stage of analysis, it was not possible to discriminate H-5 from H-6. Based on the heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ chemical shift correlation (HMQC, not shown) of DP4 and DP6, the chemical shifts of C1–C4 which coupled with H1–H4 were determined. The chemical shifts of C5–C6 were determined by *J-mod* experiments and the $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ correlations observed on HMQC spectra allowed discriminating H-5 from H-6. At the end, we observed that the chemical shift of the protons and carbons of the G4S residues encountered in ι -carrabiose moieties were very close to that of the G4S of κ -carrabiose^{8,9}.

As for the G4S residues, the DA2S protons were assigned at first using the proton correlation of the COSY (Figure 3). The H1-H6 correlation system was observed on the COSY except for the H3-H4 and H4-H5 connectivity. The chemical shift of the carbons corresponding to the H1-H3 and H5-H6 systems were deduced from HMQC (not shown). DA2S-H4 and C4 were identified using the long range $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ chemical shift correlation HMBC. The HMBC (supplementary data) experiment and, more especially, the correlations between the anomeric carbons with the H3 or H4 depending on the α - or β -linkage were very helpful to locate the various G4S and DA2S residues in the oligosaccharides.

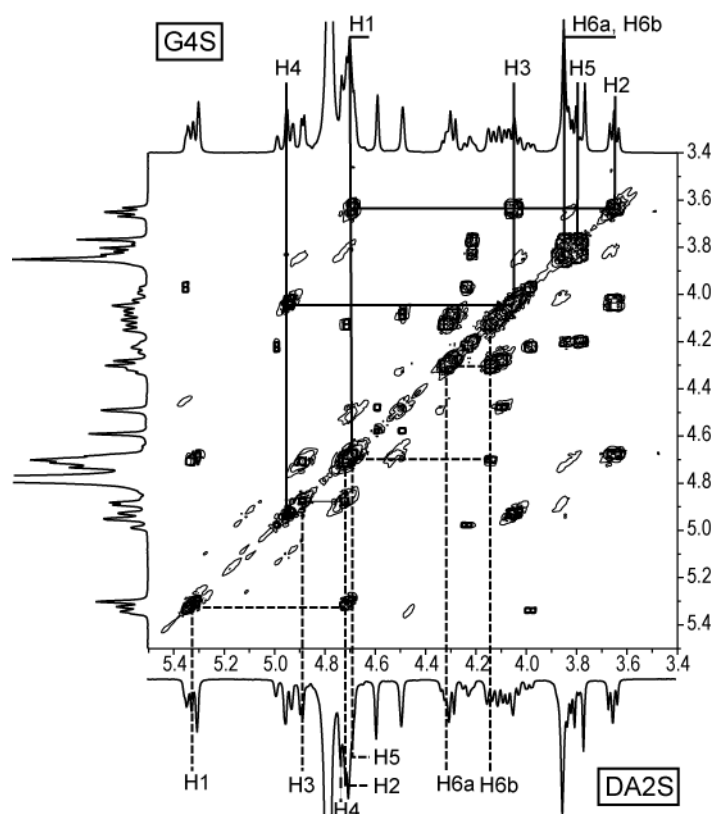


Figure 3. ^1H COSY (500 MHz) spectrum of neo- ι -carratetraose recorded at 25°C. Correlation system of protons belonging to the internal G4S and DA2S are drawn.

The proton and carbon chemical of neo- ι -carratetraose and neo- ι -carrahexaose were reported in Table 1 and 2 and compared with neo- κ -carrahexaose⁹. As expected, the main differences between κ - and ι -oligosaccharides were observed on the anhydro-galactose residues. Notably, we found that the DA2S-H2 signal was shifted downfield of 0.7 ppm when compared with the DA-H2 signal of the κ -carrabiose. Similarly, the influence of the sulfation ester group has affected also the other ring protons; the DA2S-H3 signal of about 0.3 ppm and in lesser extend the DA2S-H4 and H5 of about 0.1 ppm shifted downfield. Impact of sulfate was also obvious on ^{13}C NMR spectra and, as an example; the DA2S-C2 was shifted of 5 ppm downfield.

Table 1: ^1H NMR data (δ) ppm of the DA2S and G4S residues at 25°C of the neo- ι -tetracarrabiose (DA2S-G4S)₂ and neo- ι -hexacarrabiose (DA2S-G4S)₃ and ι -carrageenan (DA2S-G4S)_n.

		(DA2S-G4S) _n	(DA2S-G4S) ₃	(DA2S-G4S) ₂			(DA2S-G4S) _n	(DA2S-G4S) ₃	(DA2S-G4S) ₂
G4S α	H-1		5.328	5.323	DA2S α	H-1		5.310	5.315
G4S β	H-1		4.657	4.651	DA2S β	H-1		5.298	5.297
G4S	H-1	4.643	4.673	-	DA2S	H-1	5.311	5.298	-
G4S α'	H-1		4.673	4.670	DA2S α'	H-1		5.277	5.278
G4S α	H-2		4.023	4.016	DA2S α	H-2		4.698	4.696
G4S β	H-2		3.624	3.626	DA2S β	H-2		4.698	4.696
G4S	H-2	3.633	3.631	-	DA2S	H-2	4.696	4.698	-
G4S α'	H-2		3.631	3.634	DA2S α'	H-2		4.663	4.682
G4S α	H-3		4.201	4.203	DA2S α	H-3		4.865	4.860
G4S β	H-3		4.004	4.010	DA2S β	H-3		4.865	4.860
G4S	H-3	4.005	4.036	-	DA2S	H-3	4.850	4.865	-
G4S α'	H-3		4.036	4.041	DA2S α'	H-3		4.678	4.675
G4S α	H-4		4.961	4.962	DA2S α	H-4		4.689	4.681
G4S β	H-4		4.903	4.900	DA2S β	H-4		4.689	4.681
G4S	H-4	4.910	4.929	-	DA2S	H-4	4.658	4.689	-
G4S α'	H-4		4.929	4.926	DA2S α'	H-4		4.571	4.576
G4S α	H-5		4.192	4.192	DA2S α	H-5		4.679	4.682
G4S β	H-5		3.809	3.800	DA2S β	H-5		4.679	4.682
G4S	H-5	3.804	3.809	-	DA2S	H-5	4.677	4.679	-
G4S α'	H-5		3.809	3.800	DA2S α'	H-5		4.463	4.470
G4S α	H-6a		nd	3.798	DA2S α	H-6a		4.117	4.121
G4S β	H-6a		3.829	3.828	DA2S β	H-6a		4.117	4.121
G4S	H-6a	3.823	3.829	-	DA2S	H-6a	4.108	4.117	-
G4S α'	H-6a		3.829	3.828	DA2S α'	H-6a		4.088	4.082
G4S α	H-6b		nd	3.759	DA2S α	H-6b		4.283	4.285
G4S β	H-6b		3.829	3.828	DA2S β	H-6b		4.283	4.285
G4S	H-6b	3.823	3.829	-	DA2S	H-6b	4.272	4.283	-
G4S α'	H-6b		3.829	3.828	DA2S α'	H-6b		4.263	4.267

Table 2: ^{13}C NMR data (δ) ppm of the DA2S and G4S residues at 25°C of the neo- ι -tetracarrabiose (DA2S-G4S)₂ and neo- ι -hexacarrabiose (DA2S-G4S)₃ and ι -carrageenan (DA2S-G4S)_n.

		(DA2S-G4S) _n	(DA2S-G4S) ₃	(DA2S-G4S) ₂			(DA2S-G4S) _n	(DA2S-G4S) ₃	(DA2S-G4S) ₂
G4S α	C-1		94.64	94.68	DA2S α	C-1		94.38	94.34
G4S β	C-1		98.97	99.00	DA2S β	C-1		94.49	94.43
G4S	C-1	104.38	104.68	-	DA2S	C-1	94.40	94.49	-
G4Snr'	C-1		104.59	104.67	DA2Snr	C-1		94.26	94.31
G4S α	C-2		69.46	69.48	DA2S α	C-2		77.38	77.38
G4S β	C-2		71.58	71.55	DA2S β	C-2		77.38	77.38
G4S	C-2	71.55	72.51	-	DA2S	C-2	77.33	77.38	-
G4Snr'	C-2		72.51	72.75	DA2Snr	C-2		77.29	77.27
G4S α	C-3		76.05	76.15	DA2S α	C-3		80.13	80.16
G4S β	C-3		79.25	79.41	DA2S β	C-3		80.13	80.16
G4S	C-3	79.32	79.35	-	DA2S	C-3	80.12	80.13	-
G4Snr'	C-3		79.10	79.15	DA2Snr	C-3		81.98	81.98
G4S α	C-4		75.41	75.51	DA2S α	C-4		80.76	80.83
G4S β	C-4		74.40	74.59	DA2S β	C-4		80.76	80.83
G4S	C-4	74.39	74.27	-	DA2S	C-4	80.74	80.76	-
G4Snr'	C-4		74.27	74.44	DA2Snr	C-4		72.87	72.84
G4S α	C-5		77.47	77.52	DA2S α	C-5		79.39	79.41
G4S β	C-5		77.12	77.12	DA2S β	C-5		79.39	79.41
G4S	C-5	77.10	77.27	-	DA2S	C-5	79.26	79.39	-
G4Snr'	C-5		77.27	77.27	DA2Snr	C-5		80.19	80.17
G4S α	C-6		64.00	64.00	DA2S α	C-6		72.24	72.27
G4S β	C-6		64.00	64.00	DA2S β	C-6		72.24	72.27
G4S	C-6	63.78	63.73	-	DA2S	C-6	72.18	72.24	-
G4Snr'	C-6		63.73	63.76	DA2Snr	C-6		71.85	71.92

2. Experimental

2.1 Production and purification of oligosaccharides. Enzymatic degradation was achieved using recombinant *Alteromonas fortis* ι -carrageenase which was over-expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by affinity chromatography according to Michel and co-workers¹³. ι -Carrageenan (0.5% w/v, in 0.1 M NaNO₃ pH 7.5) was incubated with ι -carrageenase aliquot (0.3 μ g/mL) for 24h at 40°C. A second aliquot was added after 16h to ensure complete hydrolysis. The oligosaccharide fraction was separated from the enzyme resistant fraction (ERF) by ultrafiltration using a 30 kDa MWCO membrane (Amicon). The digestion mixture was gently stirred in a pressure-filtration cell (Amicon) maintained under a nitrogen gas pressure of 1.0 kg/cm². ERF was diluted in distilled water and washed by repeated ultrafiltration to recover the whole oligosaccharide fraction. The oligosaccharide fraction was concentrated by rotary-evaporation to a final concentration of about 4 % (w/v), and 2.5 mL of this sample were injected on a Pharmacia Superdex 30 prep grade column (600 x 26 mm i.d.). The elution was conducted in 50 mM (NH₄)₂CO₃ at 20 °C using isocratic Gilson 306 pump working at a flow rate of 1.7 mL/min. Oligosaccharides were detected by differential refractometry (Spectra System RI-50, Thermo Separation products) and fraction were collected with a Gilson 215 Liquid Handler. According to this procedure, the neo- ι -carratetraose and neo- ι -carrhexaose were detected at 138 min and 124 min respectively. 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 purities of the different fractions were determined by high performance anion exchange chromatography (HPAEC) analysis. The fractions (20 μ L) were injected on an AS11 analytic column (4 x 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. According to this procedure, the neo- ι -carratetraose and neo- ι -carrhexaose were detected at 11.5 min and 12.7 min respectively. The purest fractions were pooled and freeze-dried.

2.2 NMR spectroscopy. Purified oligosaccharide samples were exchanged twice in D₂O, and redissolved in D₂O (99.7%) at a 5 mg/mL concentration. Chemical shifts are expressed in ppm by reference to an external standard (trimethylsilylpropionic acid)¹⁴. ¹H NMR (500

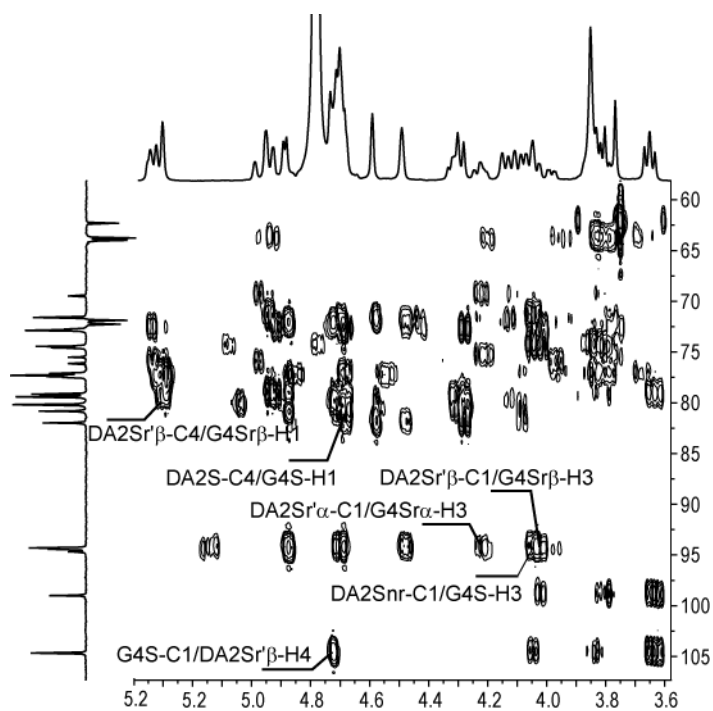
MHz) spectra of oligosaccharides were recorded at 25 °C, using 64K data points. The parameters were as follows: pulse angle, 30°; sweep width, 7485 Hz; acquisition time, 4.38 s; relaxation delay, 2 s; scans number, 32; digital resolution, 0.11 Hz/point. Non exchangeable proton and carbon assignments and sugar sequences of oligosaccharides were determined from 1D (^1H , *J-mod* (0.92 Hz/point)) and 2D experiments (COSY-DQF, ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C HMBC) using the conventional pulse program provided by Bruker. 500-MHz ^1H NMR 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; digital resolution, 0.31 Hz/point. Spectra of polymer were recorded at 70°C, the number of scans being 64. Spectra of oligosaccharides were recorded at 25°C, the number of scans being 32. 500-MHz ^1H COSY experiments were achieved at 25°C. A total of 120 fid's, each consisting of 32 scans per fid with relaxation delay of 2 sec and data acquisition time of 0.18 sec, were collected. The sweep width in both dimensions was 1578 Hz. The data matrix was completed to a 1024*1024 real matrix with a digital resolution of 2.77 Hz/point.

500-MHz Heteronuclear ^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 64 scans per fid with relaxation delay of 2 sec and data acquisition time of 0.18 sec, were collected. The sweep width in the F2 and F1 dimensions were respectively 1578 and 25162 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. *J*Mode NMR spectra were recorded at 25°C using 32K data points. The parameters were as follows: sweep width, 31446 Hz; acquisition time, 0.52 s; relaxation delay, 2 s; number of scans, 100000, digital resolution 0.95 Hz/point. Zero filling of the fid was used.

References

1. Bellion, C.; Hamer., G.K.; Yaphe W. *Can. J. Microbiol.* **1982**, 28, 874-880
2. Bodeau-Bellion, C. *Physiol. Vég.* **1983**, 21, 785-793
3. Bixler, H.; Johndro, K.; Falshaw, R. *Foods Hydrocoll.* **2001**, 15, 619-630
4. Bixler, H.J. *Hydrobiologia*, **1996**, 327, 35-57
5. van de Velde, F. *Food Hydrocoll.*, **2008**, 22, 727-734
6. 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.
7. Usov, A. I. *Food Hydrocoll.* **1998**, 12, 301–308.
8. Guibet, M.; Boulenguer, P.; Mazoyer, J.; Kervarec, N.; Antonopoulos, A.; Lafosse, M.; Helbert, W. *Biomacromolecules*, **2008**, 9, 408-415
9. Knutsen, S.H.; Grasdalen, H. *Carbohydr. Res.* **1992**, 229, 233-244
10. Guibet, M.; Kervarec, N.; Genicot, S.; Chevlot, Y.; Helbert, W. *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 1859-1869
11. Knutsen, S. PhD Thesis, University of Trondheim, 1992
12. Knutsen, S.H.; Sletmoen, M.; Kristensen, T.; Barbeyron, T.; Kloareg, B.; Potin, P. *Carbohydr. Res.* **2001**, 331, 101-106
13. Michel, G.; Helbert, W.; Kahn, R.; Dideberg, O.; Kloareg, B. *J. Mol. Biol.* **2003**, 334, 421-433
14. van de Velde, F.; Pereira, L.; Rollema, H.S. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 2309-2313

Supplementary data. Long range heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ correlation spectrum HMQC of neo- ι -hexacarrabiose (DA2S-G4S)₃ highlighting the galactose residue neighboring.

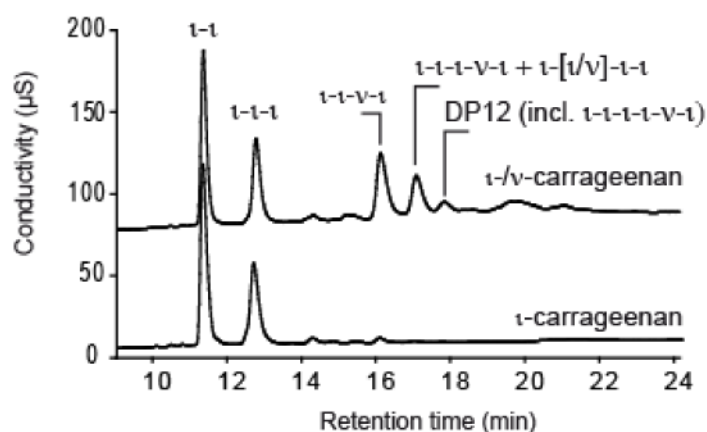


Enzymatic degradation of hybrid ι - ν -carrageenan by *Alteromonas fortis* ι -carrageenase

Diane Jouanneau[§], Patrick Boulenguer[†], Jacques Mazoyer[†], William Helbert^{§*}

[§] Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, CNRS, Marine plants and biomolecules, UMR 7139, Station Biologique, BP 74, F-29680 Roscoff Cedex, France

[†] Cargill Texturizing Solutions, F-50500 Baupré, France



ABSTRACT

Hybrid ι - ν -carrageenan was water-extracted from *Eucheuma denticulatum* and incubated with *Alteromonas fortis* ι -carrageenase. The degradation products were then separated by anion-exchange chromatography. The three most abundant fractions of hybrid ι - ν -carrageenan oligosaccharides were purified and their structures were analyzed by NMR. The smallest hybrid was an octasaccharide with a ι - ν - ι structure. The second fraction was composed of two deca-saccharides with ι - ι - ι - ν - ι and ι - $[\iota/\nu]$ - ι - ι structures. The third fraction was a mixture of dodeca-saccharides which contained at least a ι - ι - ι - ν - ι oligosaccharide. The carbon and proton NMR spectra of the octasaccharides were completely assigned, thereby completely attributing the ν -carrabiose moiety for the first time.

KEYWORDS: ι - ν -carrageenan, distribution, composition, ι -carrageenase

1. Introduction

Carrageenan is the generic name for a family of natural, water-soluble sulfated galactans extracted from numerous species of red seaweeds. They are composed of alternating 3-linked β -D-galactopyranose (G-units) and 4-linked α -D-galactopyranose (D-units) or 4-linked 3,6-anhydrogalactose (DA-units) disaccharide repetition units—called carrabiose units—that form the neutral backbone of carrageenans. Carrageenans are classified according to the occurrence of the 3,6-anhydrogalactose on the 4-linked residue and the position and number of sulfate (S) groups. For example, the standard repetition moieties of the gelling κ - and ι -carrageenans are DA-G4S and DA2S-G4S, respectively. The diversity of carrageenans is explained in part by the diversity of possible carrabiose structures, but mainly by the co-occurrence of various carrabiose units in polysaccharide extracts¹⁻⁵.

The variability of carrageenan composition, which depends on algal source, life stage and extraction procedure, offers a wide range of physico-chemical properties for various food industry applications^{1, 6}. Variation in carrabiose content can strongly affect the gelling or texturizing properties of carrageenans. For example, the ι -/ κ -carrabiose ratio has been found to be critical for some dairy applications, leading to the definition of kappa-2-carrageenan, a low gelling κ -carrageenan containing 20-45% of ι -carrabiose moieties⁷. Another example is the occurrence of biosynthetic precursors, such as ν -carrabiose in water-extracted ι -rich carrageenan which may hinder this carrageenan's gelling properties⁸.

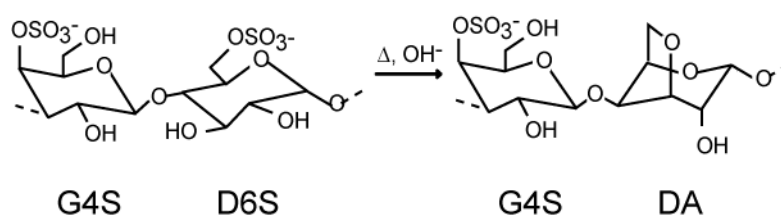


Figure 1. Structure of ν - and ι -carrabiose occurring in hybrid ι - ν -carrageenan. The cyclization of the anhydro ring is obtained *in vitro* by hot alkaline treatment.

In addition to physico-chemical studies, enzymatic degradation studies on carrageenan provide strong support for the concept of hybridity, because the hybrid oligosaccharides that result from degradation probably arise from the cleavage of copolymer (hybrid) structures^{2, 3, 5, 9}. Hybridity implicitly suggests that both the composition and the distribution of carrabiose

along the polysaccharide are two key parameters in the relationship between carrageenan structure and its properties. In this context, using *Pseudoalteromonas carrageenovora* κ-carrageenase has made it possible to address not only the composition, but also the distribution of the carrabiose units of κ-rich carrageenan such as κ-ι- and κ-μ-carrageenan^{5,10}. Similar work has been carried out on the hybrid structure of λ-carrageenan using *P. carrageenovora* λ-carrageenase¹¹. In contrast to κ- and λ-carrageenan, less attention has been paid to the composition and distribution of carrabiose units in the hybrid structure of ι-rich carrageenan.

Here, we analyzed the composition and distribution of ν-carrabiose units along the chain of hybrid ι-ν-carrageenan extracted from *Eucheuma denticulatum*. This carrageenan was incubated with *Alteromonas fortis* ι-carrageenase¹². This carrageenase specifically catalyzes the cleavage of β(1–4) glycosidic bonds of ι-carrageenan and has been shown to yield neo-ι-carratetraose and neo-ι-carrahexaose as end products. This enzyme belongs to the glycoside hydrolase family GH 82 and proceeds according to a mechanism that inverts the anomeric configuration. The degradation products were purified by chromatography and characterized by ¹H and ¹³C NMR.

2. Experimental

2.1 Preparation of carrageenan samples. Carrageenans were provided by Cargill Texturizing Solutions (Baupte, France). They were hot-extracted with water (ι-ν-carrageenan) or with NaOH (ι-carrageenan) from the cultivated red alga *Eucheuma denticulatum*. Prior to use, the carrageenans were dialyzed (6-8 kDa MWDO Spectra/Pore®) against distilled water to remove excess of salt and non-polymeric materials. The polysaccharides were then freeze-dried and stored at room temperature in a dry atmosphere.

2.2 Enzymatic degradation. Enzymatic degradations were carried out using recombinant *A. fortis* ι-carrageenase which was over-expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by affinity chromatography according to Michel and co-workers¹². Carrageenans (0.5% w/v, in 0.1 M NaNO₃ pH 7.5) were incubated with an ι-carrageenase aliquot (0.3 μg/mL) for 24 h at 40°C. These incubation conditions allow the complete degradation of ι-carrageenan, i.e. when no other reducing ends could be detected after a second addition of fresh enzyme.

2.3 Size-exclusion chromatography. Filtered samples (200 μ L, 0.22 μ m) were injected on analytical Superdex 200 and Superdex peptide columns connected in series. The elution was conducted in 0.1 M LiNO₃ at 20°C using an isocratic Dionex Ultimate 3000 pump working at a flow rate of 0.5 mL/min. The chromatography experiments were monitored using a Wyatt Optilab Rex refractive index detector. Chromeleon-Peak Net software (Dionex) was used for data acquisitions.

2.4 High-pressure anion-exchange chromatography (HPAEC). Filtered samples (20 μ L, 0.22 μ m, Millipore) were injected on analytical AS11 column (4 x 250 mm Ion Pac® Dionex), coupled with an AS11 guard column, equilibrated in NaOH 8.4 mM. The elution was conducted at 20°C at a flow rate of 0.5 mL/min with 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) after a 300 mA current suppression with an ASRS ultra II-4mm (Dionex). Chromeleon-Peak Net software (Dionex) was used for data acquisition. According to this method, neo- ι -carratetraose and neo- ι -carrhexaose were detected at 11.5 min and 12.7 min, respectively. Integration of signal intensity was achieved using PeakFit 4.12 software (Seasolve Software Inc.).

2.5 Reducing sugar analysis. The amount of reducing sugars produced during the enzymatic incubations was determined by the reducing sugar method adapted from Kidby and Davidson¹³. Briefly, aliquots (100 μ L) of the reaction medium were mixed with 900 μ L of ferricyanide solution (300 mg potassium hexacyanoferrate III, 24 g of Na₂CO₃, 1 mL NaOH 5M, QSP 1 L). The mixture was maintained in boiling water for 10 min, cooled down to room temperature and the absorbance was read at 420 nm.

2.6 Purification of hybrid oligocarrageenans. The degradation products of *E. denticulatum* were used to isolate pure hybrid oligo- ι - ν -carrageenans. A first fractionation of hybrid oligosaccharides was carried out by size-exclusion chromatography. Filtered solutions (0.22 μ m, Millipore) of oligosaccharides mixtures (2 mL, 2% w/v) were injected on a Pharmacia Superdex 30 prep grade column (600 x 26 mm i.d.). The elution was conducted in 50 mM (NH₄)₂CO₃ at 20 °C using isocratic Gilson 306 pump working at a flow rate of 1.7 mL/min. Oligosaccharides were detected by differential refractometry (Spectra System RI-50, Thermo Separation products) and fractions were collected with a Gilson 215 Liquid

Handler. According to this procedure, neo- ι -carratetraose and neo- ι -carrahexaose were detected at 138 min and 124 min, respectively. Enriched fractions of the oligo- ι - ν -carrageenans were collected at 113 min (ι - ι - ν - ι), 106 min (ι - ι - ν - ι - ι) and 100 min (ι - ν - ι - ν - ι) elution times. The oligosaccharide fractions were then freeze-dried and stored under dry conditions.

Pure hybrid oligosaccharides were successfully obtained at the mg scale by HPAEC. The equipment used was the same for the analytical chromatography, as described above. The freeze-dried oligosaccharides were dissolved in water (0.3% w/v), filtered (0.22 μ m, Millipore), and injected (200 μ L) on semi-preparative AS11 column (9 x 250 mm, Ion Pac®, Dionex). The samples were eluted at a flow rate of 1.0 mL/min with a NaOH (280 mM) step gradient which was adapted to each oligosaccharide. For the ι - ι - ν - ι purification, the gradient was as follows: 0-13 min: 36-60%, 13-15 min: 60-100%. According to this gradient, the ι - ι - ν - ι was observed at a retention time of 9.5 min. In the case of the ι - ι - ν - ι - ι , the NaOH gradient used was: 0-16 min: 41-69%, 16-18 min: 69-100%. The ι - ι - ν - ι - ι was eluted after 10.5 min. In the case of the ι - ν - ι - ν - ι , the NaOH gradient used was 0-10 min: 50-54%, 10-13 min: 54-100%. The ι - ν - ι - ν - ι was eluted after 9.5 min. The purified oligosaccharides were then freeze-dried and stored in dry conditions.

2.7 ^1H and ^{13}C NMR analyses. NMR spectra were recorded with a BRUKER Advance DRX 500 spectrometer equipped with an indirect 5 mm gradient probehead $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$. Samples were exchanged twice in D_2O , and re-dissolved at concentration of about 5 mg/mL in 99.97 % atom D_2O . Chemical shifts are expressed in ppm in reference to an external standard (trimethylsilylpropionic acid)¹⁴.

Prior to analysis, undigested high molecular weight carrageenan was ground with MM200 ball mill (Retsch). The low depolymerization of the polysaccharide obtained after 6 h at 30 Hz resulted in a noticeable increase in the quality of the NMR spectra. 500 MHz ^1H NMR spectra of high molecular weight material (ground carrageenans, enzyme resistant fraction) were recorded at 70°C using 32K data points and the following parameters: pulse angle, 30°; sweep width, 10330 Hz; acquisition time, 1.58 s; relaxation delay, 5 s; digital resolution 0.31 Hz/point, scan number, 128.

500 MHz ^1H NMR spectra of oligosaccharides were recorded at 25°C, using 64K data points. The parameters were as follows: pulse angle, 30°; sweep width, 7485 Hz; acquisition time, 4.38 s; relaxation delay, 2 s; scan number, 32; digital resolution, 0.11 Hz/point. Non exchangeable proton and carbon assignments and sugar sequences of oligosaccharides were

determined from 1D (^1H , Jmode (0.92 Hz/point)) and 2D experiments (COSY-DQF, ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C HMBC, Jdelta) using the conventional pulse program provided by Bruker.

2.8 Oligosaccharide nomenclature. We used the nomenclature established by Knutsen and co-workers¹⁵. The 4-linked α -D-galactopyranosyl unit is designated as a D-unit and the 3-linked β -D-galactopyranosyl unit as a G-unit. The disaccharide repetitive units of ι -carrageenan, ν -carrageenan, κ -carrageenan and μ -carrageenan are DA2S-G4S, D2S6S-G4S, DA-G4S and D6S-G4S, respectively. For oligosaccharides of the neo-carrabiose series, the internal ι -, ν - and κ -carrabiose units are written as DA2S-G4S, D2S6S-G4S and DA-G4S without any additional indices. When an ι -carrabiose moiety (DA2S-G4S) is positioned at the reducing end, it is designated as DA2Sr'-G4Sr α or DA2Sr'-G4Sr β according to the anomeric configuration. At the non-reducing end, it is designated as DA2Snr-G4Snr'. Similar rules were applied to ν - and κ -carrabiose units. The NMR resonance of the galactose (DA2Sr', D2S6Sr' or DAr') neighboring a G4Sr reducing end can be affected by the α/β anomer equilibrium. Consequently, we made a distinction between DA2Sr' α (or D2S6Sr' α or DAr' α) and DAr' β (D2S6Sr' β or DAr' β) when they were observed.

3. Results

3.1 Enzymatic degradation of hybrid ι - κ - and ι - ν -carrageenans

^1H NMR spectra of the starting material were straightforward to assign based on the close similarity with values found in the literature¹⁶ (Figure 2). The standard ι -carrageenan obtained after alkaline extraction from *E. denticulatum* (Figure 2B) presented the characteristic deshielded signal at 5.3 ppm, corresponding to the anomeric proton DA2S-H1. In addition to the ι -carrabiose moiety, minor amounts of κ - and μ -carrabiose moieties were also identified by their typical anomeric protons DA-H1 (5.1 ppm) and D6S-H1 (5.25 ppm), respectively. The spectrum of the water-extracted carrageenan from *E. denticulatum* (Figure 2A) was highly enriched in ν -carrabiose moieties, the biosynthetic precursor of ι -carrageenan, with the typical anomeric proton D2S6S-H1 signal at 5.5 ppm¹⁶. The proportions of the various carrabiose moieties were estimated by integrating the anomeric signals and the content of ν -carrabiose was estimated at about 16%. As in the alkali-extracted *E. denticulatum* carrageenan, minor amounts of κ - and μ -carrabiose were also observed.

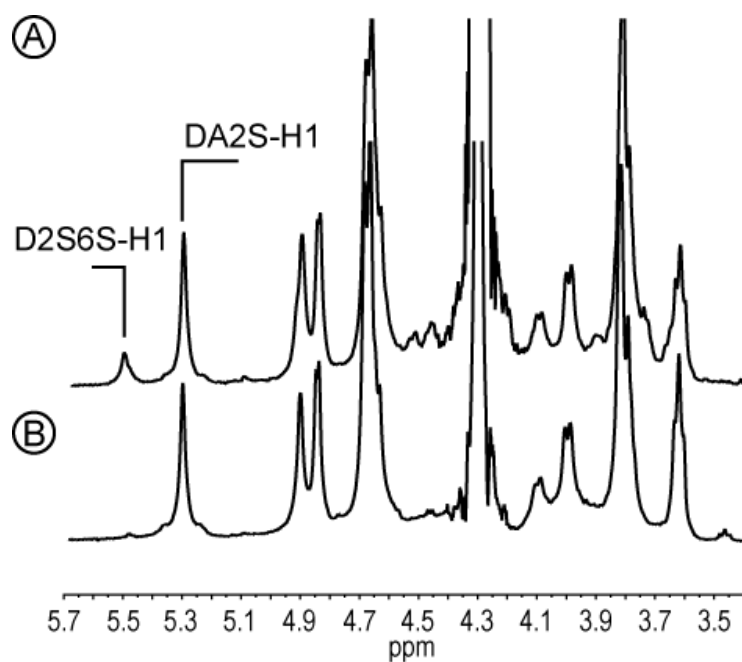


Figure 2. ¹H NMR (500MHz) spectra of water- (A) and alkali- (B) extracted carrageenan from *Eucheuma denticulatum*. The characteristic anomeric protons of the ι - (DA2S-H1) and ν -(D2S6S-H1) carrabiose moieties are indicated.

Enzymatic degradation of hybrid ι - ν -carrageenans was monitored by assaying the amount of reducing ends that were produced. We thereby determined that the complete degradation of standard and hybrid ι -carrageenans was reached in 24 h. At the end of the reaction, the number of glycosidic bond cleavages in ι - ν -carrageenan was about half of what was obtained in standard ι -carrageenan. The difference between the amount of cleavage and the amount of ι -carrabiose moieties can be accounted for by the production of hybrid oligo- ι - ν -carrageenans. Using permeation gel chromatography (Figure 3), it was clear that oligosaccharides eluting at retention times of between 40-56 min and absent in the digested ι -carrageenan chromatogram, were hybrid oligo- ι - ν -carrageenans. This was confirmed by HPAEC chromatograms, presented in Figure 3, which showed that degraded standard and hybrid carrageenan both showed DP4 and DP6 eluting at 11.5 and 12.7 min, respectively. However, three additional signals corresponding to hybrid ι - ν -carrageenans were also well separated. Their elution times were greater than the neo- ι -octasaccharide, which can be explained by the additional sulfate ester group carried by the ν -carrabiose moieties and their larger size.

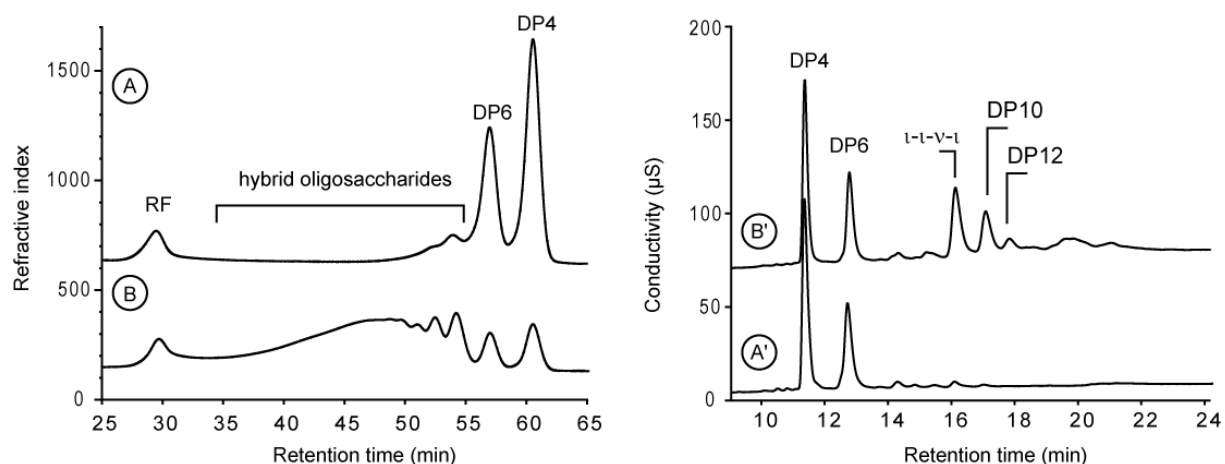


Figure 3. Comparison of the degradation products obtained after incubation of ι - (A, A') and ι - ν -carrageenan (B, B') with *A. fortis* ι -carrageenase using size-exclusion chromatography (left) and high-performance anion-exchange chromatography (right). DP4 and DP6 designate neo- ι -carratetraose and neo- ι -carrahexaose, respectively. DP10 and DP12 refer to fractions of hybrid ι - ν -deca- and dodecasaccharides. RF: enzyme-resistant fraction.

3.2 Structural analysis of hybrid oligo- ι - ν -carrageenans

The three most abundant oligo- ι - ν -carrageenans were purified by permeation gel chromatography followed by semi-preparative HPAEC. The oligosaccharides were collected at the mg scale with 90-95% purity according to HPAEC analysis. The 1D ^1H NMR spectra of the purified oligosaccharides are presented in Figure 4 with neo- ι -carrahexaose for comparison. All ^1H NMR recorded on hybrid oligo- ι - ν -carrageenans shared common features. All spectra showed the four α -anomeric signals encountered in the neo- ι -hexacarrabiose spectrum between 5.25 and 5.35 ppm: the α -anomer of the G4S residue positioned at the reducing end and the three α -linked anhydro-galactoses (DA2Sr'-H1, DA2S-H1 and DA2Snr-H1). This observation indicates that the extremities of all the purified oligosaccharides were always occupied by ι -carrabiose moieties (DA2Snr-H1 = 5.28 ppm, DA2Sr'-H1 = 5.31 ppm) and that the third signal corresponded to the internal ι -carrabiose moiety (DA2S-H1 = 5.30).

The most downfield doublet at about 5.528 ppm ($J^3 = 3,3$ Hz), which were not present in ι -carrageenan, were ascribed to D2S6S residues in accordance with the reported chemical shift of ν -carrageenan¹⁶. The composition and more specifically the number of internal ι - and ν -carrabiose units were determined by integrating the signals of the α -anomeric protons. We

found that the oligosaccharide eluting at 16.2 min in the HPAEC chromatogram was an octasaccharide containing a single internal ν -carrabiose. The ι -[ι/ν]- ι structure was confirmed by determining its molecular weight by mass spectrometry (DA2S-G4S-[DA2S-G4S/D2S6S-G4S]-DA2S-G4S, $m/z = 1387$)¹⁷.

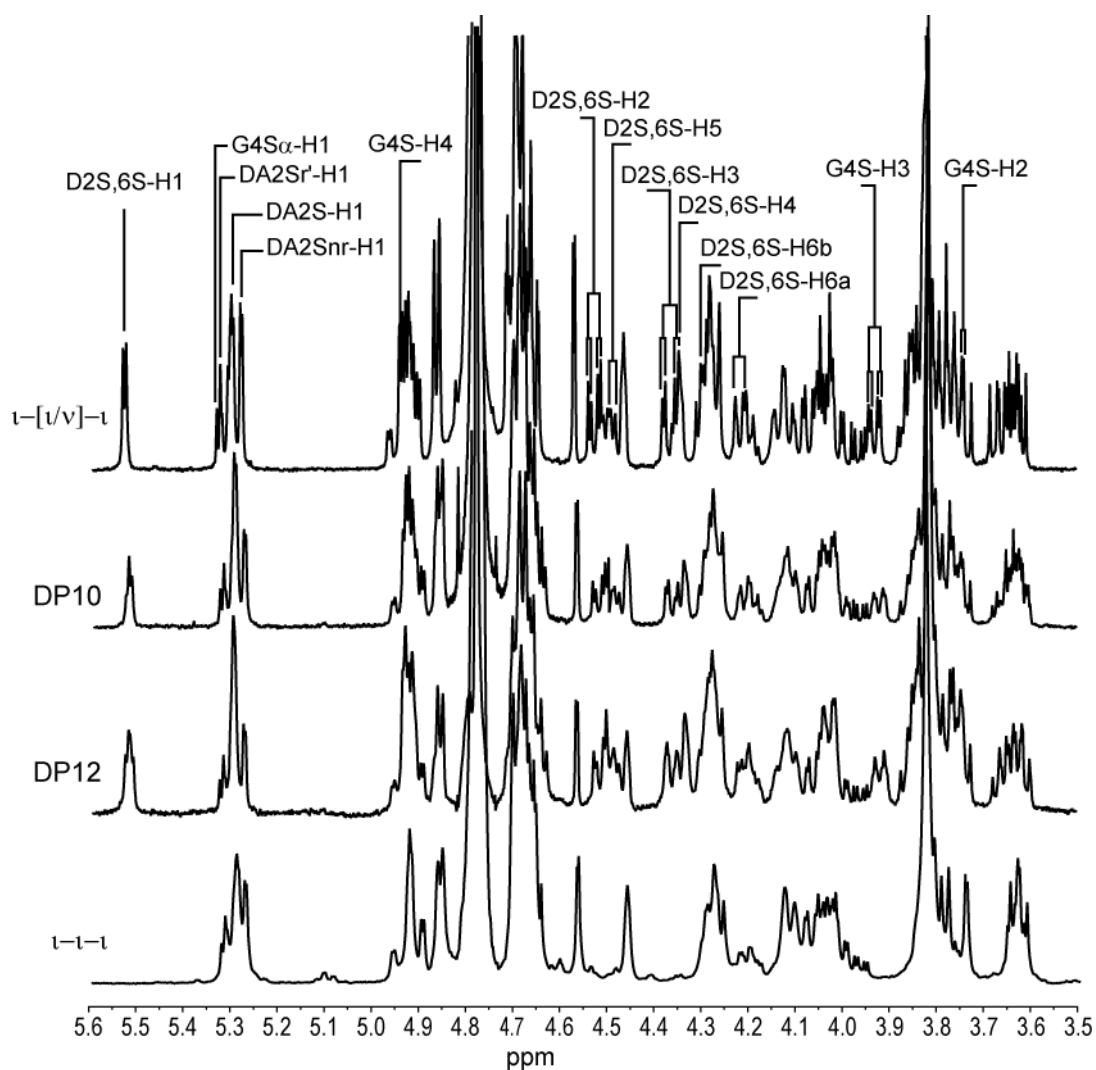


Figure 4. ^1H NMR (500 MHz) of the fractionated hybrid ι - ν -oligo-carrageenans recorded at 25°C including the purified ι - ι - ν - ι octasaccharide and mixtures of deca- (DP10) and dodecasaccharides (DP12). The signals corresponding to the α - and β -anomeric protons are indicated on the spectra as well as the signals not present in neo- ι -carrahexaose (ι - ι - ι) which correspond to the ν -carrabiose moiety.

The integration of the α -anomeric protons of the oligosaccharides eluting at 17 min in the HPAEC chromatogram suggested a decasaccharide composed of four ι -carrabiose and one

ν -carrabiose moieties, which was confirmed by mass spectrometry (α -[α / ν]- α , $m/z = 1744$)¹⁷. However, the occurrence of two D2S6S-H1 signals with different intensities at 5.522 and 5.528 ppm indicates that these moieties did not have the same neighboring moieties. Possible contamination of this fraction with smaller or larger oligosaccharides was excluded after careful inspection by HPAEC. Therefore, since the two D2S6S-H1 signal intensities were not equivalent and because the α - ν -carrabiose ratio was incompatible with a decasaccharide containing two ν -carrabioses, it is likely that the purified fraction contained at least two oligosaccharides having the same composition, but not the same localization of the internal ν -carrabioses. Interestingly, the chemical shift of the D2S6S-H1 in the α -[α / ν]- α octasaccharides was identical to that of the most downfield signal observed in the decasaccharide spectrum. Assuming that the most downfield signal corresponds to the ν -carrabiose moiety closest to the reducing end, and, conversely, that the least downfield signal is probably positioned closer to the non-reducing end, it can be deduced that the octasaccharide had a α - α - ν - α structure. In the case of a α - ν - α - α structure, a lower downfield D2S6S-H1 chemical shift would have been observed. Unfortunately, the purified decasaccharide fraction was not digested by α -carrageenase. Thus, it was not possible to unambiguously determine the structure of all of the oligosaccharides. However, we assumed that one decasaccharide must have a α - α - α - ν - α structure, because the ν -carrabiose had the same chemical environment as the octasaccharides, and that another decasaccharide probably had a α - ν - α - α - α or α - α - ν - α - α structure, both of which have a ν -carrabiose closer to the non-reducing end and could explain the higher field signal of the D2S6S-H1.

The third fraction purified by HPAEC was a dodecasaccharide containing at least two internal ν -carrabiose units (α -[α / ν / ν]- α) characterized by two different D2S6S-H1 signals resonating at 5.518 ppm and 5.528 ppm. We were not able to confirm the carrabiose composition by mass spectrometry, probably due to oligosaccharide size and charge. The chemical shift of the most downfield D2S6S-H1 signals was the same as for the octa- and decasaccharides (5.528 ppm), suggesting a similar pattern of neighboring moieties for the corresponding ν -carrabiose residue. This was confirmed by enzymatic degradation of this fraction (Figure 5). The dodecasaccharide fraction was partly converted to α - α - ν - α octasaccharide and neo- α -carratetraose (α - α), suggesting that an α - α - α - α - ν - α oligosaccharide was present in the mixture. In the same dodecasaccharide fraction, a second ν -carrabiose was characterized by the most upfield D2S6S-H1 signal (5.518 ppm)

recorded in our analysis. This observation suggests that this ν -carrabiose moiety was probably positioned closer to the non-reducing end than in the case of the decasaccharide. As found in decasaccharides, the dodecasaccharide fraction was a mixture of oligosaccharides which were not well-separated by HPAEC.

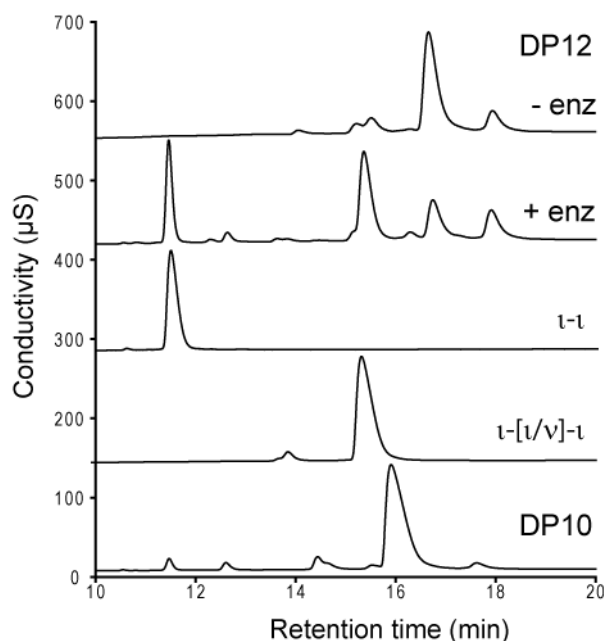


Figure 5. Anion -exchange chromatograms of fractionated dodecasaccharides DP12 (-enz) incubated with the *A. fortis* ι -carrageenase (+enz). The digestion products were compared with neo- ι -carratetraose (ι - ι), the purified ι - ι - ν - ι octasaccharide, and the fraction corresponding to the decasaccharide DP10.

3.3 Complete assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of the ν -carrabiose moiety

Assignments of the protons and the carbons in the ν -carrabiose moiety was carried out on the purified the ι - ι - ν - ι oligosaccharide. The protons of the D2S6S residues were assigned using the anomeric proton (D2S6S-H1=5.528 ppm) as the starting point of the COSY spectrum. The H1–H6 correlation system of the D2S6S is reported on the COSY spectrum (Figure 6), except the H4/H5 connectivity because of the small coupling constant of the vicinal H-4eq and H-5ax of the galactose moieties. Based on the heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ chemical shift correlation (HMQC), the chemical shifts of C1–C6 coupled with H1–H6 were straightforward identified and are reported in Table 1.

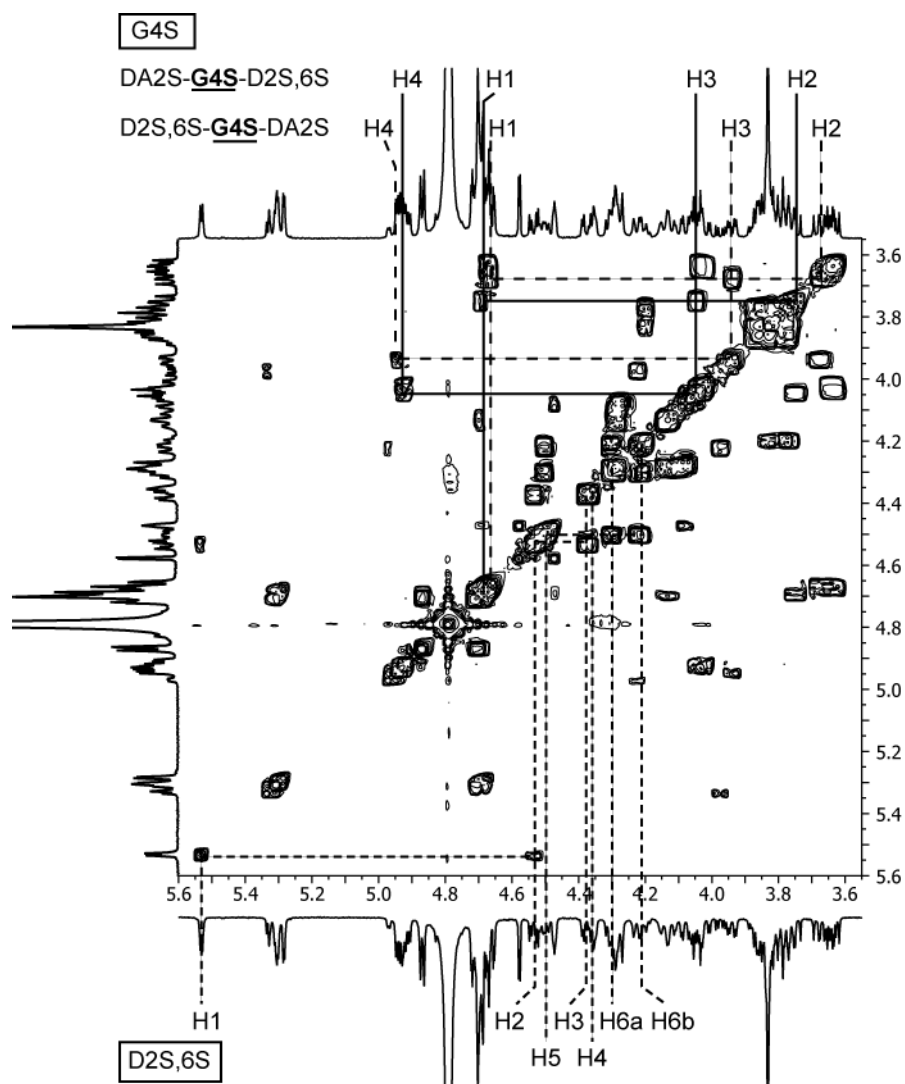


Figure 6. ^1H COSY (500MHz) spectrum of the ι - ι - ν - ι octasaccharide (DA2S nr -G4S nr' -DA2S-G4S-D2S6S-G4S-DA2S r' -G4S $\text{r}_{(\alpha,\beta)}$) at 25°C. Correlation systems of the protons belonging to the D2S6S and the two neighboring G4S residues are drawn.

Since ι - and ν -carrabiose both have a G4S residue, five very distinct H1-H4 correlation systems were observed in the COSY spectrum (Figure 6). The correlation system of the reducing-end G4S residues (G4S $\text{r}\alpha$ and G4S $\text{r}\beta$) and one internal G4S were straightforward to identify, by comparing them with the COSY spectrum of neo- ι -carrahexaose¹⁰. The two other G4S correlation systems are reported on the COSY spectrum in Figure 6 and were attributed to the residues localized next to the D2S6S residue. Assignments of the protons and the carbons of these G4S units were carried out as for the G4S encountered in ι - and κ -carrabioses^{10, 18}. The position of the G4S residue at the reducing or non-reducing end of the D2S6S residue was determined using long-range heteromolecular $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ chemical shift

correlations (HMBC). For example, we observed a correlation between D2S6S-H1 and G4S-C3 of the residue positioned at the reducing end. Similarly, the coupling between G4S-H1 and D2S6S-H4 confirmed the position of the second G4S residue at the non-reducing end.

α -[α / β]- α	H1	H2	H3	H4	H5	H6a	H6b
¹ G4Sr α	5.33	3.99	4.21	4.97	4.20		
¹ G4Sr β	4.66	3.64	4.02	4.91	3.79	3.83	3.83
³ G4S	4.67	3.68	3.94	4.95		3.83	3.83
⁵ G4S	4.69	3.75	4.05	4.92		3.83	3.83
⁷ G4Snr'	4.67	3.63	4.04	4.92		3.83	3.83
² DA2Sr' α	5.32	4.70	4.87	4.69	4.68	4.12	4.29
² DA2Sr' β	5.30	4.70	4.87	4.69	4.68	4.12	4.29
⁴D2S.6S	5.53	4.53	4.39	4.36	4.51	4.30	4.22
⁶ DA2S	5.30	4.70	4.87	4.69	4.68	4.12	4.29
⁸ DA2Snr	5.28	4.68	4.67	4.58	4.47	4.08	4.27

α -[α / β]- α	C1	C2	C3	C4	C5	C6
¹ G4Sr α	94.25	69.39	75.96	75.54		63.70
¹ G4Sr β	98.73	71.49	79.05	74.45	77.08	63.70
³ G4S	104.10	73.39	81.93	78.64		63.70
⁵ G4S	106.74	72.27	79.05	74.30		63.70
⁷ G4Snr'	104.41	72.72	79.05	74.30	77.29	63.70
² DA2Sr' α	94.15	77.40	80.00	80.56	79.35	72.18
² DA2Sr' β	94.30	77.40	80.09	80.56	79.35	72.18
⁴D2S.6S	100.55	79.14	70.12	82.45	71.90	70.38
⁶ DA2S	94.30	77.40	80.09	80.56	79.35	72.18
⁸ DA2Snr	94.00	77.26	81.93	72.47	79.85	71.78

Table 1. ¹H and ¹³C NMR data (δ) ppm of the DA2S, D2S6S, and G4S residues at 25°C in α - α - β - α octasaccharide. The chemical shifts shown in bold are those of the β -carrabiose moiety.

We observed that the D2S6S residue had a strong influence on the chemical shifts of the G4S units and this influence was clearly different according to whether the G4S was localized at the reducing or the non-reducing end of the D2S6S residue. The chemical shifts of G4S-H4 and H3 positioned at the non-reducing end were different from those measured for a G4S between two DA2S units (Table1). Similarly, the G4S-H1 and H2 signals linked at the reducing end of the D2S6S had a chemical shifts greater than those measured for the G4S,

between two DA2S units in ι -carrabiose. Similar observations were made with the corresponding carbon chemical shifts (Table 1).

4. Discussion

The crystal structure of *A. fortis* ι -carrageenase has shown that the active site of the enzyme is composed of eight subsites¹². The active site can accommodate an octasaccharide which is the smallest ι -carrageenan fragment that can be cleaved by the enzyme. The eight-subsite topology of the enzyme accounts for the fact that the standard ι -carrageenan end-products are ι -carratetraose and ι -carrahexaose. The smallest hybrid ι - ν -oligosaccharide that we observed was an octasaccharide containing a single ν -carrabiose moiety (ι - ι - ν - ι) which was not cleaved even after long incubation with ι -carrageenase. The occurrence of ν -carrabiose probably prevented binding, and therefore glycosidic bond cleavage, due to sterical hindrance and the charge of the additional sulfate ester group carried by the D2S6S residue. In addition, the difference in chair conformation between DA2S (4C_1) and D2S6S (1C_4) induces conformational distortion or “kinks”¹⁹ which do not occur in standard oligo- ι -carrageenans.

Because of the high selectivity of ι -carrageenase, the length of the hybrid end-products was greater than or equal to DP8. Therefore, we had to purify long and highly anionic oligosaccharides to determine their carrabiose composition and distribution. The difficulties encountered in purifying the hybrid deca- and dodecasaccharides using semi-preparative HPAEC arose from the column's limited separation power for long oligosaccharides having such a high charge density. In comparison, the most abundant hybrid oligosaccharides obtained after incubating hybrid κ - ι - or κ - μ -carrageenans with *Pseudoalteromonas carrageenovora* κ -carrageenase, were not longer than decasaccharides (κ - ι - κ - ι - κ ⁵ or κ - μ - μ - μ - κ ¹⁰). Because these oligosaccharides have a lower number of charges (i.e., κ - ι - κ - ι - κ , 7 charges; κ - μ - μ - μ - κ , 8 charges) than that the smallest ι - ν -hybrid oligosaccharide (ι - ι - ν - ι , 9 charges), they were not as strongly retained on the anion-exchange column (not shown). This means that the most recalcitrant hybrid κ -carrageenan is easier to separate than the smallest hybrid ι - ν -carrageenan.

To gain better insight into the distribution of the carrabiose moieties along the hybrid ι - ν -carrageenan chain as well as in other ι -rich hybrid carrageenans, such as ι - κ - and ι - α -carrageenans, the use of better adapted semi-preparative separation methods would be very helpful for isolating to homogeneity long-length and highly anionic oligosaccharides. However, as accomplished in the case of hybrid κ -carrageenans, the use of an ι -carrageenase

able to produce smaller oligosaccharides, such as neo- ι -carrabiose and neo- ι -carratetraose, than the *A. fortis* ι -carrageenase would greatly simplify analysis. This type of enzyme activity has been observed in the uncharacterized strains numbered 2, 3, 4 and 5 by Bellion and co-workers²⁰ who screened ι -carrageenan-degrading bacteria. This suggests that ι -carrageenan depolymerization may occur *via* the production of DP2 and DP4 oligosaccharides as is the case for *P. carrageenovora* κ - and λ -carrageenase.

Despite our difficulties in purifying and characterizing the deca- and dodecasaccharide fractions, we successfully determined the structure of the ι - ι - ν - ι octasaccharide. This oligosaccharide was effectively used to completely assign, for the first time, the ^1H and ^{13}C NMR of the ν -carrabiose moiety. The values of the chemical shifts recorded for the D2S6S residue were very different from those of the D2S6S residue that occurs in λ -carrageenan¹¹ because, in λ -carrageenan, the D2S6S is located between two G2S units instead of two G4S units. We noticed that the D2S6S-H1 signal can be slightly shifted to higher fields when two ν -carrabioses appeared to co-occur in the hybrid deca- and dodeca-oligosaccharides. We attributed the variation in chemical shift to the relative position of the D2S6S residue in the fragment (i.e. relative to the reducing end). In the case of hybrid κ -/ μ -oligosaccharides, it has been observed that when two μ -carrabiose moieties are contiguous, the chemical shifts of the two μ -carrabioses are shifted downfield by about 0.04 ppm¹⁰. Similarly, when two ν -carrabioses are contiguous, their respective chemical shifts would probably be affected by their ν -carrabiose neighbor, leading to an increase in their chemical shifts. We did not detect this variation in chemical shift, notably in the dodecasaccharide fraction, suggesting that if two ν -carrabioses occur in the same oligosaccharide, they are probably separated by at least one ι -carrabiose moiety.

The chemical shifts expected for the G4S of the ν -carrabiose moiety belonging to the ideal ν -carrageenan should reflect those of a G4S unit inserted between two D2S6S residues, meaning that at least two ν -carrabiose units are contiguous (D2S6S-G4S-D2S6S-G4S). Our analyses suggested that only one single ν -carrabiose unit occurs in the octa- and decasaccharides. Concerning the dodecasaccharides, the NMR spectra suggested that if two ν -carrabioses were present, they were probably separated by at least one ι -carrabiose moiety. Comparison of the proton and carbon chemical shifts of the G4S unit belonging to ι -carrabiose moieties with the G4S residues linked at the reducing and non-reducing end of the D2S6S residue, revealed some important differences, which are attributed to the D2S6S

neighboring moiety. We hypothesize that these variations in chemical shifts represent the G4S chemical shift, which may be expected in ideal ν -carrageenans. Therefore, the chemical shift of the G4S belonging to ideal ν -carrageenan should be close to the G4S-H1, -H2 of the G4S linked at the non-reducing end of the D2S6S, and the G4S-H3, -H4 of the G4S located at the reducing end (in bold Table 1). The same suggestions can be proposed for the corresponding carbon chemical shifts, G4S-C1, -C2, -C3 and -C4.

5. Conclusion

The ν -carrabiose moiety is converted into ι -carrabiose by hot alkaline treatment *in vitro*²¹ or by sulfurylase enzymes *in vivo*²². Controlling the conversion yield helps monitor the physico-chemical properties of ι -rich carrageenan. Consequently, an in-depth analysis of ν -carrabiose distribution should reveal the exact influence of both the composition and distribution of ν -carrabiose on the functional properties of hybrid ι - ν -carrageenans. We sought to determine the distribution of carrabiose moieties along a hybrid ι - ν -carrageenan chain, using a strategy that we have efficiently applied to hybrid κ -rich carrageenans^{5, 10}. Using enzymes to produce small hybrid oligosaccharides as for κ -carrageenase is ideal as a first approach. However, hybrid ι - ν -oligosaccharides produced by the *A. fortis* ι -carrageenase were long in length, making their purification to homogeneity and, therefore their structural analysis, more difficult. This study nonetheless provides evidence of ι - ν -carrageenan hybridity. Furthermore, we completely assigned the NMR spectra of the ν -carrabiose moieties. Other oligosaccharide sequencing strategies, such as mass spectrometry, should be performed in addition to screening new ι -carrageenan-degrading enzymes to completely resolve the composition and distribution of ι -rich carrageenans.

Acknowledgments. ANRT (CIFRE), French National Center for Scientific Research (CNRS) and Pierre and Marie Curie University (Paris VI).

References

1. 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.
2. Greer, C.; Yaphe, W. *Bot. Mar.* **1984**, *27*, 473–478.
3. Greer, C.; Yaphe, W. *Bot. Mar.* **1984**, *27*, 479–484.
4. Bixler, H. *Hydrobiologia* **1996**, *326/327*, 35–37.
5. Guibet, M.; Boulenguer, P.; Mazoyer, J.; Kervarec, N.; Antonopoulos, A.; Lafosse, M.; Helbert, W. *Biomacromolecules*, **2008**, *9*, 408-415
6. Usov, A. I. *Food Hydrocoll.* **1998**, *12*, 301–308.
7. Bixler, H.; Johndro, K.; Falshaw, R. *Food Hydrocoll.* **2001**, *15*, 619-630
8. van de Velde, F.; Rollema, H.; Grinberg, N.; Burova, T.; Grinberg, V.; Tromp, R. *Biopolymers* **2002**, *65*, 299–312.
9. Bellion, C.; Brigand, G.; Prome, J.-C.; Welti, D.; Bociek, S. *Carbohydr. Res.*, **1983**, *119*, 31–48.
10. Jouanneau, D.; Guibet, M.; Boulenguer, P.; Mazoyer, J.; Smietana, M.; Helbert, W. *Food Hydrocoll.* **2009**, Submitted.
11. Guibet, M.; Kervarec, N.; Génicot, S.; Chevolut, Y.; Helbert, W. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1859-1869
12. Michel, G.; Helbert, W.; Kahn, R.; Dideberg, O.; Kloareg, B. *J. Mol. Biol.* **2003**, *334*, 421-433
13. Kidby, D. K.; Davidson, D. J. *Anal. Biochem.* **1973**, *55*, 321–325
14. van de Velde, F.; Pereira, L.; Rollema, H.S. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2309-2313
15. Knutsen, S.; Myslabodski, D.; Larsen, B.; Usov, A. *Bot. Mar.*, **1994**, *37*, 163-169
16. van de Velde, F.; Knutsen, S. H.; Usov, A.I.; Rollema, H.S.; Cerezo, A.S. *Trends Food Sci. Technol.*, **2002**, *13*, 73-92
17. Antonopoulos, A.; Hardouin, J.; Favetta P.; Helbert, W.; Delmas, A. F.; Lafosse, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 2217-2226
18. Knutsen, S. H.; Grasdalen, H. *Carbohydr. Res.* **1992**, *229*, 233–244.

19. Rees, D. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1969**, 24, 267–332.
20. Bellion, C; Hamer, G.K.; Yaphe, W. *Can. J. Microbiol.* **1982**, 28, 874-880
21. Ciancia, M.; Nosedà, M. D.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Polym.* **1993**, 20, 95–98.
22. Genicot-Joncour, S.; Poinas, A.; Richard, O.; Potin, P.; Rudolph, B.; Kloareg, B.; Helbert, W. *Plant. Physiol.* **2009**, in press

Deuxième partie

Chapitre 3

Analyse structurale des carraghénanes hybrides de *C. chamissoi*, *M. laminarioides*, *S. crispata* et *S. radula*

Article 4 : D. Jouanneau, P. Boulenguer, J. Mazoyer and W. Helbert. Hybridity of water and alkali-extracted carrageenans from the red algae *Chondracanthus chamissoi*, *Mazzaella laminarioides*, *Sarcothalia crispata* and *Sarcothalia radula*. En préparation.

Chapitre 3 : Analyse structurale de carraghénanes hybrides

Les carraghénanes hybrides de type κ - ι font l'objet d'une attention croissante de la part des industriels, due à l'augmentation des prix des κ - et ι - carraghénanes, et également à leurs propriétés physico-chimiques intéressantes. Ces carraghénanes sont des produits industriels, extraits de nombreuses algues de la famille des Gigartinaceae, par traitement alcalin. Ceci signifie que les éventuels précurseurs présents dans la paroi algale ont été transformés en motifs κ - ou ι -carrabiose. Si les κ - ι -carraghénanes ont fait l'objet de nombreuses études, tant structurales que physico-chimiques, les carraghénanes natifs, c'est-à-dire ceux contenant en plus des motifs μ - et ν -carrabiose, n'ont presque pas été étudiés. Il n'existe aucune donnée concernant la distribution de ces précurseurs dans les parois.

La nature hybride des κ - ι -carraghénanes a été démontrée par l'hydrolyse enzymatique (Guibet *et al.*, 2008) dans le cas de plusieurs algues de la famille des Gigartinaceae : *Chondrus crispus*, *Chondracanthus chamissoi*, *Gigartina skottsbergii*. Avec cette étude, une proposition d'organisation des différentes unités a été apportée. Ces carraghénanes seraient composés de blocs de motifs κ et de blocs de motifs ι , dont les longueurs ne peuvent être déterminées. Ils contiendraient aussi des segments κ -majoritaires avec une répartition aléatoire de motifs ι , ainsi que des segments non hydrolysables formés d'une alternance de motifs κ et ι . Toutes les algues étudiées contiendraient ces différents types de distribution, mais les importances relatives de ceux-ci diffèrent d'une algue à l'autre.

La distribution des précurseurs μ - et ν - au sein de chaînes de κ - et ι -carraghénanes respectivement a fait l'objet des deux précédents chapitres de cette thèse. Dans le premier cas, une distribution de type aléatoire des unités μ -carrabiose a été observée. Dans le second cas la distribution des motifs ν -carrabiose n'a été qu'abordée. Il semble qu'elle soit également de type aléatoire, avec pas ou peu de blocs de motifs ν -carrabiose.

L'étude de la distribution dans ces différentes structures est un prérequis nécessaire à l'analyse structurale de carraghénanes hybrides plus complexes, formés des motifs κ -, ι -, μ - et ν . Néanmoins cette dernière ne peut pas être déduite directement des études précédentes. Une étude approfondie de la dégradation de ces carraghénanes par la κ - et la ι -carraghénase est nécessaire. La caractérisation de différents oligosaccharides, idéaux et hybrides, réalisée au cours de travaux précédents, a été mise à profit pour analyser les hydrolysats de carraghénanes produits par les deux enzymes.

Hybridity of water and alkali-extracted carrageenans from the red algae *Chondracanthus chamissoi*, *Mazzaella laminarioides*, *Sarcothalia crispata* and *Sarcothalia radula*

Diane Jouanneau[§], Patrick Boulenguer[†], Jacques Mazoyer[†], and William Helbert[§]

[§] Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, CNRS, Marine plants and biomolecules, UMR 7139, Station Biologique, BP 74, F29680 Roscoff Cedex, France

[†] Cargill Texturising Solutions, F-50500 Baupte, France

ABSTRACT

Water and alkali-extracted carrageenans from *Chondracanthus chamissoi*, *Mazzaella laminarioides*, *Sarcothalia crispata* and *Sarcothalia radula* (Rhodophyta) were degraded by the addition of recombinant carrageenases, notably *Pseudoalteromonas carrageenovora* κ -carrageenase and *Alteromonas fortis* ι -carrageenase, either separately or in combination. Determination of the composition of the high molecular fraction (i.e. enzyme resistant fraction) as well as the content of standard and hybrid oligosaccharides allowed highlighting differences between the carrageenans in terms of composition and distribution of the carrabiose moieties. Inspection of the distribution of the μ - and ν -carrabiose, the biosynthetic precursors of κ - and ι -carrabioses, has revealed their localization in κ -carrabiose or ι -carrabiose-rich segments, respectively.

KEYWORDS: carrageenan, distribution, composition, alkaline conversion

INTRODUCTION

Carrageenans are sulfated galactans extracted from the cell wall of numerous members of the Rhodophyta. They are composed of D-galactose residues linked alternately by $\alpha(1,3)$ and $\beta(1,4)$ bonds, and the disaccharide repetition moieties - the carrabiose moieties - are classified according to the substitutions that occur on the free hydroxyl groups (Rees, 1969; Usov, 1992; Knutsen *et al.*, 1994). These substitutions are generally the addition of ester sulfate (S) or the presence of the 3,6-anhydro-ring (DA) on the 4-linked residue. Other substitutions such as methyl (M) or pyruvate (P) groups have also been observed, increasing, as a consequence, the number of possible carrabiose structures. Carrageenans are composed of sequences of the various carrabiose units (Craigie, 1990; Lahaye, 2001; van de Velde, 2008) and, for example, hybrid κ - ι -carrageenans (or $\kappa 2$ -carrageenans) are heteropolymers of ideal κ -carrabiose, ι -carrabiose (Bixler, 1996) and their respective biological precursors: μ - and ν -carrabiose (Van de Velde and De Rooter, 2002a). The composition and the distribution of these carrabiose units are specific to the species and to the growth conditions of seaweeds, as well as to the extraction procedures of carrageenan (Craigie, 1990; Lahaye, 2001).

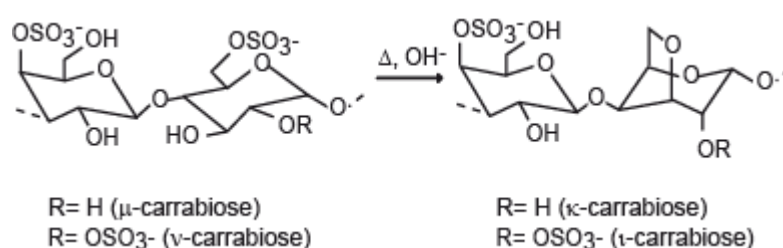


Figure 1. Chemical structure of κ - and ι -carrabiose and their respective biosynthetic precursors: μ - and ν -carrabiose. The cyclization of the anhydro ring is obtained *in vitro* by hot alkaline treatment.

The diversity of carrageenan structures is correlated to the wide range of functional properties of these macromolecules and exploited in numerous food applications (van de Velde, 2002a). The composition and distribution of the carrabiose units are two key-parameters involved in the fine tuning of the physical properties (van de Velde *et al.*, 2002b, 2005). Several approaches have been used to highlight the structural heterogeneity of carrageenans such as measuring different physical properties (i.e. viscosity, solubility and gel strength) and relating them to the percentage of the different carrabiose units. Other analytical methods have been proposed and most of them have been reviewed by Roberts and Quemener (1999). Visualizing hybridity of carrageenan has been facilitated by the use of carrageenases.

The degradation products of these enzymes reflect the structure of the undigested polymer. The hybrid oligosaccharides obtained after digestion of κ - ι -carrageenan (Guibet *et al.*, 2008), κ - μ -carrageenan (Jouanneau *et al.*, 2009a) by the *Pseudoalteromonas carrageenovora* κ -carrageenase have been purified and their structure resolved by NMR. Similarly, enzymatic digestion of hybrid ι - ν -carrageenan by the *Alteromonas fortis* ι -carrageenase was investigated (Jouanneau *et al.*, 2009b). These analyses allowed proposing a distribution of the carrabiose moieties along hybrid chains. In addition, the recorded data set allowed ascribing the elution time of standard and hybrid oligosaccharides in anion exchange chromatograms.

Analysis of the degradation of various hybrid carrageenans has led to a better definition of the recognition modalities of the κ - and ι -carrageenases toward their respective substrates (Knutsen, 1992; Guibet *et al.*, 2008; Jouanneau *et al.*, 2009a, b). The end-products of the degradation of *Kappaphycus alvarezii* κ -carrageenan with *P. carrageenovora* κ -carrageenase were the standard neo- κ -carrabiose and neo- κ -carratetraose, and hybrid oligosaccharides which were systematically terminated at each end of the fragment by one κ -carrabiose moiety. This indicated that the cleavage of hybrid κ -carrageenan requires at least two contiguous κ -carrabiose units. The degradation products of *Eucheuma denticulatum* ι -carrageenan by the *A. fortis* ι -carrageenase were the neo- ι -carratetraose and neo- ι -carrahexaose. The smallest hybrid oligo- ι - ν -carrageenans obtained after incubation of water extracted *E. denticulatum* ι -carrageenan was an octasaccharide and all the identified hybrid structures contained at least one ι -carrabiose unit at the reducing and non-reducing end of the oligosaccharides. Altogether, these observations have revealed that the number of sub-sites encountered in the active site of the ι -carrageenase is superior to that of the κ -carrageenase and that the ι -carrageenase required a longer sequence of standard ι -carrabiose to perform the cleavage.

Analysis of complex carrageenan structures composed of more than two types of carrabiose moieties was first undertaken by Greer and Yaphe (1984a, b). These pioneering works highlighted unambiguously the hybrid nature of carrageenan. However, the distribution analysis of the repetition moieties of in these carrageenans which contained more than two different moieties has never been undertaken. Therefore, using a similar strategy involving the use of enzymes, we have investigated the structures of complex carrageenans containing the four κ -, ι -, μ - and ν -carrabiose repetition moieties. The carrageenan samples were obtained after water or alkali-extraction of four red algae exploited industrially: *Chondracanthus chamissoi*, *Mazzaella laminarioides*, *Sarcothalia crispata* and *Sarcothalia radula*. We have then compared the structure of the carrageenan extracts, which differed strongly by their

biosynthetic precursors content. The carrageenans were incubated with recombinant κ - and ι -carrageenases. In order to depict the hybridity of these polysaccharides, we have analyzed the degradation products (oligosaccharides) and high molecular fraction (enzyme resistant fraction) by means of ^1H NMR and chromatography.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of carrageenan samples.

Carrageenans were extracted from the dried red algae *Chondracanthus chamissoi*, *Mazzaella laminarioides*, *Sarcothalia crispata* and *Sarcothalia radula* harvested in Chile and provided by Cargill Texturizing Solutions (Baupte, France). Water extracted carrageenans were obtained after incubation of dried seaweed with water (100 mL/g) at 60°C during 4 h, under stirring. For alkaline extraction (resembling the industrial extraction), seaweeds were placed in NaOH 0.1 M, and stirred at 80°C during 6 h. The solutions were then hot filtered under vacuum. One volume of carrageenan solution was added to three volumes of isopropanol and allowed to coagulate prior to being dried at 60°C for 24 h in an oven.

Prior to use, the carrageenans were dialysed (6-8 kDa MWDO Spectra/Pore®) against distilled water in order to remove excess salt and non-polymeric materials. The polysaccharides were then freeze-dried and stored at room temperature in a dried atmosphere.

Enzymatic degradations:

Enzymatic degradations were achieved using recombinant *Pseudoalteromonas carrageenovora* κ -carrageenase and *Alteromonas fortis* ι -carrageenase which were over-expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by affinity chromatography according to Michel et al. (2001) and Michel *et al.* (2003), respectively. Carrageenans (0.5% w/v, in 0.1 M NaNO_3 pH 7.5) were incubated with excess of carrageenase (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h at 40°C. The complete degradation of the carrageenan was verified as a lack of additional reducing ends measurable after a second addition of fresh enzyme.

Size Exclusion Chromatography:

Filtered samples (200 μL , 0.22 μm) were injected on analytical Superdex 200 and Superdex peptide columns connected in series. The elution was conducted in 0.1 M LiNO_3 at 20°C using an isocratic Dionex Ultimate 3000 pump working at a flow rate of 0.3 mL/min.

The chromatography experiments were monitored using a Wyatt Optilab Rex refractive index detector. Chromeleon-Peak Net software (Dionex) was used for data acquisitions.

High Performance Anion Exchange Chromatography (HPAEC):

Filtered samples (20 μ L, 0.22 μ m, Millipore) were injected on analytical AS11 column (4 x 250 mm Ion Pac® Dionex), coupled with an AS11 guard column, equilibrated in NaOH 15 mM. The elution was conducted at 20°C at a flow rate of 0.5 mL/min with NaOH (280 mM) step gradient. For κ -carrageenase degradation products, the gradient was: 0-3.5 min: 3-3%, 3.5-4.1 min: 3-5%, 4.1-6.5 min: 5-10%, 6.5-22 min: 10-50%, 22-28 min: 50-74.7%, 28-28.1 min: 74.7-100%. For ι -carrageenase degradation products, the gradient was: 0-5 min: 3-5%, 5-6.5 min: 5-30%, 6.5-15 min: 30-57.5%, 15-26 min: 57.5-100%. The elution was monitored by a GP40 Gradient Pump (Dionex). Oligosaccharide elution was detected by conductivity with an ED40 detector (Dionex) after a 300mA current suppression with an ASRS ultra II-4mm (Dionex). Chromeleon-Peak Net software (Dionex) was used for data acquisitions. Integration of signal intensity was achieved using PeakFit 4.12 software (Seasolve software Inc.).

Reducing sugar analysis:

The amount of reducing sugars produced during the enzymatic incubations was determined by the reducing sugar method adapted from Kidby and Davidson (1973). Briefly, aliquots (100 μ L) of the reaction medium were mixed with 900 μ L of ferricyanide solution (300 mg potassium hexacyanoferrate III, 24 g of Na₂CO₃, 1 mL NaOH 5 M, QSP 1 L). The mixture was maintained in boiling water for 10 min, cooled down to room temperature and the absorbance was read at 420 nm. The percentage of hydrolysis was calculated considering that the maximum yield of hydrolysis with κ - and ι -carrageenase was obtained for standard *Kappaphycus alvarezii* κ -carrageenan and *Eucheuma denticulatum* ι -carrageenan, respectively (Guibet et al., 2008). According to this procedure, the complete digestion of the standard κ -carrageenan was defined as 94% of hydrolysis because it contained 94% of κ -carrabiose units estimated by ¹H NMR. Similarly, the percentage of hydrolysis of 88% was attributed to the complete hydrolysis of standard ι -carrageenan containing 88% of ι -carrabiose units.

Purification of the Enzyme Resistant Fraction (ERF):

ERF was separated from the oligosaccharide fraction by ultrafiltration using a 50 kDa MWCO membrane (Amicon). Fifty milliliters of sample was gently stirred in a pressure-

filtration cell (Amicon) 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. The ERF was then lyophilized and stored at room temperature in a dried atmosphere.

Purification of hybrid oligo- ι -/ κ -carrageenans:

Alkali-extracted carrageenan from the red seaweed *Gymnogongrus furcellatus* was used due to the high levels of hybrid κ -/ ι -oligosaccharides produced from this species by incubation with *A. fortis* ι -carrageenase. The ι -carrageenase degradation products (2 mL, 2% w/v) were filtered (0.22 μ m, Millipore) and injected on three Pharmacia Superdex 30 prep grade columns (600x26 mm i.d.) connected in series. The elution was conducted in 50 mM (NH₄)₂CO₃ at 20°C using an isocratic Gilson 306 pump working at a flow rate of 1.5 mL/min. Oligosaccharides were detected by differential refractometry (Spectra System RI-50, Thermo Separation products) and fractions were collected with a Gilson 215 Liquid Handler. The oligosaccharide fractions were then freeze dried and stored in a dried atmosphere.

¹H and ¹³C NMR analyses:

NMR spectra were recorded with a BRUKER Advance DRX 500 spectrometer equipped with an indirect 5 mm gradient probehead ¹H/¹³C/³¹P. Samples were exchanged twice in D₂O, and re-dissolved at concentration of about 10 mg/mL in 99.97% atom D₂O. Chemical shifts are expressed in ppm by reference to an external standard (trimethylsilylpropionic acid).

Prior to analysis, undigested high molecular weight carrageenan was ground with MM200 ball miller (RETSCH). The low depolymerisation of the polysaccharides obtained after 24 hours at 40 % of the maximal speed allowed a noticeable increase in the quality of NMR spectra. 500 MHz ¹H-NMR spectra of high molecular weight material (ground carrageenans, enzyme resistant fraction) were recorded at 70°C using 32 K data points and the following parameters: pulse angle, 30°C; sweep width, 10330 Hz; acquisition time, 1.58 s; relaxation delay, 5 s; digital resolution, 0.31 Hz/point, scan number, 128.

Oligosaccharide Nomenclature

We used the nomenclature established by Knutsen *et al.* (1994) 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 κ -carrageenan,

ι -carrageenan, μ -carrageenan and ν -carrageenan are DA-G4S, DA2S-G4S, D6S-G4S and D2S,6S-G4S, respectively. For oligosaccharides of the neo-carrabiose series, the internal κ - and μ -carrabiose units are written as DA-G4S and D6S-G4S without additional index. When the κ -carrabiose moiety (DA-G4S) is positioned at the reducing end, it is symbolised by DAr'-G4Sr α or DAr'-G4Sr β according to the anomeric configuration. At the non-reducing end it is designated as DANr-G4Snr'. Similar rules have been applied for μ -carrabiose units. The NMR resonance of the galactose (DAr' or D6Sr') neighboring the G4Sr reducing end can be affected by the α/β anomer equilibrium. Consequently, we distinguish DAr' α (or D6Sr' α) and DAr' β (D6Sr' β) when observed.

RESULTS

Enzymatic degradations of carrageenans

¹H NMR spectra of the water and alkali-extracted carrageenans from *C. Chamissoi*, *M. laminarioides*, *S. crispata* and *S. radula* were assigned based on the close similarity with values found in the literature (van de Velde *et al.*, 2002c, Figure 2). The two most intense deshielded signals recorded at 5.1 and 5.3 ppm present in all samples were attributed to the α -anomeric protons DA-H1 (κ -) and DA2S-H1 (ι -), respectively. The asymmetrical signals present in the spectra of the water extracted carrageenans, but absent or with low intensity in the alkali treated carrageenans, measured at 5.25 and 5.55 ppm were ascribed to the D6S-H1 (μ -) and D2S6S-H1 (ν -) of the carrageenan precursors, respectively. The proportions of the various carrabiose moieties were estimated by integrating their respective anomeric signals and the content of κ -, μ - ι - and ν -carrabiose are reported in Table 1. The ratio of κ/ι -carrabiose units in alkali-extracted carrageenans was in the range of 67/33 for *C. chamissoi* to 53/47 for *S. radula*. The content of κ -carrabiose (or ι -carrabiose) measured in alkali treated samples was very close to the sum of κ -and μ -carrabioses (or ι - and ν -carrabioses) determined for water-extracted samples.

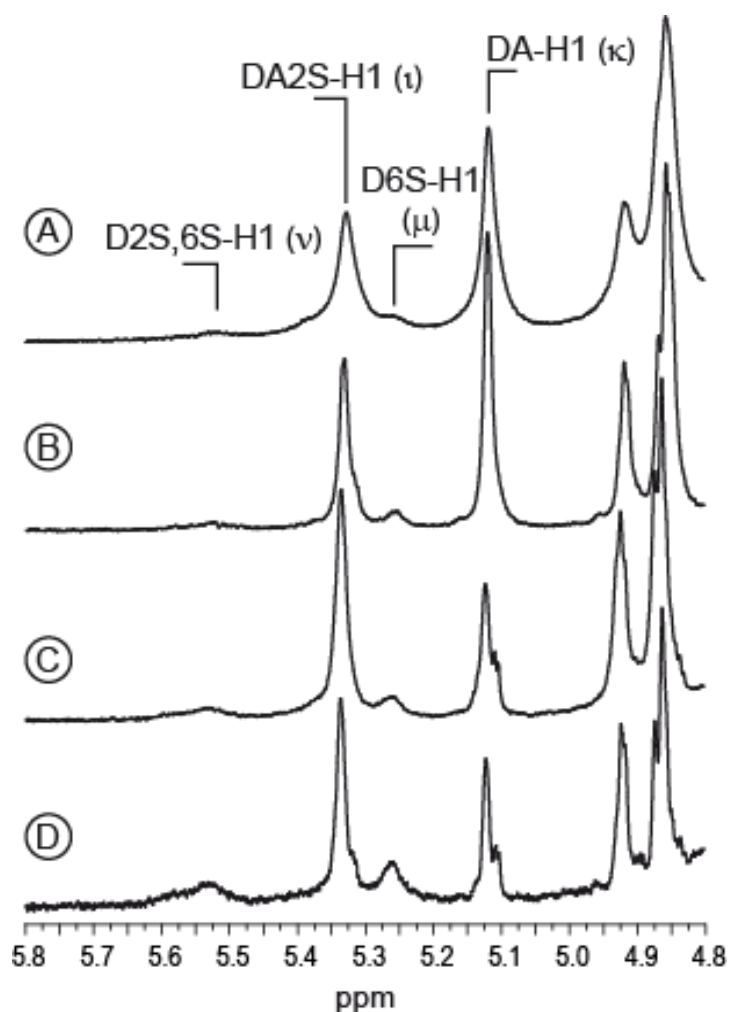


Figure 2. (A) Anomeric region of ^1H NMR (500MHz) spectra of water-extracted carrageenan from *Mazzaella laminarioides*. (B), (C) and (D) are spectra of the enzyme resistant fraction obtained after incubation with the *A. fortis* ι -carrageenase, *P. carrageenovora* κ -carrageenase or with the two enzymes in combination.

Water and alkali-extracted carrageenans were incubated with *P. carrageenovora* κ -carrageenase and *A. fortis* ι -carrageenase. The yield of degradation was monitored by assaying the amount of reducing ends produced during the hydrolysis and the percentage of degradation was calculated according to Guibet and co-workers (Guibet *et al.*, 2008, Table 1). As expected, the water extracted carrageenans were systematically less degraded than the alkali-extracted ones because they contained additional ν - and μ -carabiose moieties. In addition, for all carrageenan samples analysed, hydrolysis was always more important with the κ -carrageenase, in agreement with the higher content of κ -carrabiose units. However, there was no direct correlation between the amount of κ - or ι -carrabiose units and the level of

hydrolysis by the respective enzyme. Indeed, for example, the alkali-extracted *M. laminarioides* (54% κ -units) is digested at 37% by the κ -carrageenase which is superior to the yields of degradation of 32% of *S. crispata* (56% κ -unit). Similarly, *S. crispata* (42% ι -units) was less degraded by the ι -carrageenase than *C. chamissoi* (32% ι -units).

Table 1. Composition the water-extracted (WE) and alkali-extracted (AE) carrageenans. Percentage of degradation of the carrageenans after incubation with the κ -carrageenase (κ -ase) and ι -carrageenase (ι -ase).

		Composition (mol-%) ^a				Degradation (%) ^b	
		κ	μ	ι	ν	κ -ase	ι -ase
<i>Kappaphycus</i>	AE	94	0	6	0	94	0
<i>alvarezii</i>	WE	83	11	6	0	88	0
<i>Chondracanthus</i>	AE	64	0	32	4	50	20
<i>chamissoi</i>	WE	59	10	24	7	34	13
<i>Sarcothalia</i>	AE	56	2	42	0	32	17
<i>crispata</i>	WE	51	5	27	17	20	12
<i>Mazzaella</i>	AE	54	0	46	0	37	26
<i>laminarioides</i>	WE	46	12	20	22	24	15
<i>Sarcothalia</i>	AE	53	0	47	0	34	33
<i>radula</i>	WE	45	7	28	20	18	12
<i>Euचेuma</i>	AE	6	4	88	0	0	88
<i>denticulatum</i>	WE	6	4	74	16	0	49

^a Molar fraction of carrageenan repeating units. ^b Percentage of degradation is the amount of reducing sugar produced after incubation with the κ -carrageenase or the ι -carrageenase using *K. alvarezii* κ -carrageenan or *E. denticulatum* ι -carrageenan as standard, respectively.

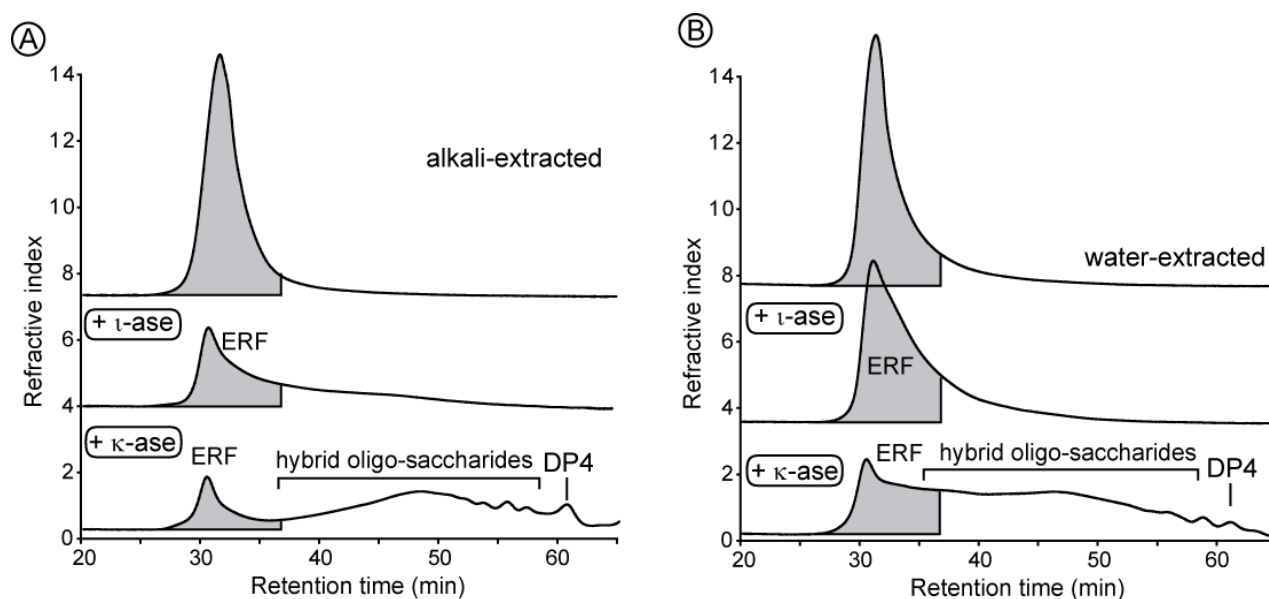


Figure 3. Comparison by size exclusion chromatography of the degradation products obtained after incubation of the alkali- (A) and water-extracted carrageenan (B) from *M. laminarioides* with the ι -carrageenase (ι -ase) or with the κ -carrageenase (κ -ase). DP4 designates neo- κ -carratetraose. ERF: enzyme resistant fraction.

The higher degree of degradation by the κ -carrageenase compared to the ι -carrageenase, of the different water and alkali-extracted carrageenans, was also confirmed by size exclusion chromatography. As an example, are presented in Figure 3, the chromatograms of the water- and alkali-extracted carrageenans of *M. laminarioides* recorded after incubation with the κ - and ι -carrageenases. The chromatogram of the water extracted carrageenan incubated with the ι -carrageenase consisted essentially of high molecular weight fragments. The low decrease of molecular mass of the sample was associated to an enlargement of the signal of the ERF (centered at about 30 min elution time) indicating an increase of the polydispersity characteristic of chain cleavage. Because the alkali-extracted sample contained more ι -carrabiose units, the degradation of this sample by the ι -carrageenase was more pronounced and highlighted by the decrease of the signal intensity of the ERF associated to the increased amounts of fragments eluting between 38-50 min. However, only a very small amount of oligosaccharides was produced, in agreement with the limited number of cleavages. The important degradation of *M. laminarioides* carrageenans by the κ -carrageenase was obvious from the chromatography analyses (Figure 3). The intensity of the high molecular weight fraction has strongly decreased and the oligosaccharides represent the main fraction in both digested *M. laminarioides* carrageenans. The chromatograms recorded with the carrageenans

extracted from the other seaweeds had the same overall shape and features. They were characterized by a high molecular fraction, resistant to enzyme degradation, as well as an oligosaccharide fraction. The relative amounts were dependent on the treatment and the source of the carrageenan.

Composition of the high molecular weight fraction

The high molecular fractions of the digested carrageenans were separated by filtration using a 50 kDa membrane. Analysis of these fractions by chromatography, revealed that the membrane cut-off corresponded to about 35 min elution time on the chromatogram. We have thus estimated the amount of ERF by integrating the chromatogram signal before 35 min. According to this procedure, we have observed, as expected, that the amount of ERF was systematically the most abundant after incubation with the ι -carrageenase and the lowest when the two carrageenases were used together. In addition, for the four algae, the amount of the ERF was always more important after enzymatic degradation of the water-extracted than with the alkali-extracted carrageenans.

As for the reducing sugars assays, there was no straightforward correlation between content of κ - and ι -carrabiose moieties and the amount of ERF. The resistant fraction toward the κ -carrageenase of the alkali extracted *C. chamissoi* carrageenan (64% κ -unit) was of about 34% which was higher than the 31% resistant fraction of *S. radula* (53% κ -units). Another example is the very similar amount of ERF measured in both water (37%) and alkali-extracted *M. laminarioides* (38%) incubated by the κ -carrageenase suggesting that, in that case, the occurrence of the biosynthetic precursors didn't influence the efficiency of the enzyme.

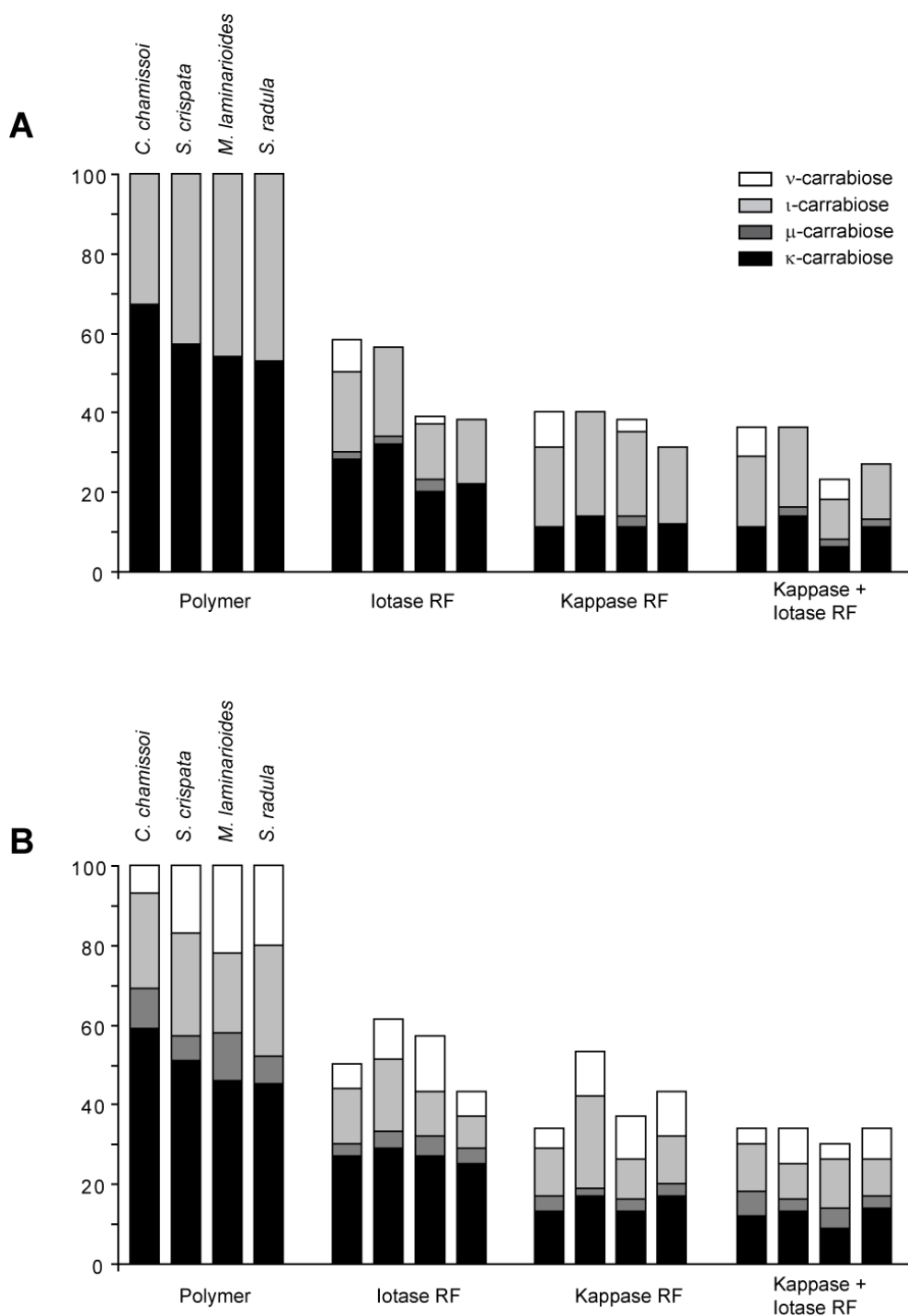


Figure 4. Composition of the alkali- and water-extracted carrageenans of *C. chamissoi*, *S. crispata*, *M. laminaroides* and *S. radula* determined by ^1H NMR (500MHz). The composition of the enzyme resistant fraction toward the ι -carrageenase, κ -carrageenase and the two enzymes are reported in the bars where the scale correspond the percentage of degradation.

The composition of the ERF was determined by ^1H NMR (as illustrated in Figure 2) and was graphically presented in Figure 4 (numerical values are given in supporting material). We

have observed that the treatment with the ι -carrageenase has led to the enrichment of the high molecular fraction with κ -, μ - and ν -carrabiose moieties. For example, in the case of the alkali-extracted *M. laminaroides* carrageenan, the fraction of ι -carrabiose decreased from 46% to 35% to the profit of the κ - (53%), μ - (7%) and ν -carrabioses (6%). Symmetrically, the incubation with the κ -carrageenase has led to the increase of ι - (54%), μ - (8%) and ν -carrabiose (9%) content. One should notice that for all alkali-extracted carrageenans, the ^1H NMR analyses of the enzyme resistant fraction highlighted the occurrence of μ - and ν -carrabiose moieties which were almost undetectable in the undigested samples. Similar enrichments of the enzymes resistant fractions were observed with the four water extracted carrageenans. Another constant feature was that the resistant fraction to the κ -carrageenase was enriched in ν -carrabiose but the content of μ -carrabiose was about equal or smaller than that measured in the undigested samples. This trend was not observed with the specimens digested by the ι -carrageenase where an increase of μ -carrabiose and decrease of ν -carrabiose content was not constantly observed.

When the carrageenans were incubated with the two enzymes, we found that the number of ι -carrabiose units in the resistant fraction was systematically higher than that of the κ -carrabiose moieties whereas it was the less abundant in the four undigested carrageenans. We have observed that the enrichment in μ - and ν -carrabiose could be very important and, as for the alkali extracted *M. laminarioides* carrageenan, it could represent one third of the total content of carrabiose.

Structure and content of hybrid oligosaccharides

The oligosaccharide fractions were characterized by anion exchange chromatography and the chromatograms recorded after incubation with the κ - and ι -carrageenase are presented in Figure 5. The oligosaccharide mixtures obtained after hydrolysis of the water and alkali extracted carrageenans by the κ -carrageenase contained standard oligo- κ -carrageenans as well as hybrid oligosaccharides including oligo- κ -/ ι - and oligo- κ -/ μ -carrageenans. The chromatogram signals were attributed to oligosaccharide structures based on previous investigations (Guibet et al., 2008; Jouanneau et al. 2009a). The oligosaccharide mixtures (Figure 5A) were composed of oligosaccharides having the same structures but their relative content was characteristic of the extraction procedure as well as the source of the carrageenans. The digested alkali-extracted samples contained low amounts of oligo- κ -/ μ -carrageenans and were characterized by the high contents of the κ -/ ι -oligosaccharides.

Notably, the κ - ι - κ hexasaccharide was the most abundant fragment in *M. laminarioides*, *S. crispta* and *S. radula*. This contrasted with chromatograms of the water extracted carrageenans on which the most abundant hybrid oligosaccharide was the κ - μ - κ hexasaccharides. Again, there was no direct relationship between the composition of the undigested carrageenans and the relative amount of standard and hybrid oligosaccharides.

The oligosaccharides obtained after hydrolysis with ι -carrageenase were straightforwardly ascribed to the standard oligo- ι -carrageenans as well as hybrid oligo- ι - ν -carrageenans based on previous analyses (Jouanneau *et al.*, 2009b). The additional signals eluting at 14.4, 15.7 and 16.2 minutes were purified by permeation gel chromatography. The ^1H NMR of these oligosaccharides has revealed that they were hybrid oligo- ι - κ -carrageenans (Figure 6). Their spectra shared common features such as the four α -anomeric signals encountered in neo- ι -hexacarrabiose between 5.20 and 5.35 ppm (G4S-H1, DA2Sr'-H1, DA2S-H1 and DA2Snr-H1). This observation indicated that all the hybrid oligosaccharides were systematically terminated by one ι -carrabiose moiety (DA2Snr-H1 = 5.280 ppm, DA2Sr'-H1 = 5.323 ppm) and that the third signal at DA2S-H1=5.3 ppm corresponded to an internal ι -carrabiose moiety. The signal at 5.1 ppm was characteristic of the α -anomeric signal of the DA-H1 belonging to κ -carrabiose moieties in accordance to previous observations (Knutsen *et al.*, 1992; Guibet *et al.*, 2008).

The main difference between the water and alkali-extracted carrageenans digested by the ι -carrageenase was the amount of oligosaccharides which was very low for the water extracted carrageenans. The proportions of the standard and hybrid oligosaccharides in water or in alkali-extracted carrageenan were not markedly different contrasting with what was noticed with the digestion products of the κ -carrageenase.

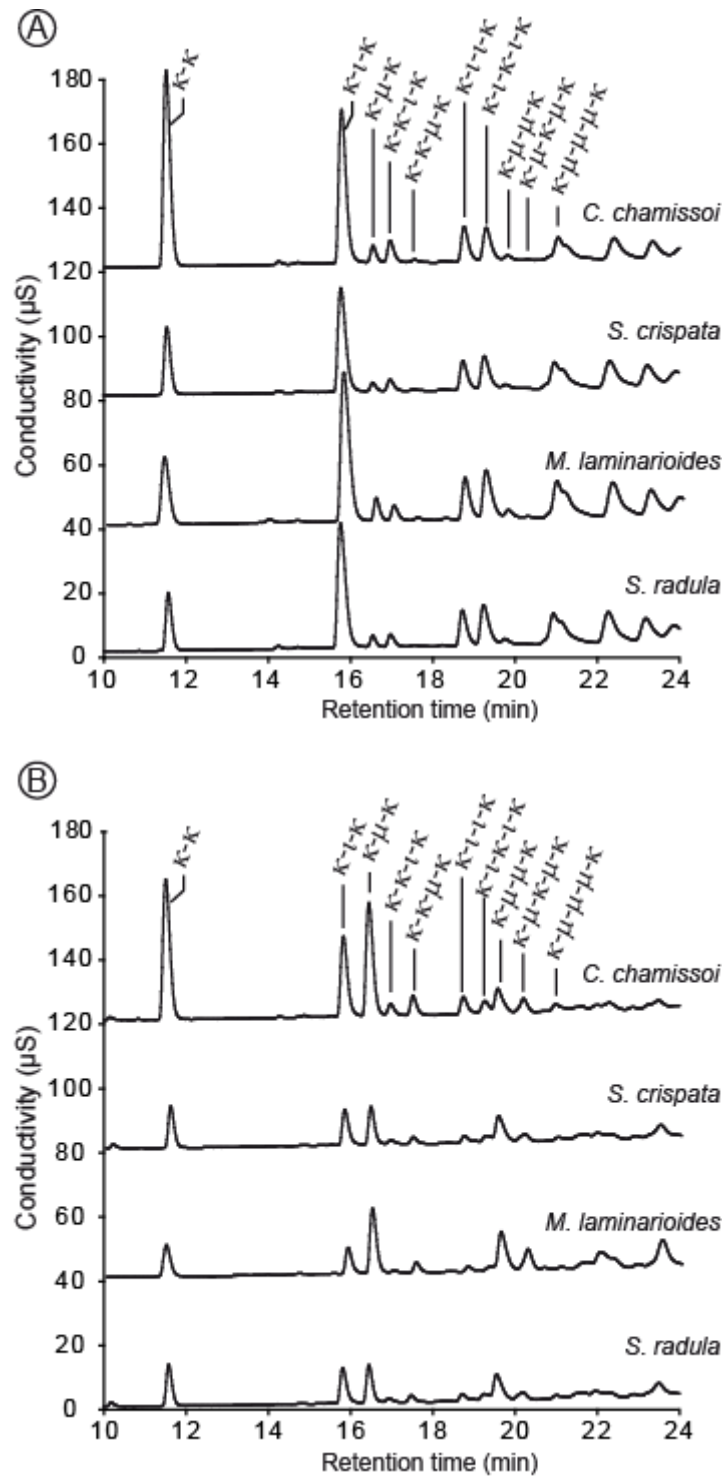


Figure 5. High-performance anion exchange chromatograms of the degradation products obtained after incubation of alkali- (A) and water-extracted (B) carrageenans with the *P. carrageenovora* κ -carrageenase. The structures of standard, hybrid κ - ι - and κ - μ -oligosaccharides are indicated on the corresponding signal.

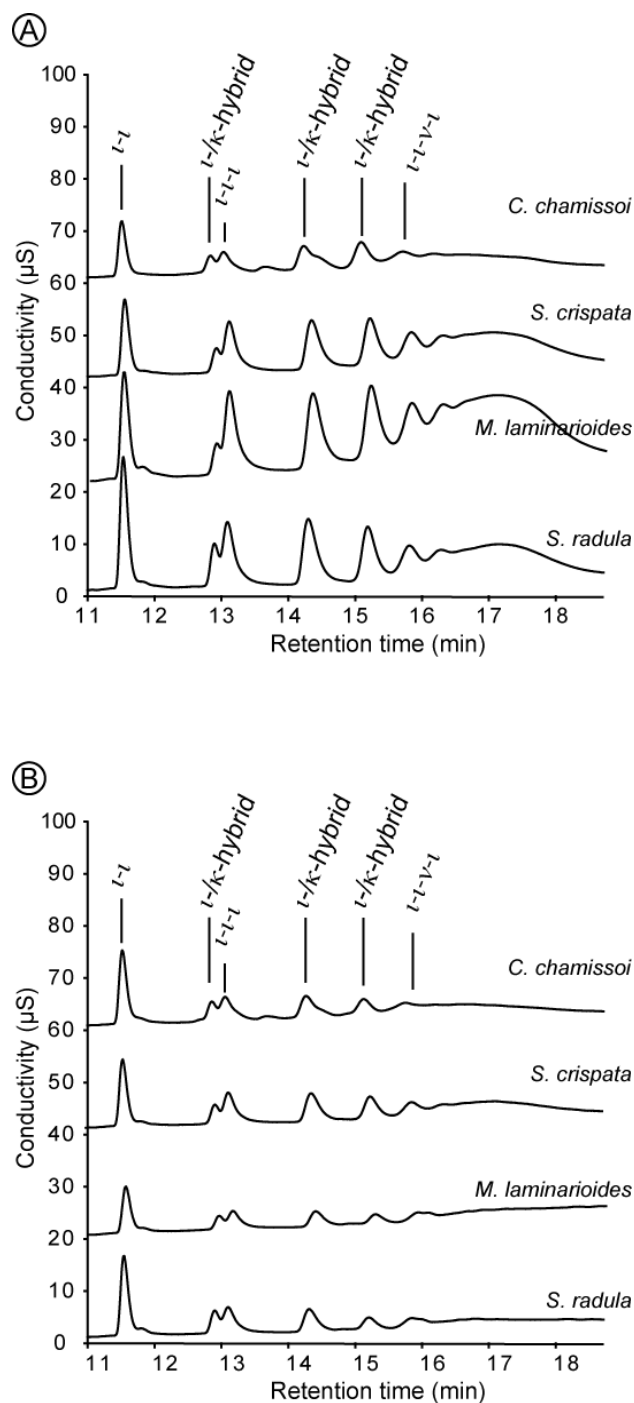


Figure 6. High-performance anion exchange chromatograms of the degradation products obtained after incubation of alkali- (A) and water-extracted (B) carrageenans with the *A. fortis* ι -carrageenase. The structures of standard and hybrid ι - ν -oligocarrageenan are indicated on the corresponding signal. Hybrid oligo- ι - κ -carrageenan refers to as fragment which structure is unresolved but terminated by one ι -carrabiose at each ends.

DISCUSSION

Distribution of carrabiose moieties in alkali-extracted carrageenans

Analysis of the degradation products of alkali-extracted *C. chamissoi*, *M. laminarioides*, *S. crispata* and *S. radula* carrageenans by the κ - and ι -carrageenase revealed numerous features similar to the enzymatic digestions already performed on other κ - ι -carrageenans including notably *Gigartina skottsbergii* and *Chondrus crispus* (Guibet *et al.*, 2008). The yield of hydrolysis was systematically lower than the amount of corresponding carrabiose moieties, which indicate that these polysaccharides are not mixtures of homopolymers and that κ - and ι -carrabiose are not distributed along the carrageenan chain as long block copolymers. This was supported by the chromatography analysis which revealed a very limited amount of standard neo- ι -oligosaccharides after ι -carrageenase treatment whereas the sample contained between about 33 to 44% ι -units. Because of the topology of the ι -carrageenase active site (Michel *et al.*, 2003), cleavage may occur when at least four ι -carrabiose moieties are contiguous. In other words, when one neo- ι -carratetraose is obtained by two cleavages at both side of the fragment, the number of contiguous ι -carrabiose must be six. Consequently, the very low amount of detected neo- ι -carratetraose indicated that the ι -carrabiose units are distributed mainly in sequences shorter than six carrabioses and the probability to observe one sequence of four ι -carrabioses could be correlated to the percentage of degradation. The short length of ι -carrageenan blocks is also supported by the very high amount of hybrid oligo- ι - κ -carrageenans compared to the content of standard oligosaccharides.

After incubation with the κ -carrageenase, beside the not negligible amount of standard neo- κ -carrabiose, the hybrid oligo- κ - ι -carrageenans represented the most abundant oligosaccharide fraction. Cleavage of κ -carrageenan requires at least two κ -carrabiose moieties, which means that the κ -carrabioses encountered in the κ -carrageenase resistant fraction are likely single κ -carrabiose positioned between two ι -carrabiose units. Then one can distinguish three possible distributions for κ -carrabiose units: blocks of κ -carrabiose (standard oligo- κ -carrageenan), κ -carrageenan rich-domains which contained ι -carrabiose (hybrid oligo- κ - ι -carragenan) and κ -carrabiose units distributed in ι -carrageenan rich domains (κ -carrageenase resistant fraction).

Distribution of the biosynthetic precursors

The distribution of μ -carrabiose in hybrid κ/μ -carrageenan has been investigated using enzymatic digestion of unmodified *Kappaphycus alvarezzi* carrageenan. It was found that the μ -carrabiose adopted three distributions: $-\mu-$, $-\mu-\mu-$ and $-\mu-\mu-\mu-$, which allowed explaining the asymmetrical $^1\text{H-NMR}$ signals of the D6S-H1 (Jouanneau *et al.*, 2009a). The D6S-H1 signal recorded on the four water extracted samples showed similar asymmetry suggesting the occurrence of the three modalities μ -carrabiose distribution. This was confirmed by chromatography analyses which revealed the occurrence of the $\kappa-\mu-\kappa$, $\kappa-\mu-\mu-\kappa$ and $\kappa-\mu-\mu-\mu-\kappa$ oligosaccharides. However, the proportions of these oligosaccharides varied with the algal source of the carrageenan. This is illustrated by the ratio of $\kappa-\mu-\kappa/\kappa-\mu-\mu-\kappa$ oligosaccharides, which is very high in *C. chamissoi* and almost equal to 1 for *S. crispata*. The digestion of carrageenans by the κ -carrageenase didn't enrich the resistant fraction with μ -carrabiose which indicated that the μ -carrabioses are mainly associated to the production of κ -oligosaccharides. This suggests that the μ -carrabiose units are mainly localised in stretches of κ -carrageenan.

After the alkaline treatment, the μ -carrabioses are converted in κ -carrabiose, therefore, the detection of hybrid κ/μ -oligosaccharides give some insight on the possible length of κ -blocks in alkali-extracted carrageenan. Because of the enzymes recognition modalities, the $-\kappa-\mu-\kappa-\mu-\kappa-$ oligosaccharides is obtained from a $-\kappa-\kappa-\mu-\kappa-\mu-\kappa-\kappa-$ fragment. Consequently, in the alkali-extracted carrageenan sequences of at least seven contiguous κ -carrabiose moieties are likely to occur.

The content of ν -carrabiose in the four water extracted carrageenans was superior to that of μ -carrabiose. However, we have never detected hybrid oligo- κ/ν -carrageenan in the κ -carrageenase degradation products. In addition, the κ -carrageenase resistant fraction was enriched with both ι - and ν -carrabioses and the oligosaccharides produced with the ι -carrageenase contained hybrid oligo- ι/ν -carrageenan (not ι/μ -carrageenan). Altogether, these observations suggest that the ν -carrabiose moieties are localised mainly in ι -carrageenan sequences. The detection of $\iota-\iota-\nu-\iota$ oligosaccharides in the water extracted samples was obtained from the cleavage of $\iota-\iota-\iota-\nu-\iota-\iota-$ sequence, therefore some blocks 8 contiguous ι -carrabiose units are occurring in alkali-treated carrageenan.

The co-occurrence of κ -, μ -, ι - and ν -carrabioses in same carrageenan chains support that these chemically closely related moieties were produced *in alga* through a common

biosynthesis pathway. Craigie and Wong (1979) have proposed that addition of sulphate by hypothetical sulfotransferase on μ -carrabiose gives ν -carrabiose and the cyclisation of μ - and ν -carrabiose by sulfohydrolases or galactose-6-sulfurylases lead to κ - and ι -carrabioses. Because formation of the anhydro-ring is the last step of the carrageenan biosynthesis, it seems likely that ν - and ι -carrabioses, in one hand, and μ - and κ -carrabiose, in another hand, are closely localised in the hybrid chain. According to this scheme, μ -carrabiose is the biosynthetic precursor of κ - carrabiose but also of ι -carrabiose (with ν -carrabiose as intermediate). The low amount of μ -carabiose compared to ν -, κ - and ι -carrabiose seems also in agreement with the μ -carrabiose moieties as the root of the three other moieties. Consequently, the lack of co-localisation of μ - with ι - and μ - with ν - could give new insights in the biosynthesis of carrageenan and, more especially, on the possible biosynthetic relationship between carrabiose units.

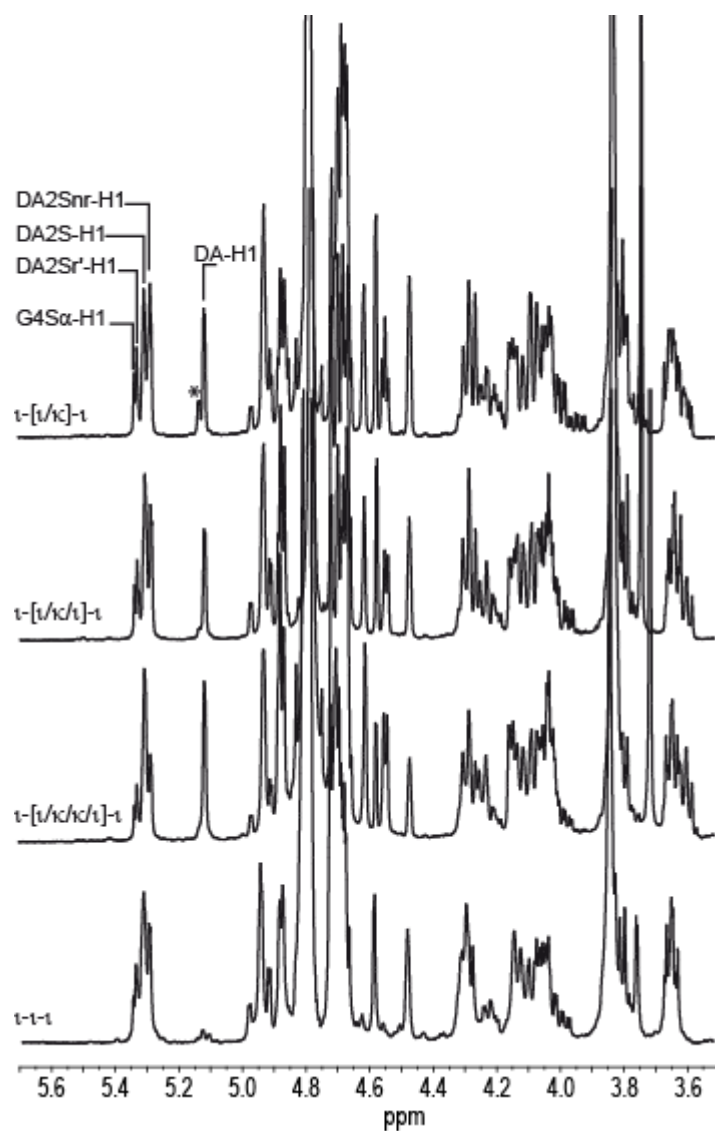
ACKNOWLEDGMENT. ANRT (CIFRE), French National Center for Scientific Research (CNRS) and Pierre and Marie Curie University (Paris VI).

REFERENCES

- Bixler H (1996) Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan. *Hydrobiologia* 326/327: 35-37
- Craigie J, Wong K (1979) Carrageenan biosynthesis. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 6:369-377.
- Craigie JS (1990) The cell wall. In KM Cole, RG Sheath, eds, *Biology of the Red Algae*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 221–257
- Greer C, Yaphe W. (1984a) Characterization of hybrid (beta-kappa-gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatinae* J. Agardh (Rhodophyta, Solieriaceae) using carrageenases, Infrared and ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Bot. Mar.* 27: 473-478
- Greer C, Yaphe W. (1984b) Hybrid (iota-nu-kappa) carrageenan from *Eucheuma nudum* (Rhodophyta, Solieriaceae), identified using iota- and kappa-carrageenases and ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Bot. Mar.* 27: 479-484
- Guibet M, Boulenguer P, Mazoyer J, Kervarec N, Antonopoulos A, Lafosse M, Helbert W (2008) Composition and distribution of carrabiose moieties in hybrid kappa-/iota-carrageenans using carrageenases. *Biomacromolecules* 9: 408-415
- Jouanneau D, Guibet M, Boulenguer P, Mazoyer J, Smietana M., Helbert W. (2009a) New insights into the structure of hybrid κ-/μ-carrageenan and its alkaline conversion. *Food Hydrocoll. In press*
- Jouanneau D, Boulenguer P, Mazoyer J, Helbert W (2009b) Enzymatic degradation of hybrid ι-/ν-carrageenan by the *Alteromonas fortis* ι-carrageenase. *In preparation*
- Kidby DK, Davidson DJ (1973) A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. *Anal. Biochem.* 55: 321–325
- Knutsen S, Myslabodski D, Larsen B, Usov A (1994) A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Bot. Mar.* 37: 163–169
- Knutsen SH, Grasdalen H (1992). The use of neocarrabiose oligosaccharides with different length and sulphate substitution as model compounds for ¹H-NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 229: 233–244
- Knutsen, S. PhD Thesis, University of Trondheim, 1992.
- Lahaye M (2001) Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *J Appl. Phycol.* 13: 173-184
- Michel G, Chantalat L, Duee E, Barbeyron T, Henrissat B, Kloareg B, Dideberg O (2001) The kappa-carrageenase of *P. carrageenovora* features a tunnel-shaped active site: a novel insight in the evolution of Clan-B glycoside hydrolases. *Structure* 9:513–52

- Michel G, Helbert W, Kahn R, Dideberg O, Kloareg B (2003) The structural bases of the processive degradation of iota-carrageenan, a main cell wall polysaccharide of red algae. *J. Mol. Biol.* 334:421–433
- Rees D (1969) Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 24: 267–332
- Roberts MA, Quemener B (1999) Measurement of carrageenans in food: challenges, progress, and trends in analysis. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 169-181
- Usov AI (1998) Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. *Food Hydrocoll.* 12: 301–308
- van de Velde F (2008) Structure and function of hybrid carrageenans. *Food Hydrocoll* 22: 727–734
- van de Velde F, Antipova AS, Rollema HS, Burova TV, Grinberg NV, Pereira L, Gilsenan PM, Tromp RH, Rudolph B, Grinberg VY (2005) The structure of kappa/iota-hybrid carrageenans II. Coil-helix transition as a function of chain composition. *Carbohydr. Res.* 340: 1113–1129
- van de Velde F, De Ruiter G (2002a) In *Biopolymers, Vol6 Polysaccharides II*; E.J. Vandamme, S. De Baets and A. Steinbüchel eds; Wiley-VCH, Weinheim.
- van de Velde F, Rollema H, Grinberg N, Burova T, Grinberg V, Tromp R (2002b) Coil-helix transition of iota-carrageenan as a function of chain regularity. *Biopolymers* 65: 299–312
- van de Velde F, Knutsen SH, Usov AI, Rollema HS, Cerezo AS (2002c) ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends Food Sci. Technol.* 13: 73-92

Supporting material 1. ^1H NMR (500MHz) of the fractionated hybrid ι -/ κ -oligo-carrageenans recorded at 25°C. The hypothetical structures deduced from the spectra are indicated.



Supporting material 2. Numerical values of the composition of the alkali- and water-extracted carrageenans of *C. chamissoi*, *S. crispata*, *M. laminarioides* and *S. radula* determined by ^1H NMR (500MHz). The composition of the enzymes resistant fraction toward the ι -carrageenase, κ -carrageenase and the two enzymes are also reported.

		undigested	ι -ase	κ -ase	κ -ase + ι -ase
<i>C. chamissoi</i> AE	% ^a	100	58	40	36
	κ	67	48	28	31
	μ	0	3	0	0
	ι	33	34	50	50
	ν	0	14	23	19
<i>C. chamissoi</i> WE	% ^a	100	50	34	34
	κ	59	54	38	35
	μ	10	6	12	18
	ι	24	28	35	35
	ν	7	12	15	12
<i>M. laminarioides</i> AE	% ^a	100	39	38	23
	κ	54	51	29	26
	μ	0	8	8	9
	ι	46	36	55	43
	ν	0	5	8	22
<i>M. laminarioides</i> WE	% ^a	100	57	37	30
	κ	46	47	35	30
	μ	12	9	8	17
	ι	20	19	27	40
	ν	22	25	30	13
<i>S. crispata</i> AE	% ^a	100	56	40	36
	κ	57	57	35	39
	μ	0	4	0	6
	ι	43	39	65	56
	ν	0	0	0	0
<i>S. crispata</i> WE	% ^a	100	57	37	30
	κ	46	47	35	30
	μ	12	9	8	17
	ι	20	19	27	40
	ν	22	25	30	13
<i>S. radula</i> AE	% ^a	100	38	31	27
	κ	53	58	39	41
	μ	0	0	0	7
	ι	47	42	61	52
	ν	0	0	0	0
<i>S. radula</i> AE	% ^a	100	43	43	34
	κ	45	58	40	41
	μ	7	9	7	9
	ι	28	19	28	26
	ν	20	14	26	24

Deuxième partie

Chapitre 4

Etude de la conversion alcaline des précurseurs biosynthétiques des carraghénanes

Chapitre 4 : Etude de la conversion alcaline des précurseurs biosynthétiques des carraghénanes

Les unités μ - et ν -carrabiose sont les précurseurs biosynthétiques des unités κ - et ι -carrabiose respectivement (**Figure 23**). La présence de ces précurseurs dans les carraghénanes altère fortement leurs propriétés physico-chimiques. En effet, les chaînes de κ - et de ι -carraghénanes sont constituées d'une alternance régulière d'unités en conformation chaise 4C_1 et 1C_4 , favorable à la formation d'hélices et donc à la gélification. Les précurseurs sont formés de deux unités galactose en conformation 4C_1 . Ces unités induisent des défauts dans la régularité des chaînes de carraghénane, en imposant un changement de direction brusque à la chaîne polysaccharidique. Ces défauts, appelés « kinks » (Rees, 1969), empêchent la formation des hélices et donc la gélification.

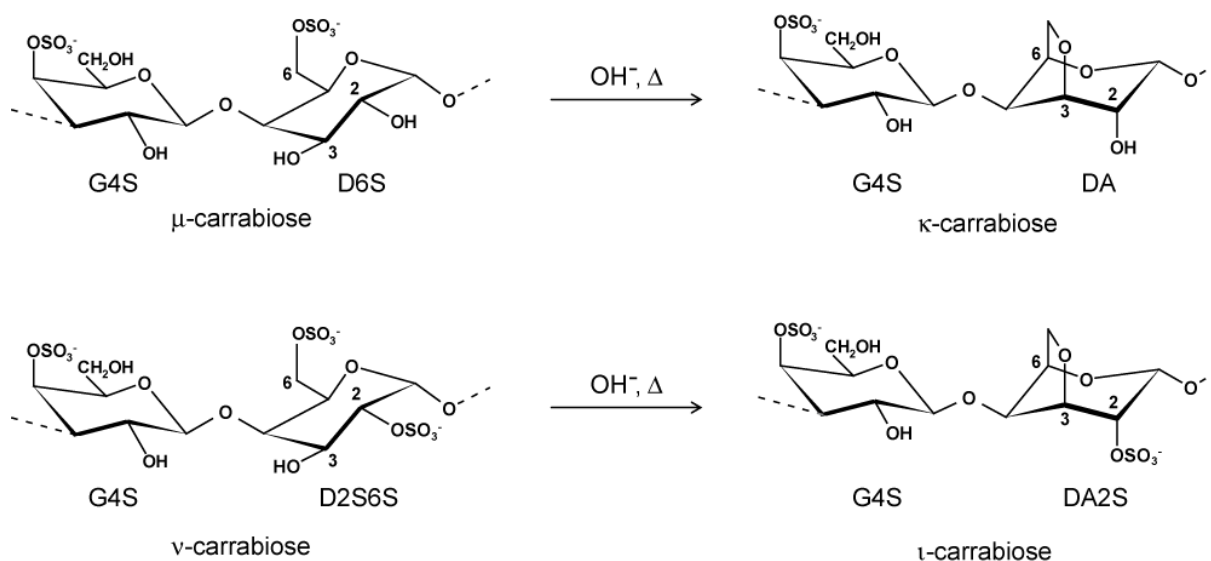


Figure 23 : Structure chimique des principaux carraghénanes et réaction de conversion alcaline.

La présence de nombreux précurseurs biosynthétiques dans la paroi des algues a été démontrée (Bellion *et al.*, 1983 ; Knutsen *et al.*, 1995). Pour obtenir des produits gélifiants, l'élimination de ces précurseurs dans les carraghénanes est primordiale. C'est pourquoi l'extraction industrielle des carraghénanes est presque toujours réalisée en milieu alcalin à chaud, conditions qui favorisent la conversion des unités μ - et ν -carrabiose en κ - et ι -carrabiose respectivement. Cette réaction est très largement utilisée dans les procédés

industriels d'extraction, mais reste assez mal connue. Ses mécanismes n'ont pas été caractérisés, et seules quelques études cinétiques ont été publiées. Cette réaction se déroulerait selon un mécanisme en une étape, de type SN₂, suivant une cinétique de pseudo ordre 1 (Ciancia *et al.*, 1993b). Les cinétiques de conversion en anhydro-galactose des unités galactose-6-sulfate ont été étudiées dans le cas du ι -*v*-carraghénane et de plusieurs κ - ι -carraghénanes (Ciancia *et al.*, 1993b ; Viana *et al.*, 2004). Dans le cas des κ - ι -carraghénanes, le suivi de la réaction était réalisé par dosage des unités 3,6-anhydro-galactose, par la méthode au résorcinol (Yaphe & Arsenault, 1965). Cette méthode ne permettait pas de distinguer les unités DA₂S des unités DA. La cinétique de conversion du μ - en κ -carraghénane n'a donc pas été étudiée directement.

Dans le premier chapitre de cette thèse, nous avons décrit une méthode permettant de mettre en évidence de faibles quantités d'unités μ -carrabiose. Cette méthode repose sur l'hydrolyse enzymatique, associée à des techniques d'analyse par chromatographie des oligosaccharides libérés. L'hydrolyse à la κ -carraghénase produisait des oligo- κ - μ -carraghénanes, même lorsque les unités μ -carrabiose n'étaient pas détectées par RMN. La caractérisation complète de ces oligo- κ - μ -carraghénanes a permis de déterminer avec précision la quantité d'unités μ -carrabiose présentes dans les échantillons de carraghénane. Grâce à ces outils enzymatiques et chromatographiques, des études cinétiques de la conversion alcaline des unités μ -carrabiose en κ -carrabiose ont pu être mises en œuvre, et la constante de vitesse de cette réaction a été pour la première fois déterminée. La méthodologie employée a également été appliquée au cas des ι -*v*-carraghénanes. En revanche, pour comparer les vitesses de conversion des unités μ - et *v*-carrabiose présentes dans les mêmes échantillons, d'autres méthodes ont été employées.

Résultats

La cinétique de conversion des unités μ - en κ -carrabiose a été étudiée. Ces résultats ont été décrits en détail dans l'article 1, au premier chapitre de cette thèse. Brièvement, le κ - μ -carraghénane de *K. alvarezii* a été soumis à un traitement par la soude à 80°C. Les échantillons prélevés au cours de la réaction ont été hydrolysés par la κ -carraghénase et analysés par HPAEC. Au cours du traitement alcalin, on observe la disparition progressive des différents oligo- κ - μ -carraghénanes (**Figure 24**). Les concentrations de ces oligosaccharides ont été mesurées, à partir des intensités des pics correspondants. Nous avons ainsi pu mesurer et comparer les vitesses de disparition des unités μ -carrabiose, en fonction de

leur voisinage. Nous avons établi que les unités μ -carrabiose étaient converties avec la même rapidité, qu'elles aient des unités μ - ou κ -carrabiose pour voisines. La constante de vitesse de cette réaction est de l'ordre de $6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Ce résultat est du même ordre de grandeur, bien qu'inférieur, à la vitesse mesurée par Ciancia ($26 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) (Ciancia *et al.*, 1993b).

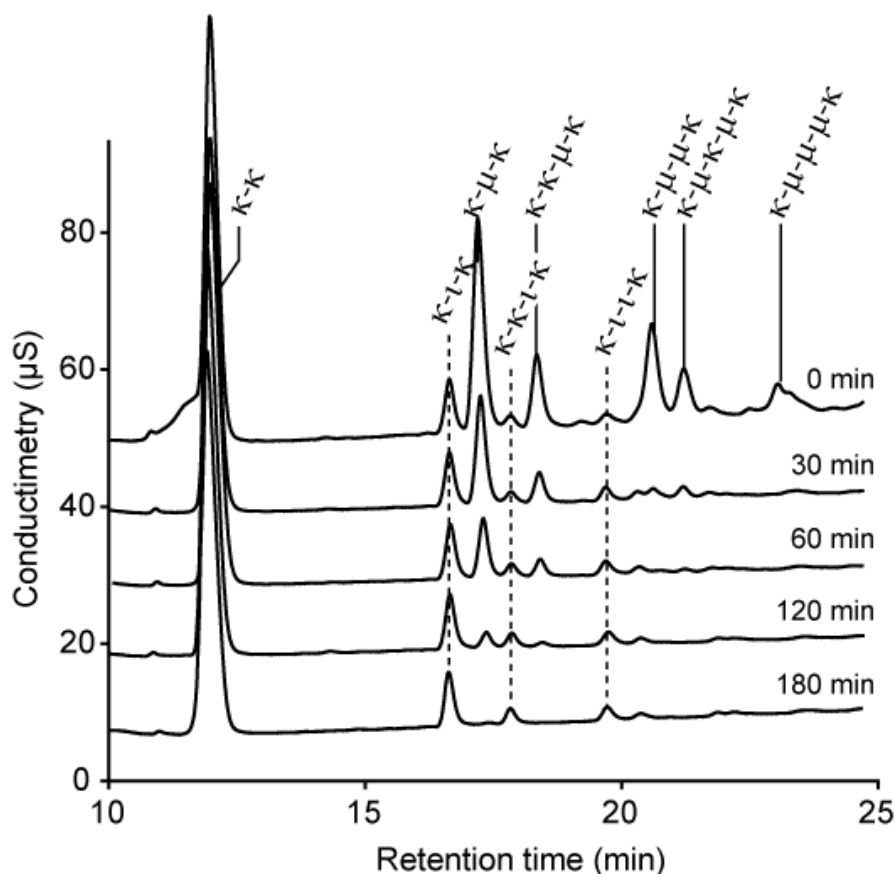


Figure 24 : Evolution des profils HPAEC d'hydrolyse à la κ -carraghénase, au cours du traitement alcalin du κ -/ μ -carraghénane de *K. alvarezii*.

Une stratégie identique a été appliquée au ι - ν -carraghénane d'*E. denticulatum*. Ce carraghénane a été incubé en présence de soude à 80°C , conditions induisant l'élimination du sulfate en position 6 de l'unité D2S,6S et la formation du pont 3,6-anhydro. Les échantillons prélevés au cours de la réaction étaient neutralisés, soumis à une hydrolyse à la ι -carraghénase et analysés par HPAEC (**Figure 25**). Une diminution de l'intensité des pics correspondant aux oligo- ι - ν -carraghénanes a été observée. Après 3 h de réaction, les chromatogrammes n'évoluent plus, suggérant que la réaction est terminée. Cependant tous les pics d'oligo- ι - ν -carraghénanes n'ont pas disparu, indiquant soit que la conversion n'est pas totale dans ces conditions, soit que ces signaux correspondent également à d'autres produits. Il pourrait s'agir

d'oligo- ι - κ -carraghénanes de taille supérieure au dodécasaccharide (cf Article 4). A partir de ces données et en supposant que la réaction est d'ordre 1 (Ciancia *et al.*, 1993b), la constante de vitesse a été calculée, à partir du tracé de $\ln[(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)]$ en fonction du temps, où A est l'intensité du pic correspondant à l'oligosaccharide ι - ι - ι . Cette constante de vitesse est de l'ordre de $1,2 \times 10^{-3} \pm 0,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (n=3), ce qui est inférieur aux valeurs reportées par Viana ($7,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) et Ciancia ($2,6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) (Ciancia *et al.*, 1993b ; Viana *et al.*, 2004).

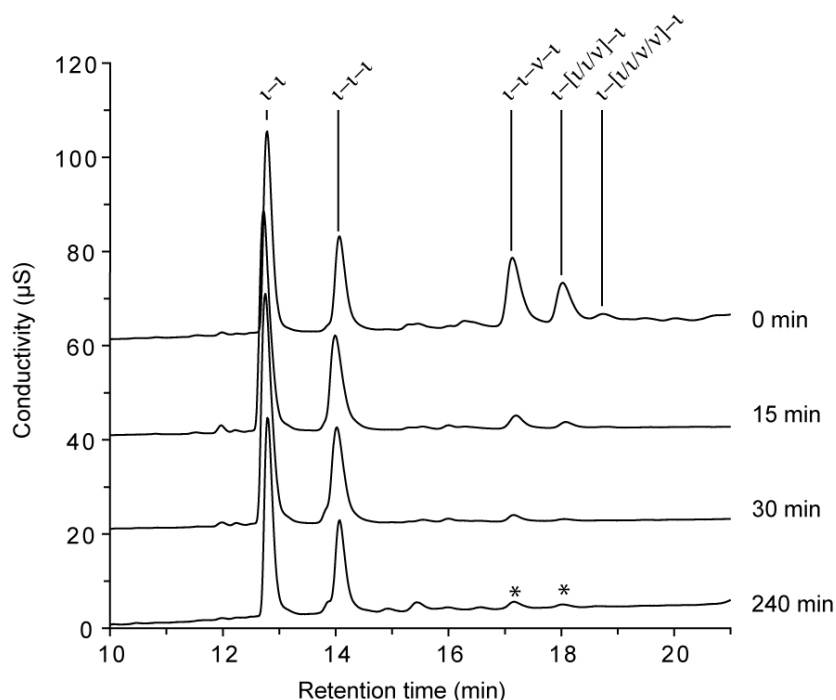


Figure 25 : Evolution des profils HPAEC d'hydrolyse à la ι -carraghénase, au cours du traitement alcalin du ι - ν -carraghénane d'*E. denticulatum*.

Les pics n'ayant pas disparu à la fin de la réaction sont indiqués par un astérisque.

Le carraghénane natif extrait de *M. laminarioides* contient une forte proportion de précurseurs biosynthétiques μ - (12%) et ν -carrabiose (22%). C'est donc un substrat de choix pour étudier la conversion alcaline de ces précurseurs dans un même échantillon de carraghénane. Nous avons montré, dans le chapitre précédent (chapitre 3), que ce carraghénane n'était pas intégralement dégradé par les enzymes. L'analyse des oligosaccharides produits ne peut donc pas, à elle seule, représenter la structure du polysaccharide. Par conséquent, la méthodologie employée précédemment pour étudier la conversion alcaline, à savoir l'hydrolyse enzymatique combinée à la chromatographie ionique, ne peut pas être appliquée dans ce cas précis.

La composition des carraghénanes peut être déterminée par ^1H -RMN à haute température. Nous avons donc choisi de suivre la réaction directement en observant l'évolution des spectres ^1H -RMN. La réaction a été réalisée à 80°C dans le spectromètre de RMN, par ajout de soude deutérée à la solution de carraghénane dans D_2O . Après l'ajout de cette solution, des spectres ont été enregistrés à intervalles réguliers (**Figure 26**). Une diminution rapide du signal correspondant aux unités ν -carrabiose, à 5.5 ppm, a été observée, après 43 min celui-ci avait disparu. A l'inverse, le signal correspondant aux unités μ -carrabiose, à 5.25 ppm, diminuait lentement, après 4h il n'avait pas tout à fait disparu. Les proportions de μ - et ν -carrabiose présents dans l'échantillon ont été déterminées par intégration de ces signaux anomériques. Ainsi, l'étude cinétique a révélé que la réaction était d'ordre 1, ce qui est en accord avec les précédentes études (Ciancia *et al.*, 1993b ; Viana *et al.*, 2004). La vitesse de cyclisation était déterminée grâce au tracé de $\ln[(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)]$ en fonction du temps, où A est l'intensité du signal anomérique (**Figure 27**). Celle du ν -carraghénane ($1.49 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) est environ 10 fois plus importante que celle du μ -carraghénane ($1.77 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

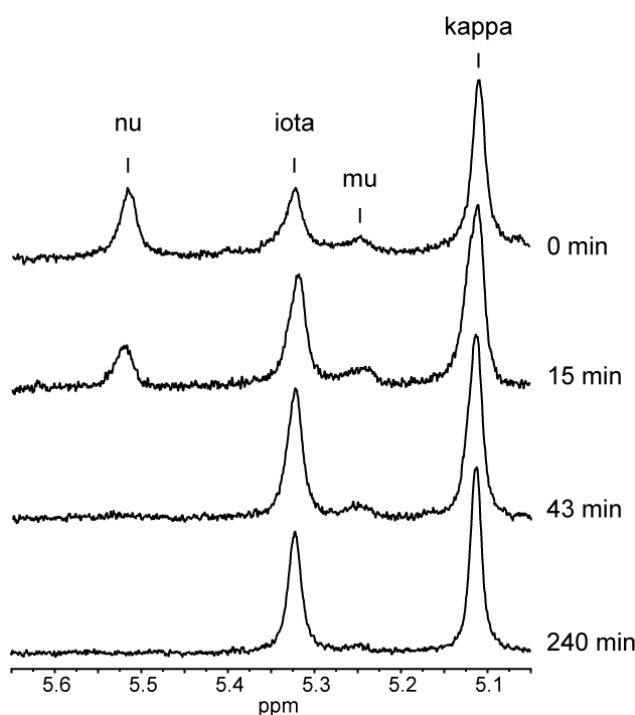


Figure 26 : Suivi par ^1H -RMN de la conversion alcaline du carraghénane de *M. laminarioides*. Les signaux caractéristiques des différentes unités carrabiose sont indiqués.

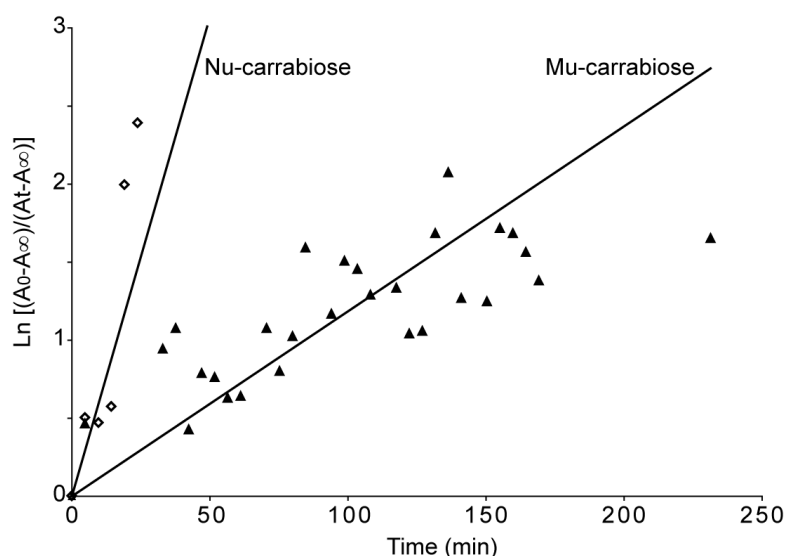


Figure 27 : Détermination des constantes de cyclisation des unités μ - et du ν -carrabiose à 80°C.

Discussion

La seule constante de conversion des unités μ - en κ -carrabiose a été mesurée dans un échantillon contenant à la fois des unités μ - et ν -carrabiose, sans distinction de ces deux types d'unités (Ciancia *et al.*, 1993b). Le résultat obtenu correspondait donc à une moyenne des constantes de cyclisation des unités μ - et ν -carrabiose. La constante de vitesse que nous avons mesurée pour les unités μ -carrabiose, par la méthode hydrolyse enzymatique – chromatographie ionique, était environ 4 fois inférieure à celle déterminée par Ciancia dans les mêmes conditions de concentration, de pH et de température (Ciancia *et al.*, 1993b). Ceci suggère une cyclisation plus rapide des unités ν -carrabiose, comme cela a été observé par Viana (Viana *et al.*, 2004).

En appliquant la même méthodologie au ι - ν -carraghénane, nous avons en effet observé que la constante de cyclisation des unités ν -carrabiose est deux fois supérieure à celle des unités μ -carrabiose. Cependant, ce résultat ne reflète que la fraction hydrolysable du polysaccharide. Il ne tient pas compte de la fraction résistante à l'enzyme, correspondant à environ 15% de la masse initiale et composée d'environ 20% de motifs ν -carrabiose. Ce résultat ne tient pas compte non plus de la proportion de motifs ν -carrabiose présents dans les oligosaccharides de grande taille. Ainsi, ce sont plus de 15% des motifs ν -carrabiose qui ne sont pas pris en compte dans le calcul des concentrations initiales. Dans ce cas, la méthode employée sous-estime donc la vitesse de conversion. En effet, Viana avait déterminé une

vitesse de cyclisation plus importante ($77 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), alors que la température d'incubation était inférieure (Viana *et al.*, 2004). Dans le cas des μ -/ ν -carraghénanes, la méthode d'analyse par hydrolyse enzymatique et chromatographie ionique ne s'avère donc pas très adaptée à des études cinétiques.

Les vitesses de conversion des unités μ - et ν -carrabiose en κ - et ι -carrabiose n'avaient jamais été directement comparées. En effet, la méthode de dosage au résorcinol (Yaphe & Arsenault, 1965) utilisée par Ciancia et Viana ne permettait pas de distinguer ces deux types de motifs (Ciancia *et al.*, 1993b ; Ciancia *et al.*, 1997 ; Viana *et al.*, 2004). Grâce à la RMN, nous avons pu, pour la première fois, déterminer séparément les vitesses de cyclisation des motifs μ - et ν -carrabiose présents dans les mêmes échantillons. Nos résultats indiquent que les motifs ν -carrabiose sont convertis environ 10 fois plus rapidement que les motifs μ -carrabiose. Viana (Viana *et al.*, 2004) avait en effet émis cette hypothèse, ayant observé que la vitesse de conversion du ν -carraghénane seul est plus importante que celle déterminée par Ciancia (Ciancia *et al.*, 1993b), qui prenait en compte μ - et ν -carraghénane. Cette différence de réactivité entre les motifs μ - et ν -carrabiose peut s'expliquer par l'acidité du groupement hydroxyle en C-3 de l'unité D2S,6S, plus importante que celle de l'unité D6S, due au voisinage du groupement sulfate en position C-2 (**Figure 28**).

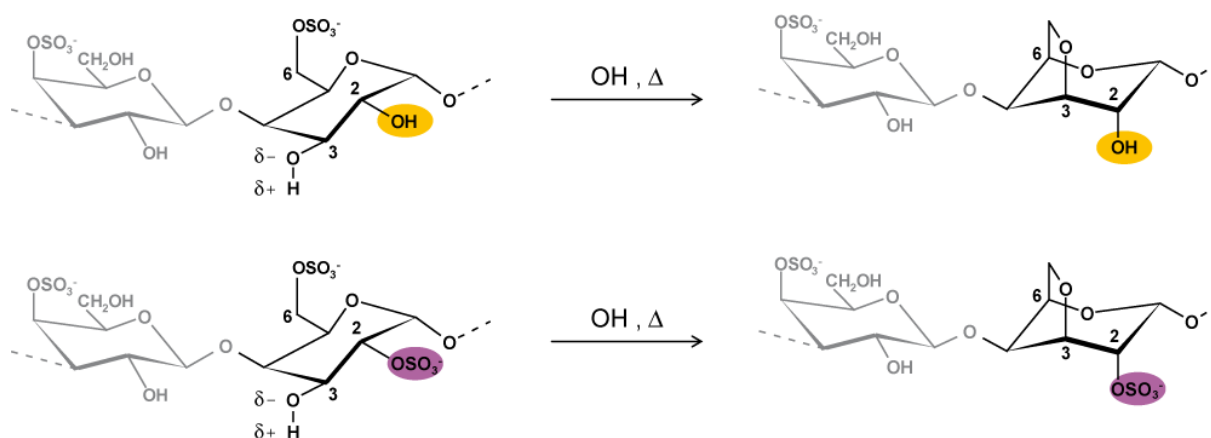


Figure 28 : Conversion alcaline des unités μ - et ν -carrabiose.

La constante de cyclisation calculée par RMN, pour les unités μ -carrabiose, est environ trois fois inférieure à celle déterminée par hydrolyse enzymatique. Pour expliquer cette différence, l'effet de l'utilisation du deutérium pourrait être étudié.

Conclusion

Nous avons pour la première fois démontré directement que dans les mêmes conditions les unités μ - étaient converties 10 fois moins rapidement que les ν -carrabiose. Cette différence de réactivité pourrait expliquer la structure de nombreux carraghénanes industriels de type κ - ι . En effet, dans les produits extraits en milieu alcalin, les motifs ν -carrabiose sont en général absents, et l'on trouve souvent des traces de μ -carrabiose. Pourtant, avant le traitement alcalin, ces carraghénanes contiennent le plus souvent une plus forte proportion de motifs ν - que de μ -carrabiose. Les conditions utilisées pour la conversion des précurseurs semblent donc adéquates pour une cyclisation de tous les motifs ν -carrabiose, mais pas pour convertir toutes les unités μ -carrabiose.

Cependant, la présence, en faible quantité, de précurseurs dans les chaînes de carraghénane n'est pas toujours défavorable à la gélification. Dans le cas des ι - ν -carraghénanes par exemple, les meilleures propriétés de gélification étaient obtenues pour une proportion de motifs ν -carrabiose de 3% (van de Velde *et al.*, 2002). Il serait donc intéressant d'étudier les propriétés physico-chimiques des carraghénanes à différents taux de transformation, afin de mieux adapter les conditions du traitement alcalin.

Enfin nous avons mis au point une méthode d'analyse sensible, permettant d'étudier en détail, dans un κ - μ -carraghénane, la conversion alcaline des unités μ - en κ -carrabiose, pouvant aller jusqu'à discriminer les différents types d'organisation rencontrés dans ces carraghénanes.

Troisième partie : Discussion et perspectives

Troisième partie : Discussion et perspectives

1. Utilisation de la RMN pour l'analyse structurale des carraghénanes

La RMN est l'une des méthodes utilisées en routine pour déterminer la composition des carraghénanes, tant en recherche que dans l'industrie. La RMN du carbone a été très utilisée, néanmoins elle reste peu sensible, car elle ne permet de voir que les ^{13}C , soit 1% des noyaux. Ainsi, dans bien des cas, les composants mineurs des carraghénanes ne sont pas détectables. La RMN du proton, lorsqu'elle est conduite sur des polysaccharides préalablement dépolymérisés par sonication ou broyage, est beaucoup plus sensible, et est utilisée pour quantifier les différents constituants d'un échantillon de carraghénane. Néanmoins, dans le cas de constituants minoritaires, la quantification s'avère souvent trop peu précise. Par exemple, l'oligo-carraghénane κ - μ - κ apparaissait dans tous les chromatogrammes enregistrés après hydrolyse à la κ -carraghénase de carraghénanes extraits en milieu alcalin, alors qu'aucune unité μ -carrabiose n'était détectée par RMN dans ces échantillons (*cf* Article 4). De même, dans les fractions résistantes aux enzymes du carraghénane de *M. laminarioides* extrait en milieu alcalin, des quantités non négligeables de μ - et ν -carrabiose ont été détectées, alors qu'elles n'étaient pas détectées dans le carraghénane non hydrolysé. Nous avons ainsi pu estimer à plus de 3 et 5% respectivement les proportions de μ - et ν -carrabiose dans ce carraghénane.

Les spectres de carraghénanes hybrides ou de mélanges de carraghénanes sont la somme des spectres correspondant aux unités carrabiose qui les composent. C'est pourquoi il est nécessaire de connaître les différents signaux correspondant à ces unités carrabiose (van de Velde *et al.*, 2002). Des études précédentes avaient permis d'attribuer les signaux ^{13}C -RMN des précurseurs biologiques μ - et ν -carrabiose (Bellion *et al.*, 1983 ; Ciancia *et al.*, 1993a). Les signaux des protons anomériques avaient également été déterminés (Ciancia *et al.*, 1993a). Au cours de cette étude, nous avons pu attribuer, pour la première fois, tous les signaux protons et carbones correspondant à ces motifs.

Nous avons mis en évidence une différence de déplacement chimique des protons anomériques des unités μ -carrabiose en fonction de leur mode de distribution, expliquant la forme asymétrique habituellement observée du signal μ -carrabiose dans les spectres de polysaccharides (**Figure 29**). Aussi l'observation détaillée de la forme de ce signal donne une

information directe sur la distribution des motifs μ -carrabiose au sein des chaînes de carraghénane. Dans le cas de l'analyse structurale du ι - ν -carraghénane, aucun oligosaccharide contenant plus d'un motif ν -carrabiose n'a été intégralement caractérisé, le même phénomène n'a donc pas pu être observé. Cependant le signal du ν -carrabiose dans les spectres ^1H -RMN de carraghénanes montre également une légère asymétrie (**Figure 30**). Il se pourrait donc que les unités ν -carrabiose aient également des déplacements chimiques différents en fonction de leur mode de distribution. Si tel était le cas, la RMN du proton pourrait s'avérer un outil très utile pour obtenir des éléments d'information sur la distribution des précurseurs biosynthétiques dans les carraghénanes.

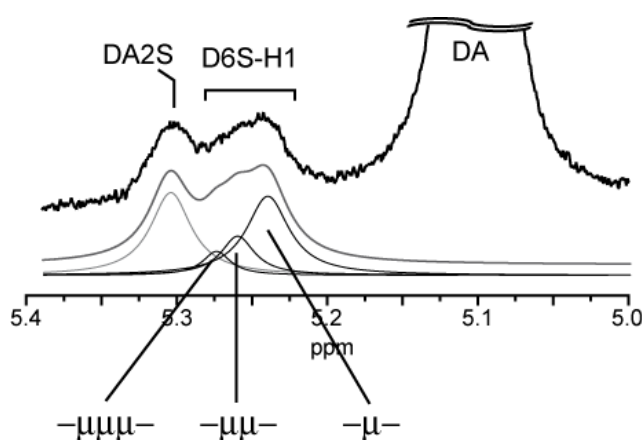


Figure 29 : Région anomérique du spectre ^1H -RMN du κ - μ -carraghénane de *K. alvarezii*.

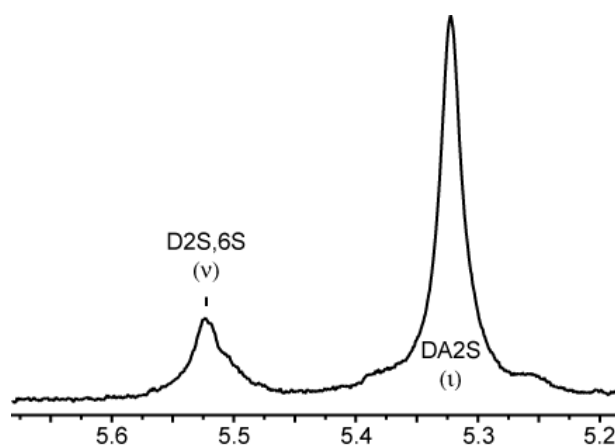


Figure 30 : Région anomérique du spectre ^1H -RMN du ι - ν -carraghénane d'*E. denticulatum*. On observe la forme asymétrique du signal D2S,6S-H1 de l'unité ν -carrabiose.

Un déblindage, associé à une diminution de l'intensité du signal du proton anomérique D6S de l'oligo-carraghénane κ - μ - μ - κ , a été observé. Ce phénomène pourrait résulter d'un effet nucléaire Overhauser (NOE), attribué à des interactions longues distances. Ceci mettrait en évidence la proximité spatiale des protons anomériques D6S des deux unités μ -carrabiose voisines. Cette information pourrait être utilisée comme point de départ pour étudier la conformation des unités μ -carrabiose dans des oligosaccharides et dans des polymères. Ainsi, des informations sur la structure tridimensionnelle des « kinks » introduits dans les κ -carraghénanes par la présence de motifs μ -carrabiose pourraient être obtenues.

Finalement nous avons montré que la RMN pouvait apporter de nombreuses informations pour l'analyse structurale des carraghénanes : elle permet non seulement de déterminer la composition, mais elle apporte également quelques éléments de distribution et de conformation.

2. Les carraghénases dans l'analyse structurale

La méthodologie que nous avons employée pour étudier la structure des carraghénanes repose sur la dépolymérisation par des enzymes spécifiques. Les modalités de reconnaissance de ces enzymes constituent un élément clé pour l'analyse structurale des carraghénanes. Elles définissent la taille et la structure des produits libérés. La connaissance de ces modalités de reconnaissance progresse avec l'analyse structurale. En effet, c'est la caractérisation des produits libérés par les carraghénases sur des substrats simples (carraghénanes constitué d'un ou deux types d'unités carrabiose) qui permet de déterminer les produits limites ainsi que le substrat minimum de l'enzyme.

Des études cristallographiques et enzymologiques ont montré que le site actif de la κ -carraghénase était constitué de 6 sous-sites de fixation (-4 à +2) (Potin *et al.*, 1995 ; Michel *et al.*, 2003). Au cours de l'analyse structurale du κ - β - et du κ - ι -carraghénane, il a été démontré que la kappa-carraghénase pouvait accepter des unités β - et ι -carrabiose dans son site actif. Parmi les produits d'hydrolyse du κ - β -carraghénane, des oligo-carraghénanes hybrides possédant un motif β -carrabiose à leur extrémité non réductrice, ont été caractérisés. La κ -carraghénase peut donc accueillir une unité **G** en position +2, à la place d'une unité **G4S** (Knutsen, 1992). De même, des oligo- κ - ι -carraghénanes ont été observés parmi les produits d'hydrolyse du κ - ι -carraghénane, avec des motifs ι -carrabiose au voisinage direct des

extrémités réductrice et/ou non réductrice. L'enzyme peut donc également accueillir une unité **DA2S** dans son sous-site -4, à la place d'une unité **DA** (Guibet *et al.*, 2008).

Notre étude a montré que la κ -carraghénase était capable d'accepter des unités D6S dans son site actif. En effet, la production d'oligo-carraghénane κ - μ - κ par cette enzyme implique qu'une unité D6S puisse se positionner dans le sous-site -4 (**Figure 31**). Ce sous-site, qui est le plus externe, doit être suffisamment vaste pour s'adapter à la conformation en chaise 4C_1 de l'unité D6S. Cette unité induit en effet un « kink », changement brusque de la direction de la chaîne de carraghénane, qui ne semble pas empêcher une fixation productive.

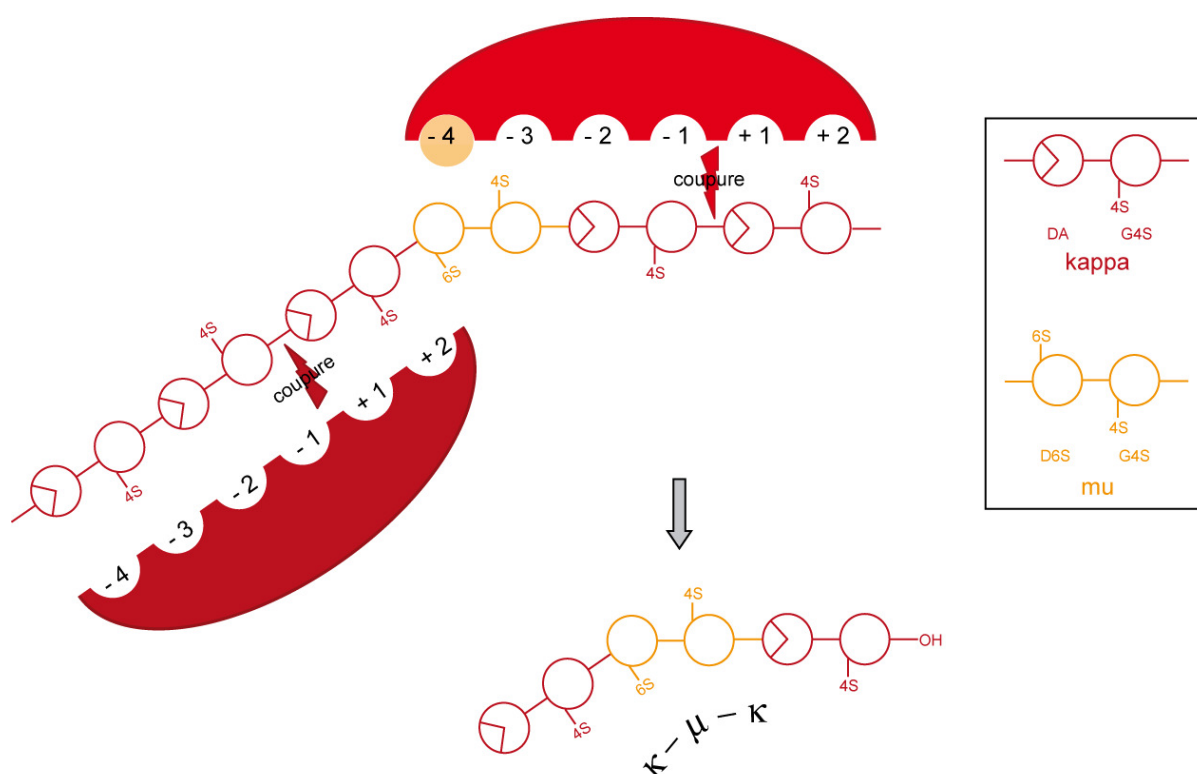


Figure 31 : Positionnement des motifs μ -carrabiose dans le site actif de la κ -carraghénase de *P. carrageenovora* et production de l'oligo-carraghénane κ - μ - κ .

La résolution de la structure tridimensionnelle de la ι -carraghénase d'*A. fortis* a montré que cette enzyme possédait un site actif formé de 8 sous-sites de fixation (Michel *et al.*, 2003). L'hydrolyse du ι - ν -carraghénane d'*E. denticulatum* par cette enzyme a permis de libérer, entre autres, l'oligo-carraghénane ι - ι - ν - ι . Ceci implique donc que l'enzyme est capable d'accepter une unité D2S,6S à la place d'une unité DA2S dans le sous-site -4 (**Figure 32**), malgré un encombrement stérique et un environnement électrostatique tout à fait différent entre ces deux unités. En effet, tandis que les unités DA2S possèdent une conformation en

chaise 1C_4 , celle des unités D2S,6S est en chaise 4C_1 . Cette conformation induit un coude dans la chaîne de carraghénane, dont l'enzyme peut donc s'accommoder, par son sous-site -4. De plus la présence d'un sulfate supplémentaire modifie drastiquement le volume occupé par cette unité, ainsi que sa densité de charge. Ceci peut expliquer que des unités D2S,6S se fixent uniquement dans le sous-site -4 et non dans des sous-sites plus proches du site catalytique de l'enzyme. Le substrat minimum de l'enzyme est donc à reconsidérer : 3 motifs ι-carrabiose consécutifs sont nécessaires pour réaliser une fixation productive. Néanmoins ces 3 motifs ne sont pas une condition suffisante à la coupure, il semble que l'enzyme ne puisse pas accepter n'importe quel motif en quatrième position. Elle accepte un motif ν-carrabiose, mais il n'a pas été démontré qu'elle pouvait accepter des motifs κ- ou μ-carrabiose.

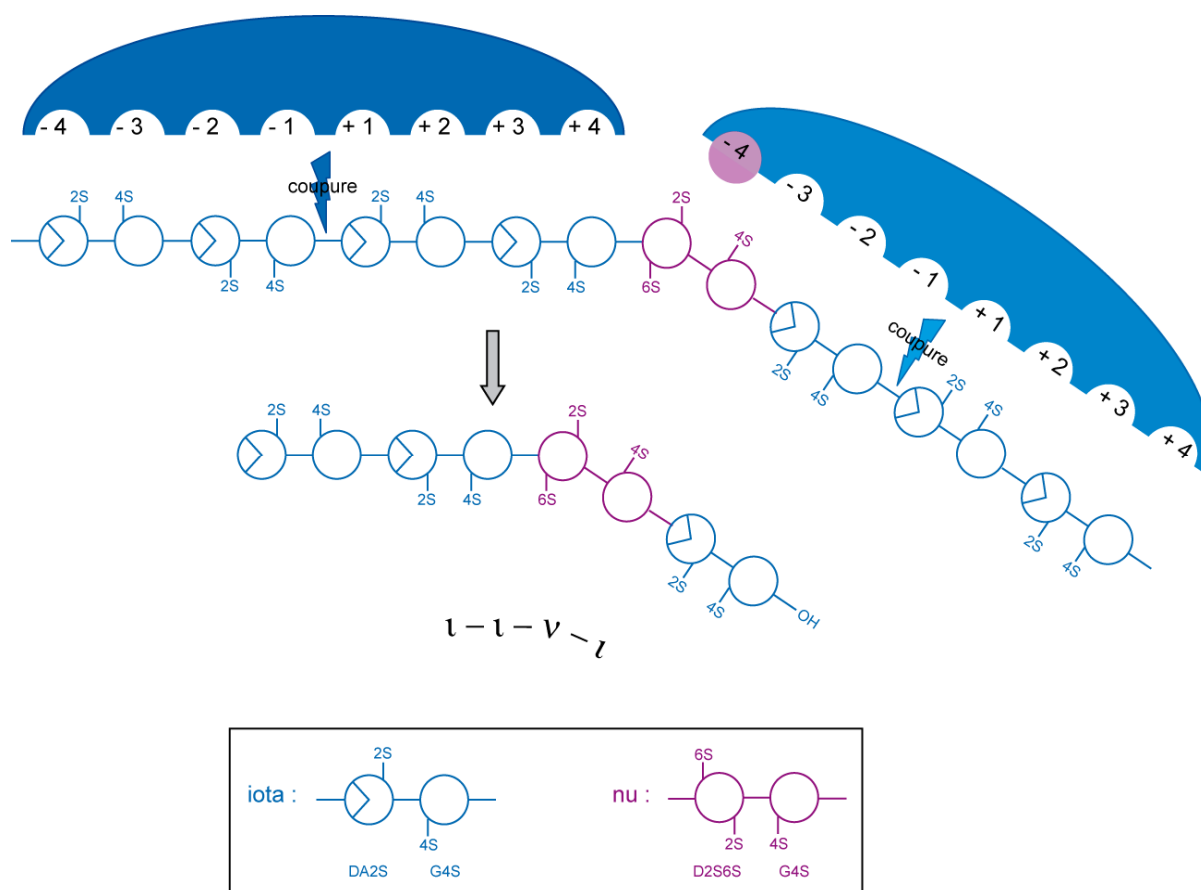


Figure 32 : Positionnement des unités ν-carrabiose dans le site actif de la ι-carraghénase d'*A. fortis* et production de l'oligo-carraghénane ι-ι-ν-ι.

Il semble également que la ι-carraghénase soit capable d'accepter une unité DA, cette fois dans son sous-site -2, situé plus près du site de coupure. Un octasaccharide possédant une unité κ-carrabiose en extrémité réductrice a en effet été observé parmi les produits

d'hydrolyse du carraghénane de *G. furcellatus* (**Figure 33**). Cependant cet oligosaccharide n'a pas été obtenu pur, il n'a donc pas pu être intégralement caractérisé. Les unités DA ne possèdent qu'un groupement sulfate de moins que les unités DA2S. Il leur est donc possible, pour des raisons stériques, de s'insérer à la place de ces dernières dans certains sous-sites de l'enzyme. Les interactions électrostatiques en résultant seraient différentes, mais n'empêcheraient pas une fixation productive.

L'ensemble des informations obtenues sur la flexibilité du site actif de la ι -carraghénase sont résumées dans la **figure 34**.

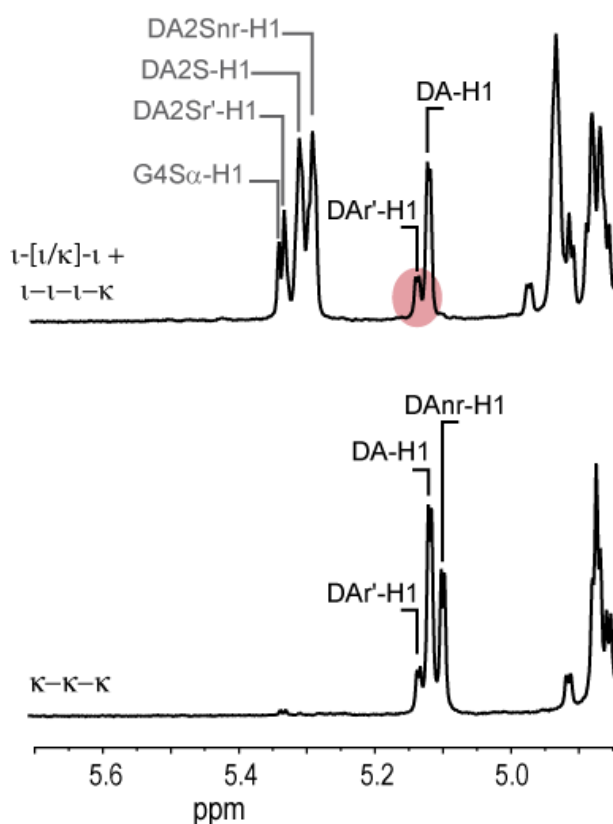


Figure 33 : Région anomérique du spectre ^1H -RMN correspondant à un octa- ι/κ -carraghénane. Le signal anomérique caractéristique d'une unité κ -carrabiose positionnée du côté réducteur est indiqué.

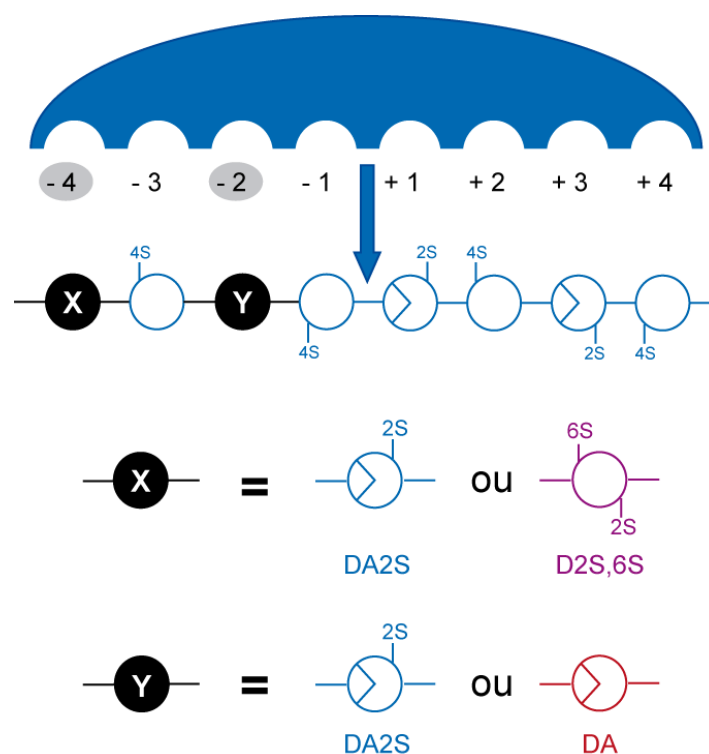


Figure 34 : Modalités de reconnaissance de la ι -carraghénase d'*A. fortis*.

3. Longueur des blocs

Nous avons tenté de décrire la distribution des motifs carrabiose dans les différents carraghénanes analysés. Nous avons notamment mis en évidence des zones κ -riches, hydrolysables par la κ -carraghénase, ainsi que des zones ι -riches, hydrolysables par la ι -carraghénase. Dans ces zones, des blocs des motifs κ - ou ι -carrabiose devraient exister, et la longueur de ces blocs devrait pouvoir être estimée.

Le κ -/ μ -carraghénane de *K. alvarezii* est composé d'environ 10% de motifs μ -carrabiose. Si la répartition de ces motifs était régulière tout au long des chaînes, la longueur moyenne des blocs de motifs κ serait de 9 motifs.

Le profil HPAEC d'hydrolyse à la κ -carraghénase du κ -/ μ -carraghénane de *K. alvarezii* était représentatif de la structure du carraghénane non hydrolysé. Ainsi, connaissant la proportion de motifs μ -carrabiose impliqués dans des groupes de 1 à 3 motifs, nous avons pu déterminer le nombre moyen de « kinks » par molécule (un groupe de motifs μ -carrabiose correspond à un seul « kink »). Nous avons donc pu établir que les blocs de motifs κ ont en réalité une longueur moyenne de 12 motifs.

Dans le cas des ι - ν -carraghénanes, la distribution des différents motifs n'a pas pu être décrite car le polysaccharide n'était pas totalement dégradé par l'enzyme (*cf* Article 3). Ce carraghénane est composé d'environ 75% de motifs ι -carrabiose. En supposant une distribution régulière des motifs ν -carrabiose, la longueur moyenne des blocs de motifs ι -carrabiose est donc d'environ 3 motifs. Cependant cette valeur reste hypothétique. Comme dans le cas du κ - μ -carraghénane cette méthode de calcul surestime le nombre de « kinks », et par conséquent sous-estime la longueur des blocs.

Dans les κ - ι -carraghénanes étudiés, ayant subi un traitement alcalin, le rapport de motifs κ - et ι -carrabiose est de l'ordre de 60/40. Avec ce ratio, la probabilité de trouver des groupes de plus de 2 motifs identiques est en théorie très faible. Cependant, comme dans le cas du κ - μ -carraghénanes, cette méthode de calcul doit certainement sous-estimer la longueur des blocs. Celle-ci pourrait être appréhendée en étudiant la structure des carraghénanes correspondants, avant traitement alcalin.

On connaît maintenant mieux les modalités de reconnaissance des enzymes. La κ -carraghénase nécessite uniquement deux motifs κ -carrabiose consécutifs pour réaliser la coupure, tandis que pour la ι -carraghénase, quatre motifs ι -carrabiose consécutifs sont nécessaires. On pourrait donc déduire, de la structure des oligosaccharides libérés, la structure des fragments qui ont été hydrolysés. Par exemple, on sait que l'oligo-carraghénane κ - μ - μ - κ provient de l'hydrolyse d'un fragment $-\kappa$ - κ - μ - μ - κ - κ -. Après traitement alcalin, ce fragment devient $-\kappa$ - κ - κ - κ - κ - κ -. En déterminant les proportions relatives des oligo- κ - et κ - μ -carraghénanes produits par hydrolyse du carraghénane extrait en milieu neutre, et sachant que la fraction oligosaccharidique représente environ 40% du carraghénane hydrolysé, on pourrait calculer les fréquences d'apparition de blocs d'une longueur donnée dans le carraghénane correspondant, extrait en milieu alcalin (**Figure 35**). Ainsi, la probabilité de rencontrer des blocs d'au moins 6 motifs κ dans les carraghénanes serait de 15% pour *C. chamissoi* et d'environ 11% pour les autres algues. La probabilité de rencontrer des blocs plus longs, constitués d'au moins 8 motifs κ , serait plus faible, de 7% pour *M. laminarioides* et de 3% pour les autres algues. Nous pourrions ainsi mettre en évidence des modalités de distribution des motifs κ différentes selon les algues : pour trois des échantillons analysés, *C. chamissoi*, *S. crispata* et *S. radula*, les motifs κ seraient majoritairement organisés en blocs de 6 motifs maximum. A l'inverse chez *M. laminarioides*, les blocs plus longs, supérieurs à 8 motifs, seraient les plus nombreux.

De la même manière, on sait que l'oligo-carraghénane ι - ι - ν - ι provient de la coupure du fragment ν - ι - ι - ν - ι - ι - ν - ι - ι , qui est transformé, par traitement alcalin, en ν - ι - ι - ν - ι - ι - ν - ι - ι . La fréquence d'apparition de blocs d'au moins 8 motifs est donc d'environ 6%, pour toutes les espèces d'algues étudiées. Cette longueur de bloc de 8 motifs ι serait la longueur critique à partir de laquelle la formation d'hélices devient possible (van de Velde *et al.*, 2002).

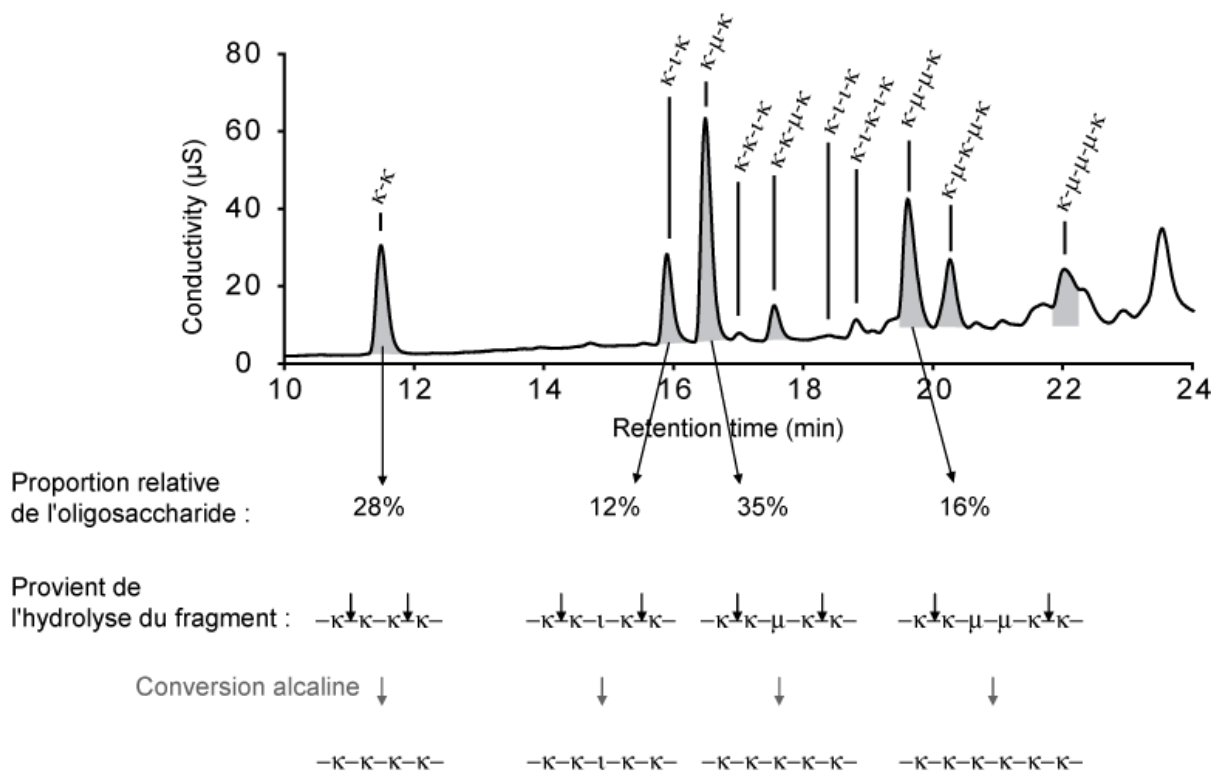


Figure 35 : Proposition de calcul des probabilités de présence de fragments de différentes tailles, à partir du profil HPAEC d'hydrolyse à la κ -carraghénase de *M. laminarioides*.

Pour chaque oligosaccharide, la proportion relative indiquée correspond à l'intensité relative du signal, ramenée à sa charge (nombre de groupements sulfate). Cette proportion relative correspond à la fréquence d'apparition, dans les zones κ -riches, du fragment indiqué au-dessous.

La méthode d'analyse par hydrolyse enzymatique est complémentaire de l'analyse par RMN. Elle est plus sensible, car elle permet de détecter des motifs minoritaires, comme les unités μ - et ν -carrabiose, qui n'étaient pas détectés par RMN. De plus, elle permet d'appréhender la distribution des motifs carrabiose, notamment la taille des blocs. Ce paramètre est d'ailleurs essentiel, car c'est lui qui régit la formation des hélices, et donc la gélification.

4. Origines de la complexité des échantillons de carraghénanes

Les échantillons étudiés étaient extraits de mélanges de différents individus, de générations parfois différentes, et éventuellement collectés à des endroits différents. Les résultats obtenus correspondent donc à une moyenne des molécules extraites. A l'heure actuelle, on ne sait pas si ces molécules représentent une population homogène en termes de composition. Les échantillons étudiés pourraient en effet être composés d'un groupe de molécules riches en κ -carrabiose et d'un groupe riche en ι -carrabiose. Des expériences de fractionnement des chaînes de carraghénanes par chromatographie ionique pourraient être menées pour mettre en évidence l'homogénéité ou l'hétérogénéité des échantillons, comme cela a déjà été réalisé dans le cas des pectines (Guillotin, 2005). S'il s'avérait que les populations de molécules étaient hétérogènes, on pourrait tenter de déterminer l'origine de cette hétérogénéité, en étudiant des carraghénanes extraits séparément de différentes populations d'algues, de différents individus ou de différentes parties de l'algue. D'éventuelles variations saisonnières, ou en fonction de l'âge des individus, de la structure des carraghénanes pourraient également être étudiées.

Pour réaliser ces études, une méthode permettant de traiter, dans un délai raisonnable, un grand nombre d'échantillons, devrait être employée. Des expériences d'hydrolyse enzymatique sur des algues ont été réalisées (Guibet, 2007). Celles-ci ont montré que les oligosaccharides libérés par cette méthode étaient les mêmes que dans le cas d'une hydrolyse sur du carraghénane préalablement extrait, et que leurs proportions relatives étaient similaires. Cette méthode ne nécessite que peu de matériel, quelques milligrammes suffisent à obtenir un résultat exploitable. Cette méthode est également facile à mettre en œuvre, car elle ne nécessite pas de préparation particulière de l'échantillon, elle peut être réalisée sur des algues fraîches, sur des algues congelées ou encore sur des algues séchées et broyées.

5. Conclusions et perspectives

Notre étude structurale a d'abord porté sur des carraghénanes binaires contenant de fortes proportions de précurseurs biosynthétiques μ - ou ν -carrabiose. Elle a confirmé le caractère hybride du κ -/ μ -carraghénane de *K. alvarezii* et du ι -/ ν -carraghénane d'*E. denticulatum*. Dans le cas du κ -/ μ -carraghénane, la distribution des unités μ - et κ -carrabiose a été décrite en détail. Dans ce carraghénane, les unités μ -carrabiose ont une répartition non aléatoire, en groupes de

1 à 3 motifs, et les motifs κ -carrabiose sont organisés en blocs de 12 motifs de longueur moyenne.

Les analyses structurales du κ -/ μ - et du ι -/ ν -carraghénane ont conduit à l'obtention d'un jeu de données spectroscopiques et chromatographiques suffisant pour aborder l'étude structurale de carraghénanes plus complexes, composés des 4 types de motifs, κ -, ι -, μ - et ν -carrabiose. Nous avons ainsi confirmé l'hybridité des carraghénanes extraits de 4 algues rouges, *C. chamissoi*, *M. laminarioides*, *S. crispata* et *S. radula*. Nous avons également apporté des éléments d'information concernant la distribution des différents motifs dans ces carraghénanes. Les motifs μ -carrabiose sont majoritairement localisés dans des zones κ -riches, tandis que les unités ν -carrabiose se retrouvent majoritairement dans des zones ι -riches. De plus, nous avons pu mettre en évidence des modalités de distribution différentes, pour des carraghénanes de composition similaires. Ces différents types d'organisation seraient à corrélérer avec les propriétés physico-chimiques des carraghénanes correspondants.

L'observation minutieuse des spectres ^1H -RMN des oligo- κ -/ μ -carraghénanes a permis de démontrer que la RMN peut apporter bien plus d'informations que simplement la composition des carraghénanes. Elle permet également d'obtenir des informations sur la distribution de certains motifs, comme les μ -carrabiose. Cependant la RMN présente une sensibilité limitée, elle ne permet pas toujours de détecter ou de quantifier les constituants minoritaires. L'hydrolyse enzymatique, à l'inverse, est très performante pour la détection des constituants très peu abondants. De plus, c'est l'une des seules méthodes qui permet d'appréhender l'organisation des différents motifs de répétition dans les chaînes de carraghénane, avec une grande précision.

Pour que l'outil enzymatique offre le maximum de ses possibilités, il est nécessaire d'utiliser des enzymes adaptées. Par exemple, l'utilisation de la ι -carraghénase d'*A. fortis* n'a pas permis une dégradation très efficace des carraghénanes étudiés, à cause de son site de fixation très spécifique. L'emploi d'une autre ι -carraghénase, capable de produire des oligosaccharides plus petits, devrait permettre de faciliter l'analyse structurale des carraghénanes riches en ι -carrabiose. Plusieurs souches bactériennes montrant une activité ι -carraghénase, ont permis de libérer des oligosaccharides néo- ι -carrabiose et néo- ι -carratétraose (Bellion, 1982). Ces enzymes pourraient constituer un nouvel outil pour l'analyse structurale. D'autres enzymes, possédant des sites de fixation différents, pourraient apporter des informations complémentaires, notamment pour le calcul des longueurs de blocs.

Par exemple la κ -carraghénase de *Z. galactanivorans*, qui produit le néo- κ -carratetraose et le néo- κ -carrahexaose, pourrait être utilisée.

Quatrième partie :

Matériel et méthodes

Quatrième partie : Matériel et méthodes

1. Extraction des carraghénanes

Les carraghénanes utilisés ont été extraits des algues cultivées *Kappaphycus alvarezii* et *Eucheuma denticulatum*, et des espèces sauvages *Ahnfeltiopsis furcellata*, *Mazzaella laminarioides*, *Sarcothalia crispata*, *Sarcothalia radula*, *Chondracanthus chamissoi*. Pour chaque algue, deux extractions étaient réalisées, l'une en milieu neutre et l'autre en milieu alcalin.

Avant utilisation, tous les carraghénanes ont été dialysés dans des membranes de seuil de coupure 6-8 kDa (MWCO, Spectra/Por®) contre de l'eau ultrapure puis lyophilisés.

1.1. Extraction en milieu neutre

Des fragments d'algues séchées (150 g) ont été plongés dans 16 L d'eau distillée et mis à chauffer à 60°C sous agitation pendant 2 h. Le mélange était ensuite finement broyé pendant 2 min (Ultra Turrax T50 basic, Ika-Werke, 10 000 tours/min) et remis à chauffer à 60°C pendant 2 h. De la terre filtrante (silice, 150 g) était ajoutée au mélange et le tout était filtré sur Büchner. Le filtrat était lentement versé dans un mélange isopropanol (45 L) KCl (140 g/L, 0,5 L) sous agitation. Ce mélange était ensuite filtré sur toile de nylon, repris dans 5 L d'isopropanol, et filtré de nouveau. Le coagulum obtenu a finalement été égoutté, mis à sécher à l'étuve à 60°C pendant 15 h et broyé (broyeur Retsch, 0,5 mm).

1.2. Extraction alcaline

Des fragments d'algues séchées (150 g) ont été plongés dans 11 L de solution contenant 4 g/L de soude et 35 g/L de NaCl. Le mélange a été mis à chauffer à 80°C sous agitation pendant 3 h. Le mélange était ensuite finement broyé pendant 2 min (Ultra Turrax T50 basic, Ika-Werke, 10 000 tours/min) et remis à chauffer à 80°C pendant 3 h. Cinq litres (5 L) de solution de NaCl 35 g/L ont été ajoutés et le mélange était remis à chauffer pour atteindre la température de 80°C. La suite de l'extraction identique à l'extraction en milieu neutre.

2. 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 (Michel *et al.*, 1999 ; Michel *et al.*, 2000). Des culots obtenus après centrifugation 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'élution des carraghénases a ensuite été réalisée par un gradient linéaire d'imidazole (100-300 mM) à un débit de 1 mL/min sur 60 min. Le début de l'élution 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 (6-8 kDa) contre le tampon HEPES (2 fois 3 L pendant 15 h à 4°C). L'élution 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.

3. Conditions d'hydrolyse

3.1. Pour l'analyse

Des solutions à 0,2% de carraghénane ont été préparées dans une solution de NaNO₃ à 0,1 M, à un pH de 7,5. Les hydrolyses ont été réalisées à 40°C par ajout de 0,18 µg de κ - et/ou de ι -carraghénase par mL de solution. Des prélèvements ont été effectués de manière

régulière, et pour ces échantillons, l'hydrolyse a été arrêtée par chauffage à 100°C pendant 15 min. Après 24 h d'hydrolyse, 0,09 µg de ι-carraghénase ont de nouveau été ajoutés, et l'hydrolyse a été stoppée après 48 h.

3.2. Pour la purification d'oligo-carraghénanes

Les hydrolyses ont été réalisées sur 500 mL de solutions à 0,5% de carraghénane dans NaNO₃ à 0,1 M, à un pH de 7,5. Pour l'obtention d'oligo-κ/μ-carraghénanes, le carraghénane était extrait de *Kappaphycus alvarezii* en milieu neutre et l'hydrolyse était réalisée par la κ-carraghénase (90 µg). Pour l'obtention d'oligo-ι/ν-carraghénanes, le carraghénane était extrait d'*Eucheuma denticulatum* en milieu neutre et l'hydrolyse était réalisée par la ι-carraghénase (90 µg). Pour la production d'oligo-ι/κ-carraghénanes, le carraghénane était extrait de *Gymnogongrus furcellatus* en milieu alcalin et l'hydrolyse était réalisée par la ι-carraghénase (90 µg). Les hydrolysats étaient reconcentrés à l'évaporateur rotatif avant d'être purifiés par chromatographie d'exclusion de taille.

3.3. Hydrolyse enzymatique des oligo-κ/μ-carraghénanes

Les oligosaccharides purifiés ont été dissous dans 100 µL de NaNO₃ 0,1 M à pH 7,5 et l'hydrolyse a été réalisée par incubation en présence de κ- ou de ι-carraghénase en excès à 40°C pendant 24 h.

4. Purification des oligo-carraghénanes

4.1. HPSEC préparative

Les hydrolysats reconcentrés (2,5 mL, filtrés 0,22 µm) ont été injectés par un injecteur automatique 819 (Gilson) sur des colonnes SuperdexTM 30 préparatives montées en série (Amersham Biosciences, 600 x 26 mm). Pour la purification des oligo-κ/μ-, ι/ν- et ι/κ-carraghénanes, le nombre de colonnes utilisées étaient respectivement deux, une et trois. La séparation des oligos était réalisée à 20°C en mode isocratique (pompe 306, Gilson). Le tampon d'élution était le carbonate d'ammonium 50 mM et le débit était de 1,5 mL/min. Le logiciel UniPoint de Gilson a été utilisé pour l'acquisition et le traitement des données. Les oligosaccharides étaient détectés par un réfractomètre (Spectra system RI-150, Thermo

Separation Products) et recueillis en différentes fractions par un collecteur automatique (Liquid Handler 215, Gilson) La composition des différentes fractions était déterminée par HPAEC, et les fractions de même composition étaient regroupées puis lyophilisées. L'utilisation de carbonate d'ammonium comme éluant a permis d'éviter l'étape de dialyse.

4.2. *HPAEC semi-préparative*

Les oligosaccharides impurs après l'étape de purification par HPSEC ont été repris dans de l'eau ultrapure (0,3% (p/v) environ, filtrés 0.22 μ m), puis injectés (200 μ L, 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 oligo- ι / ν -carraghénanes a été réalisée par un gradient de soude, à partir de solutions d'eau ultrapure (phase mobile A) et de soude 288 mM (phase mobile B), à un débit de 1 mL/min ; les gradients étaient spécifiques à chaque oligosaccharide.

Pour les oligo- κ / μ -carraghénanes de DP6 et DP8, le gradient était : 0–11 min : 25–43.4% B, 11–11.1 min : 43.4–25% B, 11.1–16.1 min : 25% B. Les oligo-carraghénanes κ - μ - κ , κ - κ - μ - κ et κ - μ - μ - κ étaient collectés entre 7.5 et 9 min, 10.8 et 11.8 min et entre 12 et 12.5 min respectivement. Pour les oligo- κ / μ -carraghénanes de DP10, le gradient était : 0–11 min : 25–43.4% B, 11–11.1 min : 43.4–25% B, 11.1–18.1 min : 25% B. Les oligo-carraghénanes κ - μ - κ - μ - κ et κ - μ - μ - μ - κ étaient collectés entre 10 et 11 min et entre 14 et 15 min respectivement. Pour l'oligo- ι / ν -carraghénane de DP 8 le gradient était : 0-13 min: 36-60% B ; 13-15 min: 60-100% B, 15-15,1 min: 100-36% B, 15,1-23 min: 36% B. L'oligo- ι / ν -carraghénane de DP 8 était collecté entre 9 et 10 min.

Pour l'oligo- ι / ν -carraghénane de DP 10 le programme était : 0-16 min: 41-69% B ; 16-18 min: 69-100% B, 18-18,1 min: 100-41% B, 18,1-24 min: 41% B. L'oligo- ι / ν -carraghénane de DP 10 était collecté entre 10 et 11 min. Pour l'oligo- ι / ν -carraghénane de DP 12 le programme était : 0-10 min: 50-54% B ; 10-13 min: 54-100% B, 13-13,1 min: 100-50% B, 13,1-19 min: 50% B. L'oligo- ι / ν -carraghénane de DP 12 était collecté entre 9 et 10 min.

Le logiciel utilisé pour l'acquisition et le traitement des données est le logiciel Chromeleon-Peak Net. 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.

Les oligo-carraghénanes collectés étaient lyophilisés avant d'être analysés par RMN. Afin d'éviter la dégradation des oligo-carraghénanes lors de cette étape, il a été nécessaire

d'ajouter aux solutions collectées du carbonate d'ammonium, de manière à obtenir une concentration finale de 20 mM.

5. Purification des Fractions Résistantes aux enzymes

Les fractions résistantes aux enzymes ont été séparées des oligosaccharides par filtration dans un système Amicon équipé d'une membrane de seuil de coupure 50 kDa. Les rétentats, contenant les fractions résistantes, ont été lavés 2 fois avec 10 mL d'eau ultrapure, puis lyophilisés.

6. Analyses des carraghénanes et des hydrolysats

6.1. Dosage des extrémités réductrices

Cette méthode permet de suivre l'avancement de l'hydrolyse en mesurant la quantité d'extrémités réductrices générées par coupure enzymatique au cours du temps. A 100 μ L du milieu réactionnel, éventuellement dilué, ont été ajoutés 900 μ L de ferricyanide 1X. Les échantillons ont été chauffés à 100°C pendant 10 min, pour permettre la réaction d'oxydo-réduction des extrémités réductrices avec le ferricyanide (Kidby & Davidson, 1973). La réduction du cation métallique, donc la décoloration du milieu, a été suivie par une mesure de la DO à 420 nm, à température ambiante. Le glucose a été utilisé comme référence.

6.2. HPAEC analytique

Les échantillons (20 μ l, filtré 0,22 μ m) ont été injectés (injecteur automatique 100XR de Thermo Separation Products) 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 ultrapure (éluant A) et de soude 288 mM (éluant B), à un débit de 0,5 mL/min (Pompe ICS3000, Dionex) Les programmes étaient spécifiques à chaque type de carraghénane :

Pour le κ -carraghénane : 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.

Pour le ι -carraghénane : 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.

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

6.3. *Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE)*

Le marquage des extrémités réductrices par le 2-aminoacridone (AMAC) a été réalisé selon le protocole de Goubet (Goubet et al., 2002). A environ 1 mg d'oligo- κ/μ -carraghénanes purifiés ont été ajoutés 50 μ L de solution de NaCNBH₃ 1 M dans l'eau et 50 μ L de solution d'AMAC 0,1 M dans un mélange acide acétique/diméthylsulfoxyde (3/17, v/v). La réaction a été réalisée à 37°C, à l'obscurité, pendant 15 h.

Afin d'éliminer les co-produits de cette réaction, une purification a été réalisée par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 27% (gel de concentration 6%) de dimensions 1,5 x 140 x 140 mm, à 40 mA. Les bandes fluorescentes correspondant aux oligosaccharides marqués ont été excisées puis broyées ; les oligosaccharides ont été récupérés par diffusion dans de l'eau ultrapure, puis lyophilisés.

Les oligosaccharides marqués purifiés et ont été de nouveau hydrolysés par la κ -carraghénase, à 37°C pendant 48 h, dans les conditions décrites précédemment. Ils ont ensuite été analysés par migration sur gel C-PAGE (gel de concentration 6%, gel de séparation 27%, épaisseur 0,75 mm, dimensions 80 x 85 mm) à 20 mA pendant 30 min. Les bandes d'oligosaccharides ont été visualisées sous UV à 302 nm.

6.4. *Résonance Magnétique Nucléaire*

Les échantillons de carraghénanes (2 g) ont été dépolymérisés par broyage pendant 15 h à la fréquence maximale (30 Hz) d'un broyeur à billes MM200 (RETSCH). Ils ont ensuite été échangés deux fois dans D₂O, lyophilisés et redissous dans D₂O, à une concentration d'environ 10 mg/mL. Les oligosaccharides lyophilisés ont été échangés deux fois dans D₂O, lyophilisés et redissous dans D₂O, à une concentration d'environ 5 mg/mL.

Les études ont été menées sur un spectromètre BRUKER Avance DRX 500 équipé d'une sonde inverse 5 mm triple résonance TXI ¹H/¹³C/³¹P avec gradient Z. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport à la référence externe TSP (trimethylsilylpropionic acid). Le TSP a un déplacement chimique de $\delta = -0,18$ ppm (¹³C) et

$\delta = -0,017$ ppm (^1H), par comparaison à la référence DSS (diméthyl-silapentane-sulfonate) recommandée par l'IUPAC, il peut donc être utilisé comme référence.

6.4.1. Caractérisation par RMN des carraghénanes et des fractions résistantes aux enzymes

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.

6.4.2. Caractérisation par RMN des oligo-carraghénanes

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.

7. Conversion alcaline

7.1. Carraghénanes de *K. alvarezii* et *E. denticulatum*

Une solution de carraghénane, extrait en milieu neutre de *K. alvarezii* ou *E. denticulatum*, dans l'eau ultrapure, était préparée (1%, 5 mL). Du borohydrure de sodium (NaBH_4 , 5 mg) était ajouté et le mélange était stocké pendant 24 h à température ambiante. De la soude 2 M était ajoutée (5 mL), en même temps que 2,5 mg de NaBH_4 . Le mélange était réparti dans 10 tubes en plastique, fermés. La réaction était réalisée dans un bain-marie à 80°C pendant 6 h. Les tubes étaient prélevés à différents temps et la réaction arrêtée par trempage (dans la glace) et neutralisation. La neutralisation était effectuée par ajout de 1 mL de tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8 et le pH était ajusté par ajout d'acide chlorhydrique 1 M.

Pour l'analyse par chromatographie, le volume des échantillons était ajusté à 5 mL par ajout d'eau ultrapure. Une solution de l'enzyme correspondante (κ -carraghénase pour *K. alvarezii* et ι -carraghénase pour *E. denticulatum*) était ajoutée (10 μL). La réaction était réalisée à 40°C pendant 48 h. Les échantillons étaient ensuite filtrés (0,22 μm) et analysés par HPAEC comme décrit précédemment.

Pour l'analyse par RMN, les échantillons neutralisés étaient dialysés contre de l'eau ultrapure, à l'aide de membranes de seuil de coupure 6-8000 Da, avant d'être lyophilisés et échangés 2 fois dans D_2O . Les échantillons redissous dans environ 750 μL de D_2O étaient analysés par RMN à 70°C comme décrit précédemment.

7.2. *Carraghénane de M. laminarioides*

Les échantillons de carraghénanes étaient échangés deux fois dans D₂O, puis solubilisés (10 mg/mL) dans D₂O. Les échantillons (600 µL) étaient introduits dans le spectromètre de RMN, équilibré à 80°C. Après enregistrement d'un premier spectre, 60 µL d'une solution de NaOD dans D₂O (0.1M) étaient ajoutés. Des spectres étaient alors enregistrés en continu, comme décrit précédemment, avec un temps d'acquisition de 4,2 min par spectre.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Ackloo, S., Terlouw, J. K., Ruttink, P. J. A. and Burgers, P. C. (2001). Analysis of carrageenans by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. I. Kappa-carrageenans. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **15**, 1152-1159.

Agrawal, P. K. (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*. **31**, 3307-3330.

Anderson, N. S., Campbell, J. W., Harding, M. M., Rees, D. A. and Samuel, J. W. B. (1969). X-Ray diffraction studies of polysaccharide sulphates - Double helix models for kappa- and lambda-carrageenans. *Journal of Molecular Biology*. **45**, 85-99.

Anderson, N. S., Dolan, T. C. S. and Rees, D. A. (1973). Carrageenans. 7. Polysaccharides from *Eucheuma Spinosum* and *Eucheuma Cottonii* - Covalent structure of iota-carrageenan. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1*, 2173-2176.

Antonopoulos, A., Favetta, P., Helbert, W. and Lafosse, M. (2004). Isolation of kappa-carrageenan oligosaccharides using ion-pair liquid chromatography - Characterisation by electrospray ionisation mass spectrometry in positive-ion mode. *Carbohydrate Research*. **339**, 1301-1309.

Antonopoulos, A., Favetta, P., Helbert, W. and Lafosse, M. (2007). On-line liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry for kappa-carrageenan oligosaccharides with a porous graphitic carbon column. *Journal of Chromatography A*. **1147**, 37-41.

Antonopoulos, A., Hardouin, J., Favetta, P., Helbert, W., Delmas, A. F. and Lafosse, M. (2005). 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.

Armisen (2000). Agar. Handbook of hydrocolloids, *Woodhead Publishing* 21-40.

Barbeyron, T., Gérard, 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). Iota-carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of kappa-carrageenases. *Journal of Biological Chemistry*. **275**, 35499-35505.

Bellion, C. (1982) Utilisation d'enzymes et de spectroscopie de RMN ¹³C pour la caractérisation des carraghénanes. Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse.

- 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.
- 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*.
- Bellion, C., Hamer, G. K. and Yaphe, W.** (1982). The degradation of *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottonii* carrageenans by iota-carrageenases and kappa-carrageenases from marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. **28**, 874-880.
- Bhattacharjee, S. S., Yaphe, W. and Hamer, G. K.** (1978). ^{13}C -NMR spectroscopic analysis of agar, kappa-carrageenan and iota-carrageenan. *Carbohydrate Research*. **60**, C1-C3.
- Bixler, H. J.** (1996). Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan. *Hydrobiologia*. **326-327**, 35-57.
- Bixler, H. J., 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.
- Bouarab, K., Potin, P., Correa, J. and Kloareg, B.** (1999). Sulfated oligosaccharides mediate the interaction between a marine red alga and its green algal pathogenic endophyte. *Plant Cell*. **11**, 1635-1650.
- Buck, C. B., Thompson, C. D., Roberts, J. N., Müller, M., Lowy, D. R. and Schiller, J. T.** (2006). Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *PLoS Pathogens*. **2**, 671-680.
- 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.

Chai, W., Luo, J., Lim, C. K. and Lawson, A. M. (1998). Characterization of heparin oligosaccharide mixtures as ammonium salts using electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. **70**, 2060-2066.

Chiovitti, A., Bacic, A., Craik, D. J., Kraft, G. T. and Liao, M.-L. (2004). A nearly idealized 6'-O-methylated iota-carrageenan from the Australian red alga *Clavicornium ovatum* (Acrotylaceae, Gigartinales). *Carbohydrate Research*. **339**, 1459-1466.

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., Kerin, B. F. and Mazerolle, R. (1999). Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycological Research*. **47**, 167-188.

Ciancia, M., Matulewicz, M. a. C. and Cerezo, A. S. (1997). Alkaline modification of carrageenans. Part III. Use of mild alkaline media and high ionic strengths. *Carbohydrate Polymers*. **32**, 293-295.

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. (1995) Développement d'enzymes recombinants issus des bactéries marines P. carrageenovora et SW5 pour la production d'oligo-fucoïdanes et d'oligo-lambda-carraghénanes. Thèse de doctorat de l'Université de Compiègne.

Craigie, J. S. (1990). Cell walls. Biology of the red algae. *K. M. Cole and R. G. Sheath, Cambridge University Press* 221-258.

Craigie, J. S. and Wong, K. F. (1978). Carrageenan biosynthesis. *International seaweed symposium*.

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. J., Stanley, N. F. and Stancioff, D. J. (1977). Seasonal and reproductive aspects of plant chemistry, and iota-carrageenan from floridian *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. L. and Bell, R. A. (1979). Pyruvic acid derivative of a carrageenan from a marine red alga (*Petrocelis* species). *Carbohydrate Research*. **71**, C1-C4.

Dodgson, K. S. and Price, R. G. (1962). A note on determination of ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochemical Journal*. **84**, 106-&.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. 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., Lähteenmäki, P., Massai, R., Mishell, D. R., Phillips, D. M. and Salvatierra, A. M. (1997). Colposcopic evaluation of a vaginal gel formulation of iota-carrageenan. *Contraception*. **56**, 387-389.

Estevez, J. M., Ciancia, M. and Cerezo, A. S. (2004). The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. *Carbohydrate Research*. **339**, 2575-2592.

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 applications of extracts from the New Zealand red seaweed, *Gigartina atropurpurea*. *Food Hydrocolloids*. **17**, 129-139.

Falshaw, R. and Furneaux, R. H. (1994). Carrageenan from the tetrasporic stage of *Gigartina decipiens* (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydrate Research*. **252**, 171-182.

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.

Farias, W. R. L., Valente, A. P., Pereira, M. S. and Mourao, P. A. S. (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.

Fredericq, S., Hommersand, M. H. and Freshwater, D. W. (1996). The molecular systematics of some agar- and carrageenan-containing marine red algae based on rbcL sequence analysis. *Hydrobiologia*. **326-327**, 125-135.

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.

Fukuyama, Y., Nakaya, S., Yamazaki, Y. and Tanaka, K. (2008). Ionic liquid matrixes optimized for MALDI-MS of sulfated/sialylated/neutral oligosaccharides and glycopeptides. *Analytical Chemistry*. **80**, 2171-2179.

Genicot, S., Kloareg, B., Potin, P., Rudolf, B., De Ruiter, G. A., Penninkhof, B. and Richard, O. (2004). Sulfohydrolases, corresponding amino acid and nucleotide sequences, sulfohydrolase preparations, processes and products thereof.

Genicot-Joncour, S., Poinas, A., Richard, O., Potin, P., Rudolph, B., Kloareg, B. and Helbert, W. (2009). The cyclization of the 3,6-anhydro-galactose ring of iota-carrageenan is catalyzed by two D-galactose-2,6-sulfurylases in the red alga *Chondrus crispus*. *Plant Physiol.*, pp.109.144329.

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.

Goulard, F., Diouris, M., Deslandes, E. and Floc'h, J. Y. (1999). Nucleotides, nucleoside sugars and UDP-glucose-4-epimerase activity in the iota-carrageenophytes *Solieria chordalis* and *Calliblepharis jubata* (Rhodophyceae). *European Journal of Phycology*. **34**, 21-25.

Greer, C. W. (1984) A study of carrageenases from marine bacteria.

Greer, C. W., 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.

Greer, C. W., Shomer, I., Goldstein, M. E. and Yaphe, W. (1984). Analysis of carrageenan from *Hypnea musciformis* by using kappa- and iota-carrageenases and ¹³C-NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*. **129**, 189-196.

Greer, C. W. and Yaphe, W. (1984a). Characterization 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. W. 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 spectroscopy. *Botanica Marina*. **27**, 479-484.

Greer, C. W. and Yaphe, W. (1984c). Purification and properties of iota-carrageenase from a marine bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*. **30**, 1500-1506.

Guibet, M. (2007) Analyse structurale des carraghénanes par hydrolyse enzymatique. Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale.

Guibet, M., Boulenguer, P., Mazoyer, J., Kervarec, N., Antonopoulos, A., Lafosse, M. and Helbert, W. (2008). Composition and distribution of carrabiose moieties in hybrid kappa-/iota-carrageenans using carrageenases. *Biomacromolecules*. **9**, 408-415.

Guibet, M., Colin, S., Barbeyron, T., Genicot, S., Kloareg, B., Michel, G. and Helbert, W. (2007). Degradation of lambda-carrageenan by *Pseudoalteromonas carrageenovora* lambda-carrageenase: a new family of glycoside hydrolases unrelated to kappa- and iota-carrageenases. *Biochemical Journal*. **404**, 105-114.

Guibet, M., Kervarec, N., Genicot, S., Chevotot, Y. and Helbert, W. (2006). Complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of *Gigartina skottsbergii* lambda-carrageenan using carrabiose oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate Research*. **341**, 1859-1869.

Guillotin, S. (2005) Studies on the intra- and intermolecular distribution of substituents in commercial pectins.

Haijin, M., Xiaolu, J. and Huashi, G. (2003). A kappa-carrageenan derived oligosaccharide prepared by enzymatic degradation containing anti-tumor activity. *Journal of Applied Phycology*. **15**, 297-303.

Hamer, G. K., Bhattacharjee, S. S. and Yaphe, W. (1977). Analysis of the enzymic hydrolysis products of agarose by ^{13}C -NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*. **54**, C7-C10.

Harris, M. J. and Turvey, J. R. (1970). Sulphates of monosaccharides and derivatives: Part IX. The conformations of glycoside sulphates in solution determined by NMR 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.

Hjerde, T., Smidsrod, O., Stokke, B. T. and Christensen, B. E. (1998). Acid hydrolysis of kappa- and iota-carrageenan in the disordered and ordered conformations: characterization of partially hydrolyzed samples and single-stranded oligomers released from the ordered structures. *Macromolecules*. **31**, 1842-1851.

Hoffman, R. (1993). Carrageenans inhibit growth-factor binding. *Biochemical Journal*. **289**, 331-334.

Izumi, K. (1973). NMR spectra of some 3,6-anhydro-galactose derivatives. *Carbohydrate Research*. **27**, 278-281.

Johnston, K. H. and McCandless, E. L. (1973). Enzymic hydrolysis of the potassium chloride soluble fraction of carrageenan : properties of lambda-carrageenases from *Pseudomonas carrageenovora*. *Canadian Journal of Microbiology*. **19**, 779-788.

Juhasz, P. and Biemann, K. (1994). Mass spectrometric molecular-weight determination of highly acidic compounds of biological significance via their complexes with basic

polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**, 4333-4337.

Kawasaki, N., Haishima, Y., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S. and Hayakawa, T. (2001). Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin. *Glycobiology*. **11**, 1043-1049.

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. *Oceanography and marine biology annual review*. **26**, 259-315.

Knutsen, S. H. (1992) Isolation and analysis of red algal galactans. Thèse de doctorat de l'Université de Trondheim.

Knutsen, S. H. and Grasdalen, H. (1987). Characterization of water-extractable polysaccharides from norwegian *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour. (Gigartinales, Rhodophyceae) by IR and NMR spectroscopy. *Botanica Marina*. **30**, 497-505.

Knutsen, S. H. and Grasdalen, H. (1992a). Analysis of carrageenans by enzymic degradation, gel filtration and ¹H-NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*. **19**, 199-210.

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.

Knutsen, S. H., Murano, E., D'Amato, M., Toffanin, R., Rizzo, R. and Paoletti, S. (1995). Modified procedures for extraction and analysis of carrageenan applied to the red alga *Hypnea musciformis*. *Journal of Applied Phycology*. **7**, 565-576.

Knutsen, S. H., Myslabodski, D. E. and Grasdalen, H. (1990). Characterization of carrageenan fractions from Norwegian *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour. by ¹H-NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*. **206**, 367-372.

Knutsen, S. H., Myslabodski, D. E., Larsen, B. and Usov, A. I. (1994). A modified system of nomenclature of red algal galactans. *Botanica Marina*. **37**.

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 iota- and kappa-carrageenase. *Carbohydrate Research*. **331**, 101-106.

Kolender, A. A., Pujol, C. A., Damonte, E. B., Matulewicz, M. C. and Cerezo, A. S. (1997). The system of sulfated galactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: Structures, antihyperlipidemic and anticoagulant properties. *Carbohydrate Research*. **304**, 53-60.

La Claire, J. W. and Dawes, C. J. (1976). An autoradiographic and histochemical localization of sulfated polysaccharides in *Euclima nudum* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*. **12**, 368-375.

- Lawson, C. J. and Rees, D. A.** (1970). An enzyme for the metabolic control of polysaccharide conformation and function. **227**, 392-393.
- Lemoine, M., Collen, P. N. and Helbert, W.** (2009). Physical state of kappa-carrageenan modulates the mode of action of kappa-carrageenase from *Pseudoalteromonas carrageenovora*. *Biochemical Journal*. **419**, 545-553.
- Lemonnier-Le Penhuizic, C., Chatelet, C., Kloareg, B. and Potin, P.** (2001). Carrageenan oligosaccharides enhance stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* var. italica. *Plant Science*. **160**, 1211-1220.
- Manley, S. L. and Burns, D. J.** (1991). Formation of nucleoside diphosphate monosaccharides (NDP-sugars) by the agarophyte *Pterocladia Capillacea* (Rhodophyceae). *Journal of Phycology*. **27**, 702-709.
- McCandless, E. L. and Craigie, J. S.** (1979). Sulfated polysaccharides in red and brown algae. *Annual reviews in plant physiology*. **30**, 41-53.
- McCandless, E. L., Craigie, J. S. and Walter, J. A.** (1973). Carrageenans in the gametophytic and sporophytic stages of *Chondrus crispus*. *Planta*. **112**, 201-212.
- McCandless, E. L., West, J. A. and Guiry, M. D.** (1982). Carrageenan patterns in the Phylloporaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. **10**, 275-&.
- McCandless, E. L., West, J. A. and Guiry, M. D.** (1983). Carrageenan patterns in the Gigartinaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. **11**, 175-182.
- McCarter, J. D. and Withers, S. G.** (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*. **4**, 885-892.
- McLean, M. and Williamson, F.** (1979a). Glycosulphatase from *Pseudomonas carrageenovora*. Purification and some properties. *Eur J Biochem*. **101**, 497-505.
- McLean, M. and Williamson, F.** (1979b). Kappa-carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora*. *Eur J Biochem*. **93**, 553-558.
- McLean, M. W. and Williamson, F. B.** (1981). Neocarratetraose 4-O-monosulphate beta-hydrolase from *Pseudomonas carrageenovora*. *Eur J Biochem*. **113**, 447-456.
- Michel, G., Barbeyron, T., Flament, D., Vernet, T., Kloareg, B. and Dideberg, O.** (1999). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the kappa-carrageenase from *Pseudoalteromonas carrageenovora*. *Acta Crystallographica Section D*. **55**, 918-920.
- Michel, G., Chantalat, L., Duee, E., Barbeyron, T., Henrissat, B., Kloareg, B. and Dideberg, O.** (2001a). 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., Chantalat, L., Fanchon, E., Henrissat, B., Kloareg, B. and Dideberg, O. (2001b). The iota-carrageenase of *Alteromonas fortis* - A beta-helix fold-containing enzyme for the degradation of a highly polyanionic polysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*. **276**, 40202-40209.

Michel, G., Flament, D., Barbeyron, T., Vernet, T., Kloareg, B. and Dideberg, O. (2000). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the iota-carrageenase from *Alteromonas fortis*. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*. **56**, 766-768.

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.

Miller, I. J. (2003). The chemical structure of galactans from some New Zealand red algae. *Botanica Marina*. **46**, 572-577.

Mollion, J., Moreau, S. and Christiaen, D. (1986). Isolation of a new type of carrageenan from *Rissoella Verruculosa* (Bert) J Ag (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*. **19**, 1070-1074.

Mori, J. (1943). Carbohydrase acting on the mucilage of *Chondrus ocellatus* II. *Journal of the agricultural chemical society of Japan*. **19**, 740-742.

Morris, E. R., Rees, D. A. and Robinson, G. (1980). Cation-specific aggregation of carrageenan helices: Domain model of polymer gel structure. *Journal of Molecular Biology*. **138**, 349-362.

Nonami, H., Fukui, S. and Erra-Balsells, R. (1997). Beta-carboline alkaloids as matrices for matrix-assisted ultraviolet laser desorption time-of-flight mass spectrometry of proteins and sulfated oligosaccharides: a comparative study using phenylcarbonyl compounds, carbazoles and classical matrices. *Journal of Mass Spectrometry*. **32**, 287-296.

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.

Nyvall-Collen, P., Lemoine, M., Daniellou, R., Guégan, J.-P., Paoletti, S. and Helbert, W. (2009). Enzymatic degradation of kappa-carrageenan in aqueous solution. *Biomacromolecules*. **10**, 1757-1767.

Parish, C. R., Coombe, D. R., Jakobsen, K. B., Bennett, F. A. and Underwood, P. A. (1987). Evidence that sulfated polysaccharides inhibit tumor-metastasis by blocking tumor-cell-derived heparanases. *International Journal of Cancer*. **40**, 511-518.

- Patier, P., Potin, P., Rochas, C., Kloareg, B., Yvin, J. C. and Lienart, Y.** (1995). Free or silica-bound oligo-kappa-carrageenans elicit laminarinase activity in *Rubus* cells and protoplasts. *Plant Science*. **110**, 27-35.
- Penman, A. and Rees, D. A.** (1973). Carrageenans. Part X. Methylation analysis of galactan sulphates from *Furcellaria fastigiata*, *Gigartina canaliculata*, *Gigartina chamissoi*, *Gigartina atropurpurea*, *Ahnfeltia durvillaei*, *Gymnogongrus furcellatus*, *Eucheuma isiforme*, *Eucheuma uncinatum*, *Aghardhielle tenera*, *Pachymenia hymantophora*, and *Gloiopeltis cervicornis*. Structure of ksi-carrageenan.
- Piculell, L., Sparrman, T., Ramzi, M., Borgstrom, J. and Quist, P.-O.** (1998). Iota-carrageenan is excluded from the chiral nematic phase of kappa-carrageenan. *Macromolecules*. **31**, 5152-5154.
- 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 kappa-carrageenase of *Alteromonas carrageenovora*. *Eur J Biochem*. **228**, 971-975.
- 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. *Eur J Biochem*. **201**, 241-247.
- Prado-Fernández, J., Rodríguez-Vázquez, 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.
- Prosselkov, P. V., Gross, W., Igamberdiev, A. U. and Schnarrenberger, C.** (1996). Purification and characterization of UDP-D-galactose 4-epimerase from the red alga *Galdieria sulphuraria*. *Physiologia Plantarum*. **98**, 753-758.
- 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. A.** (1961). Enzymic desulphation of porphyran. *Biochemical Journal*. **80**, 449-&.
- Rees, D. A.** (1969). Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. **24**, 267-332.
- Renn, D. W., Santos, G. A., Dumont, L. E., Parent, C. A., Stanley, N. F., Stancioff, D. J. and Guiseley, K. B.** (1993). Beta-carrageenan: isolation and characterization. *Carbohydrate Polymers*. **22**, 247-252.
- Reynaers, H.** (2003). Light scattering study of polyelectrolyte polysaccharides - the carrageenans. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*. **11**, 88-96.

Roberts, J. N., Buck, C. B., Thompson, C. D., Kines, R., Bernardo, M., Choyke, P. L., Lowy, D. R. and Schiller, J. T. (2007). Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nature Medicine*. **13**, 857-861.

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., Rinaudo, M. and Vincendon, M. (1983). Spectroscopic characterization and conformation of oligo-kappa-carrageenans. *International Journal of Biological Macromolecules*. **5**, 111-115.

Ross, A. G. (1953). Some typical analyses of red seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **4**, 333-335.

Sen, A. K., Das, A. K., Banerji, N., Siddhanta, A. K., Mody, K. H., Ramavat, B. K., Chauhan, V. D., Vedasiromoni, J. R. and Ganguly, D. K. (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.

Siegel, M. M., Tabei, K., Kagan, M. Z., Vlahov, I. R., Hileman, R. E. and Linhardt, R. J. (1997). Polysulfated carbohydrates analyzed as ion-paired complexes with basic peptides and proteins using electrospray negative ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. **32**, 760-772.

Slootmaekers, D., Vandijk, J., Varkevisser, F. A., Vantreslong, C. J. B. and Reynaers, H. (1991). Molecular characterization of kappa-carrageenan 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. J. (1981). Reflections on the interrelationships between red seaweed source chemistry and uses. *Xth International Seaweed Symposium*, Walter de Gruyter & Co., Berlin. New York 1981.

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., 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.

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.

Tobacman, J. K., Bhattacharyya, S., Borthakur, A. and Dudeja, P. K. (2008). The carrageenan diet: Not recommended. *Science*. **321**, 1040-1041.

Tveter-Gallagher, E., Cheney, D. and Mathieson, A. C. (1981). Uptake and incorporation of ^{35}S into carrageenan among different strains of *Chondrus crispus*. *International seaweed symposium*.

Usov, A. I. (1984). NMR spectroscopy of red seaweed polysaccharides : agars, carrageenans, and xylans. *Botanica Marina*. **27**, 189-202.

Usov, A. I. and Arkhipova, V. S. (1981). Polysaccharides of Algae. 30. Methylation of kappa-carrageenan type polysaccharides of the red seaweeds *Tichocarpus Crinitius* (Gmel.) Rupr, *Furcellaria Fastigiata* (Huds.) Lam and *Phyllophora Nervosa* (De Cand.) Grev. *Bioorganicheskaya Khimiya*. **7**, 385-390.

Usov, A. I., Yarotsky, S. V. and Shashkov, A. S. (1980). ^{13}C -NMR spectroscopy of red algal galactans. *Biopolymers*. **19**, 977-990.

van de Velde, F., Antipova, A. S., Rollema, H. S., Burova, T. V., Grinberg, N. V., Pereira, L., Gilenan, 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.

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., Pereira, L. and Rollema, H. S. (2004). The revised NMR chemical shift data of carrageenans. *Carbohydrate Research*. **339**, 2309-2313.

van de Velde, F., Rollema, H. S., Grinberg, N. V., Burova, T. V., Grinberg, V. Y. and Tromp, R. H. (2002). Coil-helix transition of iota-carrageenan as a function of chain regularity. *Biopolymers*. **65**, 299-312.

Vanneste, K., Sloopmaekers, D. and Reynaers, H. (1996). Light scattering studies of the dilute solution behaviour of kappa-, iota- and lambda-carrageenan.

Viana, A. G., Nosedá, M. D., Duarte, M. E. R. and Cerezo, A. S. (2004). Alkali modification of carrageenans. Part V. The iota- ν hybrid carrageenan from *Eucheuma denticulatum* and its cyclization to iota-carrageenan. *Carbohydrate Polymers*. **58**, 455-460.

Viebke, C., Borgstrom, J., Carlsson, I., Piculell, L. and Williams, P. (1998). A differential scanning calorimetry study of kappa-carrageenan in the NaCl/NaI/CsI/CsCl systems and analysis by Poisson-Boltzmann calculations. *Macromolecules*. **31**, 1833-1841.

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.

- Vreeland, V. and Kloareg, B.** (2000). Cell wall biology in red algae: Divide and conquer. *Journal of Phycology*. **36**, 793-797.
- Weigl, J., Turvey, J. R. and Yaphe, W.** (1966). The enzymic hydrolysis of kappa-carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora*. *Vth International Seaweed Symposium*.
- Welti, D.** (1977). Carrageenan Part XII : The 30 MHz proton magnetic resonance spectra of methyl-beta-D-galactopyranoside, methyl-3,6-anhydro-alpha-D-galactopyranoside, agarose, kappa-carrageenan and the segments of iota-carrageenan and agarose sulphate. *Journal of chemical research*, 3566-3587.
- Whyte, J. N. C., Hosford, S. P. C. and Englar, J. R.** (1985). Assignment of agar or carrageenan structures to red algal polysaccharides. *Carbohydrate Research*. **140**, 336-341.
- Wittgren, B., Borgström, J., Piculell, L. and Wahlund, K.-G.** (1998). Conformational change and aggregation of kappa-carrageenan studied by flow field-flow fractionation and multiangle light scattering. *Biopolymers*. **45**, 85-96.
- Witvrouw, M. and DeClercq, E.** (1997). Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *General Pharmacology-the Vascular System*. **29**, 497-511.
- Witvrouw, M., Desmyter, J. and Declercq, E.** (1994). Antiviral portrait series. 4. Polysulfates as inhibitors of HIV and other enveloped viruses. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. **5**, 345-359.
- Wong, K. F. and Craigie, J. S.** (1978). Sulfohydrolase activity and carrageenan biosynthesis in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). *Plant Physiol*. **61**, 663-666.
- Yamada, T., Ogamo, A., Saito, T., Uchiyama, H. and Nakagawa, Y.** (2000). Preparation of O-acylated low-molecular-weight carrageenans with potent anti-HIV activity and low anticoagulant effect. *Carbohydrate Polymers*. **41**, 115-120.
- Yaphe, W. and Arsenault, G.** (1965). Improved resorcinol reagent for determination of fructose and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. *Analytical Biochemistry*. **13**, 143-&.
- Yaphe, W. and Baxter, B.** (1955). The enzymic hydrolysis of carrageenin. 380-383.
- Yermak, I. M., Kim, Y. H., Titlynov, E. A., Isakov, V. V. and Solov'eva, T. F.** (1999). Chemical structure and gel properties of carrageenans from algae belonging to the Gigartinales and Tichocarpaceae, collected from the Russian Pacific coast. *Journal of Applied Phycology*. **11**, 41-48.
- Zablackis, E. and Santos, G. A.** (1986). The carrageenan of *Catanelia nipae* Zanard, a marine red alga. *Botanica Marina*. **29**, 319-322.
- Zaia, J.** (2004). Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrometry Reviews*. **23**, 161-227.

Zaia, J. and Costello, C. E. (2001). Compositional analysis of glycosaminoglycans by electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. **73**, 233-239.

Zhang, W., Piculell, L. and Nilsson, S. (1991). Salt dependence and ion specificity of the coil-helix transition of furcellaran. *Biopolymers*. **31**, 1727-1736.

Zhou, G., Sun, Y., Xin, H., Zhang, Y., Li, Z. and Xu, Z. (2004). In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. *Pharmacological Research*. **50**, 47-53.

Détermination de la composition et de la distribution 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 les proportions des produits de l'hydrolyse sont représentatives de la structure du polymère. Ces études ont été menées à l'aide des κ - et ι -carraghénases, sur des carraghénanes riches en précurseurs biosynthétiques, les κ/μ - et ι/v -carraghénanes, ainsi que d'autres carraghénanes hybrides. 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.

Mots clés : carraghénanes hybrides, κ/μ -carraghénane, ι/v -carraghénane, κ -carraghénase, ι -carraghénase, oligo-carraghénanes, précurseurs biosynthétiques, hydrolyse enzymatique, HPAEC, RMN.

Determination of the composition and distribution 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 carrageenans 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 proportions of hydrolysis products are representative of the polymer structure. These studies were performed with κ - and ι -carrageenases on carrageenans containing their biosynthetic precursors, the κ/μ - and ι/v -carrageenans, as well as other hybrid carrageenans. 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.

Keywords : hybrid carrageenans, κ/μ -carrageenan, ι/v -carrageenan, κ -carrageenase, ι -carrageenase, oligo-carrageenans, enzymatic hydrolysis, biosynthetic precursors, HPAEC, NMR.