

50376
1988
139

50376
1988
139

N° d'ordre : 764

THESE

présentée à

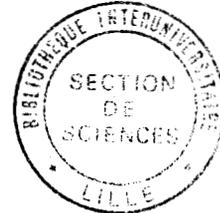
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

JEAN MOLLION



ETUDE DES CARRAGHENANES DE
RISSOELLA VERRUCULOSA
SUR LES FILIATIONS ENTRE LES
DIFFERENTS SYSTEMES DE
CARRAGHENANES

Soutenue le 18 avril 1988 devant la commission d'examen

Membres du Jury :	MM.	MONTREUIL J.	Président
		BODARD M.	Rapporteur
		JOSELEAU J.P.	Rapporteur
		MICHANEK G.	Rapporteur
		FOURNET B.	Examineur
		MORVAN H.	Examineur

Au terme de ce travail je tiens à remercier :

- Monsieur le professeur Bodard, directeur du laboratoire d'Algologie et de Biologie végétale marine de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois, qui a bien voulu assurer la direction de mes recherches.

Vous avez été à l'origine de mon intérêt pour les phycocolloïdes lorsque dans votre laboratoire j'ai effectué des travaux sur le caraghen de *Hypnea* qui m'ont permis d'obtenir une thèse de 3^e cycle.

Votre compétence et la rigueur scientifique que vous avez su me communiquer m'ont permis par la suite de continuer mes travaux à l'Equipe Polysaccharides Pariétaux des Végétaux (EPPV). C'est avec une profonde gratitude qu'il me plait d'évoquer l'intérêt constant et l'écoute attentive que vous avez su réserver à l'étude faisant l'objet de ce mémoire.

- Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Montreuil qui préside ce jury. Ceci témoigne de l'intérêt que vous avez toujours manifesté pour les travaux de notre équipe et je vous prie de croire que votre présence dans ce jury est pour moi un très grand honneur.

- Ma considération va toute entière à Monsieur le Professeur Joseleau pour l'attention qu'il a su prêter à mon travail. Sa haute compétence dans le domaine des macromolécules végétales rend très précieuse sa participation en tant que rapporteur de ce jury.

- Ma reconnaissance va également à Monsieur Michanek qui a bien voulu juger mon travail et accepter de faire le rapport de thèse. Sa grande culture générale dans le domaine des phycocolloïdes et de leur utilisation rend ses remarques et sa participation à ce jury particulièrement importantes.

- Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Fournet pour ses conseils et sa participation à ce jury.

- Monsieur Morvan a montré une attention particulière à mes travaux au sein de l'EPPV. Ses critiques et ses commentaires m'ont fourni une aide appréciable tout au long de mon travail. Je lui suis très reconnaissant d'avoir accepté de siéger dans ce jury.

Je veux remercier toutes les personnes de l'EPPV sans laquelle ce travail n'aurait pu être présenté aujourd'hui. Mon intégration au sein de ce groupe m'a permis d'entrevoir la recherche scientifique sous un jour nouveau et d'apprécier la complémentarité des personnes travaillant autour d'un grand thème scientifique. Le dynamisme résultant de ce regroupement a facilité l'accomplissement de ce travail.

Il ne m'est pas possible de nommer tous les membres de cette équipe qui m'ont aidé matériellement et au niveau de la réflexion. Je tiens à remercier particulièrement Daniel Christiaen qui avec Henri Morvan a créé cette équipe.

La haute compétence de Marie Claire Verdus m'a permis de donner une dimension plus biologique à cette thèse.

Yannis Karamanos m'a transmis une partie de son savoir dans le domaine de la biochimie et je l'en remercie.

Je remercie également Fabienne Bellanger qui m'a fourni la kappa carraghenase. L'obtention de cette enzyme a facilité la progression de mes travaux.

Je tiens également à remercier les personnes extérieures au laboratoire qui m'ont apporté une aide au cours de ces recherches.

Serge Moreau en réalisant tous les spectres RMN figurant dans ce manuscrit et en m'aidant à les interpréter a joué un rôle déterminant dans l'identification des structures de carraghenane et je l'en remercie.

Ma reconnaissance va également à Monsieur le Professeur Legrand et à sa collaboratrice, Mademoiselle Sekkal, qui m'ont permis d'obtenir les spectres IR

Les échantillons utilisés pour cette étude ont été obtenus à partir d'algues cultivées à la station IFREMER de Pinia, en Corse, avec l'aide de Mademoiselle Isabelle Richard que je remercie. .

RESUME

Un nouveau type de carraghénane a été extrait de l'algue rouge Rissoella verruculosa. Ce polymère, nommé omega carraghénane, a été isolé et identifié par spectroscopie RMN du ^{13}C . R. verruculosa contient également deux autres types de carraghénane: le kappa et le beta. Ce dernier polymère n'a pu être dissocié du omega carraghénane, ce qui permet d'envisager l'hypothèse d'une filiation biosynthétique liant ces deux molécules. Ceci se traduirait par l'existence de molécules hybrides constituées d'une alternance séquences omega et beta. Le kappa carraghénane semble ne présenter aucun lien avec la structure beta.

La chromatographie de perméation sur gel a montré que le beta carraghénane n'était constitué que de polymères de poids moléculaire élevé, alors que le omega présente une plus grande polydispersité. Un modèle de construction du omega carraghénane à partir du beta est proposé. Une telle filiation biosynthétique est très différente de celle proposée par différents auteurs pour d'autres systèmes carraghénanes.

SUMMARY

The carrageenans of Rissoella verruculosa - A study of the filiations in different carrageenan systems.

A new type of carrageenan was extracted from the red alga Rissoella verruculosa. This polymer, designated as omega, was isolated and identified by ^{13}C NMR spectroscopy. Two more carrageenans, kappa and beta were extracted from R. verruculosa. The latter polymer could not be separated from omega. A biosynthetic filiation between the two molecules is suspected. Such filiation would result in hybrid polymers containing alternating omega and beta sequences. No linkage between kappa and beta structures could be demonstrated.

Gel permeation chromatography shows that beta carrageenan consist of high molecular weight polymers, whereas omega exhibit higher polydispersity. A model in which omega carrageenan would derive from beta is described. The proposed biosynthetic filiation is quite different from what was demonstrated in various carrageenan systems from other algae.

TABLE DES MATIERES

Introduction générale

- I - Situation du sujet1
- II - Objet de cette étude.....5

Première partie: Historique et état de la recherche

- I - Les différents types de carraghénanes.....8
- II - Valeur taxonomique de la présence d'un type de carraghénane chez différentes espèces d'algues.....21
- III - Méthodes utilisées pour l'étude de la structure des carraghénanes..... 25
- IV - Effets de la structure sur les propriétés physiques33
- V - Les carraghénanes sont-ils des molécules hybrides?.....38
- VI - Les hypothèses sur la biosynthèse des carraghénanes.....40

Deuxième partie - Matériel et méthodes

- I - Obtention des échantillons de *R. verruculosa*.....46
- II - Extraction.....54
- III - Fractionnement.....58
- IV - Obtention de parois isolées.....61
- V - Méthodes analytiques.....64

Troisième partie - Isolement et description des carraghénanes extraits de *R. verruculosa*

- I - Identification des principaux carraghénanes, mise en évidence d'un nouveau type de carraghénane.....71
- II - Recherche des précurseurs éventuels de ces carraghénanes, mise en évidence d'un beta carraghénane.....91
- III - Etude par chromatographie en phase gazeuse des sucres totaux extractibles par hydrolyse acide de l'algue entière.....109

IV - Les différents types de carraghénanes rencontrés chez <i>R. verruculosa</i> peuvent-ils coexister chez un même individu ?.....	112
V - Identification des produits d'hydrolyse de ces carraghénanes.....	116

Quatrième partie - Localisation des carraghénanes et physiologie de leur production

I - Localisation.....	125
II - Physiologie de la production des carraghénanes - variations du carraghénane de <i>R. verruculosa</i> en fonction des conditions de croissance des échantillons au moment de leur récolte.....	143

Cinquième partie - Etude des relations entre les carraghénanes

A - Introduction.....	156
B - Protocole expérimental.....	158
C - Résultats.....	159
1 - Chromatographie sur colonne S400 des fractions D.E.A.E. ...	159
2 - Détection de kappa carraghénane dans les sous-fractions S400 des fractions D.E.A.E.	167
Chromatographie S400 du carraghénane total - distribution des masses moléculaires du kappa carraghénane.....	170
D - Discussion	172

3 -

Sixième partie - Discussion générale

A - Rappel des objectifs et justification de la stratégie.....	176
B - Vérification des hypothèses de départ et réflexions sur le mécanisme de mise en place des composés pariétaux.....	179
C - Elaboration d'une stratégie future.....	185
Bibliographie.....	189
Annexe.....	200

TABLE DES FIGURES

Figure 1 - Classification des carraghénanes et transformation de l'unité galactose 6-sulfate en 3,6 anhydrogalactose.....	20
Figure 2 - Modèle de biosynthèse des carraghénanes proposé par Craigie (A) et interprétation du modèle proposé par Bellion (B)	44
Figure 3 - Spectre RMN du ^{13}C de la fraction R42 K1 alc F1 du carraghénane de <u>R. verruculosa</u>	80
Figure 4 - Structure proposée pour l'unité répétitive isolée dans la fraction R42 K1 alc F1, désignée sous le nom de omega carraghénane	81
Figure 5 - Spectre RMN du ^{13}C en séquence DEPT de la fraction R42 K1 alc F1 du carraghénane de <u>R. verruculosa</u>	84
Figure 6 - Spectre RMN du ^{13}C de la fraction R42 K2 du carraghénane de <u>R. verruculosa</u>	85
Figure 7 - Spectre IR de la fraction R42 K2 du carraghénane de <u>R. verruculosa</u>	87
Figure 8 - Spectre IR de la fraction R42 K1 du carraghénane de <u>R. verruculosa</u>	88
Figure 9 - Spectre RMN du ^{13}C de la fraction R42 K1 du carraghénane de <u>R. verruculosa</u>	95
Figure 10 - Spectre RMN du ^{13}C de la fraction extractible à froid R44 CE K1 du carraghénane de <u>R. verruculosa</u>	97
Figure 11 - Spectre RMN du ^{13}C de la fraction extractible à froid R44 CE K2 du carraghénane de <u>R. verruculosa</u>	98
Figure 12 - Spectre RMN du ^{13}C de la fraction extractible à froid R49 CE K2 du carraghénane de <u>R. verruculosa</u>	99
Figure 13 - Spectre RMN du ^{13}C des différentes fractions d'éluion obtenues par fractionnement D.E.A.E. du carraghénane de l'échantillon R42 de <u>R. verruculosa</u>	101
Figure 14 - Chromatographie en phase gazeuse des monosaccharides (alditol acetates) obtenus par hydrolyse de la poudre d'algue entière de l'échantillon R42 de <u>R. verruculosa</u>	110

Figure 15 - Spectre RMN du ^{13}C du carraghenane extrait de l'échantillon R51 de <u>R. verruculosa</u>	115
Figure 16 - Spectre RMN du ^{13}C du disaccharide obtenu par action de la kappa carraghenase sur la fraction R42 K2 alc du carraghenane de <u>R. verruculosa</u>	121
Figure 17 - Spectres RMN du ^{13}C des fractions R42K2alc et R42K2alc FRE du carraghenane de <u>R. verruculosa</u>	123
Figure 18 - Spectre RMN du ^{13}C du carraghenane extrait des parois isolées de <u>R. verruculosa</u> , R42 Pi	135
Figure 19 - Spectre RMN du ^{13}C des carraghenanes totaux des échantillons R38 (A) et R42 (B) de <u>R. verruculosa</u>	148
Figure 20 - Spectres RMN du ^{13}C des fractions K1 alc F2 des carraghenanes des échantillons R38 (A) et R42 (B) de <u>R. verruculosa</u>	149
Figure 21 - Courbe d'élution sur colonne S400 des fractions D.E.A.E. de l'échantillon de carraghenane R42	161
Figure 22 - Spectre RMN du ^{13}C des sous fractions S400 de la fraction D.E.A.E. 1 M du polymère extrait de l'échantillon R42 de <u>R. verruculosa</u> , A = fr 98-148, B = fr 149-216	163
Figure 23 - Spectre RMN du ^{13}C des sous fractions S400 de la fraction D.E.A.E. 2 M du polymère extrait de l'échantillon <u>R. verruculosa</u> , A = fr 95-148, B = fr 149-193	164
Figure 24 - Courbe d'élution sur colonne Sephacryl S400 du carraghenane total de l'échantillon R42 de <u>R. verruculosa</u>	171

à ma fille Krista

à mes parents

à la mémoire du Professeur Yaphe

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

I - Situation du sujet

Depuis déjà un certain nombre d'années les biologistes ne décrivent plus la paroi végétale comme un élément cellulaire inerte dont la seule fonction serait, grâce à ses propriétés mécaniques, de protéger l'intérieur de la cellule. La tendance actuelle consiste plutôt à considérer la paroi cellulaire comme un "centre de communication" entre la cellule et son environnement extérieur. L'idée que la paroi cellulaire pouvait avoir une activité biologique propre a surtout été développée à propos des relations "hôte-pathogène" chez les végétaux supérieurs (Darvill et Albersheim., 1984).

La paroi des algues apparaît de plus en plus comme un modèle complexe capable de réagir rapidement à des modifications de son environnement. Des variations structurales ont été observées chez certains polymères de la paroi des algues marines, exposées à diverses conditions physiologiques (Craigie et Wen, 1984).

Les premières études ont été entreprises sur des colloïdes extraits de la paroi de certaines algues rouges parce qu'ils présentaient un intérêt industriel. De tels polymères sont désignés sous le nom de phycocolloïdes.

La principale caractéristique des phycocolloïdes est qu'ils sont constitués d'un nombre réduit de catégories de

monosaccharides, regroupés en unités répétitives et qu'ils forment de longues chaînes. Cependant, les polymères qui constituent les phycocolloïdes d'une espèce donnée sont susceptibles de différer les uns des autres, par la nature et la position de leurs substituants et par l'alternance de plusieurs types de séquences. On peut ainsi parler d'une hétérogénéité dans la composition chimique d'un phycocolloïde. Si on admet que le fonctionnement d'une voie biosynthétique conduit à l'élaboration d'un polymère plus ou moins homogène, on peut penser que cette hétérogénéité apparaît secondairement sous l'effet de facteurs externes soit par réarrangement interne et transformation de certaines séquences de la macromolécule, soit par addition de polymères nouvellement synthétisés. Ainsi les différentes séquences d'unités répétitives, à l'origine de cette hétérogénéité, constitueraient la matérialisation de cette évolution biosynthétique.

La reproduction de la plupart des espèces obéit à un rythme saisonnier. Les phycocolloïdes qui en sont extraits présentent en général des variations dans l'hétérogénéité de leur composition chimique, calquées sur ces cycles saisonniers (Mollion, 1978, Dawes, 1981, Whyte et al., 1981, Mathieson et al., 1984).

D'autres variations dans la quantité et la qualité de ces phycocolloïdes en fonction de l'âge des tissus (Craigie et Wen, 1984) et des conditions de culture (Bird et al., 1981,

Christiaen et al., 1987, Craigie et al., 1984) ont été observées.

Ainsi les différentes formes chimiques que peuvent prendre les phycocolloïdes à l'intérieur de la paroi seraient des marqueurs événementiels de la physiologie de la cellule algale.

L'étude de la distribution de ces marqueurs en fonction de l'âge de la plante montre que ceux-ci sont mis en place progressivement, suivant un ordre donné. Cette constatation est compatible avec l'idée d'une évolution continue dans la constitution chimique du phycocolloïde. La question est alors de savoir si ces variations proviennent d'une transformation in situ des phycocolloïdes, ou d'une addition différée de nouveaux polymères.

Chez les algues, aucun modèle définitif de construction de paroi n'a été décrit actuellement. Les polymères constitutifs de cette paroi ne sont connus que de façon incomplète et le mécanisme de leur biosynthèse reste le plus souvent du domaine de la spéculation. Une étude visant à mieux connaître les réponses métaboliques de la paroi végétale à des conditions physiologiques données n'est envisageable que si au préalable les différents polymères constitutifs de la paroi ont été recensés.

L'exploitation des algues marines pour l'obtention de phycocolloïdes a d'abord été effectuée à partir de récoltes naturelles. En faisant appel à la culture intensive, les producteurs ont surtout pensé améliorer quantitativement

leur source de matière première et abaisser les coûts d'exploitation. Simultanément on a constaté qu'il était également envisageable d'améliorer la qualité des polymères en contrôlant précisément les conditions de culture (Mollion, 1984).

D'une façon générale, on peut dire que chaque fois que l'on décèle une hétérogénéité dans la constitution chimique d'un composé, on soupçonne que son évolution se fait en plusieurs étapes et on songe aux moyens d'accélérer ou de ralentir cette transformation ou même de la faire dévier, pour obtenir un produit plus intéressant d'un point de vue industriel. Il est probable que dans l'avenir, des expériences de culture d'algues seront entreprises dans le but d'acquérir une technologie permettant de piloter l'évolution des polymères pariétaux. En effet des enzymes permettant la transformation d'une structure en une autre ont été isolées chez certaines algues (Wong et Craigie, 1978).

A ce stade de la présentation de la problématique des phycocolloïdes, deux stratégies s'offrent aux chercheurs pour la conduite des travaux visant à la compréhension de leur métabolisme:

- A partir d'espèces déjà bien étudiées, affiner les modèles établis en s'appuyant sur des données de plus en plus précises.
- Explorer les potentialités du plus grand nombre d'espèces disponibles pour aboutir à une présentation comparative des

résultats et à une intégration dans le cadre plus général de la construction de la paroi végétale.

Pour illustrer cette dualité d'approche on peut citer l'exemple du carraghenane, phycocolloïde extrait de certaines algues rouges. De nombreux auteurs ont choisi l'espèce Chondrus crispus et entrepris l'étude des différents carraghenanes extraits de cette espèce. Le "système carraghenane" de C. crispus est aujourd'hui relativement bien connu, bien que les modalités de sa mise en place dans la paroi ne sont aujourd'hui décrites que de façon très fragmentaire.

D'autres chercheurs ont pu mettre en évidence chez d'autres espèces d'algues des "systèmes carraghenane" différant sensiblement de celui décrit chez C. crispus

Nous avons choisi d'étudier les carraghenanes extraits d'une espèce d'algue rouge méditerranéenne, Rissoella verruculosa (Bert.) J. AG., dans le but de disposer d'un modèle supplémentaire et de le comparer à ceux déjà décrits dans la littérature.

II - Objet de cette étude

Le travail que nous exposons ici est conçu comme un maillon d'une étude plus vaste visant à une meilleure compréhension du métabolisme de la paroi végétale. Le modèle carraghenane se justifie dans la mesure où ce polymère représente chez les algues carraghenophytes une part importante de la paroi.

Le fait que ce polymère présente dans la paroi certaines variations se traduisant par la présence simultanée de plusieurs types de molécules facilement séparables et reflétant l'état physiologique de la plante nous a poussé à vouloir mieux connaître son organisation dans la paroi. Une des contributions possible à une meilleure connaissance du métabolisme pariétal serait l'élaboration d'un modèle permettant de décrire la mise en place et l'évolution des carraghenanes dans la paroi.

L'objectif de notre recherche a été de définir un certain nombre de relations existant entre les carraghenanes de R. verruculosa et de tenter d'élaborer, à partir de celles-ci, un certain nombre d'hypothèses sur leur biosynthèse, afin de pouvoir les intégrer dans une problématique plus vaste de construction de la paroi. Dans le cas particulier de R. verruculosa ceci nécessite une étude préalable de la nature des différents carraghenanes et de leur organisation au sein des différentes molécules. Aucune description du carraghenane de cette espèce n'existe dans la littérature, à l'exception d'une étude récente (Combaut et al., 1985), dans laquelle la structure du principal représentant de ce polymère est interprétée d'une façon qui nous a paru erronée.

Un autre aspect du problème, qu'il nous a paru intéressant d'aborder, concerne la localisation des carraghenanes dans la cellule de Rissoella. Une meilleure connaissance de

celle-ci non seulement permet de mieux comprendre les relations des différents types de carraghenanes, mais constitue une base indispensable pour l'étude de la biosynthèse de ces polymères.

Les recherches que nous avons entreprises comprennent donc trois grands volets:

- description et identification des différents types de carraghenanes dans R. verruculosa et de leur hétérogénéité
- localisation de ces carraghenanes
- relations entre ces différents types de carraghenanes

En introduisant les résultats obtenus à la suite d'une recherche sur la physiologie de la production de carraghenane, il sera possible de mieux interpréter l'ensemble des données acquises et d'en discuter les implications biosynthétiques.

PREMIERE PARTIE
HISTORIQUE ET ETAT DE LA RECHERCHE

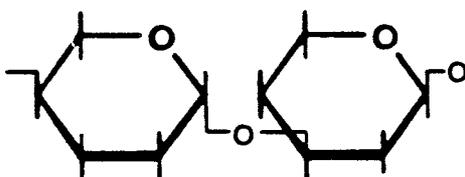
PREMIERE PARTIE: HISTORIQUE ET ETAT DE LA RECHERCHE

I - LES DIFFERENTS TYPES DE CARRAGHENANES

Cela fait plus d'un siècle que l'on sait que les carraghenanes sont composés de galactose. Le reste des caractéristiques de ces polymères, celles qui donnent à ce type de molécules toute leur originalité, ont été découvertes beaucoup plus récemment. Les carraghenanes ont comme caractéristique commune un "squelette" formé de résidus D- galactose; ceux-ci sont liés alternativement alpha (1-3) et beta (1-4). Les premiers travaux ont porté uniquement sur les extraits des algues Chondrus crispus et Gigartina ssp. Il a été montré que les carraghenanes de ces espèces pouvaient être fractionnés en 2 polysaccharides sur la base de leur solubilité dans le KCl (Smith et Cook, 1953). Les termes kappa et lambda ont été créés pour désigner respectivement les fractions insolubles et solubles dans le KCl. La méthylation du carraghenane de G. stellata a permis d'isoler du 2,6-Di-O-méthyl-beta-D-galactose (Dewar et Percival, 1947). Ceci démontre la présence dans le carraghenane de cette espèce, de galactose substitué sur les carbones 1, 3 et 4. D'autres études ont montré que le galactose était estérifié par un groupement sulfate suivant

un rapport molaire 1:1. Les connaissances sur la stabilité relative des ester-sulfates en milieu alcalin ont permis de déduire que parmi les positions possibles de substitution déduites de la méthylation, le groupement ester-sulfate ne pouvait occuper que la position 4. La liaison du résidu galactose ainsi isolé a donc été décrite comme étant portée par le carbone 3.

Le squelette carboné d'un carraghenane peut donc être représenté ainsi :

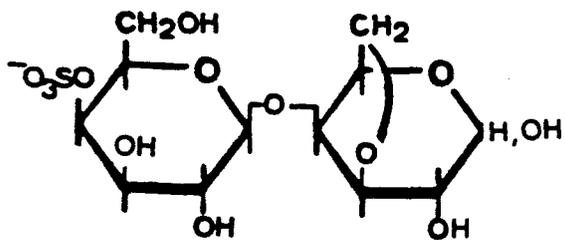


unité alpha

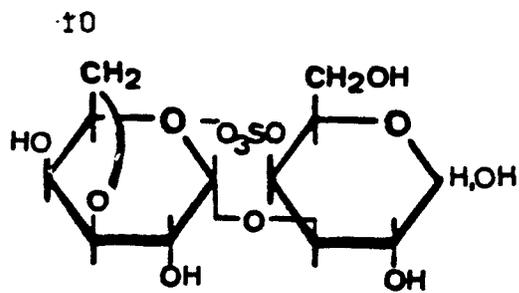
unité beta

Il a été montré que ce galactose sulfaté ne représentait, aussi bien chez Chondrus crispus que chez Gigartina stellata, que 65 % du kappa carraghenane isolé de ces deux espèces. Un second composé a par la suite été décelé et identifié comme étant du 3,6 anhydro-alpha-D-galactose (O'Neil, 1955a).

Il a ainsi été montré que le disaccharide constitutif du kappa carraghenane avait la structure suivante (O'Neil, 1955b):

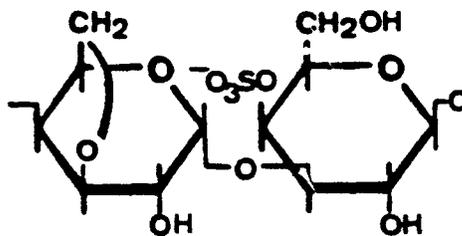


carrabiose 4-sulfate



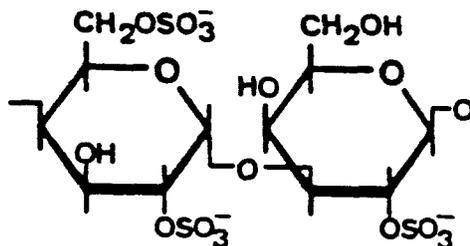
neocarrabiose 4-sulfate

Parce que la liaison 1-4 est plus facilement hydrolysée que la liaison 1-3, comme nous le verrons plus loin, nous représenterons les molécules de carraghenanes comme constituées d'une répétition d'unités néocarrabiose. La molécule de kappa carraghenane peut donc être représentée par son unité répétitive:



structure de l'unité répétitive du kappa carraghenane

Le polysaccharide soluble dans le KCl (lambda carraghenane) contient 40-50 % de beta-D-galactose 2,6-disulfate (Rees, 1963), et une proportion égale de alpha-D-galactose 2-sulfate lié ((Dolan et Rees, 1965). Ces auteurs ont donc proposé la structure suivante pour le lambda carraghenane:



structure de l'unité répétitive du lambda carraghenane

Les études de méthylation des fractions contenant principalement du kappa carraghenane ont permis de mettre en

évidence d'autres structures proportionnellement moins abondantes associées à ce polysaccharide. Il a été montré que le traitement alcalin de ces fractions permettait d'éliminer une faible proportion d'ester sulfate avec formation concomitante d'un pourcentage équivalent de 3,6 anhydro-alpha-D-galactose (Rees, 1963), indiquant ainsi la présence d'unités de alpha-D-galactose 6-sulfate.

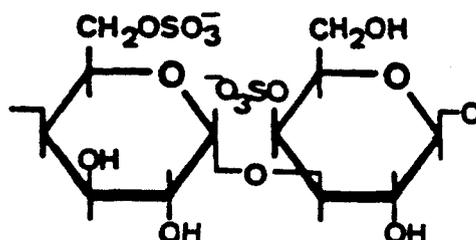
Des travaux ultérieurs ont permis de séparer, à l'aide d'une kappa carragenase isolée de Pseudomonas carrageenovora (Weigl et Yaphe, 1966^a), une série d'oligosaccharides (80 %) formés de néocarrabiose 4-sulfate, et 20 % d'une fraction résistante à l'hydrolyse.

Le traitement alcalin de cette dernière fraction permet la formation de 3,6-anhydrogalactose concomitante d'une perte équivalente en ester-sulfate.

Il a été suggéré que le kappa carragenane était un polymère contenant une structure répétitive "masquée" dans laquelle une partie des unités 3,6 anhydro-alpha-galactose liées 1-4 est remplacée par du alpha-D-galactose 6-sulfate. La modification alcaline de la fraction insoluble dans le KCl permet l'obtention d'un polymère dans lequel les proportions d'anhydrogalactose, de galactose et de sulfate approchent la valeur théorique 1:1:1 décrite pour un kappa carragenane pur (Anderson et al., 1968a).

Le nom de mu carragenane a été donné à la fraction résistante à l'hydrolyse par la kappa carragenase, et il a

été suggéré que celle-ci constituait le précurseur du kappa carraghenane (Anderson et al., 1968b):

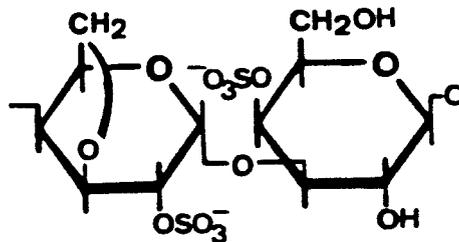


structure de l'unité répétitive du mu carraghenane

L'hypothèse suivant laquelle le mu carraghenane serait précurseur du kappa a été renforcée par l'isolement d'une enzyme catalysant cette réaction in vitro (Craigie et Wong, 1978).

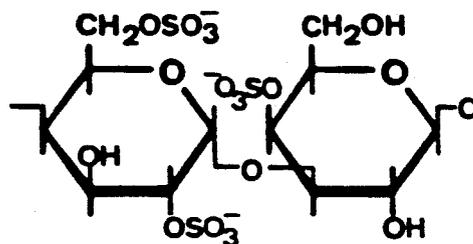
Pendant longtemps on a cru que le carraghenane n'existait que sous 3 formes (kappa, lambda et mu). Cependant des structures, proportionnellement moins abondantes, distinctes de ces trois dernières, avaient été décelées par des techniques de méthylation dans la fraction résistante à l'hydrolyse enzymatique isolée de C. crispus. Seule une partie de cette fraction, correspondant au mu carraghenane, se transforme en kappa carraghenane par l'attaque alcaline. Il a été montré beaucoup plus tard, à l'aide de la technique de RMN du ^{13}C , que cette structure distincte du mu carraghenane était constituée par du iota carraghenane (Bellion et al., 1983). Ce carraghenane, en quantité trop faible pour être détecté dans C. crispus, à l'aide des techniques disponibles à l'époque, a été décrit pour la première fois dans les extraits des algues Eucheuma spinosum

et Agardhiella tenera, parce que constituant la fraction principale du carraghenane de ces espèces (Rees, 1969). Le terme iota carraghenane représente le polymère dans lequel l'unité 3,6 anhydro- α -D-galactose porte un sulfate sur le carbone 2 qui s'ajoute au sulfate porté par le carbone 4 de l'unité β voisine :



structure de l'unité répétitive du iota carraghenane

La structure masquée du iota carraghenane a également été démontrée dans le polymère extrait de Eucheuma uncinatum dans lequel une partie du 3,6 anhydrogalactose-2-sulfate est remplacé par du galactose 2,6-disulfate (Stancioff et Stanley, 1969). Une modification alcaline transforme cette dernière unité en 3,6 anhydrogalactose 2-sulfate. Le terme nu carraghenane a été créé pour désigner cette structure, alcali labile, précurseur du iota carraghenane :

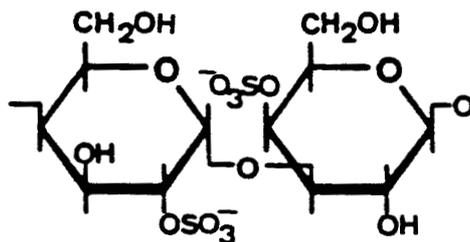


structure de l'unité répétitive du nu carraghenane

Il est intéressant de noter que l'enzyme isolée de C. crispus, catalysant la conversion du mu carraghenane en

kappa , agit également sur la transformation du nu carraghenane en iota (Craigie et Wong, 1978).

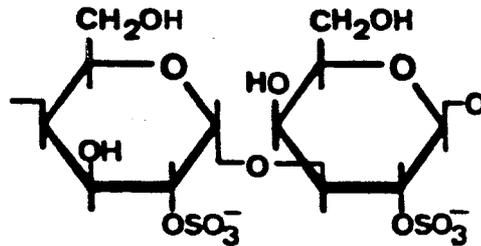
Un certain nombre d'études sur des extraits d'algues ont permis de signaler la présence de certains carraghenanes de structure intermédiaires entre celles des fractions iota et nu (Stancioff et Stanley, 1969; lawson et al., 1973; Penman et Rees, 1973a). De telles structures ne contiennent pas d'unités 3,6 anhydrogalactose et ne peuvent pas être modifiées par action alcaline, suggérant que l'unité alpha est constituée par du galactose 2-sulfate , dépourvue de sulfatation en C6. Le terme "iota carraghenane déviant" (delta) a été proposé pour désigner cette structure (Lawson et al., 1973):



structure de l'unité répétitive du iota carraghenane déviant

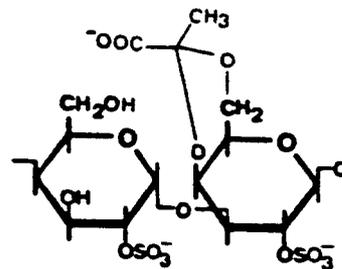
Un autre type de carraghenane "déviant" a été isolé de différentes espèces de Gigartina (Lawson et al., 1973; Penman et Rees, 1973a; Penman et Rees, 1973b). Cette structure, comme celle du lambda carraghenane, est caractérisée par le fait que l'unité alpha est dépourvue de pont 3,6 anhydro, mais en diffère par l'absence de sulfatation en C6 de cette dernière. Ce composé constitué de

galactose 2-sulfate lié alternativement alpha 1-3 et beta 1-4 a été nommé xi carraghenane (Penman et Rees, 1973a):



structure de l'unité répétitive du xi carraghenane

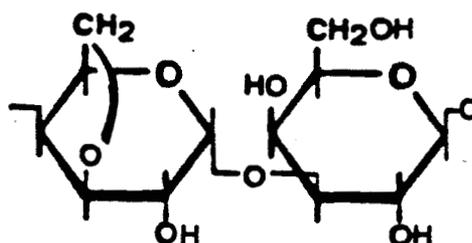
Chez les mêmes algues qui élaborent le Xi carraghenane (ou le lambda) on trouve un carraghenane proportionnellement moins abondant lié covalentiellement à de l'acide pyruvique (Hirase et Watanabe, 1972; DiNinno et al., 1978; DiNinno et al., 1979). Cette structure qui est associée au xi carraghenane, a été nommé pi carraghenane (DiNinno et al., 1979) et se représente ainsi:



structure de l'unité répétitive du pi carraghenane

Un carraghenane désulfaté et contenant du galactose et du 3,6 anhydrogalactose suivant un rapport molaire 1:1 a été isolé de Furcellaria fastigiata (Painter, 1960; Lawson et al., 1973; Penman et Rees, 1973a). Cette structure qui a été également rencontrée chez Endocladia muricata (Stancioff et Stanley, 1969), Tichocarpus crinitus (Yarotsky et al., 1977)

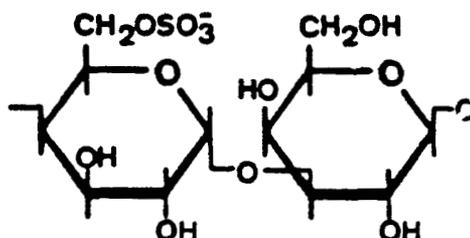
et Eucheuma gelatinae (Greer et Yaphe, 1984^a), a été nommée beta carraghenane. Nous reprendrons nous même ce terme chez Rissoella verruculosa.



structure de l'unité répétitive du beta carraghenane

Il est intéressant de noter que chez les 4 espèces dernièrement citées le beta carraghenane se rencontre toujours accompagné du kappa carraghenane.

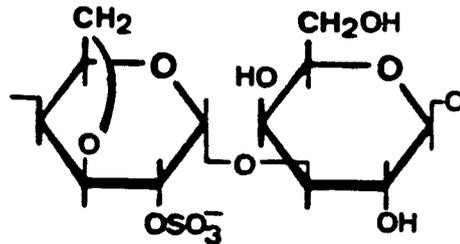
Des études de méthylation de la fraction contenant le beta carraghenane de l'extrait de F. fastigiata ont révélé la présence d'unités alpha, sulfatées en 6, et ne présentant pas de pont 3,6 anhydrogalactose galactose (Penman et Rees, 1973a). Une telle structure, identifiée par techniques RMN dans les extraits de Tichinocarpus crinitus (Usov et al., 1980) et de Eucheuma gelatinae (Greer et Yaphe, 1984^a), a été nommée gamma carraghenane:



structure de l'unité répétitive du gamma carraghenane

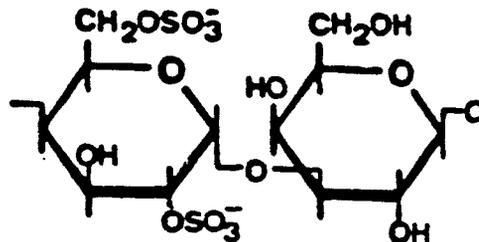
Enfin un nouveau type de carraghenane a été récemment mis en évidence chez Catenella nipae. Ce polymère caractérisé

par une alternance d'unités beta-D-galactose et de 3,6 anhydro-alpha-D-galactose 2-sulfate, a été nommé alpha carraghenane (Zablackis et Santos, 1986):



structure de l'unité répétitive de l'alpha carraghenane

On trouve également, associé à l'alpha carraghenane, un carraghenane, proportionnellement beaucoup moins abondant, dans lequel l'unité 3,6 anhydrogalactose 2-sulfate est remplacée par du galactose 2,6-disulfate. Une telle structure a été nommée delta carraghenane (Zablackis et Santos, 1986), ce qui à notre avis constitue une source de confusion, ce même nom ayant été donné au "iota carraghenane déviant" (Lawson et al., 1973). Nous désigneront dans cette étude par le nom de "précurseur de l'alpha carraghenane" le polymère associé à l'alpha carraghenane et dont l'unité alpha est constituée par du galactose 2,6-disulfate:



structure de l'unité répétitive du précurseur de l'alpha carraghenane

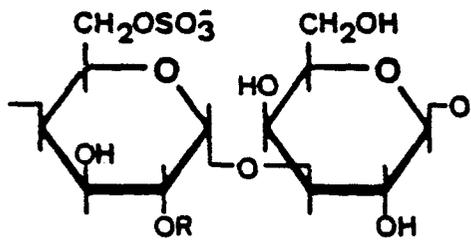
Une catégorie de carraghenanes distincte des structures "classiques" par la présence de substituants méthyl a récemment été mise en évidence dans la fraction enrichie en iota carraghenane de E. cottonii (Bellion et al., 1983). Le carraghenane méthylé ainsi décrit a une structure correspondant à un iota dont le carbone 6 de l'unité beta est substitué par un groupement méthyl.

Un dernier type de carraghenane, dont il sera beaucoup question dans cette étude, a été mis en évidence dans l'extrait de Phyllophora nervosa (Yarotsky et al., 1978). Il est constitué par une alternance de beta-D-galactose 6-sulfate et de 3,6 anhydro-alpha-D-galactose. cette structure n'avait cependant pas pu être séparée du kappa carraghenane, également présent dans cette espèce. L'isolement d'un tel carraghenane et sa caractérisation constitue l'un des objets de notre étude.

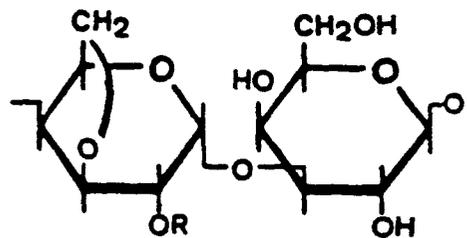
Une classification des carraghenanes (figure 1) en fonction de la structure de l'unité beta a été préconisé par divers auteurs (Percival, 1978; McCandless et Craigie, 1979; Greer

et Yaphe, 1984^a). Un tel regroupement en famille de carraghenane a été motivé à l'origine par l'observation que les carraghenanes présentant une même unité 1-3 beta semblait souvent dériver les uns des autres, ce qui laissait supposer l'existence de relations biosynthétiques entre ces molécules. Nous verrons, dans le paragraphe sur la biosynthèse, que cette observation a été fortement remise en cause par la suite, avec l'étude de nouveaux carraghenanes.

FAMILLE BETA

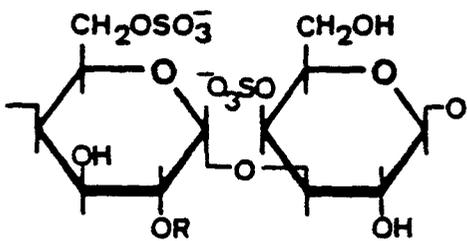


R = H : γ carraghenane
 R = SO₃ : précurseur du α carraghenane^a

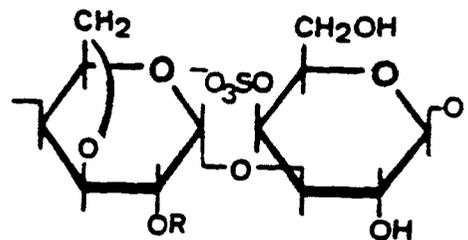


R = H : β carraghenane
 R = SO₃ : α carraghenane

FAMILLE KAPPA

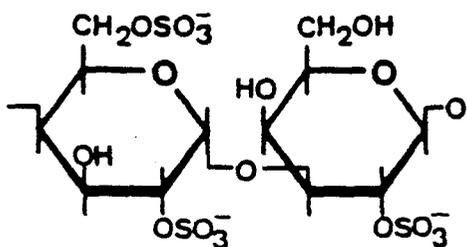


R = H : μ carraghenane
 R = SO₃ : ν carraghenane



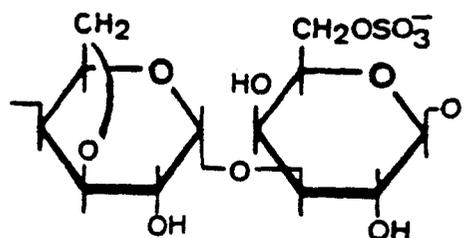
R = H : κ carraghenane
 R = SO₃ : ι carraghenane

FAMILLE LAMBDA



λ carraghenane

FAMILLE OMEGA



ω carraghenane

^aCe carraghenane a été désigné sous le nom de delta carraghenane.
 Ce même nom a été donné à la structure de carraghenane "déviant
 iota"

Figure 1 - Classification des carraghenanes et transformation de l'unité galactose 6-sulfate en 3,6 anhydrogalactose, les carraghenanes "déviant" ne sont pas représentés

II - VALEUR TAXONOMIQUE DE LA PRESENCE D'UN TYPE DE CARRAGENANE CHEZ DIFFERENTES ESPECES D'ALGUES

Dès le début des recherches sur les carragenanes les chercheurs se sont préoccupés de savoir s'il existait un lien entre la position taxonomique d'une algue et le type de carragenane qu'elle synthétise. Un premier élément qui a sans doute poussé les chercheurs à une réflexion sur ce

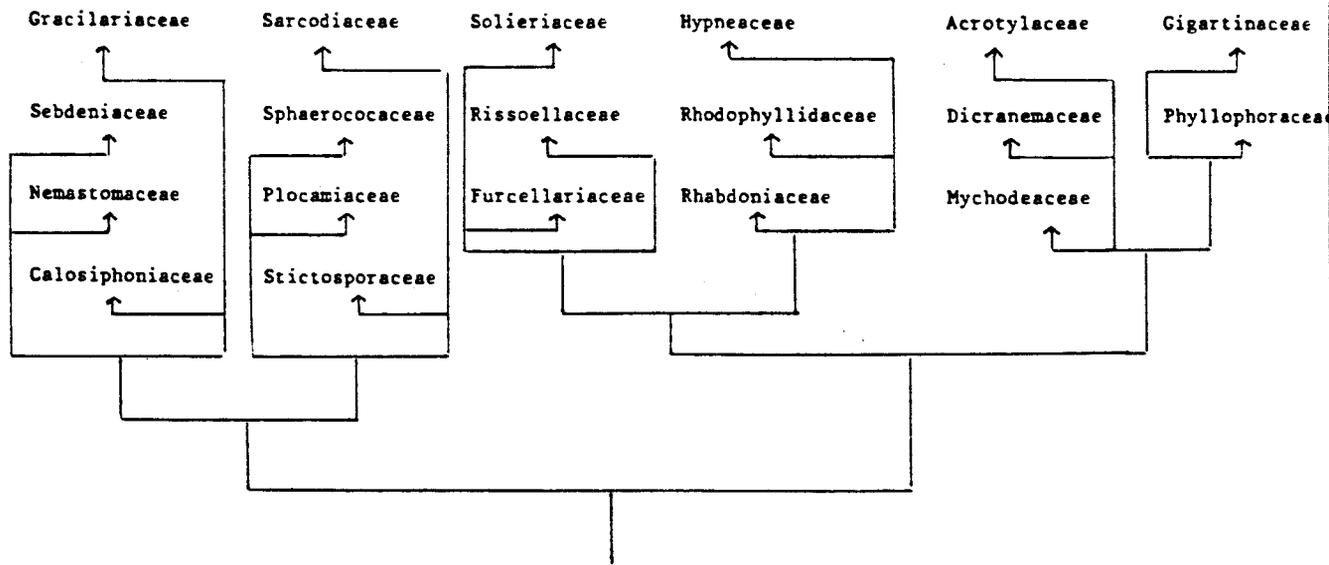
sujet réside dans l'observation que les algues qui contiennent du carragenane appartiennent toutes au même ordre constitutif des algues rouges, celui des Gigartinales. On peut remarquer que le polysaccharide proche du carragenane, l'agar est synthétisé presque exclusivement par 2 ordres d'algues rouges, celui des Gelidiales et des Gigartinales. L'agar est un polymère de structure très proche du carragenane, son représentant le moins substitué, l'agarose (Araki 1966), ayant la structure d'un beta carragenane dans lequel l'unité D 3,6 anhydrogalactose est remplacée par du L 3,6 anhydrogalactose.

Le Tableau 1 représente la classification des algues de l'ordre des Gigartinales, établie par Kylin en 1932. Il est frappant de constater que cet auteur, à une époque où l'on ne savait pas distinguer l'agar du carragenane, divise cet ordre en 2 groupes (Kylin, 1956), l'un ne contenant que des espèces à agar, l'autre que des espèces à carragenane.

Un autre élément renforçant l'hypothèse d'un lien entre le type de carraghenane formé par une espèce et sa position systématique se rencontre dans le fait que le iota carraghenane n'est produit que par des algues appartenant à la famille des Solieriaceae dans l'ordre des Gigartinales. Plus intéressante encore est l'observation que chez les deux Gigartinaceae suivantes, Chondrus crispus et Iridaea cordata les gamétophytes ne produisaient presque exclusivement que

Tableau 1

Classification des familles d'algues de l'ordre des Gigartinales*
 et distribution de l'agar et du carraghenane



espèces à agar

espèces à carraghenane

* d'après Kylin

du kappa carraghenane, alors que les tétrasporophytes contiennent principalement du lambda carraghenane (McCandless et al., 1973; McCandless et al. 1975).

Un grand nombre de chercheurs pensaient, il y a environ une quinzaine d'années, que le type de carraghenane formé constituerait un critère taxonomique dont l'importance s'affirmerait au fur et à mesure qu'un nombre croissant d'espèces seraient étudiées. Aujourd'hui la découverte d'un nombre croissant d'espèces produisant simultanément plusieurs types de carraghenanes a contribué à modifier sensiblement cette façon de voir.

Bien que les filiations biosynthétiques reliant un carraghenane à un autre soient encore mal connues, il est généralement observé que les différents types de ces molécules produites par une même espèce sont en général assez proches, d'un point de vue chimique, et correspondent souvent à des polymères considérés comme dérivant directement les uns des autres.

Une voie de recherche assez prometteuse entreprise dans le but de préciser les relations existantes dans ce domaine a été ouverte avec les travaux de McCandless qui a montré qu'il existait des différences dans la réponse immunologique de carraghenanes d'un même type extrait d'espèces d'algues différentes (McCandless et Gretz, 1984). Cette voie a été interrompue momentanément après la disparition de ce chercheur. Des travaux récents (Vreeland et al. 1988)

permettent d'espérer que cette technique viendra bientôt compléter les méthodes existantes pour l'analyse des carraghenanes.

III - METHODES UTILISEES POUR L'ETUDE DE LA STRUCTURE DES CARRAGHENANES

A - Méthodes d'extraction

Les carraghenanes étant des polymères hydrosolubles, l'extraction se fait toujours par l'eau plus ou moins tamponnée. Au cours des premières recherches sur les carraghenanes une grande diversité de pH a été utilisée lors de l'extraction. Les pH acides sont à proscrire car susceptible de provoquer, même à faible concentration, une hydrolyse du polymère. Les pH fortement basiques, générateurs de beta élimination (destruction de la molécule), sont à éviter. Une étude récente montre cependant qu'un pH légèrement alcalin contribue à augmenter le rendement de l'extraction en dissociant les liaisons entre les carraghenanes et les protéines (King et Lauterbach, 1987).

La plupart des extractions de carraghenanes sont effectuées aujourd'hui en solution tamponnée par du NaHCO_3 0.5 M.

On peut extraire sélectivement certains types de carraghenane en effectuant séquentiellement des extractions à différentes températures. D'une façon générale les

polymères les plus solubles, et ceux présentant les masses moléculaires les plus faibles sont extraits aux plus basses températures. Beaucoup de carraghenanes dépourvus d'unités 3,6 anhydrogalactose, et considérés comme précurseurs de ceux renfermant cette structure, ont pu être extraits sélectivement par l'eau froide, constituant le "cold extract" (Bellion et al., 1981; Greer et Yaphe, 1984^a).

La précipitation du carraghenane de l'extrait hydrosoluble est effectuée soit en utilisant un excès d'alcool (3 à 10 volumes), soit par action d'un sel d'ammonium quaternaire. L'éthanol ou le propanol-2 précipite les polysaccharides de masses moléculaires d'autant moins élevées que l'alcool est utilisé en plus grand excès.

Les sels d'ammonium quaternaires précipitent sélectivement les polysaccharides chargés. On utilise soit le bromure de cetyltriméthylammonium, appelé communément cetavlon ou CTAB (Craigie and Leigh, 1978; Mollion, 1978) ou le chlorure de cetylpyridinium (Greer et Yaphe, 1984^a).

La précipitation par les sels d'ammonium quaternaires est en général plus sélective que par l'éthanol, dans la mesure où les carraghenanes sont toujours au moins en partie chargés.

B - Méthodes de fractionnement

Fractionnement par gélification en présence d'ions K:

Pendant longtemps les seules méthodes de fractionnement ont été basées sur la propriété de l'ion K^+ de favoriser la gélification de certains types de carraghénanes.

Par exemple, chez Eucheuma uncinatum, le nu carraghénane qui est soluble dans le KCl 0.3 M peut être séparé du iota carraghénane, insoluble dans de telles conditions (Stancioff et Stanley, 1969).

Chromatographie sur colonne échangeuse d'ions:

Un autre type de fractionnement peut être envisagé lorsque l'on veut séparer des carraghénanes portant des charges différentes. Les molécules peuvent être fixées sur colonne D.E.A.E. sephadex et éluées en fonction de leurs charges en utilisant du NaCl de molarité croissante. Une telle méthode, fréquemment utilisée pour séparer l'agarose de l'agaropectine (Duckworth et Yaphe, 1971), est utilisée dans cette étude pour la séparation de carraghénanes diversement chargés.

Chromatographie de perméation sur gel

D'autres techniques chromatographiques ont été utilisées pour séparer les carraghénanes en fonction de leurs masses moléculaires. De telles séparations ont été effectuées sur

sepharose CL-4B (Bellion et al., 1981; Ekstroem et al., 1983).

Hydrolyse enzymatique:

La découverte d'enzymes hydrolysant sélectivement certains types de carraghenanes a permis d'isoler des fractions résistantes à l'hydrolyse.

Alors que l'extrait de Hypnea musciformis avait été décrit pendant longtemps comme ne contenant que du kappa carraghenane, la dégradation de ce polymère par une kappa carraghenase a permis de mettre en évidence une fraction iota proportionnellement moins abondante (Greer et al., 1984). A l'heure actuelle seules des kappa, iota et lambda carraghenases ont été isolées et décrites (Greer, 1984).

C - Méthodes d'analyse

Dosage des principaux constituants:

Les techniques colorimétriques classiques d'analyse sont utilisées pour quantifier les différents constituants des carraghenanes. Les analyses les plus communes sont:

Mesure des sucres totaux: on peut utiliser la méthode au phénol-sulfurique (Dubois et al., 1956), ou l'orcinol sulfurique (Tillmans et Philippi 1929, modifiée Rimington 1931).

Mesure du 3,6 anhydrogalactose: on utilise la méthode au résorcinol chlorhydrique (Yaphe et Arsenault, 1965).

Mesure de la teneur en sulfate: on utilise une méthode turbidimétrique faisant appel à la précipitation par le chlorure de baryum (Craigie et Leigh, 1978).

Mesure des sucres réducteurs obtenus après hydrolyse du carraghenane: on utilise la méthode de Somogyi (Nelson, 1944).

Identification des sucres constitutifs et de leur substituants:

- Identification des sucres constitutifs:

Les sucres sont identifiés par chromatographie après hydrolyse. On peut utiliser la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie en phase gazeuse des sucres transformés en acétates d'alditols. Ces techniques présentent l'inconvénient de n'apporter qu'une information partielle sur la nature des substituants, qui sont souvent détruits lors de l'hydrolyse, et de n'apporter aucune information sur la façon dont ces sucres s'enchaînent entre eux. Etant donné le peu de diversité des carraghenanes en ce qui concerne leurs sucres constitutifs, ces méthodes sont peu employées exception faite de l'utilisation de la chromatographie sur couche mince pour vérification rapide de l'état d'avancement des hydrolyses enzymatiques.

- Les techniques d'étude des substituants des sucres :

Méthylation:

La plupart des travaux sur le mode d'enchaînement des sucres constitutifs des carraghénanes, ainsi que sur la position de leurs substitutions, ont été effectués grâce à des techniques de méthylation (Dewar et Percival, 1947; Cerezo, 1973), suivi ou non d'une chromatographie en phase gazeuse.

RMN du ^{13}C

Aujourd'hui la plupart des identifications de structure de carraghénane se font par spectroscopie de RMN du ^{13}C ou du proton. Les spectres de RMN du ^{13}C ont été publiés pour les carraghénanes suivant, avec une interprétation totale des signaux dans le cas du kappa (Usov et al., 1980; Greer et al., 1984), beta (Usov, 1984; Greer et Yaphe, 1984a), et iota carraghénane (Usov, 1984; Greer et Yaphe, 1984b), et une interprétation partielle dans le cas des mu et nu (Bellion et al., 1983) et gamma carraghénane (Greer et Yaphe, 1984^a). Le spectre du disaccharide neocarrabiose 4-sulfate obtenu par hydrolyse du kappa carraghénane a été décrit et totalement interprété (Rochas et al., 1983). L'utilisation de la RMN du carbone présente deux inconvénients par rapport à d'autres techniques: son coût élevé et le fait qu'une quantité non négligeable de produit

soit nécessaire (20 mg minimum avec un appareil opérant à 400 MHz) pour qu'un signal soit détecté.

Spectroscopie IR:

Une autre technique, la spectroscopie infra-rouge, permet d'obtenir des informations sur la nature des substituants et sur leur position. L'information recueillie n'est que partielle et de nombreuses ambiguïtés subsistent. Les principales vibrations caractéristiques de certaines substitutions rencontrées chez les carraghenanes sont les suivantes: tous les carraghenanes présentent une large bande d'absorption à 1240 cm^{-1} (Akahane and Izumi, 1976), ainsi qu'un pic à 1370 cm^{-1} (Cross, 1964), caractéristiques des sulfates (vibration S=O). Le lambda carraghenane montre une bande d'absorption entre 810 et 840 cm^{-1} résultant de la superposition de deux pics: 820 cm^{-1} (sulfate estérifiant un alcool primaire) et 830 cm^{-1} (sulfate estérifiant un alcool secondaire équatorial). On observe également 2 pics, l'un à 1015 cm^{-1} , l'autre à 1040 cm^{-1} . Ces deux dernières absorptions sont remplacées par des pics à 1025 cm^{-1} et 1070 cm^{-1} dans la molécule de lambda carraghenane soumise à un traitement alcalin (Stancioff et Stanley, 1969).

Le kappa carraghenane présente un pic à 845 cm^{-1} (Lloyd et al., 1961) indiquant la présence de sulfate estérifiant un alcool secondaire en position axiale (liaison C-O-S axiale du galactose 4-sulfate). On observe également des pics à 930

cm^{-1} et 1070 cm^{-1} caractéristiques du pont 3,6 anhydrogalactose (Stancioff and Stanley, 1969).

Le iota carraghénane montre un pic à 805 cm^{-1} qui est toujours associé à la présence de 3,6 anhydrogalactose 2-sulfate. On n'observe pas ce pic dans le nu carraghénane précurseur du iota. Ceci indique qu'une telle absorption n'apparaît que lorsqu'il y a présence simultanée d'un groupement SO_4 fixé en C2 et d'un pont 3,6 anhydro sur le galactose. Les recherches n'ont cependant pas permis de déterminer à quelle liaison on doit attribuer cette vibration (Anderson et al., 1968a). Comme le kappa carraghénane, le iota présente des pics à 845, 930 et 1070 cm^{-1} . Le beta carraghénane est caractérisé par une bande à $895\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$ (Whyte et al., 1985) que l'on retrouve également dans l'agarose, la cellulose, la chitine et les xylanes et qui semble caractéristique d'un cycle dépourvu de groupements sulfates (antisymmetric, out of phase ring stretching mode).

Spectroscopie Raman

Une technique qui pourrait devenir complémentaire de l'infrarouge est la spectroscopie Raman, à l'aide de laquelle le kappa carraghénane, le neocarrabiose 4-sulfate et le neocarrabiose ont pu être analysés (Malfait et al., 1987). Les spectres ressemblent aux spectres infrarouges obtenus à partir des carraghénanes correspondant, avec

cependant de petites différences difficiles à expliquer à l'heure actuelle

Techniques immunologiques:

Des techniques immunologiques ont été utilisées pour l'étude de la structure fine des carraghenanes (Johnston et McCandless, 1968). Des anticorps anti-kappa et anti-lambda ont été préparés et ont permis de distinguer le kappa carraghenane du lambda. Ces mêmes anticorps obtenus de différentes sources ont également permis de distinguer plusieurs "variétés structurales" d'un même type de carraghenane provenant de différentes sources algales (Hosford et McCandless, 1975; Eveleigh et al., 1978; DiNinno et McCandless 1978a, 1978b, 1979).

IV - EFFETS DE LA STRUCTURE SUR LES PROPRIETES PHYSIQUES.

Les carraghenanes sont utilisés dans diverses industries alimentaires essentiellement pour leurs propriétés gélifiantes et épaississantes. La première de ces propriétés dépend du pouvoir gélifiant de ces molécules, alors que la deuxième est sous l'influence de leur viscosité.

Je n'ai pas l'intention de discuter du mécanisme intime qui lie ces propriétés physiques à la structure chimique, mais de faire un bilan de ce que l'on sait de l'influence des substitutions possibles de la molécule de carraghenane sur les propriétés physiques de celles-ci en solution.

D'une façon très schématique on peut dire que la gélification intervient chez les carraghenanes lorsque ces molécules se montrent aptes à former un réseau tridimensionnel enfermant des molécules d'eau. Dans la formation de ce réseau interviennent essentiellement deux paramètres qui sont la possibilité de jonction entre chaînes de carraghenane et la présence d'unités déviantes, appelées "kinks" par les anglo-saxons (Rees, 1972), qui changent l'orientation générale d'une chaîne.

La jonction entre molécules de carraghenanes se ferait par l'intermédiaire du contre-ion associé aux groupements sulfate. Ces derniers groupements, par eux-même tendent à augmenter la solubilité de la molécule, et de ce fait diminuent le pouvoir gélifiant. L'agar qui n'est pas sulfaté forme d'excellents gels; il en est sans doute de même du beta carraghenane, bien que, dans le cas de ce dernier polymère, seule la faible solubilité ait été jusqu'à présent montrée (Greer, 1984). Le contre-ion favoriserait le rapprochement des chaînes en diminuant la solubilité du système. Il est connu depuis longtemps que l'ion K^+ renforce le pouvoir gélifiant du kappa carraghenane, alors que la présence de Na^+ le diminue. Une telle action s'expliquerait par le degré d'hydratation plus élevé de l'ion Na , qui lui donne un plus grand encombrement que l'ion K , ce qui contribue à diminuer la stabilité des zones de jonction entre chaînes et de ce fait diminue le pouvoir gélifiant.

L'influence de la position du groupement sulfate sur le processus de gélification est moins claire. La présence d'un tel groupement sur le C2 de l'unité 3,6 anhydrogalactose contribue à diminuer le pouvoir gélifiant. Rees a montré que les molécules de carraghenane avaient une structure tertiaire spiralée (Rees et al., 1969), et que le groupement sulfate fixé sur le C2 du 3,6 anhydrogalactose était tourné vers l'intérieur de la spirale dans le cas du iota carraghenane. Dans l'hypothèse d'un processus de gélification faisant appel à la formation d'une double hélice entre 2 chaînes de carraghenane, la présence d'un tel groupement sulfate permet d'expliquer pourquoi les iota carraghenanes donnent des gels moins fermes que les kappa. On pense aujourd'hui que le processus de gélification ne fait pas nécessairement intervenir la formation d'une double hélice et la différence de pouvoir gélifiant entre le kappa carraghenane et le iota reste à expliquer.

Le rôle des unités déviantes dans la formation du réseau tridimensionnel permettant la gélification a été plus clairement établi. Le modèle de fibre de carraghenane simplement ou doublement spiralé a été décrit par Rees. Celui-ci a montré par des méthodes faisant appel à la diffraction des rayons X que l'alternance de galactose et 3,6 anhydrogalactose liés respectivement par liaisons beta (1-4) et alpha (1-3) confère à la molécule spiralée une orientation générale linéaire (Rees, 1969). Les différentes

chaînes de carraghénanes peuvent alors s'associer au niveau des zones de jonction comme nous l'avons vu. La substitution d'une unité 3,6 anhydrogalactose par une unité galactose 6-sulfate change complètement l'orientation de la chaîne. Le 3,6 anhydrogalactose qui avait une conformation $1C$, en raison de l'encombrement stérique du pont anhydro, est remplacé par le galactose 6-sulfate de conformation $C1$. La présence de séquences mu carraghénanes dans les chaînes de kappa diminue le pouvoir gélifiant, pour les raisons invoquées ci-dessus. Les industriels qui utilisent le kappa carraghénane pour ses propriétés gélifiantes, augmentent celles-ci par action d'un agent alcalin qui transforme les séquences mu en kappa.

La présence d'un minimum d'unités déviantes mu est cependant nécessaire pour donner au gel une certaine élasticité. Celle-ci est d'autant plus grande que le carraghénane s'organise en un réseau tridimensionnel grâce à ces unités déviantes.

On peut définir la viscosité comme la résistance que présente un fluide à l'écoulement. Aucune étude systématique de l'influence de différents substituants sur la viscosité des solutions de carraghénanes n'a été effectuée.

D'une façon générale la présence de groupement sulfate augmente à la fois la viscosité et la solubilité du polymère.

Une caractéristique importante d'un carraghénane est sa masse moléculaire, dont l'augmentation se traduit par un accroissement de la viscosité.

V - LES CARRAGENANES SONT ILS DES MOLECULES HYBRIDES?

Les recherches sur la biosynthèse des carragenanes (voir paragraphe suivant) n'en sont encore qu'à leurs débuts et pourtant plusieurs concepts reposent déjà sur des résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de cette étude. Parmi les différents types de carragenanes, les mu, nu, gamma et l'équivalent C6 sulfaté de l'alpha ont été décrits comme précurseurs respectivement des kappa, iota, beta et alpha carragenanes parce qu'une enzyme capable de transformer l'unité 6 sulphatée en 3,6 anhydrogalactose (Wong et Craigie, 1978), avait été isolée des algues contenant ces polymères.

Ces carragenanes précurseurs ne pouvant être séparés des molécules auxquelles elles peuvent donner naissance, de nombreux auteurs ont décrit l'ensemble des 2 types de structures comme formant une molécule hybride. Dans le kappa carragenane la fraction résistante à l'hydrolyse par la kappa carragenase, contenant la structure mu, représenterait d'après Yaphe une "portion inachevée de la molécule de kappa carragenane" (Weigl et Yaphe, 1966^a).

Des preuves plus convaincantes d'une telle organisation ont été apportées pour d'autres carragenanes, également décrits comme une structure hybride. Une telle structure existerait dans les carragenanes extraits de Eucheuma cottonii et E. nudum qui contiennent à la fois du kappa et du iota

carraghenane. La structure hybride kappa-iota est déduite de la diminution de la masse moléculaire moyenne lorsque l'une des structures est hydrolysée sélectivement. Cette masse moléculaire diminue alors dans des proportions supérieures à celles que l'on devrait obtenir dans le cas de 2 structures distinctes (Bellion et al., 1981). D'après Yaphe, qui se base sur ce même type de résultats expérimentaux, le carraghenane de E. nudum a une structure hybride avec des unités répétitives de kappa carraghenane organisée en courtes séquences qui viennent interrompre régulièrement la continuité des séquences iota (Greer et Yaphe, 1984b). Ce même carraghenane contiendrait également des séquences nu organisées de façon semblable au kappa.

Un carraghenane hybride a été également décrit dans l'extrait de E. gelatinae constitué principalement de séquences beta et, dans des proportions moindres, de séquences kappa et gamma, regroupées au sein d'une même molécule (Greer et Yaphe, 1984a).

D'autres carraghenanes ont été décrits comme ayant une structure hybride sans que la moindre preuve de cet état de fait soit apporté. Il semble que certains auteurs utilisent le terme de carraghenane hybride pour décrire des situations où 2 types de carraghenanes coexistent dans une même espèce d'algue.

VI - LES HYPOTHESES SUR LA BIOSYNTHESE DES CARRAGHENANES

Très peu de recherches ont été effectuées à ce jour sur la biosynthèse des carraghenanes. Il semble que le squelette carboné de la molécule soit synthétisé à partir d'un nucléotide transporteur de sucre dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (Turvey, 1978). L'incorporation des sulfates se ferait sur la molécule déjà polymérisée (Greer, 1984). Des études de marquage au ^{35}S ont montré une incorporation rapide dans les carraghenanes de C. crispus (Loewus et al., 1971) et de E. nudum (LaClaire et Dawes, 1976). On pense que le donneur de sulfate est l'adénosine 3'-phosphate-5'-phosphosulfate (PAPS) comme dans la plupart des systèmes biologiques (Turvey, 1978). Bien qu'une incorporation des sulfates directement au niveau de la paroi cellulaire ait été signalé chez Eucheuma isiforme (LaClaire et Dawes, 1976), il semble que celle-ci s'effectue plus généralement au niveau du golgi et du réticulum endoplasmique (Evans et al., 1978; Millard et Evans, 1982; Ramus et Groves, 1972; Tveter-Gallagher et al., 1984).

Un modèle de sulfatation (figure 2) progressive des molécules de carraghenanes faisant intervenir plusieurs sulfotransférases, permettant de transformer un type de carraghenane en un autre type, est proposé par Craigie et Wong (1978). Une sulfohydrolase catalysant la formation de 3,6 anhydrogalactose à partir du mu et du nu carraghenane a

ète extraite à la fois du gamétophyte et du tétrasporophyte de C. crispus (Wong et Craigie, 1978). L'activité de cette enzyme est inhibée par le lambda carraghenane, ce qui explique peut être que le tétrasporophyte, qui contient ce dernier polymère, ne puisse synthétiser le kappa carraghenane, l'autre explication étant une éventuelle impossibilité à synthétiser le mu carraghenane lui-même.

La sulfatation, comme nous l'avons dit, intervient sur la molécule déjà polymérisée. Ce processus n'étant probablement pas instantané, il doit exister des carraghenanes hybrides dans lesquels les deux types de structure se transformant l'une en l'autre coexistent. La présence de molécules hybrides contenant à la fois le précurseur C6-sulfaté et la structure correspondante contenant l'unité 3,6 anhydrogalactose témoignerait de la relation biosynthétique entre ces 2 types de carraghenanes.

Il est intéressant de noter que les carraghenanes contenant du 3,6 anhydrogalactose ne se rencontrent pas toujours accompagnés de leurs unités précurseurs. Chez E. cottonii (Bellion et al., 1983) de même que chez E. nudum (Greer et Yaphe, 1984b), on trouve un carraghenane hybride kappa-iota-nu et aucune trace de structure mu. Dans ce cas on peut penser que le nu carraghenane serait un précurseur commun au iota et au kappa. D'après Bellion le passage d'une structure nu à une structure kappa pourrait avoir le stade iota comme intermédiaire (Bellion et al. 1983). Un schéma de

cette voie biosynthétique, différente de celle proposée par Cralgie , est représenté dans la figure 2. Une telle relation biosynthétique entre le kappa et le iota expliquerait pourquoi ces deux structures se retrouvent fréquemment au sein d'une même molécule de carraghenane hybride.

De même chez E. gelatinae seul le carraghenane hybride beta-gamma-kapa a été mis en évidence (Greer et Yaphe, 1984a). L'absence de précurseur mu a fait dire à ces derniers auteurs que le kappa carraghenane pourrait dériver directement du beta.

Il n'existe pas d'algue connue actuellement qui ne contiennent qu'un seul type de carraghenane. Cette hétérogénéité au niveau des substituants des carraghenanes dépend, comme nous l'avons dit, de l'état physiologique de la plante et présente souvent des variations saisonnières.

L'évolution de l'hétérogénéité des substituants du carraghenane d'algues présentant différents degrés de maturité, est une indication du sens suivant lequel ceux-ci pourraient se mettre en place au sein de la molécule.

Une sulfatation progressive de la molécule de carraghenane a été mise en évidence chez Hypnea musciformis (Mollion, 1977). Cette espèce contient principalement du kappa carraghenane.

Nous avons montré que, au Sénégal, La teneur en sulfate du carraghenane de cette plante augmente de façon continue

Jusqu'au moment de la reproduction sexuée. Il semble donc qu'un précurseur se transforme progressivement en kappa carraghenane. Nous n'avons pas pu identifier ce "précurseur", mais on peut penser que celui-ci pourrait être constitué par du mu carraghenane (Bellion et al., 1983). La plupart des études des variations saisonnières de structures des carraghenanes publiées ont été effectuées à partir d'algues d'eaux tempérées chez lesquelles il est difficile de dissocier l'effet de la température de celui de la maturité sexuelle.

Au Sénégal la période de reproduction ne se fait pas au moment où la température de la mer est maximale. Notre étude de sulfatation progressive du carraghenane de cette espèce indique que celle-ci dépend beaucoup plus de la maturité sexuelle que de la température. Le sens de l'évolution du polymère est donc particulièrement évident dans ce cas. Ceci illustre bien comment le choix de l'état physiologique des échantillons récoltés peut permettre d'obtenir des informations sur le sens d'évolution d'une structure carraghenane.

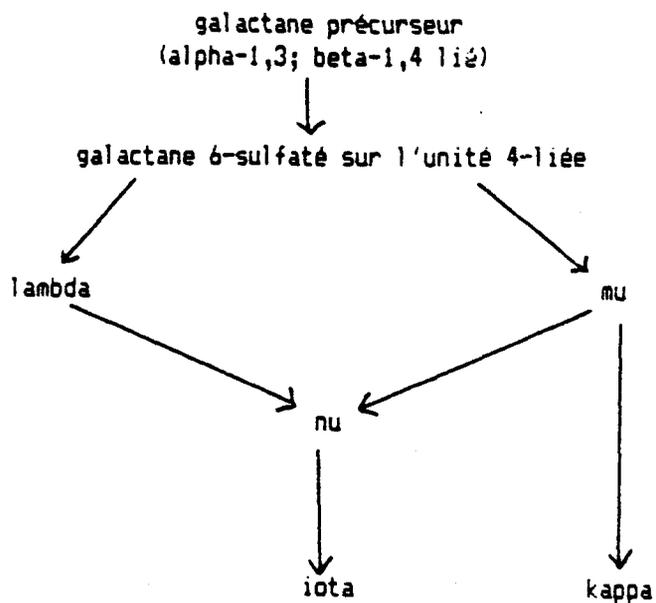
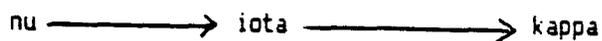
A**B**

Figure 2 - Modèle de biosynthèse des carraghenanes proposé par Craigie and Wong, 1978 (A), et interprétation du modèle proposé par Bellion et al., 1983 (B)

DEUXIEME PARTIE
MATERIEL ET METHODE

DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES

Les carraghenanes sont des polymères caractérisés par une répétitivité presque parfaite d'un certain nombre de séquences. Les différentes séquences rencontrées chez les carraghenanes sont constituées par une répétition d'unités de D-galactose (voir première partie), et ne diffèrent entre elles que par la nature et la position des substituants de ces unités. Le principal substituant rencontré chez les carraghenanes est constitué par des groupements SO_4 . La spectroscopie RMN constitue la méthode moderne la plus directe pour connaître la nature et la position de ces substituants. Dans le cas de structures dont la réponse en spectroscopie RMN est déjà connue une telle identification peut se faire directement par comparaison des assignements chimiques. Lorsque la réponse RMN ne correspond à celle d'aucune structure dont les déplacements chimiques ont été publiés, on émet des hypothèses sur la nature de cette structure.

Les valeurs que devraient avoir les déplacements chimiques des substituants de la structure supposée sont ensuite déterminés en utilisant les données publiées sur les effets de ces mêmes substituants sur les déplacements chimiques de structures voisines.

Les techniques classiques d'extraction des carraghenanes permettent d'obtenir un mélange de ces polymères, qui peut

être fractionné, notamment par des précipitations sélectives. Chaque fraction ne contient plus qu'un carraghenane majoritaire facilement identifiable. Plutôt que d'hydrolyser les échantillons de carraghenanes provenant des thalles de Rissoella, pour en faire l'analyse, nous nous sommes efforcés de caractériser ces molécules à l'état de polymères, en les séparant par des techniques de fractionnement, souvent longues et fastidieuses, mais respectant au maximum les structures.

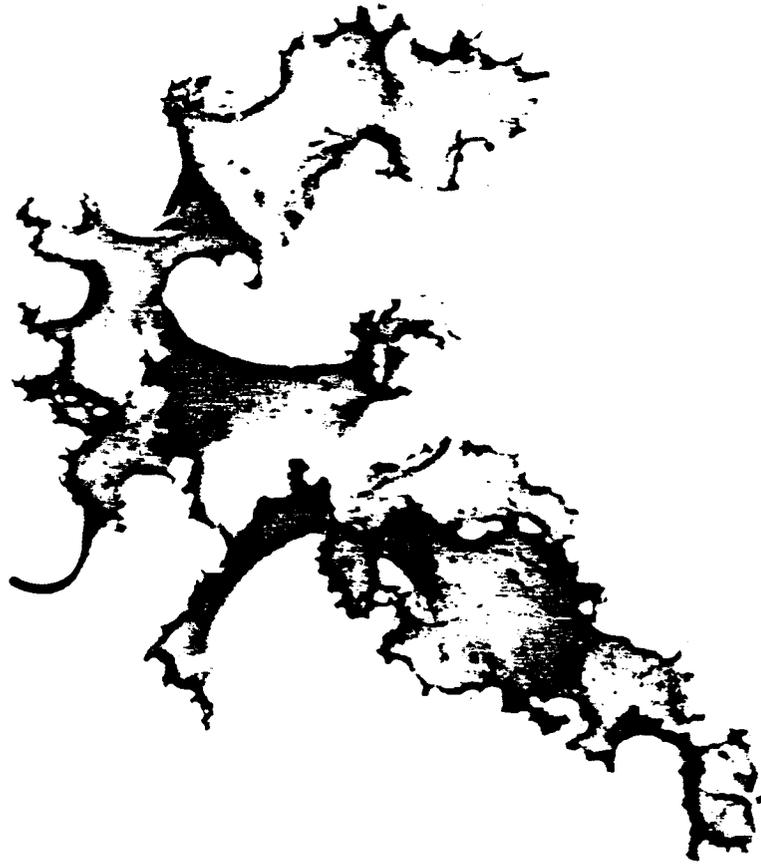
I - OBTENTION DES ECHANTILLONS DE R. VERRUCULOSA

Avant de détailler les différentes techniques d'extraction, de purification, de fractionnement et de caractérisation des carraghenanes de Rissoella, nous nous proposons de décrire succinctement cette algue à partir des observations faites à l'occasion des récoltes.

A - Description de Rissoella verruculosa

Rissoella verruculosa est une algue rouge appartenant à l'ordre des Gigartinales et à la famille des Rissoellaceae (tableau 1). Cette famille regroupe un nombre très restreint d'espèces, dont aucun représentant, à notre connaissance, n'a fait l'objet d'une étude biologique. Une photo d'un échantillon stérile de taille moyenne, récolté à Bastia, figure sur la planche 1. Une description des principaux

PLANCHE I



1 cm

Aspect général de *Rissoella verruculosa*

caractères anatomique et de reproduction de cette espèce ainsi que de sa répartition géographique (Kylin, 1956) est donnée par Kylin. D'après cet auteur, cette espèce n'a été observée qu'en mer Méditerranée. Aucune description de la période de reproduction et des proportions relatives des générations haploïdes et diploïdes ne figurent dans cette étude. Une caractéristique écologique importante de cette espèce réside dans le fait qu'elle occupe une zone verticale allant de la limite inférieure des basses mers jusqu'à un niveau situé à environ 10 cm au dessus du niveau de la haute mer (observation personnelle en Corse). L'amplitude des marées est d'environ 20 cm en mer méditerranée. Lorsque la mer est calme les individus situés aux niveaux les plus élevés se trouvent donc exposés à une dessiccation assez poussée.

B - Récolte des échantillons

Les échantillons utilisés dans cette étude ont été récoltés dans les localités suivantes:

en Corse:

- Ajaccio (côte ouest Corse), échantillons R9 et R49
- Favone (côte est Corse), échantillons R20 et R38
- Bastia, échantillon R51

dans le département du Var:

- Sanary, échantillon R44

Tableau 2

Lieu, date de récolte et maturité des échantillons
de Rissoella verruculosa récoltés dans la nature

échantillon	lieu et date de récolte	état de maturité
R9	Ajaccio 25-04-84	jeune
R20	Favone 20-05-84	jeune
R38	Favone 28-06-84	agé
R44	Sanary 05-04-86	jeune
R49	Ajaccio 27-02-87	jeune
R51	Bastia 03-03-87	jeune

état des échantillons:

La taille des thalles constituant les populations de R. verruculosa est relativement homogène car ils grandissent régulièrement et simultanément au cours de leur développement. Ceci se traduit par le fait que les individus femelles d'une population deviennent cystocarpiques en même temps juste avant de disparaître. Deux types d'échantillons ont été récoltés:

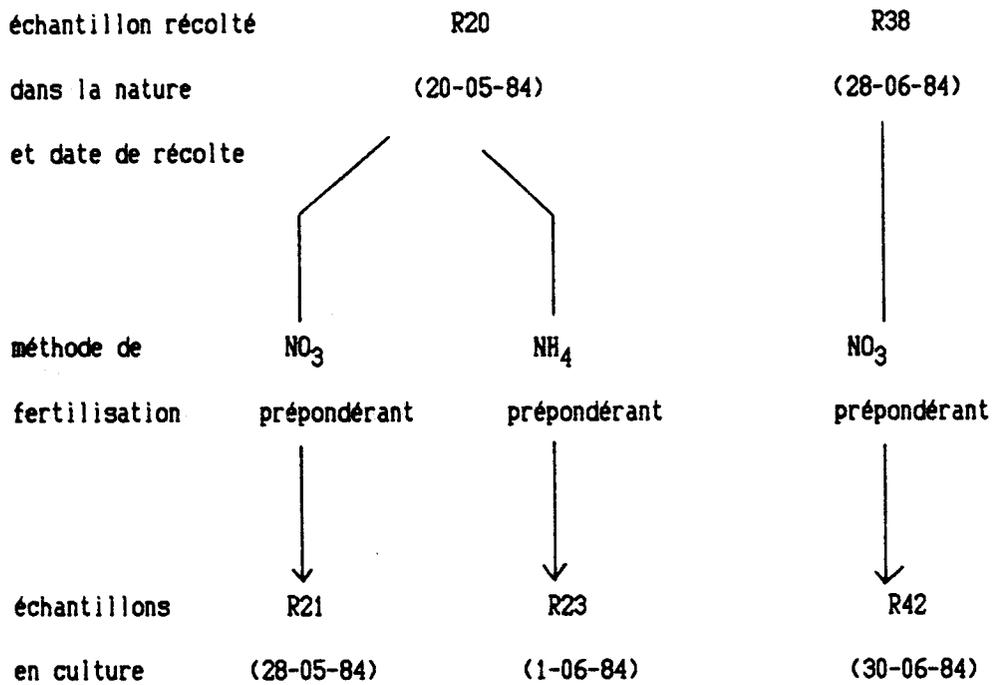
- des thalles jeunes, de petite taille et dépourvus de cystocarpes.
- des thalles âgés ayant pratiquement atteint la taille maximale observée.

Les individus âgés ont été récoltés dans une population comprenant de très rares individus cystocarpiques. Ces derniers n'ont cependant pas été recueillis en raison de la difficulté d'en réunir une quantité suffisante pour être analysée. Nous n'avons pas non plus cherché à récolter les individus mâles séparément, ceux-ci présentant des caractères sexuels difficilement discernables sur le terrain.

Le lieu, la date de récolte ainsi que le degré de maturité des échantillons prélevés dans la nature sont indiqués dans le tableau 2.

Tableau 3

Description des différents échantillons récoltés,
date de récolte, provenance, culture et date de
prélèvement de ces échantillons



C - Mise en culture d'échantillons

Certains échantillons récoltés dans la nature ont été mis en culture à la station aquacole de Pinia, appartenant à l'I.F.R.E.M.E.R. et située à Ghisonaccia, sur la côte orientale Corse. La culture a été effectuée dans des bassins dans lesquels l'eau de mer est renouvelée et enrichie en engrais en continu (tableau 3). Les conditions de culture ainsi que les infrastructures utilisées sont décrites en détail dans l'article "seaweed cultivation for phycocolloids in the mediterranean" (joint en annexe). Plusieurs types de fertilisation ont permis d'obtenir des vitesses de croissance différentes à partir de plusieurs lots issus d'une même récolte et mis en culture simultanément (tableau 3).

Après des durées de culture généralement courtes, en raison des taux de croissance très élevés, les échantillons sont prélevés dans les bassins ayant subi des procédures de fertilisation différentes (tableau 3).

1 - méthode de fertilisation

Une solution de macroélément et une solution d'oligoéléments (tableau 4) sont déversés simultanément de façon continue dans les bassins, eux-même renouvelés continuellement en eau de mer. Les concentrations figurant dans le tableau 4

Tableau 4
Composition de l'engrais utilisé pour fertiliser
les bassins de culture de Rissoella

Macroéléments:

2 types de fertilisation ont été utilisés

	fertilisation NO ₃ prépondérant	fertilisation NH ₄ prépondérant
NaNO ₃	1300 mM	-
NH ₄ Cl	200 mM	1500 mM
NaH ₂ PO ₄	75 mM	75 mM

Oligoéléments:

FeEDTA	20,66 mM
H ₃ BO ₄	24,46 mM
MnCl ₂ , 4H ₂ O	6,13 mM
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,51 mM
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	1,07 mM
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,20 mM
Co(NO ₃) ₂ , 6H ₂ O	0,10 mM

correspondent à celles que devrait avoir chaque élément dans les bassins s'il n'était pas en partie assimilé par les algues en culture.

2 - Bassins et densité de culture

Les infrastructures utilisées pour cette expérience sont décrites dans le document en annexe: Seaweed cultivation for phycocolloïd in the Mediterranean

La densité de culture dans les bassins a été maintenue entre 1,5 kg/m² et 2,5 kg/m². De telles densité de culture ont été utilisées par Ryther dans des expériences de culture de Gracilaria tikvahiae (Ryther et al., 1978).

3 - Conservation des échantillons

Les échantillons récoltés sont rincés pendant 1 minute dans un grand volume d'eau douce, puis séchés au soleil.

L'échantillon R51 n'a pas été rincé à l'eau douce et a été séché directement au soleil.

II - EXTRACTION

A - Principe de l'extraction

Les carraghenanes sont des polymères solubles dans l'eau. La température de solubilisation d'un carraghenane dépend de la structure de celui-ci (voir 1^{ère} partie). Plusieurs types de carraghenanes présents dans une même espèce d'algue

pourront ainsi être séparés par extraction séquentielle faisant appel à des températures croissantes. Nous n'avons utilisé dans cette étude qu'un seul type d'extraction séquentielle, consistant en une extraction à une température de 4° ou de 22°, permettant d'isoler une fraction "extractible à froid", suivi d'une extraction à 90°.

L'extraction du carraghénane est facilitée par la rupture préalable de certains éléments cellulaires. Cette rupture a été obtenue par broyage des cellules, suivi d'une solubilisation par les solvants organiques de certains éléments pouvant gêner l'extraction. Ces substances organosolubles peuvent en effet soit être liés aux carraghénanes, ce qui rend difficile leur purification, soit empêcher l'eau d'entrer en contact avec le carraghénane et de le solubiliser. Une étude visant à obtenir des parois isolées a été entreprise. Cette étude a permis un suivi des différentes étapes de l'extraction du carraghénane et de mieux comprendre le mécanisme de solubilisation des différents éléments cellulaires.

B - Extraction à 90°C

Environ 4 g d'algue sèche sont broyés dans un broyeur à bille jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine. Cette poudre est ensuite déposée sur un entonnoir en verre frité (porosité 3) et soumise à l'action successive de 150 ml d'acetone, 200 ml d'éthanol à 80 % bouillant, puis 200 ml

d'éthanol absolu bouillant. La poudre est ensuite séchée à l'étude sous vide à 50°C.

L'extraction des fractions hydrosolubles à chaud est effectuée en immergeant pendant 90 minutes sous agitation la poudre dans 1200 ml de solution de NaHCO_3 0,5 M à 90°C.

Le résidu non solubilisé est repris par 500 ml de solution de NaHCO_3 0,5 M à 90°C pendant 30 min.

Les fractions solubilisées sont filtrées sur filtre Sartorius 0,4 micromètres. L'extrait hydrosoluble contenu dans le filtrat est précipité par l'une des deux méthodes suivantes:

- précipitation par l'alcool

L'extrait hydrosoluble est précipité par 3 volumes d'éthanol ou de propanol2 à 95 %. Ce dernier alcool est considéré comme plus spécifique des carraghénanes que le premier. Les polysaccharides ainsi précipités sont essentiellement constitués de carraghénanes, avec des contaminations mineures par de l'amidon (Craigie et Leigh, 1978).

- précipitation par le cetavlon

L'extrait hydrosoluble est précipité par 200 ml de solution de bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB), ou cetavlon, à 2 % (Scott, 1960, Craigie et Leigh, 1978). Le cetavlon est un sel d'ammonium quaternaire qui précipite sélectivement les polymères anioniques. Toutes les analyses sur les extrait de carraghénanes précipités par cette technique (Greer et Yaphe, 1984^a, Bellion et al., 1983) ont montré que

parmi les polysaccharides contenus dans l'extrait hydrosoluble des différents carraghenophytes étudiés, seul le carraghenane était précipité par le CTAB).

L'élimination du cetavlon en excès et de celui coprecipité avec le carraghenane se fait de la façon suivante:

Le cetavlon est éliminé par deux lavages à l'eau distillée, puis par sept lavages par une solution d'acétate de sodium saturé dans de l'éthanol à 95 %. L'acétate de sodium est ensuite éliminé par 2 lavages par de l'éthanol à 95 %. Le précipité est ensuite séché à l'étuve sous vide à 50°.

C - "extraction à froid" avec broyage et action des solvants organiques

Les algues sont soumises aux mêmes traitements que lors de l'extraction à 90°C, si ce n'est que l'extraction s'effectue en immergeant sous agitation la poudre après broyage pendant 24 h dans une solution NaCl 0,05 M à 22°. Cette extraction constitue la procédure standard désignée par "extraction à froid".

D - "extraction à froid" avec broyage mais sans action des solvants organiques

Les algues sont soumises aux mêmes traitements que dans la procédure standard "extraction à froid", si ce n'est que l'étape traitement par les solvants organiques est supprimée et que l'extraction est effectuée à 4°.

E - "extraction à froid" sans broyage et sans action des solvants organiques

Les algues sont soumises aux mêmes traitements que dans la procédure standard d' "extraction à froid", si ce n'est que les étapes broyage et traitement par les solvants organiques sont supprimées et que l'extraction s'effectue à 4°.

III - FRACTIONNEMENT

A - fractionnement par gellification en présence d'ions K^+ :

Les carraghenanes ont la propriété de former des gels en présence de certains cations. Parmi ces derniers le potassium présente la particularité d'augmenter très fortement le pouvoir gelifiant des solutions de kappa carraghenanes, alors qu'il n'a que peu d'influence sur celui d'autres types de carraghenanes. En présence d'ions potassium, le kappa carraghenane gelifie et peut donc facilement être séparé des autres types de carraghenanes.

A une solution de 1 % de carraghenane de Rissoella à 90°C, on ajoute de l'acétate de potassium jusqu'à une concentration de 0,25 M et du chlorure de potassium jusqu'à une concentration de 0,05 M. La concentration totale en ion potassium étant de 0,3 M, on laisse refroidir la solution pendant 30 minutes avant de centrifuger à 29000 g. Le gel obtenu est ensuite solubilisé par une solution de NaCl 0,5 M, puis dialysé. La fraction non gélifiante est dialysée directement. Les deux fractions sont ensuite filtrées sur filtre 0,4 micromètre, puis lyophilisées.

L'emploi de l'acétate de potassium comme source principale d'ion potassium se justifie par le fait que celui-ci est particulièrement soluble dans l'éthanol ce qui facilite son élimination ultérieure, dans le cas où la dialyse serait insuffisante. Le fait d'ajouter de petites quantités de chlorure de potassium permet de mieux suivre la progression de la dialyse par détection de l'ion Cl^- dans les eaux de dialyse à l'aide du nitrate d'argent.

B - fractionnement par chromatographie d'échange d'ions

Cette technique permet de séparer des polymères en fonction de leurs charges. 100 mg de carraghénane sont dissous dans 15 ml de H_2O . On verse la solution obtenue dans 10 ml de gel D.E.A.E. A-25 contenu dans un entonnoir muni d'un verre fritté maintenu à 50°C (par une lampe électrique). L'éluion se fait séquentiellement par l'eau et par des solutions de NaCl de concentrations croissantes, successivement égales à 0,5 M; 1 M; 2 M; 3 M. Lorsqu'un volume égal à 4 fois le volume du gel a été versé sur ce dernier contenant le carraghénane et que aucun sucre n'a été détecté dans les fractions récoltées, on estime que tous les polymères susceptibles d'être élués par cet éluant l'ont été et l'on verse un éluant de force ionique supérieure.

Les fractions contenant des sucres, correspondant à chaque type d'éluant, sont réunies, dialysées, filtrées sur membrane 0.4 micromètres et lyophilisées.

C - fractionnement par chromatographie sur gel sephacryl S-400

Cette technique permet de séparer des polymères en fonction de leurs masses moléculaires.

Entre 1 et 7 ml de solution de carraghénane à 1% sont déposés au sommet d'une colonne remplie de 235 ml de gel S-400. Une solution tampon phosphate de Na 0,005 M, pH 7 + 0,2 M LiCl est utilisé comme éluant, le gel S-400 étant équilibré par cette même solution. La concentration en sucres recueillis dans chaque fraction est mesurée par la méthode au phénol-sulfurique (voir méthodes colorimétriques). On obtient ainsi la courbe d'élu-tion du polymère. Certaines fractions sont ensuite réunies, dialysées, filtrées sur membrane 0,4 micromètre et lyophilisées.

La colonne de gel S400 est étalonnée par passage de 2 mg de dextran 200 000 - 300 000 dissous dans 2 ml d'éluant.

D - modification alcaline

Nous avons utilisé la méthode décrite par Craigie (Craigie et Leigh, 1978). 700 mg de carraghénane sont dissous dans 140 ml de H₂O; on ajoute 140 mg de NaBH₄, on laisse agir 4 heures, puis on ajoute à la solution 420 mg de NaBH₄ + 70 mg de solution 3 M NaOH. On laisse agir 3 heures à 80°C. La solution est ensuite dialysée, filtrée sur membrane 0.4 microns et lyophilisée.

E - hydrolyse des kappa carraghenanes par la kappa carraghenase

On prépare une solution de carraghenane à 0.4 % diluée dans un tampon phosphate de Na 0.05 M, pH 7.4. On ajoute à cette solution 1.85 % (vol/vol) de solution de kappa carraghenase à 0,1 % dissoute dans une solution de NaCl 2 M. On effectue l'hydrolyse pendant 12 h à 30°. Le résultat de cette hydrolyse est évalué qualitativement par chromatographie sur couche mince ou quantitativement par la mesure des sucres réducteurs.

IV - OBTENTION DE PAROIS ISOLEES

Les différents traitements auxquels on soumet les cellules de Rissoella ont pour but de séparer les cellules les unes des autres, de les faire éclater et de solubiliser tous les éléments cellulaires à l'exception de la paroi.

En réalité, à partir du moment où les cellules ont éclaté, il est très probable qu'une partie des éléments de la paroi cellulaire soient solubilisés par cette technique, certains carraghenanes constitutifs de cette paroi étant solubles à froid. Nous avons choisi de faire agir des agents osmotiques et mécaniques avant de soumettre les cellules à des agents chimiques, afin que les différents éléments cellulaires

soient le plus dissociés possible au moment de l'action de ces derniers agents.

La première phase, correspondant aux traitements mécaniques et osmotiques, s'effectue dans l'eau, permettant de solubiliser tout ce qui est hydrosoluble et facilement accessible. Dans une deuxième phase on fait agir les solvants organiques permettant de solubiliser certaines protéines et lipides jouant un rôle dans la cohésion cellulaire. La raison pour laquelle on ne fait pas agir ces solvants organiques plus tôt est que ceux-ci insolubilisent irréversiblement les phycoérythrones, dont il est difficile de se débarrasser par la suite.

- protocole utilisé

La procédure d'obtention de parois isolées s'effectue dans sa totalité à 4°C. Après chaque étape du traitement les débris d'algues sont centrifugés et le surnageant contenant la fraction solubilisée est isolé pour analyse. Les différentes étapes sont les suivantes:

broyage: les algues séchées sont broyées dans un broyeur à bille jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine.

extraction à froid: 4 g d'algue broyée (poids sec) sont immergées 12 h sous agitation dans une solution de NaCl 0,25 M. Les algues sont ensuite centrifugées et le surnageant constitue "l'extractible à froid". Il faut remarquer que cet extrait à froid a été obtenu par une procédure qui diffère de celle décrite dans la méthode standard

d'extraction à froid par la suppression de l'étape "traitement par les solvants organiques" (voir "extraction", paragraphe B).

- choc osmotique

On utilise pour cela une solution de NaCl 3 M que l'on laisse agir 12 h.

- homogénéisation et presse de French

Les algues sont homogénéisées par passage dans un homogénéiseur et soumise 2 fois à l'action d'une presse de French à 2000 Psi. Elles sont ensuite soumises pendant 24 heures à l'action de l'eau distillée, afin de créer un nouveau choc osmotique et de solubiliser les polymères rendus accessibles après action de la presse de French.

- action du Triton X 100

Les algues sont mises à macérer sous agitation pendant 14 heures dans une solution de Triton X100 à 0.1 %. Cet agent solubilise les lipides. Les algues sont ensuite immergées dans de l'eau afin de récupérer par centrifugation les polymères hydrosolubles, rendus ainsi accessibles. Un tel traitement s'est montré efficace sur les parois de diverses algues brunes. (Mabeau S., 1985)

- action des solvants organiques

Les composés organosolubles sont solubilisés par action successive de l'éthanol absolu bouillant, de l'acétone puis à nouveau de l'éthanol absolu bouillant.

V - METHODES ANALYTIQUES

A - Méthodes colorimétriques

- dosage des sucres totaux par la méthode au phénol sulfurique

La méthode de Dubois et Gilles (Dubois et al., 1956) modifiée Craigie (Craigie et Leigh, 1978) pour microdosages est utilisée.

réactifs:

H₂SO₄ concentré

solution de phénol à 5 %

gamme étalon:

On prépare la gamme étalon de galactose suivante: 20 ;

50 ; 70 ; 100 microgrammes .ml⁻¹

réaction colorimétrique:

0,2 ml de solution de carraghénane ne contenant pas plus de 20 microgramme de carraghénane + 0,2 ml de solution de phénol à 5 % sont versés dans un tube à hémolyse; on agite, on verse violemment sur ce mélange 1 ml de H₂SO₄ concentré. On agite de nouveau. La lecture est effectuée à 487 nm au plus tôt 15 mn et au plus tard 30 mn après le début de la réaction.

- dosage du 3,6 anhydrogalactose par la méthode au résorcinol

Le pourcentage en 3,6 anhydrogalactose est mesuré par la méthode au résorcinol modifiée par Yaphe (Yaphe et Arsenault, 1965).

Le fructose est utilisé comme échantillon de référence. On admet que la réponse colorimétrique du 3,6 anhydrogalactose dans ce test est égale à 92 % de celle obtenue à partir du fructose.

réactifs:

a) solution stock

- solution stock de fructose : 27 mg de fructose dans 50 ml de H₂O (= 3 micromoles/ml⁻¹)

-solution stock de 1,1 diéthoxyéthane (acétal): 0,822 g d'acétal (environ 1ml) dans 100 ml de H₂O (69,6 micromoles/ml⁻¹)

-solution stock de résorcinol: 150 mg de résorcinol dans 100 ml de H₂O. Cette solution conservée dans une bouteille teintée est stable une semaine.

b) réactifs prêts à l'emploi

- fructose: on prépare à partir de la solution stock la gamme de concentrations suivantes 0,05 micromole/ml, 0,1 micromole/ml⁻¹ et 0,15 micromole/ml⁻¹

- acétal : dilution de la solution stock 25 fois (= 2,78 micromoles/ml⁻¹)

- réactif au résorcinol : on ajout 100 ml de HCl concentré à 9 ml de solution stock de résorcinol; on ajoute à ce mélange 1 ml de solution d'acétal. Ce réactif est stable 3 heures.

Réaction colorée : 2 ml de solution à doser, ne contenant pas plus de 0,25 micromole de 3,6 anhydrogalactose ou de fructose sont versés dans un tube à essai que l'on place dans un bac à glace. On ajoute à cette solution 10 ml de réactif au résorcinol. On agite vigoureusement et on laisse refroidir pendant un temps compris entre 3 min et 30 min. Le tube est placé au bain marie à 20° pendant 4 min, puis à 80° pendant 10 min. On met ensuite le tube dans de la glace pendant 1,5 min. L'absorption est mesurée au spectrophotomètre à 555 nm, au plus tard 15 min après la fin de la réaction. Il est nécessaire d'opérer en lumière atténuée.

- dosage des sulfates par turbidimétrie

Une méthode basée sur la précipitation des sulfates par le $BaCl_2$ après hydrolyse est utilisée (Craigie et Leigh, 1978). Les quantités précipitées sont évaluées par turbidimétrie à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une modification de cette méthode pour le dosage de quantités de SO_4 inférieures au mg a été mise au point par nous même. La teneur en SO_4 est mesurée par rapport à celles des sucres totaux, ce qui permet d'éviter d'avoir à peser des quantités très faibles de ce polymère.

Réactifs:**Solution de $BaCl_2$ - gelatine:**

On dissout 0,6 g de gelatine (Difco Bacto gelatin) dans 200 ml d'eau à chaud (60-70°). On laisse reposer une nuit au réfrigérateur. Après avoir porté cette solution à température ambiante, on y ajoute 2 g de $BaCl_2 \cdot 2 H_2O$ et on agite jusqu'à dissolution complète. Ce réactif est stable plusieurs semaines au réfrigérateur, à condition de le laisser à température ambiante 2 heures avant emploi.

Verrerie: toute la verrerie doit être rincée à l'acide nitrique.

Gamme étalon:

On prépare à partir de K_2SO_4 les solutions (eau ultrapure, qualité UHQ) de concentrations suivantes: 3, 6, 9, 12, 15, et 30 microgrammes/ml⁻¹.

Méthode:

On pèse environ 900 microgrammes de carraghénane que l'on dissout dans 6 ml d'eau UHQ. On prélève 0,9 ml pour le dosage des sucres totaux. Les 5,1 ml restant sont lyophilisés.

Hydrolyse: On hydrolyse la poudre lyophilisée par 0,5 ml de HCl 2N à 100° pendant 2 heures.

On évapore l'acide à 40° dans un évaporateur rotatif. On reprend le résidu sec par 5,1 ml d'eau UHQ.

Réaction turbidimétrique: On effectue la réaction en triple.

1,7 ml de solution de carraghénane hydrolysé ou de solution de sulfate étalon sont placés dans un tube à essai. On y ajoute 0,2 ml de HCl 0,5 N et 0,1 ml de solution de BaCl₂-gélatine. On agite et on effectue la lecture au spectrophotomètre à 550 nm, après avoir laissé reposer 30 minutes au moins la solution dans laquelle se développe un léger trouble.

- dosage des sucres réducteurs par la méthode de Somogyi (Nelson, 1944)

réactifs:

- Aa CuSO₄ 15 %
- Ab 25 g Na₂CO₃ anhydre
20 g bicarbonate de Na
25 g tartrate double de Na et K
Qsp 1 l de H₂O

solution A (à conserver au maximum 24 h):

1 vol Aa + 25 vol Ab = solution A

solution B:

- 25 g de molybdate de NH₄ pulvérisé dans 450 ml de H₂O
- + 25 ml de H₂SO₄ concentré
- + 25 ml d'arséniate de Na à 12 %
- à conserver à l'abri de la lumière

Dosage:

1 ml d'échantillon à doser

+ 1ml de solution A

placer 20 mn au bain marie bouillant, refroidir

+ 1 ml de solution B

+ 10 ml de H₂O

lecture au spectrophotomètre à 500 nm ou 660 nm

gamme étalon de galactose de 0 à 200 microgrammes/ml⁻¹

B - Méthodes spectroscopiques

- spectroscopie infra-rouge

10 mg de carraghénane sont déposés sur un disque de polyéthylène de 2.5 cm de diamètre. On verse sur le carraghénane quelques gouttes d'eau pour obtenir une solution pâteuse que l'on rend homogène avec une spatule. La solution est séchée sous une lampe électrique jusqu'à l'obtention d'un film que l'on place dans la fenêtre d'un spectrophotomètre IR

- spectroscopie RMN du ¹³C

Les spectres RMN du ¹³C découplés du proton ont été enregistrés sur un spectromètre AM 400 (100.62 MHz) à l'aide d'une sonde mixte ¹H/¹³C de 5 mm, dont la température a été réglée à 80° pour les polysaccharides et à 30° pour les oligosaccharides. Les déplacements chimiques sont exprimés par rapport à un témoin interne (DMSO) delta = 39.6 ppm (TMS externe).

Certains spectres ont été obtenus en utilisant une séquence DEPT (distortionless enhancement by the polarization transfer pulse technique). Cette technique permet de distinguer les signaux provenant des carbones portant une fonction alcool primaire de ceux provenant des carbones des fonctions alcools secondaires.

- chromatographie en phase gazeuse par la méthode des acétates d'alditols

Les monosaccharides, obtenus par hydrolyse des polysaccharides par HCl 2N à 100° pendant 2 heures, sont identifiés sous forme d'acétates d'alditol (Slonecker, 1972) par chromatographie en phase gazeuse (GLC).

Cette méthode permet d'identifier et de quantifier certains sucres constitutifs d'un polymères après hydrolyse. Elle a pour inconvénient de détruire le 3,6 anhydrogalactose et d'hydrolyser les groupements sulfates. Dans de telles conditions, cette méthode ne permet pas d'obtenir des informations sur la structure d'un carraghenane, mais d'évaluer quantitativement certains sucres faisant partie de polymères coexistant avec le carraghenane.

TROISIEME PARTIE
ISOLEMENT ET DESCRIPTION DES CARRAGENANES
EXTRAITS DE R. VERRUCULOSA

TROISIEME PARTIE - ISOLEMENT ET DESCRIPTION DES
CARRAGENANES EXTRAITS DE RISSOELLA VERRUCULOSA

I - Identification des principaux carragenanes, mise
en évidence d'un nouveau type de carragenane

A - Introduction

La seule étude du phycocolloïde de R. verruculosa qui figure dans la littérature fait état d'une teneur élevée en carragenane (50%) par rapport au poids sec de l'algue. Un spectre RMN de ce polymère permet aux auteurs d'identifier des carragenanes de type beta et kappa, respectivement majoritaires et minoritaires (Combaut et al., 1985).

En analysant les signaux RMN qui sont attribués au beta carragenane, il apparaît que l'identification proposée n'est pas satisfaisante. En effet, le raisonnement qui a permis l'interprétation du spectre RMN ne porte que sur les carbones anomériques, or il se trouve que les attributions des autres carbones permettent d'exclure la conclusion proposée par ces auteurs. La seule explication est que les signaux observés ont pour origine une structure différente du beta carragenane. Les signaux de certains carbones de cette structure se superposeraient à ceux du beta carragenane, ce qui est à l'origine de l'erreur d'identification.

Le spectre IR, publié également par Combaut, est très proche de celui d'un kappa carraghenane, et assez éloigné de celui d'une structure beta.

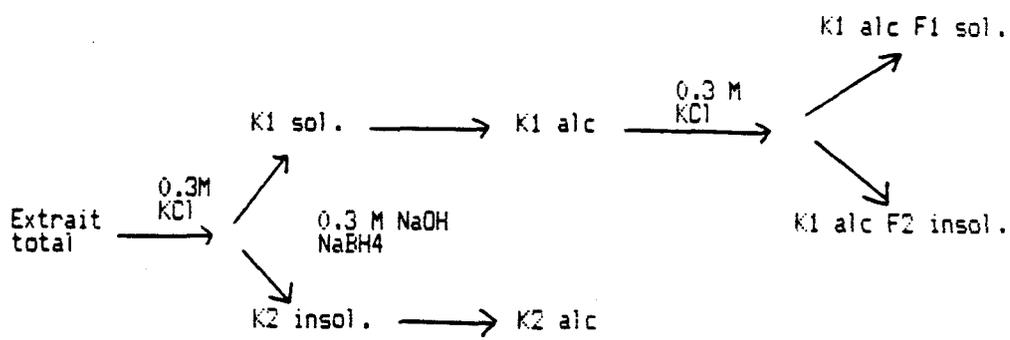
Lorsque nous avons entrepris l'étude du carraghenane de Rissoella, l'hétérogénéité du polymère nous était déjà apparue lors de son fractionnement par le KCl 0,3 M. L'existence d'une fraction, relativement importante (8 - 27 %), soluble dans le KCl 0,3 M, avait été à l'origine de notre intérêt pour cette espèce (Mollion et al., 1985), car elle est généralement considérée comme indicatrice de la présence de carraghenanes précurseurs. Au cours de l'étude des principaux carraghenanes de Rissoella, notre souci principal a été d'obtenir, dans un premier temps, une séparation de ces molécules sans modification de leur état initial. La technique de fractionnement par le KCl a donc été utilisée comme approche préliminaire pour mettre en évidence une hétérogénéité. Dans un deuxième temps, d'autres types de fractionnements, ont été choisis dans le but d'enrichir l'extrait en une structure dont on soupçonnait l'existence.

B - Protocole expérimental

Nous avons utilisé pour cette étude les échantillons R38 et R9, récoltés dans la nature (tableau 2), l'échantillon R42 provenant de la culture de l'échantillon

Tableau 5

Fractionnement du carraghenane de l'échantillon
R42 de R. verruculosa



R38, et l'échantillon R21 provenant de la culture de l'échantillon R20 (non étudié ici).

1 - préparation des échantillons

Les échantillons de carraghenane R38, R9, R42, et R21 ont été obtenus par une extraction dans l'eau à 90° et par une précipitation par le CTAB des échantillons de Rissoella correspondants.

2 - fractionnements des carraghenanes

La procédure de fractionnements successifs par le KCl, avant et après modification alcaline, est illustrée par l'exemple de l'échantillon R42 présenté dans le tableau 5.

3 - composition et identification des carraghenanes

Les méthodes utilisées sont communes à l'ensemble du travail et ont été décrites dans la 2^{ème} partie "matériel et méthode":

teneur en sucres totaux (méthode au phénol sulfurique),

teneur en 3,6 anhydrogalactose (méthode au résorcinol),

teneur en SO₄ (méthode turbidimétrique),

spectroscopie RMN du ¹³C,

spectroscopie IR.

TABLEAU 6

Teneur en carraghénane des échantillons de
R. verruculosa et résultats du fractionnement

	Echantillons				
	R42	R38	R9	R20	R21
% carraghénane total	59,9	62,1	56,4	58,2	52,8
% K1 ^a	27,3	4,7	16,1	13,5	18,3
% K2 ^a	61,3	73,7	73,7	66,8	68,0
% K1 alc ^b	66,8	78,9	68,1	-	-
% K2 alc ^b	75,6	-	94,1	-	-
% K1 alc F1 ^c	55,9	28,8	-	-	-
% K1 alc F2 ^c	34,8	46,6	-	-	-

^a exprimé par rapport au carraghénane total

^b rendement de la modification alcaline

^c exprimé par rapport à la fraction alcali modifiée

TABLEAU 7
Analyse des fractions de carraghenanes obtenues
à partir de l'échantillon R42

différentes fractions du carraghenane de R42	% sucres totaux ^a	% 3,6 AG ^a	% SO ₄ ^a	Gal: 3,6 AG: SO ₄ ^b
K1	69,6	25,2	16,6	1 : 0,63 : 0,70
K2	70,5	29,5	16,1	1 : 0,79 : 0,74
K1 alc	71,8	29,7	16,1	1 : 0,78 : 0,72
K2 alc	64,2	27,7	14,8	1 : 0,84 : 0,76
K1 alc F1	71,7	27,3	16,9	1 : 0,68 : 0,72
K1 alc F2	83,0	43,0	14,5	1 : 1,20 : 0,68

^a par rapport au poids de la fraction

^b rapport molaire; la quantité de galactose a été calculée par différence entre la quantité de sucres totaux et celle du 3,6 anhydrogalactose

C - Résultats et discussion

1 - Extraction et fractionnement

Le tableau 6 montre les teneurs en carraghénane de chaque échantillon et les résultats du fractionnement. L'analyse des principaux constituants de chaque fraction figure dans le tableau 7.

La teneur en carraghénane est assez semblable dans les 3 échantillons et représente une valeur assez élevée par rapport à celles obtenues à partir des autres carraghénophytes étudiés.

Une augmentation du rapport 3,6 anhydrogalactose/SO₄, après traitement alcalin a été décrite dans la littérature comme révélatrice de la présence d'unités liées en 4 et sulfatées en C6, elles-mêmes précurseurs du 3,6 anhydrogalactose.

Ce rapport 3,6 anhydrogalactose/SO₄ dans la fraction K2alc, obtenue par traitement alcalin de la fraction K2, n'augmente pas.

Ce même rapport augmente légèrement (de 0,9 à 1,08) dans la fraction K1alc, obtenue après traitement alcalin de la fraction K1. L'augmentation de ce rapport est uniquement due à l'augmentation du 3,6 anhydrogalactose, sans diminution simultanée de la teneur en SO₄, qui devrait se produire lors de la transformation d'un précurseur C6

sulfaté. Une autre explication doit être trouvée pour éclaircir ce phénomène.

La possibilité, après traitement alcalin, de séparer de la fraction K1, soluble dans le KCl 0,3 M, une fraction K1alcF2, insoluble dans le KCl 0,3 M, montre que ce traitement a dû provoquer une modification dans cette partie du polymère. Cette insolubilisation de la fraction K1alcF2 s'accompagne d'une forte augmentation de la teneur en 3,6 anhydrogalactose (de 25,2 à 43,0 %) alors que la teneur en SO₄ reste presque inchangée.

L'augmentation de la teneur en 3,6 anhydrogalactose ne résultant pas d'une transformation d'un précurseur 6-sulfaté, il faut admettre que le traitement alcalin provoque un effet autre que la "modification alcaline" telle qu'elle a été décrite dans la littérature (Wong et Craigie, 1978).

La présence de protéines liées aux carraghénanes a récemment été mise en évidence (King et Lauterbach, 1987). Ces auteurs ont montré que les liaisons entre les protéines et les carraghénanes pouvaient être hydrolysées par action d'une base. Une telle perte de protéines devrait se traduire par une modification de la teneur en certains constituants caractéristiques du carraghénane, ce qui pourrait expliquer les variations observées. Dans l'hypothèse où ces protéines serviraient de lien entre plusieurs types de carraghénanes, leur hydrolyse, après traitement alcalin, expliquerait la possibilité de séparer 2 nouvelles fractions par action de

KCl 0,3 M. La véritable portée de ce traitement alcalin permettant de séparer ces fractions sera réexaminée dans la discussion générale.

2 - Analyse par RMN du ^{13}C du carraghenane des différentes fractions

Le spectre RMN de la fraction R42K1alcF1 (soluble dans le KCl) présente 12 pics (Figure 3) suggérant que cette fraction est constituée d'unités répétitives d'un disaccharide. La figure 4 représente la structure de cette unité répétitive, que nous avons déduite du spectre RMN. Une telle structure, que l'on peut définir comme formée d'une répétition d'unité 3,6 anhydro-alpha-D-galactose alternant avec une unité beta-D-galactose 6-sulfate, constitue un nouveau type de carraghenane, que nous avons appelé omega carraghenane (Mollion et al., 1986). Les valeurs des déplacements chimiques du spectre RMN du ^{13}C de cette structure sont identiques à ceux du beta carraghenane (Greer et Yaphe, 1984^a) à l'exception des carbones C6, C5, C4 de l'unité galactose et du C4 de l'unité 3,6 anhydrogalactose. Le signal du C6 du galactose montre un déplacement de 5,9 ppm vers les bas champs, indiquant une sulfatation en C6 de cette unité (Lahaye et Yaphe, 1985). Les effets observés sur les autres carbones ($\Delta\Delta = - 2,4$ ppm et $\Delta\Delta = - 0,5$ ppm respectivement pour les C5 et C4 de l'unité

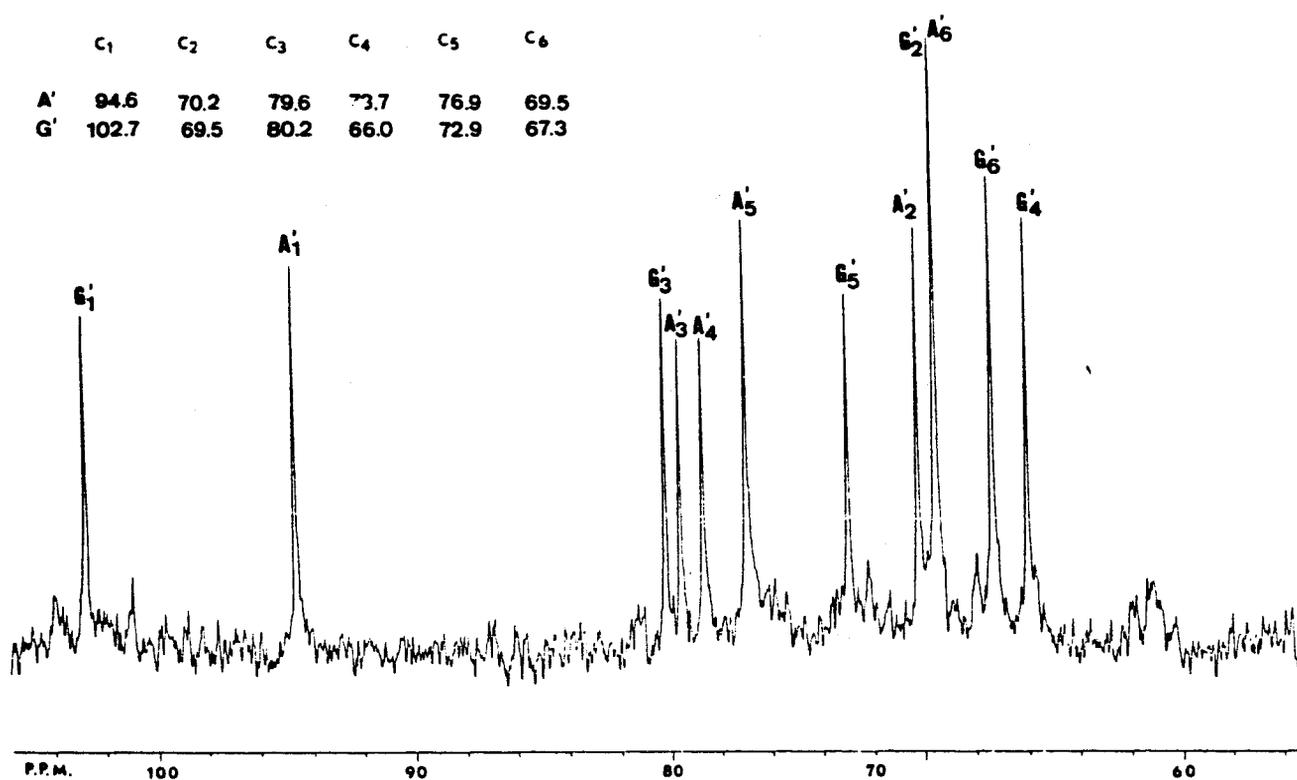


Figure 3 - Spectre RMN du ^{13}C de la fraction R42 K1 alc F1 du carraghenane de R. verruculosa, G' et A' se rapportent respectivement aux unités galactose et 3,6 anhydrogalactose de l'unité répétitive du omega carraghenane

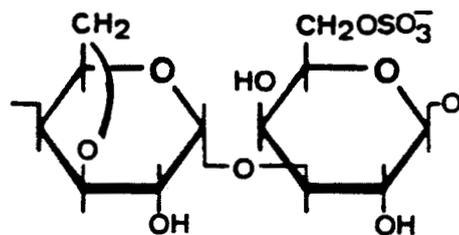


Figure 4- Structure proposée pour l'unité répétitive isolée dans la fraction R42 K1 alc F1, désignée sous le nom de omega carrageenane.

galactose; Delta delta = + 0,7 ppm pour le C4 de l'unité 3,6 anhydrogalactose) confirment la substitution proposée.

L'utilisation de séquences DEPT, qui modulent les intensité des signaux de ^{13}C en fonction du nombre de protons portés par ses carbones, permet d'identifier sans ambiguïtés les signaux provenant des carbones méthyléniques (C6). Dans la séquence choisie, les carbones méthyléniques donnent des intensités négatives. L'utilisation de cette technique permet de confirmer (figure 5) que les déplacements chimiques à 67,3 et 69,5 ppm correspondent bien respectivement aux C6 des unités galactose et 3,6 anhydrogalactose.

Le spectre de la fraction insoluble dans le KCl, R42K2 (figure 6), contient les 12 pics qui ont été attribués à la structure décrite pour la fraction R42K1alcF1, et des autres pics dont les assignements correspondent aux signaux obtenus à partir du kappa carraghenane (Rochas et al., 1980). Deux signaux d'intensité très faible, l'un à 75,3 ppm et l'autre à 66,5 ppm n'ont pu être identifiés qu'après obtention de ces mêmes signaux dans une fraction isolée par chromatographie échangeuse d'ion. L'étude du spectre RMN de cette dernière fraction (paragraphe "fractionnement D.E.A.E." de cette 3^{ème} partie) a montré que ces signaux correspondent respectivement au C5 et au C4 de l'unité galactose du beta carraghenane.

Les spectres RMN du ^{13}C des fractions R42K2alc, R42K1alcF2, R38K2, R38 K1alcF2 et R9K2alc sont identiques à ceux obtenus pour la fraction R42K2. Ces fractions peuvent donc être considérées comme constituées d'un mélange de kappa et de omega carraghenane, avec des traces de beta. Les spectres des fractions R42K1alcF2 et R38K1alcF2 sont décrits de manière plus détaillée dans la quatrième partie de cette étude.

3 - Analyse par spectroscopie IR des différentes fractions

Les signaux infra-rouges caractéristiques des différents substituants de la molécule de carraghenane ont été décrits dans la première partie de cette étude.

Le spectre IR de la fraction R42K2 est assez proche de celui que l'on obtient généralement à partir d'un kappa carraghenane, caractérisé par un pic à 845 cm^{-1} , avec cependant une petite inflexion supplémentaire dans la zone des $810\text{-}820\text{ cm}^{-1}$, caractéristique d'un groupement sulfate estérifiant un alcool primaire (figure 7).

On observe également un pic à 930 cm^{-1} , assez important, indiquant la présence de 3,6 anhydrogalactose, ainsi qu'un pic moins accentué à 895 cm^{-1} , que nous commenterons plus loin.

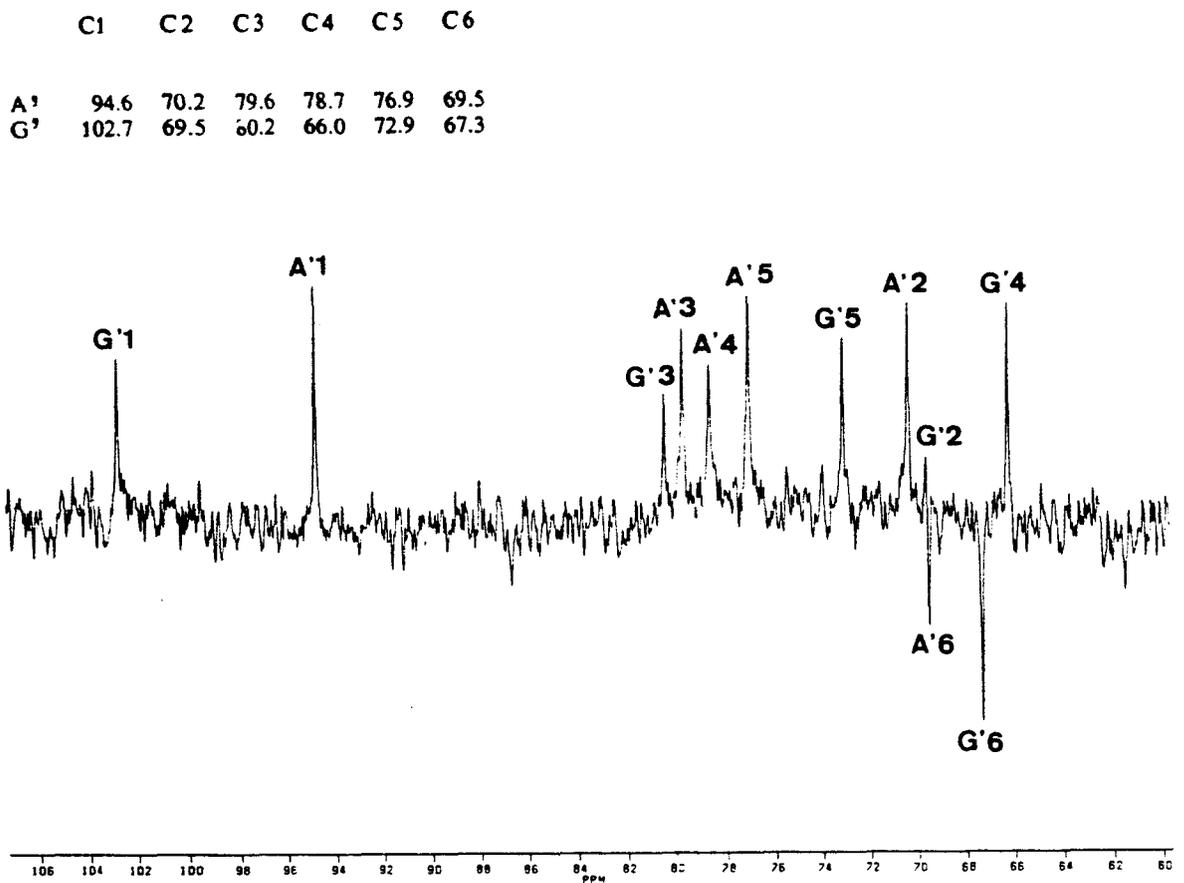


Figure 5 - Spectre RMN du ^{13}C en séquence DEPT de la fraction R42 K1 alc F1 du carraghenane de R. verruculosa G' et A' se rapportent respectivement aux unités galactose et 3,6 anhydro-galactose de l'unité répétitive de omega carraghenane

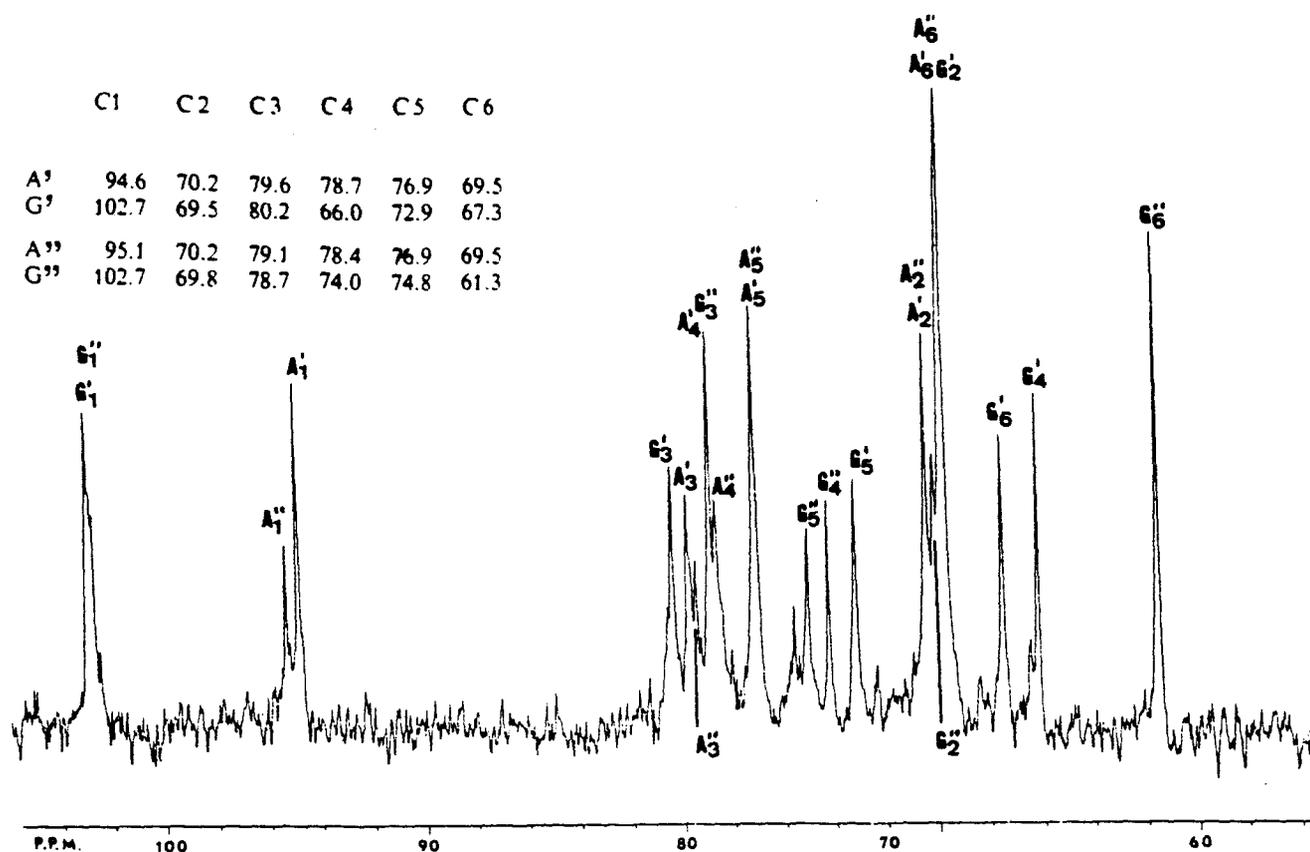


Figure 6- Spectre RMN du ^{13}C de la fraction R42 K2 du carragenane de R. verruculosa; les symboles suivants se rapportent respectivement aux unités répétitives galactose et 3,6 anhydrogalactose du omega (A', G') et kappa (A'', G'') carragenane.

On peut mesurer l'intensité d'un même signal IR dans les spectres des fractions K1 et K2.

On peut comparer des signaux dans les fractions K1 et K2 en estimant leur intensité par rapport à celle du signal correspondant au 3,6 anhydrogalactose. Les fractions K1 et K2 ont une teneur en 3,6 anhydrogalactose sensiblement identique. On peut ainsi comparer deux pics tout en s'affranchissant des différences d'absorption dues aux variations d'épaisseur du film IR.

Le spectre IR de la fraction R42 K1 (figure 8) diffère de celui de la fraction K2 par une réduction importante du pic à 845 cm^{-1} , qui n'est plus qu'un épaulement et par une forte augmentation du pic à 815 cm^{-1} .

Le spectre IR de la fraction R42 K1 est tout à fait conforme avec ce que l'on peut attendre d'une structure telle que celle révélée par le spectre RMN, constituée par du omega carraghenane (pic à 815 cm^{-1}), légèrement contaminé par du kappa. Le pic à 895 cm^{-1} présente une intensité sensiblement égale dans les spectres des fractions K1 et K2. Nous verrons par la suite que ce pic révèle la présence de beta carraghenane.

Le spectre IR de la fraction R42 K2 révèle des pics caractéristiques de omega, beta et kappa carraghenane. Ce résultat indique une composition identique à celle déduite du spectre RMN de la fraction R42 K2, mais diffère de celle-ci en ce qui concerne les pourcentages des différentes

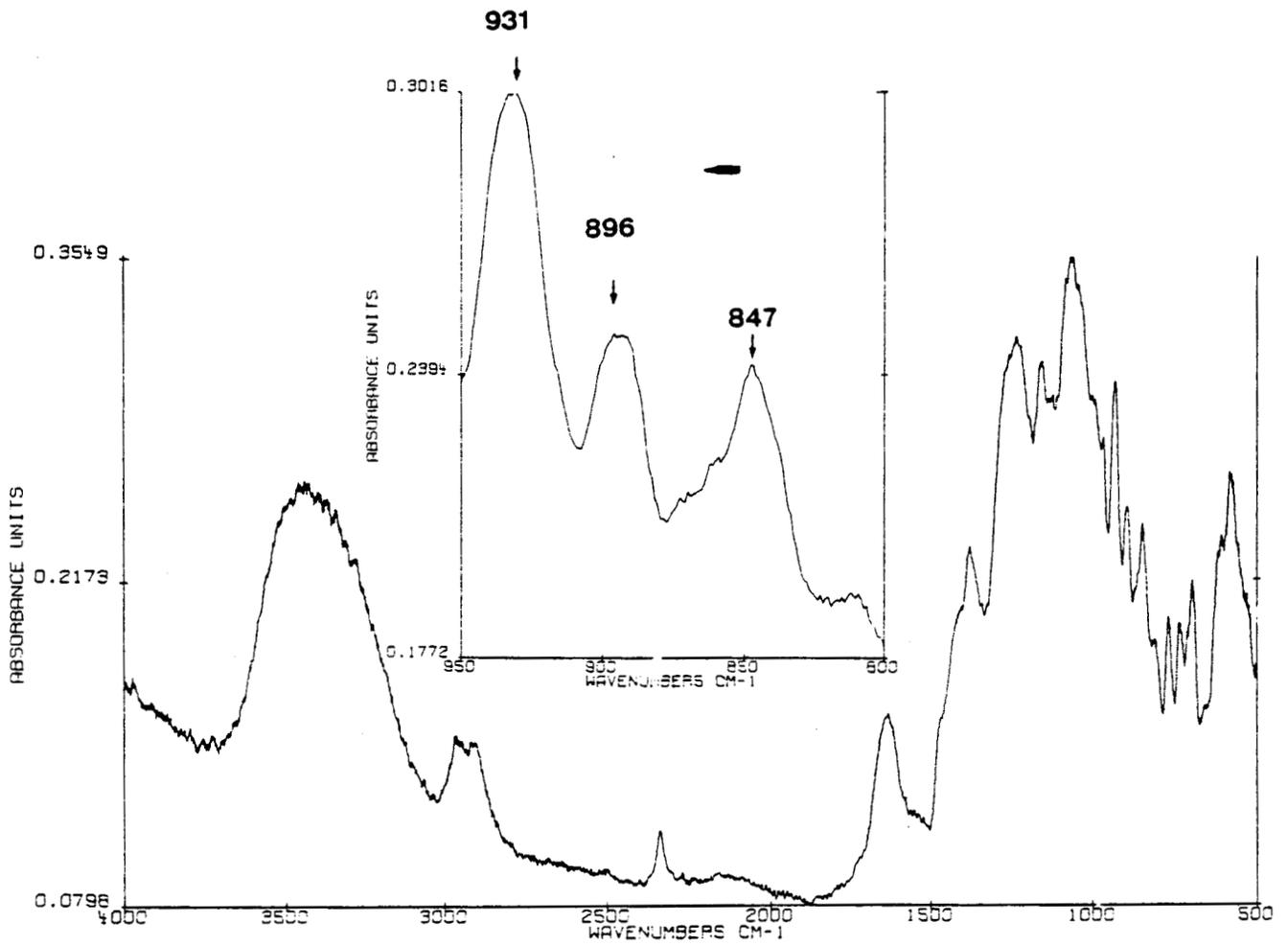


Figure 7- Spectre IR de la fraction R42 K2 du carraghenane de R. verruculosa.

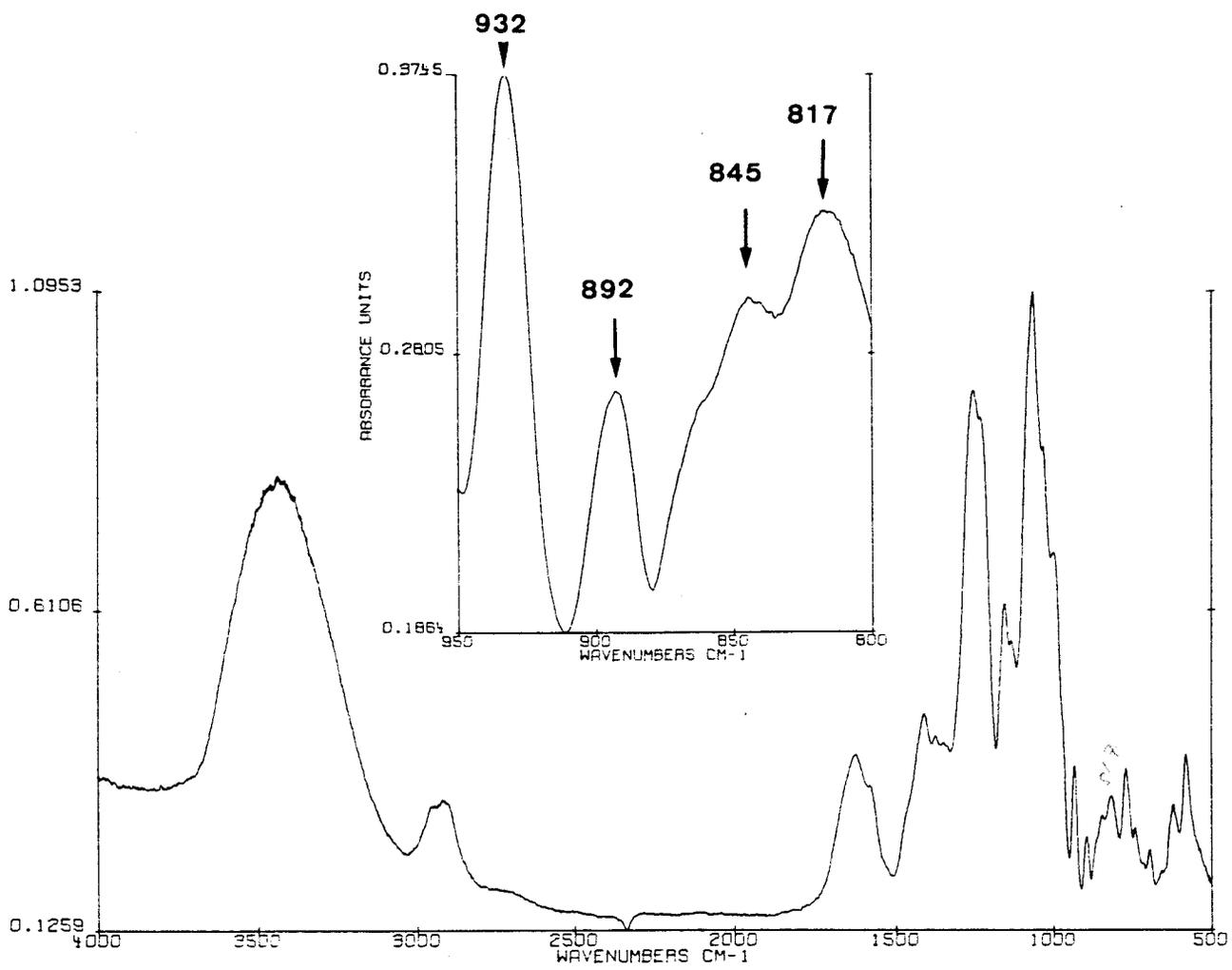


Figure 8 - Spectre IR de la fraction R42 K1 du carrageenane de R. verruculosa

structures. Ces pourcentages sont déduits des intensités relatives des différents pics correspondant à ces structures. Le spectre IR présente un pic à 845 cm^{-1} , révélateur de structure kappa, beaucoup plus important que le pic à 815 cm^{-1} attribué au omega carraghenane. L'intensité relative des signaux RMN correspondant à ces 2 structures indiquait, dans la fraction R42 K2 un omega nettement majoritaire par rapport au kappa .

L'abondance relative du omega carraghenane par rapport au kappa ayant été confirmée par des mesures gravimétriques après hydrolyse de ce dernier par la kappa carraghenase, l'intensité des pics IR correspondant ne reflète pas du tout le pourcentage réel des deux polymères.

D - Discussion

Un carraghenane de type nouveau que nous avons nommé omega carraghenane (figure 4) a été mis en évidence chez R. verruculosa. Le carraghenane de cette espèce est constitué à la fois des types omega et kappa ainsi que des traces de beta (mis en évidence plus loin), et non des types kappa et beta (neocarrabiose non sulphaté) comme décrit précédemment (Combaut et al., 1985).

Un spectre semblable à celui représenté dans la figure 6 a été obtenu à partir du carraghenane de Phyllophora nervosa (De Cand.) Grev. (Yarotsky et al., 1978). Les signaux contenus dans ce spectre ont été attribués à un carraghenane

hybride contenant à la fois la structure kappa et celle de l'unité répétitive du disaccharide proposé dans la figure 4. Usov, bien que n'ayant pas isolé cette structure (Yarotsky et al., 1978) a mis en évidence son existence par analyse des produits de méthylation du mélange des deux polymères (Usov et Arkhipova, 1981). Cet auteur a mentionné cette molécule comme étant "un représentant inhabituel d'un carraghenane de type kappa".

Le carraghenane que nous avons isolé dans l'extrait de R. verruculosa ne contient pas l'unité beta-D-galactose 4-sulfate, et ne fait donc pas partie de la famille des kappa carraghenanes (McCandless et Craigie, 1979).

Aucune famille de carraghenane, d'après la classification basée sur la nature de l'unité beta, ne contient celle-ci sous forme de beta D-galactose 6-sulfate. Le omega carraghenane constitue donc, à lui seul, une nouvelle famille de carraghenane (Mollion et al., 1988; et Mollion et al., sous presse). La figure 1 (1^{ère} partie) représente les différentes familles de carraghenanes après y avoir inclus le omega carraghenane.

La fraction contenant un carraghenane mixte omega-kappa a un pouvoir gélifiant plus élevé que celle dans laquelle nous n'avons mis en évidence que du omega carraghenane. Le faible pouvoir gélifiant de certaines fractions omega a permis d'isoler ce polymère dans la fraction soluble dans le KCl: K1alcF1. L'isolement de cette fraction n'a été possible

qu'après sa séparation de la fraction K1alcF2, contenant le mélange kappa-omega, rendue insoluble par traitement alcalin. Le mode d'action exact de ce traitement alcalin reste à déterminer, et semble différent de celui qui a souvent été invoqué dans la littérature pour expliquer la formation du 3,6 anhydrogalactose à partir de son précurseur. La raison exacte de la plus grande solubilité du omega carraghenane par rapport au mélange kappa-omega n'est pas connue. L'effet d'une sulfatation en C6 sur les propriétés rhéologiques des carraghenanes reste à étudier.

II - Recherche des précurseurs éventuels de ces carraghenanes, mise en évidence d'un beta carraghenane

A - Introduction

La classification des carraghenanes en différentes familles, basée sur la structure de l'unité beta, a été créée surtout pour rendre compte des liens biosynthétiques rassemblant les carraghenanes d'une même famille. Comme nous l'avons vu, le omega et le kappa carraghenanes, rencontrés tous deux chez R. verruculosa, appartiennent à 2 familles différentes (tableau 1). Quelle que soit l'importance que l'on accorde à cette classification, il n'en reste pas moins vrai que ces deux carraghenanes peuvent difficilement dériver directement l'un de l'autre; deux enzymes, une sulfohydrolase et une

sulfotransférase sont au minimum nécessaire pour la transformation du kappa en omega ou inversement. Ceci implique que même si une telle transformation existe, celle-ci se fait avec passage par un carraghenane intermédiaire. Cette structure intermédiaire ne peut être qu'un carraghenane non sulfaté, c'est-à-dire une structure beta. L'autre alternative, plus "classique", consiste à faire dériver chacun de ces carraghenanes de leur équivalent 6-sulfaté sur l'unité liée 1-4 (mu carraghenane précurseur du kappa). C'est cette dernière hypothèse que nous avons d'abord voulu vérifier. Notre premier souci a donc été de choisir des méthodes de fractionnement permettant d'obtenir des fractions enrichies en ce type de précurseur. La sulfatation en 6 de l'unité alpha ayant pour effet d'augmenter la solubilité du polymère, nous avons cherché à mettre à profit cette propriété physique.

Dans un deuxième temps nous avons cherché à séparer les molécules par des méthodes faisant appel à des propriétés physiques autres que la solubilité, afin de repérer, parmi les différents types de carraghenanes mis en évidence, ceux qui restaient toujours associés. La signification de cette impossibilité de dissocier certains types de carraghenanes de R. verruculosa est discutée.

B - Protocole expérimental

Nous avons utilisé pour cette étude l'échantillon R42 provenant de la mise en culture de l'échantillon R38 et l'échantillon R44 provenant de récolte naturelle (tableau 2).

1 - préparation des échantillons

Les échantillons R42CE et R44CE ont été obtenus par "extraction à froid" et précipitation par le CTAB des échantillons de Rissoella correspondants. L'échantillon de carraghenane R42 a été obtenu par une extraction par l'eau à 90° et une précipitation par le CTAB de l'échantillon de Rissoella correspondant.

2 - fractionnement KCl

Les produits de fractionnement par le KCl du carraghenane de l'échantillon R42 ont été obtenus suivant une procédure décrite dans le tableau 5.

3 - fractionnement D.E.A.E.

Le carraghenane de l'échantillon R42 a été soumis à un fractionnement sur colonne échangeuse d'ions (D.E.A.E. A25) suivant le protocole décrit dans la partie "matériel et méthodes"

4 - techniques d'identification

Les techniques suivantes ont été décrites dans la partie "matériel et méthodes":

- spectroscopie RMN du ^{13}C
- hydrolyse enzymatique par la kappa carraghenase

- précipitation par l'éthanol
- mesure de la teneur en sucres totaux (phenol sulfurique)
- dosage de la teneur en SO_4 (méthode turbidimétrique)

C - Résultats

1 - Recherche des précurseurs 6-sulfatés, fractionnement par le KCl

Le spectre RMN du ^{13}C de la fraction R42K1alcF1 a déjà été présenté et étudié au paragraphe précédent. Celui de la fraction R42K1 soluble dans le KCl 0,3 M est présenté dans la figure 9. Cette fraction, qui constitue 27,3 % du carraghenane de Rissoella, contient les polymères les plus solubles, et, par conséquent, devrait être enrichie en structures alpha-D-galactose 6-sulfate si celles ci sont présentes.

Le spectre de la fraction R42K1 est presque identique à celui correspondant à la fraction R42K1alcF1 (figure 3), qui ne contient que des signaux attribués à la structure omega carraghenane. En plus de ces signaux, tous présents dans le spectre de la fraction R42K1, on observe certains signaux, tout juste perceptibles, que l'on peut attribuer à des traces de structure kappa. Si une structure, contenant

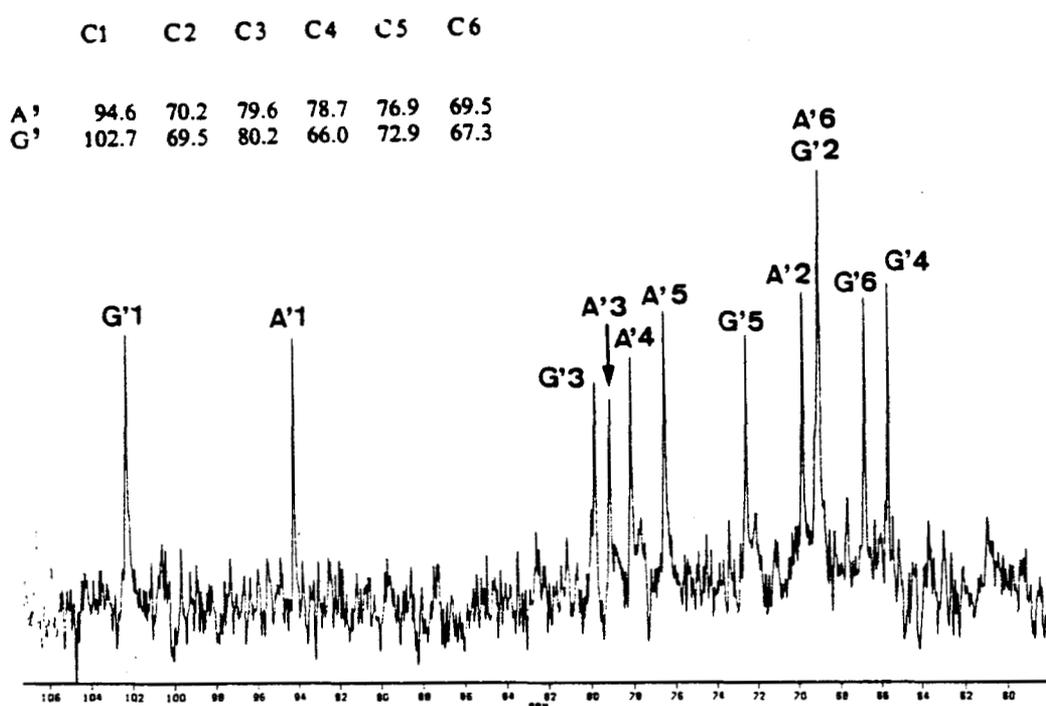


Figure 9- Spectre RMN du ^{13}C de la fraction R42 K1 du carragenane de R. verruculosa, G' et A' se rapportent respectivement aux unités galactose et 3,6 anhydrogalactose de l'unité répétitive du omega carragenane.

l'unité alpha-D-galactose 6-sulfate, était présente dans cette fraction, cela se traduirait par des signaux RMN situés entre 103 et 105 ppm, correspondant au C1 de cette unité.

Aucun signal n'ayant été détecté dans cette gamme de déplacements chimiques, on peut admettre que les polymères de cette fraction ne contiennent pas de précurseurs alpha-D-galactose 6-sulfate, au moins à une concentration supérieure au niveau de détection permis par cette technique.

2 - Recherche des précurseurs 6-sulfatés, analyse de "l'extractible à froid"

La précipitation par le CTAB de "l'extractible à froid" obtenu à partir de l'échantillon R44 permet d'obtenir un polymère représentant 18,0 % du poids sec de la plante avant extraction.

Ce polymère peut être fractionné en une fraction soluble dans le KCl 0,3 M R44CEK1 (13,9 %) et en une fraction insoluble R44CEK2 (86,1 %).

Le spectre RMN de la fraction R44CEK1 montre (figure 10) qu'elle contient essentiellement du omega carraghenane, avec des traces de beta. Cette fraction a été soumise à une hydrolyse par la kappa carraghenase. L'absence totale de détection de structure kappa par spectroscopie RMN est

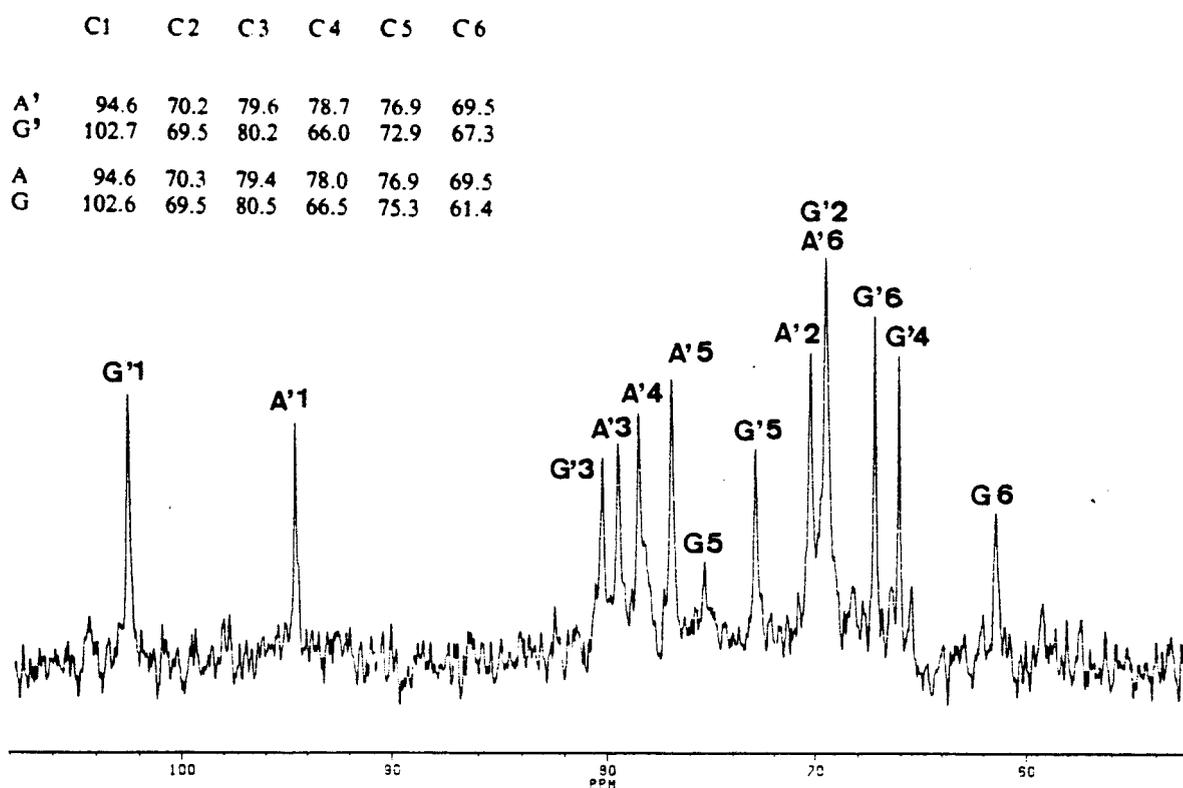


Figure 10- Spectre RMN du ^{13}C de la fraction extractible à froid R44 CE K1 du carraghenane de R. verruculosa, les symboles suivants se rapportent respectivement aux unités répétitives galactose et 3,6 anhydrogalactose du beta (A,G) et omega (A',G') carraghenane.

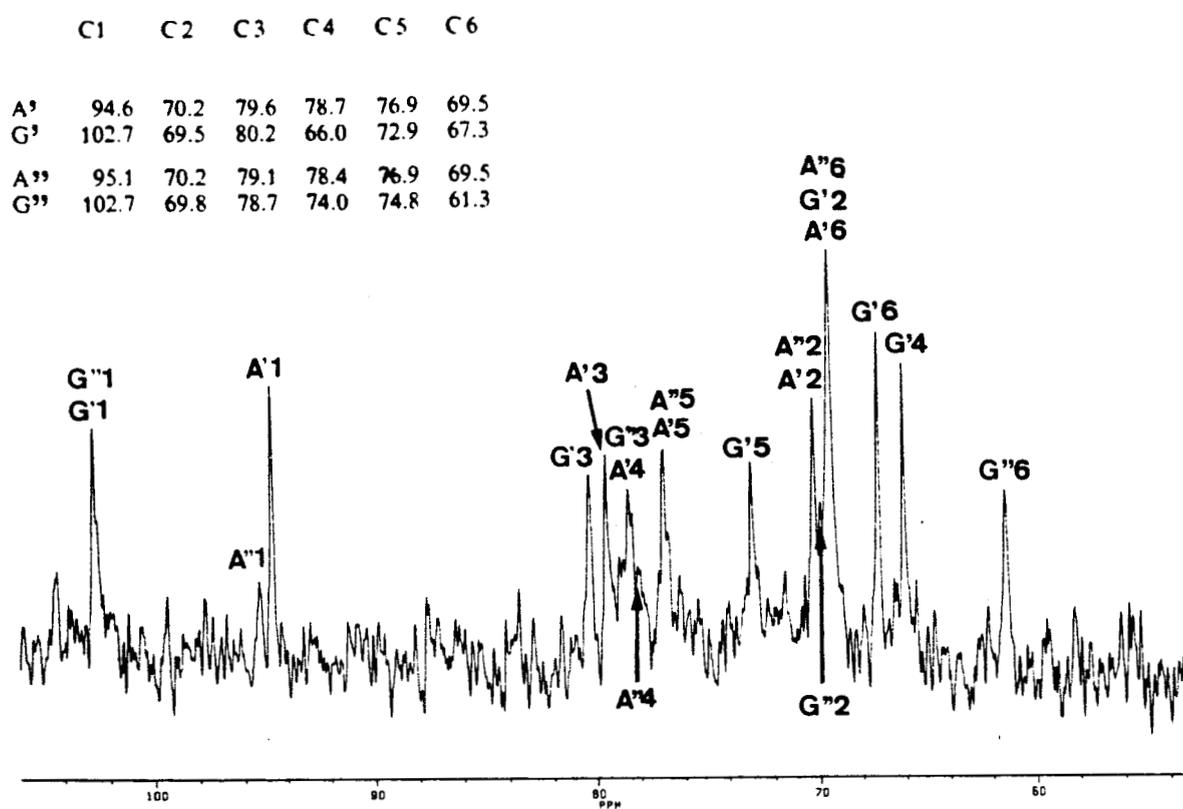


Figure 11- Spectre RMN du ^{13}C de la fraction extractible à froid R44 CE K2 du carraghenane de R. verruculosa, les symboles suivants se rapportent respectivement aux unités répétitives galactose et 3,6 anhydrogalactose du omega (A', G') et kappa (A'', G'') carraghenane.

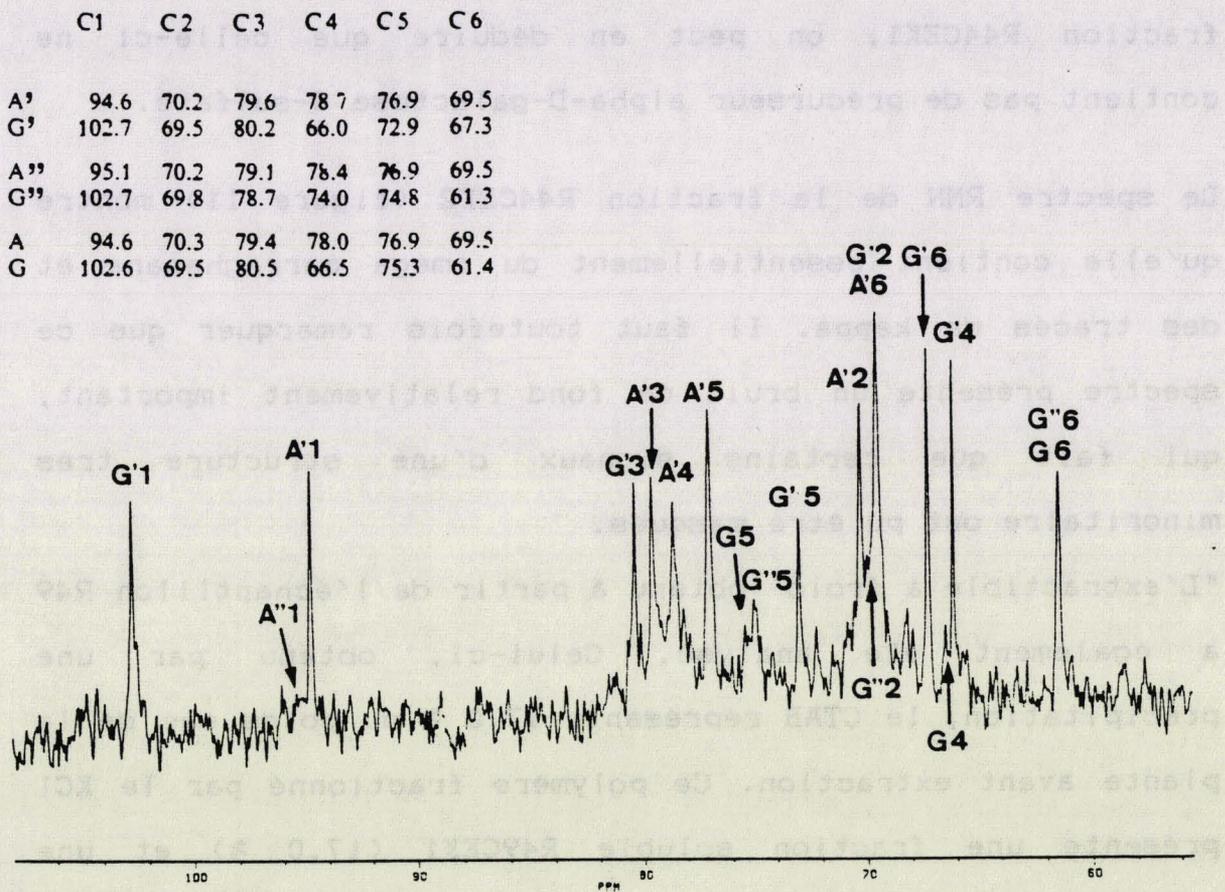


Figure 12- Spectre RMN du ^{13}C de la fraction extractible à froid R49 CE K2 du carraghénane de R. verruculosa, les symboles suivants se rapportent respectivement aux unités répétitives galactose et 3,6 anhydrogalactose du beta (A,G), omega (A',G') et kappa (A'',G'') carraghénane.

confirmée par l'impossibilité d'obtenir une hydrolyse de ce polymère par la kappa carragenase.

Aucun signal n'étant visible entre 103 et 105 ppm (Bellion et al., 1981; Greer et Yaphe, 1984^a) dans le spectre de la fraction R44CEK1, on peut en déduire que celle-ci ne contient pas de précurseur alpha-D-galactose 6-sulfate.

Le spectre RMN de la fraction R44CEK2 (figure 11) montre qu'elle contient essentiellement du omega carragenane et des traces de kappa. Il faut toutefois remarquer que ce spectre présente un bruit de fond relativement important, qui fait que certains signaux d'une structure très minoritaire ont pu être masqués.

"L'extractible à froid" obtenu à partir de l'échantillon R49 a également été analysé. Celui-ci, obtenu par une précipitation, le CTAB représente 17,0 % du poids sec de la plante avant extraction. Ce polymère fractionné par le KCl présente une fraction soluble R49CEK1 (17,0 %) et une fraction insoluble R49CEK2 (82,9 %). Le spectre ¹³C RMN de la fraction R49CEK2 (figure 12) est très semblable à celui de la fraction correspondante de R44, R44CEK2, dont il ne diffère que par la présence de traces de beta.

3 - Fractionnement D.E.A.E.- A25 du carragenane total

Le carragenane de l'échantillon R42 a été fractionné sur colonne échangeuse d'ions, D.E.A.E.- A25 à 40°.

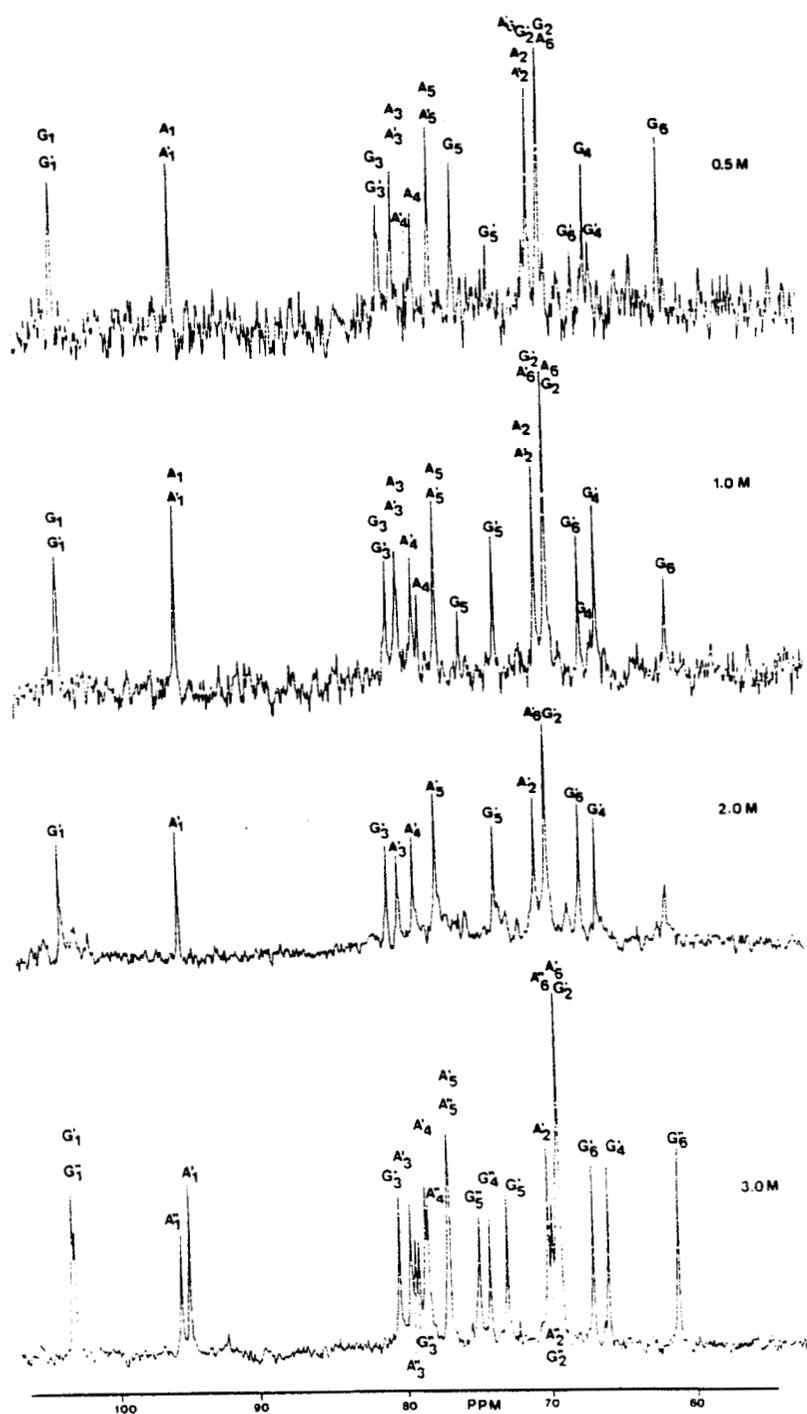


Figure 13- Spectre RMN du ^{13}C des differentes fractions d'élution obtenues par fractionnement D.E.A.E du carraghenane de l'échantillon R42 de *R. verruculosa*. Les symboles suivants se rapportent respectivement aux unités répétitives galactose et 3,6 anhydrogalactose du beta (A,G), omega (A',G') et kappa (A'',G'') carraghenane.

La première élution, effectuée à l'eau, ne contient pas de polysaccharide.

Le tableau 8 montre les quantités de chaque fraction obtenues par des éluions successives 0,5 M, 1 M, 2 M, et 3 M NaCl. La fraction éluee par 3M NaCl n'a pu être obtenue qu'après avoir porté à ébullition pendant 3 mn le gel D.E.A.E. contenant le polymère. Dans une expérience témoin nous avons vérifié que, en absence de carraghenane, le gel D.E.A.E.- A25 soumis à ce même traitement ne libérait aucun polysaccharide. La rétention du carraghenane dans le gel D.E.A.E.- A25 à une température de 50° et pour une force ionique supérieure à NaCl 2 M s'explique sans doute par une insolubilisation de celui-ci à de telles concentrations.

Les spectres RMN du ^{13}C des différentes fractions sont représentés dans la figure 13 et leurs teneurs en SO_4 dans le tableau 9.

Les spectres des fractions 0,5 M et 1 M NaCl présentent les 12 pics que nous avons attribué à l'unité répétitive de omega carraghenane (Mollion et al., 1986), ainsi que d'autres pics dont les déplacements chimiques ont été attribués à une structure beta carraghenane (Greer et Yaphe, 1984^a).

TABLEAU 8

Quantité de matériel obtenu dans les différentes fractions
d'éluion de l'échantillon R42 de R. verruculosa

fraction	% du carraghenane
	total avant fractionnement
0,5 M	6,5
1,0 M	16,5
2,0 M	14,5
3,0 M	48,0

rendement	85,5 %

Tableau 9

Teneur en SO_4 des différentes fractions D.E.A.E.
de l'échantillon R42 de R. verruculosa

fraction	% SO_4^a
0,5 M	15,0
1,0 M	17,0
2,0 M	28,1
3,0 M	17,9

^apourcentage en poids par rapport aux sucres totaux

La comparaison de la hauteur des pics se rapportant aux deux structures montre que le beta carraghenane est quantitativement plus important que le omega dans la fraction 0,5 M, alors que dans la fraction 1 M le rapport inverse est observé.

L'analyse RMN des fractions 2 M et 3 M montre que la première contient du omega carraghenane pur (valeurs des déplacements chimiques dans la figure 3), et la deuxième à la fois les structures omega et kappa. Les hydrolyses par la kappa carraghenase confirment la présence de structure kappa dans la fraction 3M. Des traces d'oligosaccharides ont été détectées dans la fraction 2 M après hydrolyse par la kappa carraghenase. Ceci indique que du kappa carraghenane est présent dans la fraction 2 M, mais en quantité trop faible pour être détectée par la technique RMN.

La teneur en SO_4 augmente avec la force ionique d'éluion depuis la fraction 0,5 M jusqu'à la 2 M, puis diminue dans la fraction 3 M.

D - Discussion

Aucun carraghenane contenant des unités galactose 6-sulfate lié 1-4, considérée comme le précurseur de l'unité 3,6 anhydrogalactose, n'a pu être isolé par les différentes méthodes de fractionnement que nous avons utilisées. Ces méthodes, basées sur la solubilité (séparation KCl, "extractible à froid") et sur la charge (DEAE), sont

suffisamment sélectives pour que l'on puisse considérer que l'unité 6-sulfaté liée 1-4, si elle existe, ne doit représenter que des quantités extrêmement faibles. Cette non-détection des précurseurs "classiques" nous a poussé à nous intéresser à d'autres types de précurseurs éventuels.

Le fractionnement D.E.A.E. a permis de détecter sans ambiguïté un troisième type de carraghenane chez R. verruculosa, le beta carraghenane.

Aucun précurseur 6-sulfaté n'ayant pu être isolé, la présence du beta carraghenane, coexistant avec le kappa et le omega, rend envisageable que le premier soit le précurseur commun des deux autres.

Cette voie biosynthétique, dans laquelle les carraghenanes sulfatés dériveraient d'une structure beta non sulfatée, est totalement différente du processus de désulfatation décrit pour la biosynthèse de la plupart des carraghenanes.

Considérant qu'il était sans doute prématuré d'aborder une véritable étude de biosynthèse qui nous aurait entraîné à rechercher les enzymes responsables de cette sulfatation et à utiliser un système de marquage radioactif, nous nous sommes efforcés de repérer les catégories de carraghenanes que nous ne parvenions pas à séparer comme moyen pour démontrer qu'elles pouvaient être associées pour constituer une macromolécule hétérogène à séquences multiples.

S'il se confirme que des liaisons covalentes sont responsables de la non-dissociation de telles structures, on peut penser que ce lien entre deux structures carraghenanes

a une signification biosynthétique. Une telle approche des relations entre les carraghenanes est basée sur les résultats des fractionnements que nous venons de présenter, ainsi que sur d'autres fractionnements qui sont mentionnés dans la partie "relations entre les carraghenanes".

Sans vouloir anticiper la discussion sur la signification de ces relations, on peut dès à présent essayer de dégager quelles sont les associations de carraghenanes mises en évidence par les expériences de fractionnement pour la recherches de précurseurs sulfatés.

Le beta carraghenane qui est un polymère neutre (non sulfaté) ne se retrouve jamais dans la fraction éluee à l'eau sur un gel de D.E.A.E. sephadex. Il est donc probable qu'il se trouve toujours associé à un autre carraghenane, lui-même chargé. Les conditions opératoires dans lesquelles nous avons effectué le fractionnement D.E.A.E. (50°), rendent peu probable un phénomène de co-entraînement des deux polymères. Lorsque le gel échangeur d'ions est éluee par NaCl 0,5 M et 1 M, les fractions obtenues contiennent effectivement le beta carraghenane avec du omega en mélange dans des proportions croissantes en faveur du second. Le fait que nous n'avons jamais réussi à les séparer plaide en faveur d'une association entre les deux catégories de carraghenane pour constituer une macromolécule hybride.

Le kappa carraghenane ne coexiste jamais avec le beta dans une même fraction d'élution du gel D.E.A.E. Il est

également frappant de constater que parmi les deux fractions du extractible à froid séparées par action du KCl, celle constituée de omega et de beta (la plus soluble, K1), ne contient aucune trace de kappa, et inversement celle constituée de omega et de kappa (la moins soluble, K2), ne contient aucune trace de beta.

On peut enfin signaler, pour terminer cette analyse des résultats du fractionnement sur gel de D.E.A.E., le fait que la teneur en SO_4 , exceptée celle de la fraction 3 M, augmente avec la force ionique de la fraction jusqu'à 2 M (tableau 9). Ceci reflète la diminution progressive en structure beta, et corrélativement l'augmentation en structure sulfatée qui atteints la valeur de 28,1 % dans la fraction 2 M. Cette fraction entièrement constituée par du omega carraghenane, aurait dû avoir une teneur en sulfate de 25 %, calculée sur la base d'un groupement SO_4 par unité de disaccharide. La diminution de la teneur en sulfate dans la fraction 3 M (17,9 %), qui contient également des carraghenanes caractérisés par un groupement SO_4 par disaccharide, reste inexplicée. Toute désulfatation partielle des polymères de la fraction 3 M se traduirait par l'apparition de nouveaux signaux RMN, ce qui n'est pas le cas. Il subsiste l'hypothèse que des carraghenanes moins chargés (composé de beta) aient pu gélifier dans la colonne et ne pas avoir été élués dans la fraction correspondant à

leur véritable charge. Le traitement particulier de la fraction 3 M (ébullition) permettrait de les ressolubiliser.

III - Etude par chromatographie en phase gazeuse des sucres totaux extractibles par hydrolyse acide de l'algue entière

Cette étude a été entreprise afin de détecter chez Rissoella la présence d'éventuelles traces de dérivés méthylés du galactose. Ces unités très fréquentes dans l'agar (Araki, 1966) ont été détectées dans certains polymères proches des carraghenanes (Allsobrook et al., 1971).

Un aliquot d'algue sèche, réduit à l'état de poudre par broyage a été analysé en chromatographie en phase gazeuse après hydrolyse.

A - protocole expérimental

Les dérivés d'acétates d'alditols obtenus à partir de l'échantillon R42 de R. verruculosa ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse par une technique décrite dans la partie "matériel et méthodes". La technique utilisée n'aboutit pas à l'hydrolyse totale de l'échantillon. Elle est cependant suffisante pour que la totalité des monosaccharides constitutifs des polymères hydrosolubles soient libérés.

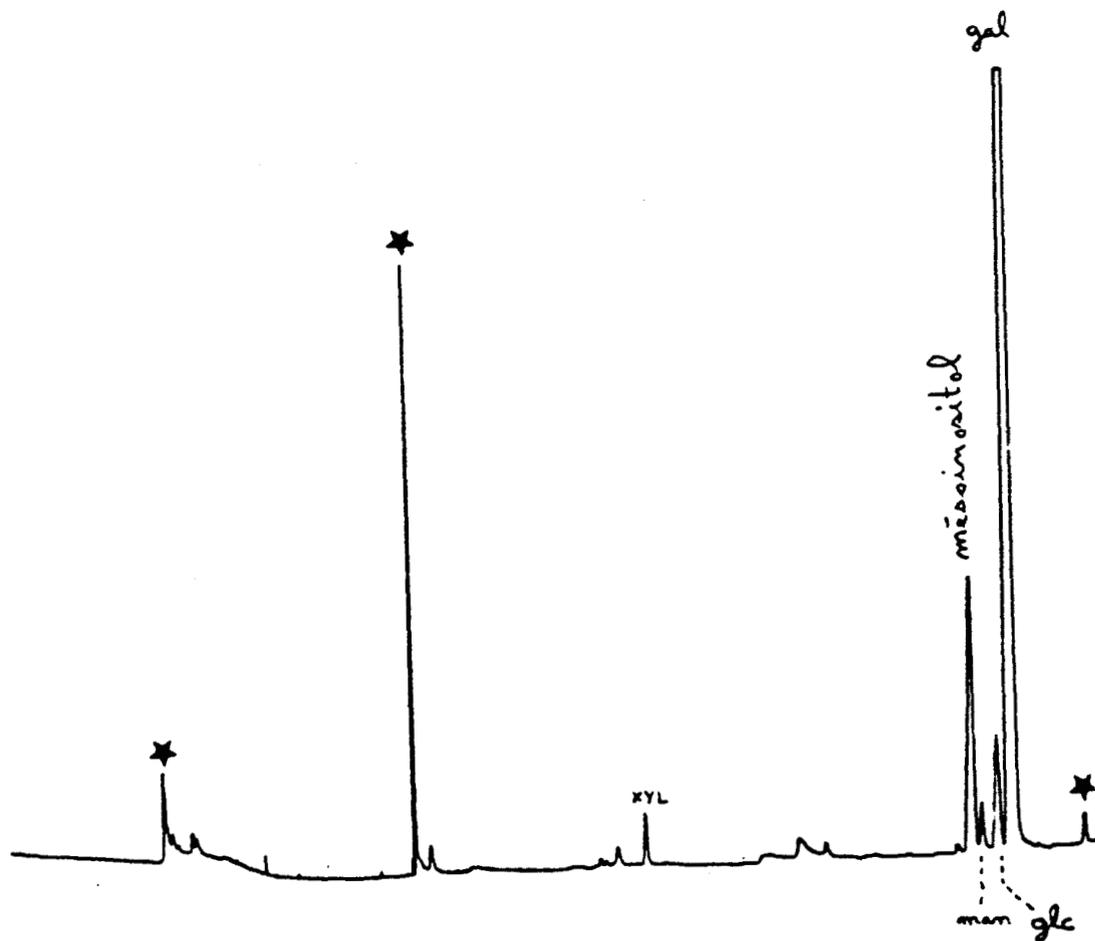


Figure 14 - Chromatographie en phase gazeuse des monosaccharides (alditol acetates) obtenus par hydrolyse de la poudre d'algue entière de l'échantillon R42 de R. verruculosa

★ pics dûs au solvant

Tableau 10

Teneur en sucres libérés par hydrolyse des polysaccharides à partir de la poudre d'algue entière de l'échantillon R42 de R. verruculosa

Sucres	% par rapport au poids sec de l'algue entière
Xylose	0,4 %
Mannose	0,4 %
Glucose	1,6 %
Galactose	30,6 %

B - résultats et discussion

L'analyse du chromatogramme obtenu (figure 14 et tableau 10) montre que le galactose représente la très large majorité des monosaccharides hydrolysés. Aucun dérivé méthylé du galactose n'est détecté. Parmi les autres monosaccharides identifiés on trouve de faibles quantités de xylose. Il a été montré que chez Porphyridium cruentum ce sucre permet le lien entre les protéines et les galactanes sulfatés, extraits de cette algue rouge (Heaney-Kieras et al., 1977).

IV - Les différents types de carraghenanes rencontrés chez *R. verruculosa* peuvent-ils coexister chez un même individu ?

A - Introduction

Toutes les hypothèses que nous avons formulées précédemment sur la biosynthèse des carraghenanes sont basées sur des relations de non dissociation lors des différents fractionnements effectués. Il a été déduit de ces relations que certains de ces carraghenanes étaient probablement associés au sein d'une molécule hybride. Tous les carraghenanes ainsi analysés proviennent d'échantillons constitués de plusieurs individus récoltés dans les mêmes conditions. Nous avons voulu vérifier que les différents types de carraghenanes décrits chez *R. verruculosa* ne

provenaient pas d'individus distincts, mais coexistaient bien chez un même individu.

Comme nous l'avons dit précédemment, il a été montré que chez Chondrus crispus la génération haploïde produisait du kappa carraghenane et la génération diploïde du lambda (McCandless et al., 1973). La seule façon de différencier les générations diploïdes et haploïdes chez R. verruculosa est d'observer des organes de reproduction sexuelle. Les individus portant de tels organes étant peu fréquents chez R. verruculosa, nous n'avons pu réunir ces individus en quantité suffisante pour une étude de leur carraghenane. Nous nous sommes limité à faire l'extraction et l'analyse des carraghenanes d'un seul individu de R. verruculosa choisi en raison de sa très grande taille, l'objectif étant de vérifier si tous les types de carraghenanes rencontrés chez un mélange d'individus étaient présents chez cet individu unique.

B - Protocole expérimental

L'échantillon R51 a été récolté à Bastia le 03-03-87. Cet échantillon, contrairement à la procédure utilisée pour les autres, n'a pas été rincé à l'eau douce avant d'être soumis à extraction.

- préparation des échantillons

Un seul individu (115 mg sec) de l'échantillon R51 a été soumis à une extraction par l'eau à 90° et les carraghenanes précipités par le CTAB.

- techniques analytiques
spectroscopie RMN du ^{13}C

C - Résultats

Le spectre RMN ^{13}C du carraghenane de l'échantillon R51 est représenté dans la figure 15. Ce spectre montre que les 3 types de carraghenanes rencontrés dans les autres échantillons de R. verruculosa, omega kappa et beta, se rencontrent dans l'individu R51, dans des proportions identiques à celles observées à partir du mélange de plusieurs individus.

D - Discussion

L'analyse des carraghenanes provenant d'un même individu montre que R. verruculosa contient simultanément les catégories omega, kappa et beta de ce type de polymère. Il est cependant impossible de préciser quelle est l'influence

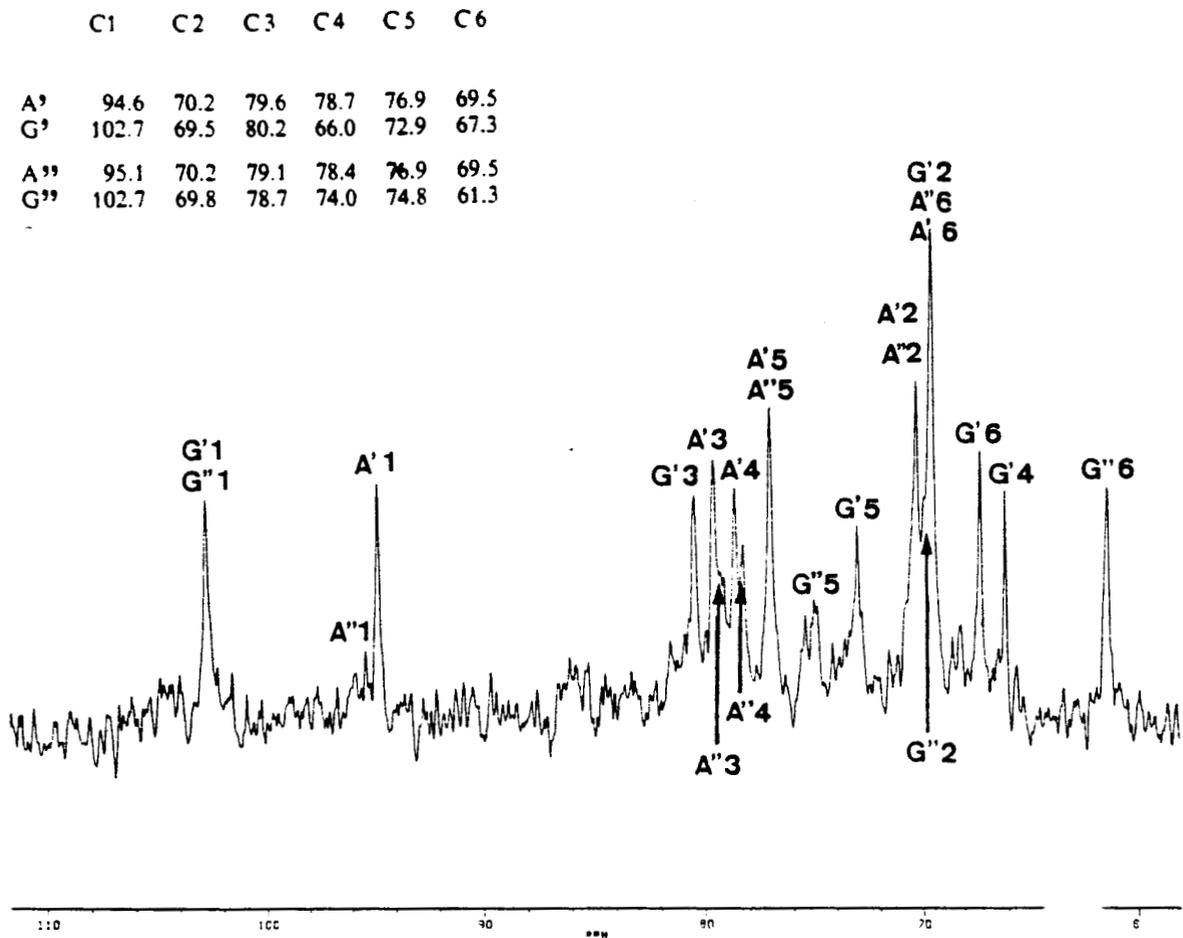


Figure 15- Spectre RMN du ^{13}C du carragenane extrait de l'échantillon R51 de R. verruculosa, les symboles suivants se rapportent respectivement aux unités répétitives galactose et 3,6 anhydrogalactose du omega (A',G') et kappa (A'',G'') carragenane.

de l'état sexuel de la plante sur la distribution de ces carraghenane. La plupart des échantillons analysés étaient constitués presque exclusivement de plantes stériles, accompagnées de traces d'échantillons cystocarpiques (inférieur à 5%). Leur présence ne pouvait modifier en quoi que ce soit les spectres RMN du polymère extrait du mélange de ces différentes catégories de plantes.

V - Identification des produits d'hydrolyse de ces carraghenanes

A - Introduction

Seule l'action de la kappa carraghenase a été testée. Cette enzyme est connue pour la spécificité de son action sur l'hydrolyse des kappa carraghenanes (Weigl et Yaphe, 1966a). Nous avons décidé de nous servir de cette enzyme comme moyen de détection de la présence de la structure kappa carraghenane. Un nouveau type de carraghenane, le omega, ayant été mis en évidence chez Rissoella, il était nécessaire de vérifier que la kappa carraghenase n'hydrolysait pas ce dernier polymère.

Nous avons également utilisé cette enzyme pour obtenir un carraghenane enrichi en structure autre que kappa dans la fraction résistante à l'enzyme, (FRE). Il est nécessaire pour cela de vérifier au préalable que l'action de la kappa

carragenase sur le kappa carragenane ne pouvait en aucun cas désulfater ce polymère pour le transformer en beta. La plupart des carragenases ne sont en effet que partiellement purifiées. Une activité désulfatase, due à une enzyme distincte, accompagne souvent l'activité carragenase, lorsque l'enzyme responsable de cette dernière action est mal purifiée (Weigl et Yaphe, 1966b).

B - Protocole expérimental

Nous avons utilisé pour cette étude l'échantillon de Rissoella R42.

1 - préparation des échantillons

L'échantillon de carragenane R42, obtenu par une extraction dans l'eau à 90° et une précipitation par le CTAB, a été fractionné par du KCl 0,3 M. La fraction K2 alc a été obtenue par modification alcaline de la fraction insoluble K2

2 - séparation de la fraction hydrolysée et de la fraction résistante à l'enzyme

2 méthodes ont été utilisées:

La première consiste à précipiter par 3 volumes d'éthanol à 95% la fraction non hydrolysée du carragenane de R42K2alc, soumise préalablement à l'action de la kappa carragenase, et de la séparer ainsi de la fraction hydrolysée. Cette méthode a été choisie pour l'obtention de la fraction résistante à l'enzyme, FRE, du carragenane de R42K2alc,

isolée après redissolution et dialyse de la fraction précipitable à l'éthanol.

La deuxième méthode consiste à passer 2 fois sur colonne Biogel P2 l'hydrolysate de R42K2alc et de séparer en sortie de colonne, les fractions ne migrant pas des fractions migrant par chromatographie TLC. Cette méthode a permis l'isolement du disaccharide produit par l'action de la kappa carragenase sur l'échantillon R42K2alc.

3 - autres techniques

Les techniques suivantes sont décrites dans la partie "matériel et méthode":

- hydrolyse du kappa carragenane par la kappa carragenase
- précipitation du carragenane par l'éthanol
- chromatographie TLC

C - Résultats

1 - Isolement du disaccharide néocarrabiose 4-sulfate:

140 mg de l'échantillon R42K2alc, hydrolysé par la kappa carragenase, permettent d'obtenir un mélange de polymère non hydrolysé (FRE) et d'oligomères qui peuvent être séparés sur colonne de Biogel P2. 9 mg d'un disaccharide sont ainsi isolés.

L'absence de contamination par un tétrasaccharide est vérifiée par chromatographie TLC.

Le spectre RMN du ^{13}C de ce disaccharide (figure 16) est strictement identique à celui décrit et interprété par Rochas pour le disaccharide (oligomère DP1) obtenu à partir du kappa carraghenane (Rochas et al., 1983). Les valeurs des déplacements chimiques du spectre que nous avons obtenu (tableau 10) sont en plein accord avec les attributions déduites de l'interprétation de ces auteurs.

Aucune trace d'oligomère kappa de degré de polymérisation supérieur à DP1, ou de contamination par une autre structure, n'est visible dans ce spectre.

L'absence d'oligomère désulfaté dans les produits d'hydrolyse montre que la kappa carraghenase que nous avons utilisé ne possède pas d'activité désulfatase contaminante.

Tableau 11

Valeurs des déplacements chimiques en RMN
du ^{13}C du disaccharide obtenu par hydrolyse
par la kappa carragenase de la fraction R42 K2alc

Unité	C1	C2	C3	C4	C5	C6
G alpha	92,7	67,6	75,7	75,3	69,9	61,7
G beta	96,9	71,0	78,9	74,3	74,9	61,7
A	95,0	69,9	81,2	70,4	77,7	69,4

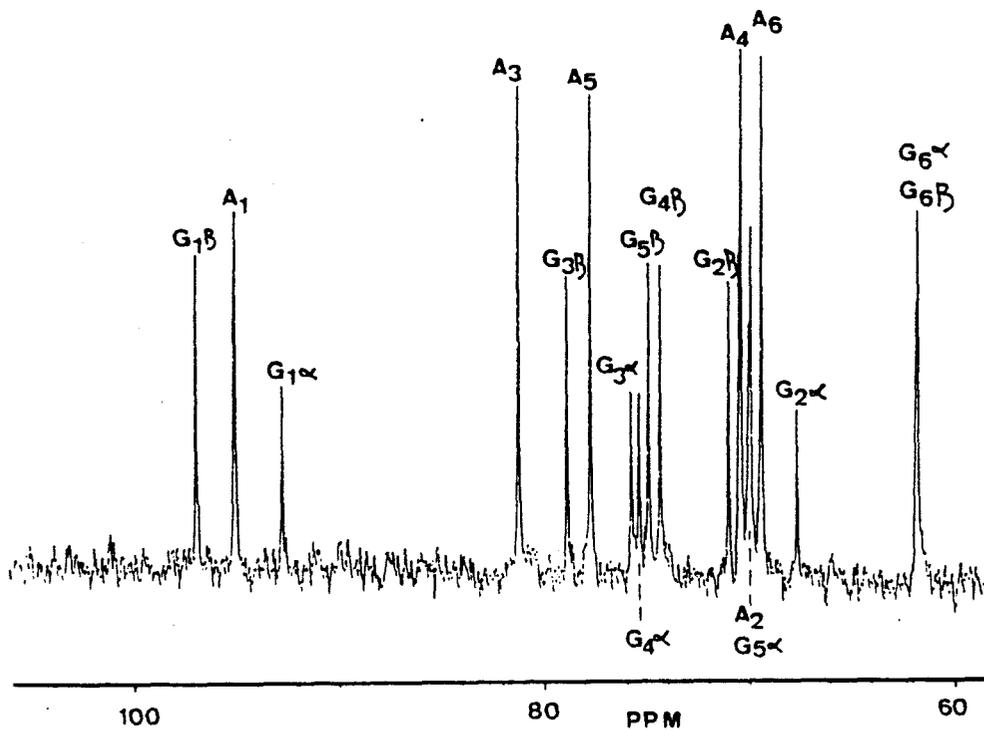


Figure 16 - Spectre RMN du ^{13}C du disaccharide obtenu par action de la kappa carragenase sur la fraction R42 K2 al du carragenane de *R. verruculosa*, G et A se rapportent respectivement aux unités galactose et 3,6 anhydrogalactose du neocarrabiose 4-sulfate (forme alpha et beta)

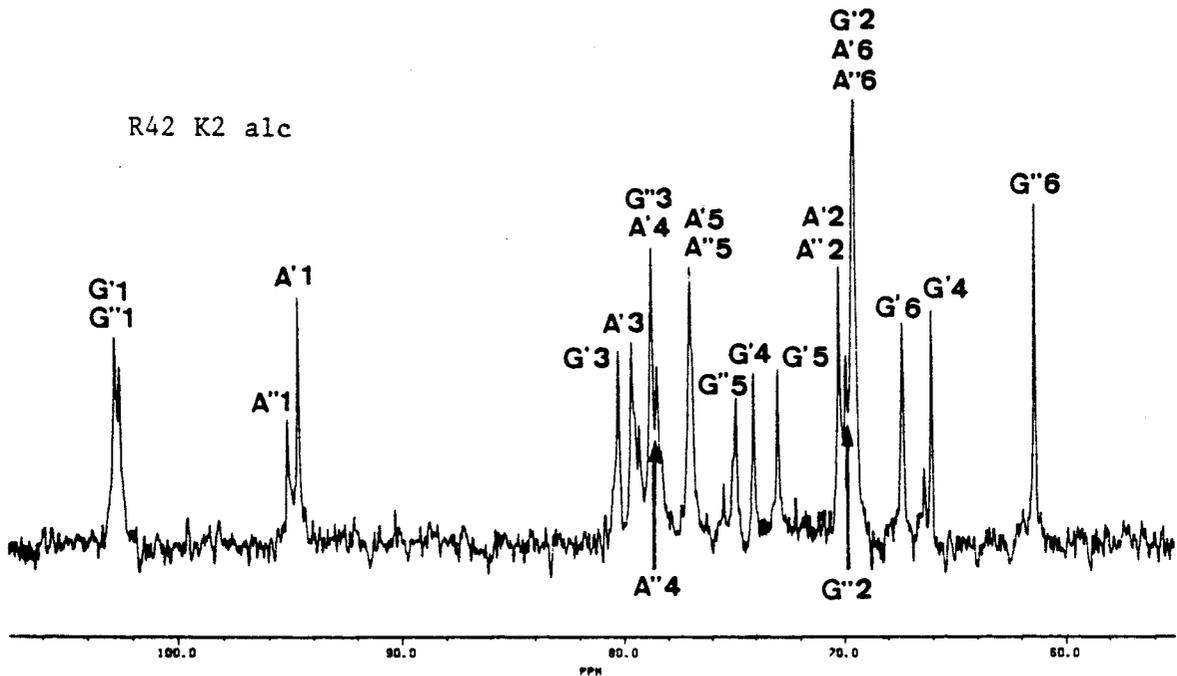
2 - Isolement de la fraction résistante à l'enzyme, FRE

100 mg de la fraction R42K2alc permettent, après hydrolyse par la kappa carragenase, d'obtenir 51 mg de carragenane résistant à l'enzyme, R42K2alcFRE.

Le spectre RMN du ^{13}C du FRE de la fraction R42K2alc, désignée par R42K2alcFRE est représenté dans la figure 17. On peut comparer ce spectre avec celui de la fraction R42K2alc, représenté sur cette même figure, et qui ne contient que du omega et du kappa carragenane. Dans le spectre de R42K2alcFRE les signaux appartenant à la structure kappa disparaissent presque totalement alors que l'on n'observe aucune diminution de l'intensité des signaux correspondant à la structure omega. Aucun produit de désulfatation du kappa ou du omega carragenane n'est visible. Un signal correspondant à un déplacement chimique de 63,11 ppm est cependant observé et ne peut être attribué à aucune des structures que nous venons de décrire.

D - Conclusion

L'action de la kappa carragenase sur le carragenane de R. verruculosa permet d'hydrolyser entièrement les structures kappa carragenanes contenues dans ce polymère. Le produit d'hydrolyse est constitué d'un mélange d'oligomères dont le terme le plus hydrolysé est le néocarrabiose 4-sulfate.



	C1	C2	C3	C4	C5	C6
A'	94.6	70.2	79.6	78.7	76.9	69.5
G'	102.7	69.5	80.2	66.0	72.9	67.3
A''	95.1	70.2	79.1	78.4	76.9	69.5
G''	102.7	69.8	78.7	74.0	74.8	61.3

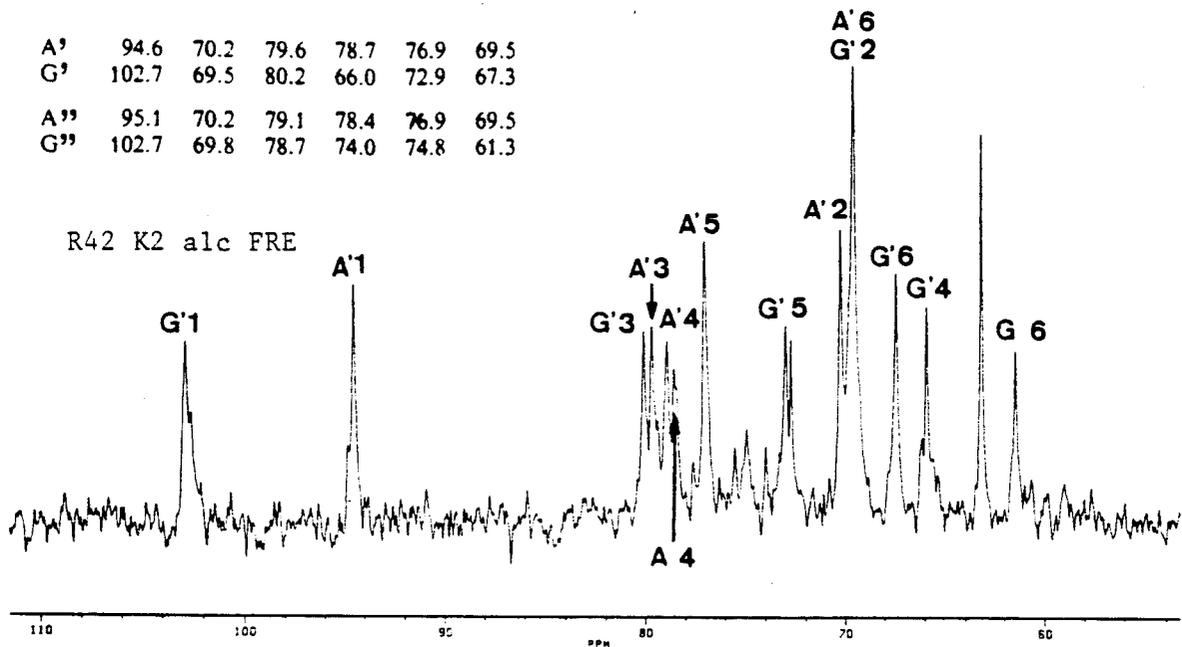


Figure 17- Spectres RMN du ^{13}C des fractions R42 K2 alc et R42 K2 alc FRE du carrageenane de *R. verruculosa*, les symboles suivants se rapportent respectivement aux unités répétitives galactose et 3,6 anhydrogalactose du omega (A', G') et kappa (A'', G'') carrageenane

Aucun produit de désulfatation des carraghenanes n'est rencontré dans cette fraction hydrolysée.

Aucun carraghenane désulfaté (beta) n'apparaît dans la fraction résistante à l'hydrolyse R42K2alcFRE. Ceci confirme l'absence d'action désulfatase de la kappa carraghenase.

Ceci renforce également la probabilité d'une absence de structure beta dans la fraction R42K2alc. L'absence de détection de beta, qui avait déjà été déduite de l'analyse du spectre RMN de cette fraction, ne doit en effet pas être considérée comme une preuve de la non existence de cette structure, compte tenu de la sensibilité de la technique RMN. L'action de la kappa carraghenase qui permet un enrichissement en structures autres que kappa, n'a pas permis de détecter des structures beta. Ainsi l'absence de structure beta dans la fraction R42K2alc est confirmée. La signification de cette absence de beta dans cette fraction sera examinée dans la discussion générale.

QUATRIEME PARTIE
LOCALISATION DES CARRAGHENANES
ET PHYSIOLOGIE DE LEUR PRODUCTION

QUATRIEME PARTIE - LOCALISATION DES CARRAGHENANES ET
PHYSIOLOGIE DE LEUR PRODUCTION

I - LOCALISATION DES CARRAGHENANES (PAROIS ISOLEES)

A - Introduction

Les thalles de R. verruculosa ont été soumis à différents traitements visant à obtenir des fragments de parois cellulaires séparées du cytoplasme, et à contrôler ainsi le contenu des extraits résultant de chaque étape de la fragmentation.

L'analyse de ces extraits a été effectuée surtout dans le but d'obtenir des données sur l'efficacité relative des différents traitements. Du fait que les parois ont été déchirées, les molécules isolées de ces extraits peuvent avoir aussi bien une origine cytoplasmique que pariétale. Le but essentiel de cette expérience est d'analyser des fragments de parois ayant résistés aux différents traitements et d'affirmer que les polymères qu'ils contiennent font bien partie de la paroi cellulaire. Par ailleurs, nous avons vérifié qu'il était impossible d'extraire quelque polymère que ce soit à température ambiante sans un broyage préalable des thalles, destiné à rompre les parois des cellules. Dans ces conditions "l'extractible à froid" obtenu est particulièrement abondant (entre 12 et 18 %, voir paragraphe extractible à froid 3^{ème}

partie). Cet "extractible à froid", nous l'avons vu, est constitué presque entièrement par des carraghenanes de masse moléculaire élevée.

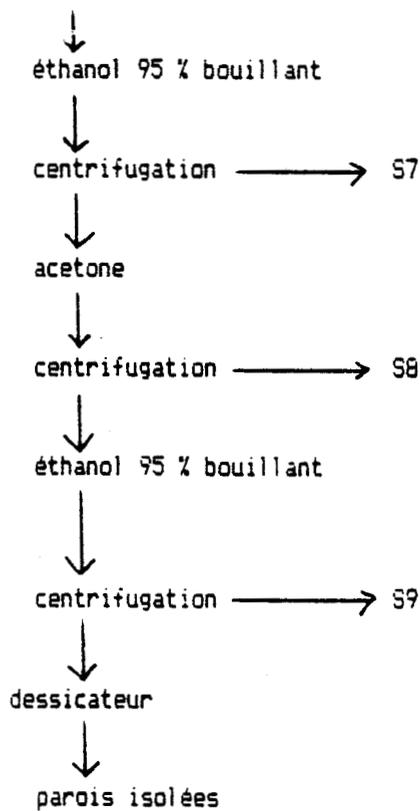
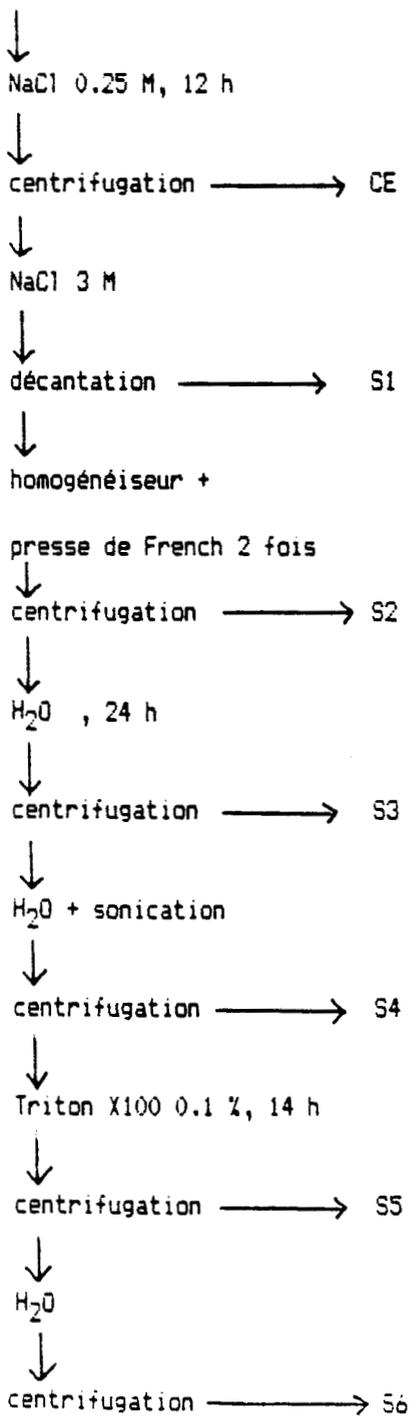
Nous ne disposons à l'heure actuelle d'aucun élément pour pouvoir déterminer l'origine de cet extractible à froid. Certaines observations sur Chondrus crispus ont montré que la quasi-totalité des carraghenanes étaient localisés dans la paroi cellulaire (Gordon-Mills et McCandless, 1975). Il semble peu probable que le carraghenane de "l'extractible à froid" de Rissoella verruculosa, représentant 18 % du poids sec de cette espèce, ait une origine entièrement cytoplasmique. La présence dans le cytoplasme d'une telle quantité de polymère de masse moléculaire élevée et fortement sulfaté serait de nature à perturber considérablement les échanges ioniques intercellulaires. Pour cette raison nous pensons qu'au moins une partie de "l'extractible à froid" doit provenir de la paroi cellulaire.

Grace à une observation en microscopie électronique aux différents stades de la fragmentation pariétale on dispose d'un moyen de contrôle périodique de l'évolution structurale de la paroi, notamment par les réponses cytochimiques de ses constituants.

Tableau 12

Protocole de préparation de parois isolées
à partir des thalles de R. verruculosa

algues broyées



B - Protocole expérimental

Nous avons utilisé pour cette étude l'échantillon R42, provenant de la culture de l'échantillon R38, ainsi que l'échantillon R49 provenant de récolte naturelle.

1 - obtention de parois isolées

L'ensemble des traitements permettant l'obtention des parois isolées est décrit dans le tableau 12. Toutes les opérations s'effectuent à une température ne dépassant pas 4°. Les modalités de ces traitements sont décrites dans la partie "matériel et méthodes".

Des prélèvements ont été effectués à chaque étape sur les culots de centrifugation, et les échantillons ont été préparés en vue d'une observation en microscopie électronique.

2 - isolement des carraghenanes extraits après chaque étape du traitement

La fraction solubilisée par chaque traitement a été séparée par une centrifugation (20 mn, 29000 g), puis filtrée (0,2 microns). Chaque extrait est soit précipité par 3 volumes d'éthanol à 95 % (surnageants S1 à S6), soit mis à sec par évaporation sous vide, redissous dans l'eau, (surnageants S7 à S9), puis lyophilisé.

Une partie de "l'extractible à froid" CE, isolé comme précédemment, est précipitée par 3 volumes d'éthanol à 95

%, l'autre partie est précipitée par le CTAB. Il est important de noter que cet "extractible à froid" obtenu sans traitement par les solvants organiques, n'a pas la même définition que celui décrit dans le paragraphe "extractible à froid" (3^{ème} partie).

L'extraction du carraghenane des algues en fin de traitement (parois isolées) a été effectuée après lyophilisation préalable de ces dernières. Le protocole de cette extraction ne diffère de celui décrit dans la partie "matériel et méthodes" que par la suppression de l'extraction à froid et de l'extraction par les solvants organiques.

3 - fractionnement sur gel D.E.A.E. sephadex de

"l'extractible à froid"

"L'extractible à froid" de R42 précipité par le CTAB a été soumis à un fractionnement sur gel D.E.A.E. sephadex selon le même procédé que celui utilisé précédemment.

4 - Préparation d'un extrait à froid sans broyage ni

traitement par les solvants organiques

L'échantillon lyophilisé R49 non broyé a été placé dans une solution de NaCl 0,25 M pendant 12 h, à 4°. La préparation a ensuite été centrifugée, permettant de séparer un surnageant R49CE1 d'un culot de centrifugation qui après lyophilisation est désigné par R49NCE1.

5 - autres techniques utilisées

spectroscopie RMN du ^{13}C

microscopie électronique

C - Résultats

1 - Etude microscopique des parois isolées

Des coupes transversales ont été effectuées sur le thalle frais de R. verruculosa avant traitement pour l'obtention de parois isolées. Une photographie de l'une de ces coupes, colorée par le bleu alcian, a été reproduite sur la planche 2. Des cellules filamenteuses, séparées par des espaces intercellulaires relativement importants, constituent une medulla au centre du thalle. Dans cette zone prennent naissance des files de petites cellules se divisant une ou deux fois de façon strictement dichotomique avant d'atteindre la surface du thalle, constituant un cortex. Ces dernières forment, en bordure du thalle, une couche de cellules jointives, constituant un cortex externe bordé d'une cuticule. Toutes les cellules ainsi que la cuticule sont colorées par le bleu alcian (se fixant spécifiquement sur les polysaccharides chargés). Par contre les espaces intercellulaires ne montrent aucune trace de coloration, ce qui semble indiquer qu'ils ne contiennent pas de polysaccharides chargés.

Au cours de la préparation des parois isolées des contrôles en microscopie optique ont été effectués à chaque étape. On peut ainsi constater la rupture de la presque totalité des parois après broyage à sec et la destruction de toutes les

structures cellulaires dès la deuxième série de broyages (presse de French). Au stade final de la préparation, le résidu insoluble est entièrement constitué de fragments de parois indemnes de contaminants cytoplasmiques.

Une confirmation de l'efficacité des traitements utilisés a été obtenue au microscope électronique, en comparant des microphotographies de coupes de thalles entiers secs avec celles des fragments de parois après broyage et en fin de préparation de parois isolées (planche 3).

Sur les coupes de thalles (colonne de droite) les parois sont très caractéristiques avec :

- une phase matricielle amorphe
- une phase fibrillaire dont la densité augmente de l'intérieur vers l'extérieur de la paroi. Ces fibrilles sont cependant plus dispersées que chez Chondrus crispus (carraghenophyte) ou chez Gracilaria verrucosa (agarophyte), espèces où a été décrite une organisation concentrique de ces éléments.
- une cuticule très dense et épaisse qui limite vers l'extérieur les cellules du cortex. À proximité, on peut constater que les fibrilles ont tendance à se disposer perpendiculairement à la surface de la paroi.

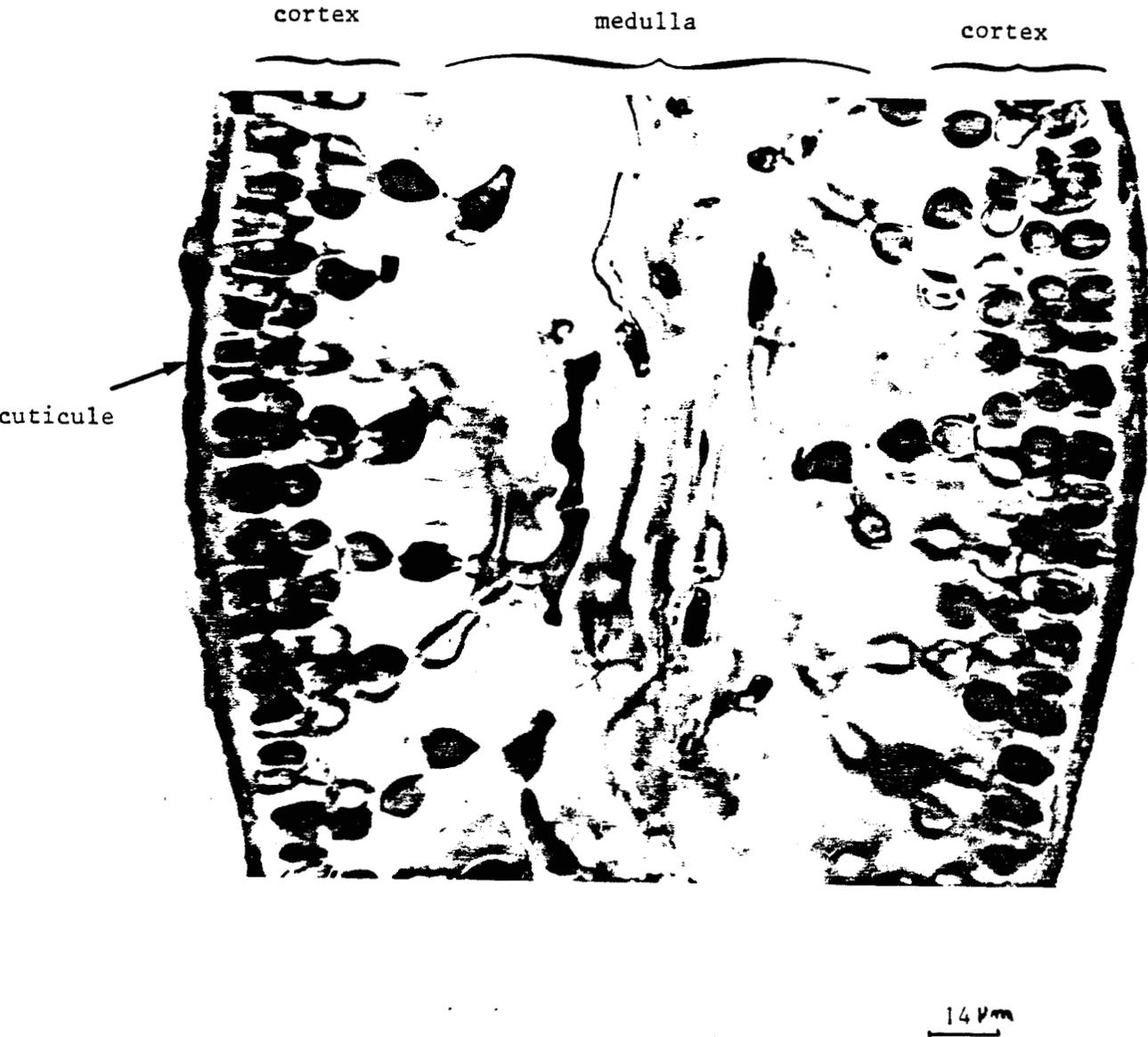
2 - Analyse des différentes fractions obtenues lors de la préparation de parois isolées

a - Bilan pondéral de préparation des parois isolées:

Le masses des précipités à l'éthanol des différentes fractions obtenues par fragmentation séquentielle de l'échantillon R42 de R. verruculosa est représenté dans le tableau 13. Ces résultats montrent qu'hormis l'extraction à froid, c'est après l'action du Triton X100 que la majeure partie des polymères est libérée. Il faut cependant remarquer que si l'on compare la somme des polymères extraits par l'éthanol (33,6 %) à la quantité de carraghenane qui aurait pu être extrait par une extraction classique (59,9 %), on constate qu'il y a eu une perte importante de ce carraghenane au cours du traitement que nous avons fait subir à Rissoella.

Les polymères présents dans le surnageant de l'extrait à froid sont précipités par l'éthanol ou par le CTAB (tableau 14). Les quantités recueillies sont pratiquement identiques.

PLANCHE 2



Coupe transversale dans le thalle de *R. verruculosa*

PLANCHE 3



Cellules de *R. verruculosa* vues au microscope électronique

avant traitement : colonne de gauche
après traitement : colonne de droite

10 μm

A : cytoplasme

C : paroi, zone fibrillaire lâche

B : paroi, zone fibrillaire dense

D : cuticule

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
A'	94.6	70.2	79.6	78.7	76.9	69.5
G'	102.7	69.5	80.2	66.0	72.9	67.3
A''	95.1	70.2	79.1	78.4	76.9	69.5
G''	102.7	69.8	78.7	74.0	74.8	61.3
A	94.6	70.3	79.4	78.0	76.9	69.5
G	102.6	69.5	80.5	66.5	75.3	61.4

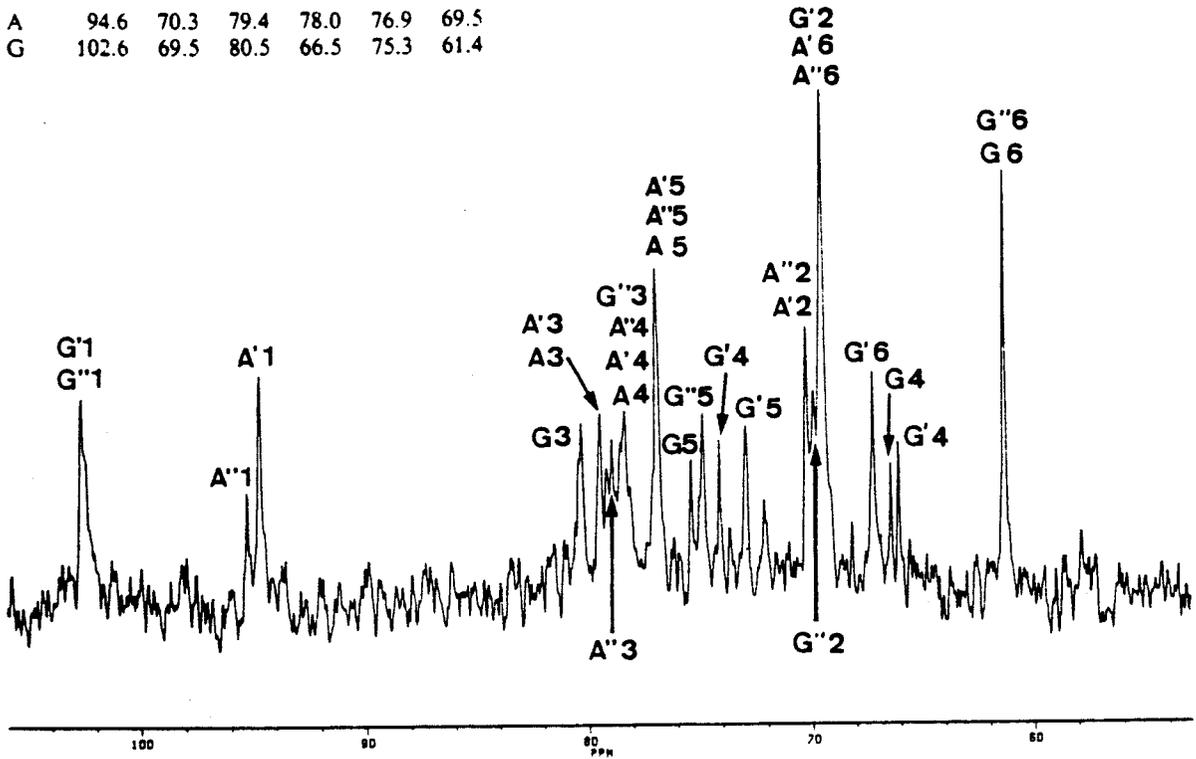


Figure 18 - Spectre RMN du ^{13}C du carragenane extrait des parois isolées de R. verruculosa, R42 Pi, les symboles suivants se rapportent respectivement aux unités répétitives galactose et 3,6 anhydrogalactose du beta (A, G) , omega (A', G') et kappa (A'', G'') carragenane

Tableau 13

Poids des fractions extraites de R. verruculosa
obtenues à différentes étapes de l'extraction séquentielle, en
vue de l'obtention de parois isolées

R42 algue totale avant extraction	: 2000 mg
R42 CE ETOH P	: 280 mg ^a
R42 S1 ETOH P	: 8 mg
R42 S2 ETOH P	: 33 mg
R42 S3 ETOH P	: 4 mg
R42 S4 ETOH P	: 25 mg
R42 S5 ETOH P	: 157 mg
R42 S6 ETOH P	: 146 mg
R42 S7 extrait total	: 8 mg
R42 S8 extrait total	: 0 mg
R42 S9 extrait total	: 6 mg
R42 parois isolées	: 275 mg
R42 Pi extrait parois CTAB P	: 35 mg

^a la quantité totale de cette fraction a été calculée par extrapolation de la quantité précipitable à l'éthanol contenue dans une partie seulement de l'extractible à froid

Tableau 14

Comparaison entre les quantités de polysaccharides
de "l'extractible à froid" précipitables par le CTAB
et celles précipitables par l'éthanol

fraction	teneur par rapport au poids de l'algue sèche
R42 CE CTAB P	12 %
R42 CE ETOH P	14 %

Ceci semble indiquer que si du carraghenane n'a pas été précipité par le CTAB, sa quantité devrait être inférieure à 2%. Ce résultat n'est pas surprenant compte tenu des résultats précédents (3^{ème} partie) qui montrent que le seul carraghenane neutre (le beta) mis en évidence n'est pratiquement jamais à l'état pur mais associé à l'omega carraghenane qui est précipitable par le CTAB. La fraction précipitable à l'éthanol et non précipitable par le CTAB n'a pas été récupérée, en raison de la difficulté de séparer une aussi petite quantité de polymère du CTAB ayant permis la précipitation.

On constate donc que "l'extractible à froid" est presque entièrement constitué par un polysaccharide chargé.

b - Analyse RMN:

On peut comparer les spectres RMN du ^{13}C des parois isolées de R42 (R42pi) à ceux des fractions K1 et K2 du carraghenane de "l'extractible à froid" de R44, ainsi qu'à celui de la fraction K2 du carraghenane des "extractible à froid" de R49.

Le spectre de la fraction R44CEK1 (figure 9) montre des signaux correspondant à une structure omega avec des traces de beta. Celui de la fraction R44CEK2 (figure 10) et celui de la fraction R49CEK2 (figure 11) sont constitués de signaux correspondant à la structure omega ainsi que d'autres signaux indiquant des traces de structures kappa et beta.

TABLEAU 15

Comparaison entre les quantités de polymères
 contenues dans les fractions D.E.A.E. du
 carraghenane total et celles des fractions
 D.E.A.E. obtenues à partir de 'l'extractible à froid'

fraction d'élution D.E.A.E.	extractible à froid	carraghenane total
0 M	0 %	0 %
0,5 M	0 %	6,5 %
1,0 M	9,0 %	16,5 %
2,0 M	19,5 %	14,5 %
3,0 M	33,3 %	48,0 %
	-----	-----
	61,8 %	85,5 %

Dans le spectre du carraghenane extrait des parois isolées R42Pi (figure 18), les signaux correspondant au beta deviennent aussi intense que ceux correspondant au kappa, mais restent d'intensité inférieure à ceux de la structure omega carraghenane. On constate donc que les carraghenanes omega, kappa et beta se retrouvent dans les parois isolées. ceci signifie qu'une partie au moins de chacun de ces carraghenane a résisté aux différents traitements auxquels nous avons soumis les thalles broyés de Rissoella. On peut remarquer que le beta carraghenane a mieux résisté à ces traitements que les deux autres types de carraghenane.

"L'extractible à froid" précipité au CTAB a été soumis à un fractionnement D.E.A.E. Le tableau 15 permet de comparer la quantité de polymères dans chaque fraction à celle obtenue par fractionnement du carraghenane total (dont les spectres RMN sont représentés sur la figure 13). On constate que la fraction 0,5 M est inexistante dans le carraghenane extrait de "l'extractible à froid". On constate également que le pourcentage de fraction 1 M par rapport à celui des autres fractions est nettement moins élevé dans le carraghenane de "l'extractible à froid" que dans le carraghenane total. Ceci reflète sans doute la part moins importante du beta carraghenane dans l'extractible à froid.

3 - Analyse de l'extractible à froid sans broyage et sans action des solvants organiques

2520 mg d'échantillon R49 sec non broyé et non soumis à l'action des solvants organiques, permettent d'obtenir, après extraction à froid par une solution de NaCl 0,25 M et centrifugation, 2095 mg de culot lyophilisé. Le surnageant, correspondant à "l'extractible à froid", a été précipité par 3 volumes d'éthanol. On constate qu'aucun polymère n'est précipité dans ces conditions. Ainsi 425 mg de substances hydrosolubles de faibles masses moléculaires, soit 16,8 % du poids de l'algue, peuvent être extraites à froid, et ne sont pas précipitables par l'éthanol. Ces substances sont probablement essentiellement constituées par de la phycoérythrine (pigments hydrosolubles) et des sels minéraux.

Il est intéressant de comparer cette valeur à celle de "l'extractible à froid" (17 %) obtenu à partir de cette même espèce broyée et soumise à l'action de solvants organiques. Si on additionne la quantité de ces deux sortes d'extrait, on peut dire que au moins 33,8 % du poids de R. verruculosa est extractible à froid par l'eau.

D - Conclusion

Les observations en microscopie électronique ont montré que le traitement utilisé pour l'obtention de parois isolées permettait de rompre la paroi de la totalité des cellules et

de désorganiser suffisamment le cytoplasme pour que tout les éléments hydrosolubles et organosolubles de celui-ci soient entraînés au cours des lavages successifs.

Les 3 types de carraghénanes, omega, kappa et beta, mis en évidence chez R. verruculosa, se retrouvent dans l'extrait obtenu à partir des parois isolées. On peut donc dire que ces 3 carraghénanes sont constitutifs de la paroi cellulaire de R. verruculosa. Notre expérience d'isolement de parois n'a donc pas permis de mettre en évidence un carraghénane dont l'absence dans les parois isolées aurait pu constituer un signe (mais non une preuve) indicateur de sa provenance cytoplasmique. Cette expérience a en revanche permis de mettre en évidence la moins grande extractibilité du beta carraghénane qui, lors d'une extraction à froid, reste presque entièrement dans la paroi. Il est probable que le beta carraghénane de la fraction D.E.A.E. 0,5 M du carraghénane total, que l'on ne retrouve pas dans "l'extractible à froid", corresponde à celui que l'on retrouve dans les parois isolées. Nous avons émis l'hypothèse que le beta carraghénane de la fraction 0,5 M était lié à du omega carraghénane, ce qui expliquerait qu'il ne puisse être élué à l'eau bien que n'étant pas chargé. Cette liaison entre le omega et le beta carraghénane pourrait, si elle existe, contribuer à rendre la molécule insoluble, ce qui expliquerait pourquoi une partie importante du omega reste dans les parois isolées, alors que

celui-ci est beaucoup plus soluble à froid que les deux autres types de carraghénane.

A défaut de pouvoir apporter d'autres arguments cytochimiques pour tenter d'élucider la logique de l'organisation des carraghénanes dans la paroi, nous avons recherché des variations dans leur distribution, pour des récoltes différentes et des conditions de culture contrôlées.

II - PHYSIOLOGIE DE LA PRODUCTION DES CARRAGHENANES - PREMIERE APPROCHE - VARIATION DU CARRAGHENANE DE R. VERUCULOSA EN FONCTION DES CONDITIONS DE CROISSANCE DES ECHANTILLONS AU MOMENT DE LEUR RECOLTE

L'origine de notre intérêt pour les carraghénanes de Rissoella a été une série d'observation concernant des variations importantes dans les propriétés de solvabilité de ces polymères en présence de KCl (rapport K1/K2), suivant l'état physiologique des échantillons au moment de leur récolte. Antérieurement Cheney avait également signalé que la qualité d'un carraghénane (Cheney et al., 1979) produit par différentes souches de Chondrus crispus dépendait beaucoup plus de l'état physiologique de l'algue au moment de sa récolte que de son patrimoine génétique.

Avant d'entreprendre l'étude de ces carraghenanes, nous pensions qu'ils étaient probablement constitués de molécules insolubles dans KCl, alors que leurs précurseurs devraient y être solubles. Nous avons alors entrepris d'extraire et d'analyser les carraghenanes d'échantillons récoltés dans des conditions très diverses, afin de savoir si ces dernières avaient une influence sur le rapport K1/K2. Nous nous sommes aperçu par la suite que les précurseurs du carraghenane de Rissoella n'étaient peut être pas les plus solubles et que K1 n'était peut être pas tout à fait représentatif de ceux-ci. Nous avons cependant poursuivi cette étude des variations de la teneur en fraction K1 simultanément à celle d'autres paramètres du carraghenane d'échantillons placés dans des conditions physiologiques très différentes.

En outre, des échantillons de R. verruculosa récoltés dans la nature ont été mis en culture dans des bassins alimentés continuellement en eau de mer et soumis à différents types de fertilisation en azote. Il est aussi possible d'obtenir en quelques jours des taux de croissance très variables. Il suffit alors de contrôler ces paramètres, de récolter les échantillons et d'en extraire les carraghenanes.

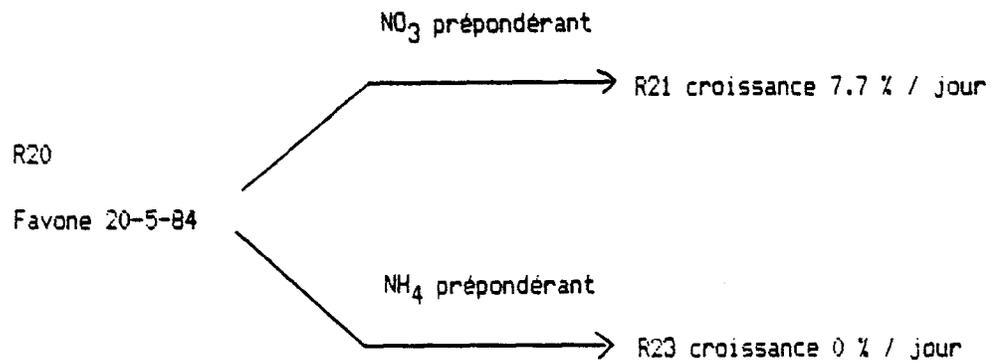
Tableau 16

Conditions de récolte et de culture des échantillons étudiés

échantillon récolté dans la	échantillon cultivé, différents
nature, lieu et date de récolte	types de fertilisation et taux
	de croissance obtenus

R9

Ajaccio 25-4-84



R38

Favone 28-6-84

NO₃ majoritaire

R42 croissance 4.6 % / jour

A - Protocole expérimental

Les échantillons utilisés et les différents types de fertilisation auxquels certains d'entre eux ont été soumis sont représentés dans le tableau 16.

1 - Les techniques de culture et la mesure du taux de croissance

les techniques utilisées sont décrites dans la partie matériel et méthodes et dans l'article "seaweed cultivation..." (Mollion et al., 1986) inséré en annexe.

2 - Préparation des échantillons de carraghenanes

Les échantillons de carraghenanes R9, R20, R21, R38 et R42 ont été obtenus par des extractions dans l'eau à 90° et des précipitations par le CTAB, à partir des lots d'algues correspondants.

3 - Fractionnements par le KCl et modification alcaline:

Les protocoles sont décrits dans la partie Matériel et Méthodes

4 - Technique d'analyse:

Spectroscopie RMN du ^{13}C

B - Résultats

Deux échantillons (R20 et R38) ont été mis en culture en présence d'un enrichissement en NO_3 (respectivement 200 et

1500 micromoles) et le premier (R20), le premier de ces échantillons recevant en plus un apport de NH_4 (1300 micromoles). En quelques jours, on constate que l'apport d'azote sous forme NO_3 a un effet très favorable sur la croissance, alors que l'azote ammoniacal annule complètement l'accroissement pondéral des lots d'algues mis en culture.

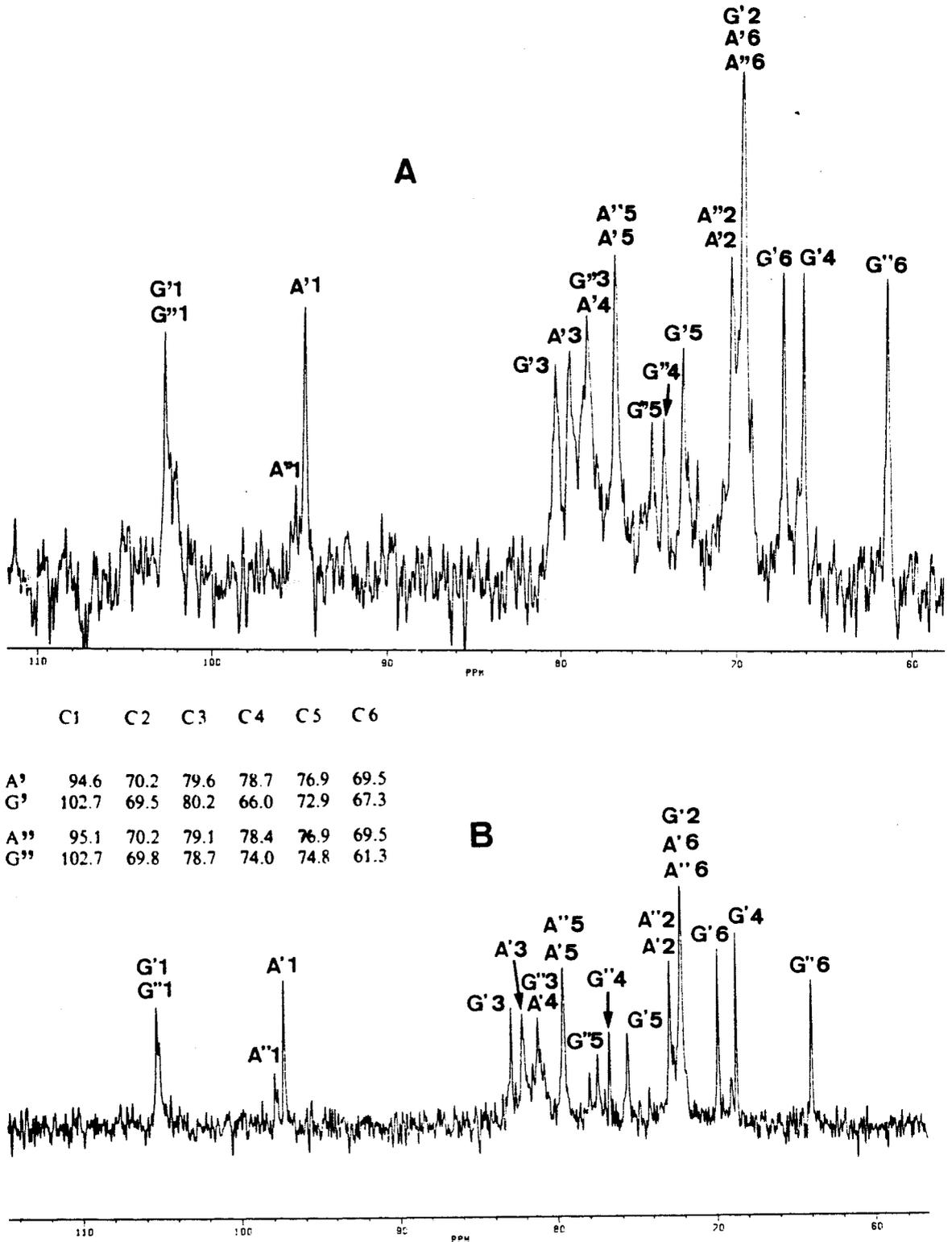


Figure 19- Spectre RMN du ^{13}C des carrageenanes totaux des échantillons R38 (A) et R42 (B) de R. verruculosa, les symboles suivants se rapportent respectivement aux unités répétitives galactose et 3,6 anhydrogalactose du type (A'' G'') et omega (A' G') carrageenane.

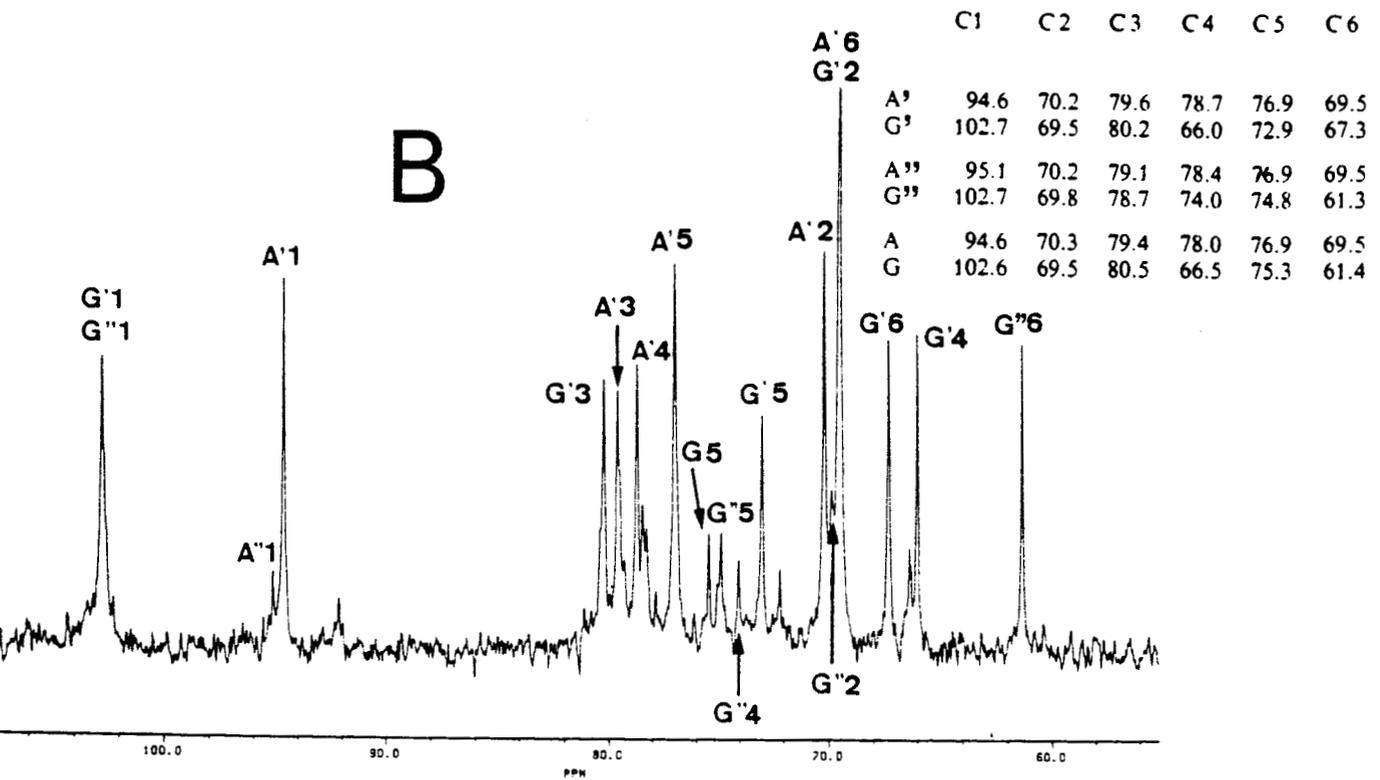
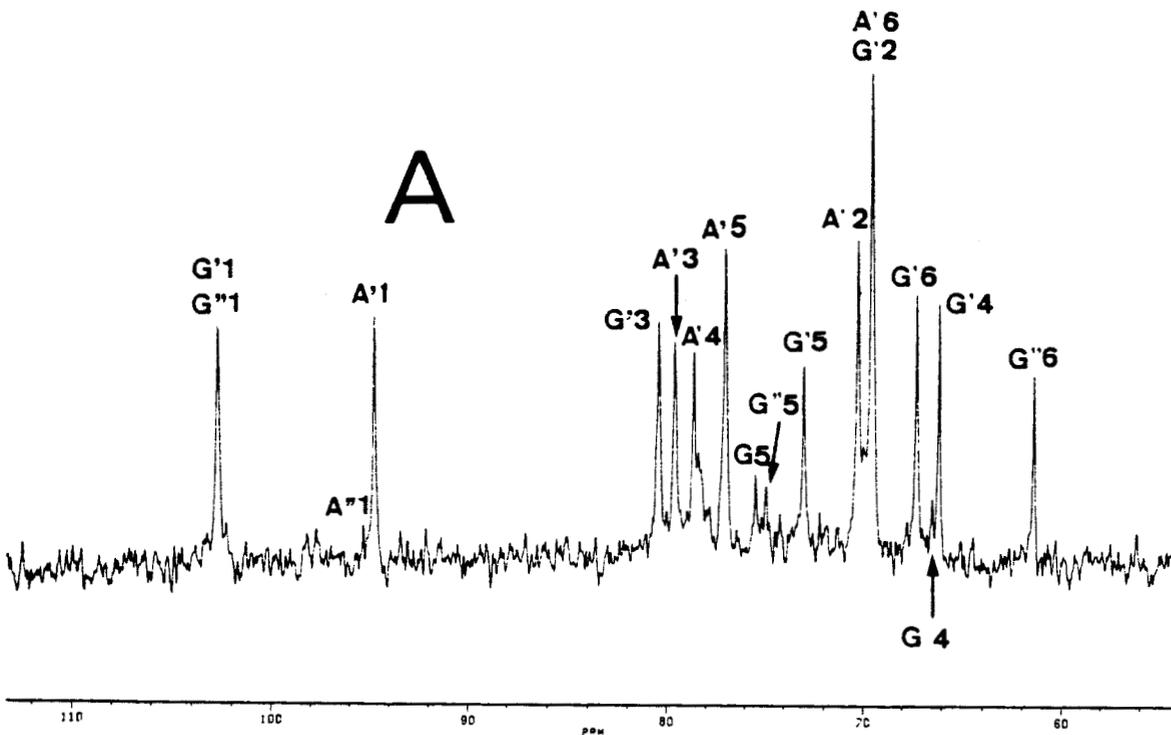


Figure 20- Spectres RMN du ^{13}C des fractions KI alc F2 carraghenanes des échantillons R38 (A) et R42 (B) de *R. verruculosa*. Les symboles suivants se rapportent respectivement aux unités répétitives galactose et 3,6 anhydrogalactose du beta (A,G), omega(A',G') et kappa (A'',G'') carraghenane.

Tableau 17

Pourcentage des fractions solubles en présence
d'ions K^+ des échantillons de R. verruculosa

échantillons, origine et taux de croissance	% K_1
R9, Ajaccio	16,1
R20, Favone	13,5
R21, culture 7,7 % /j	18,3
R23, culture 0 % /j	4,3
R38, Favone	4,7
R42, culture 4,6 % /j	27,3

1 - Spectres ^{13}C RMN des carraghenanes totaux

Les spectres ^{13}C RMN des carraghenanes extraits des échantillons R38 et R42 sont représentés dans la figure 19. Les spectres provenant de ces deux échantillons sont identiques et constitués principalement de omega carraghenane avec de moindres quantités de kappa et des traces de beta.

2 - Fractionnement par le KCl

a - fractionnement simple

Le pourcentage en fraction soluble K1 en présence de KCl par rapport au carraghenane total extrait des différents échantillons est représenté dans le tableau 17.

On constate que l'échantillon R21, récolté en phase de croissance rapide, a un pourcentage en K1 très supérieur à celui de l'échantillon R23 récolté en croissance nulle. Ces deux échantillons proviennent de la mise en culture de l'échantillon R20, qui a un pourcentage en K1 intermédiaire. On peut penser qu'au moment de sa récolte ce dernier échantillon avait un taux de croissance intermédiaire entre celui de R21 et de R23. Ainsi le pourcentage en K1 du carraghenane des différents échantillons semble proportionnel aux taux de croissance lors de la récolte des échantillons. Ceci semble confirmé si l'on compare le pourcentage en K1 de l'échantillon R42 en croissance très

rapide, avec celui de la même plante, échantillon R38, au moment de sa récolte. Le pourcentage en K1 de l'échantillon R42 est très supérieur à celui du carraghenane R38 de cette plante récoltée dans la nature.

D'une façon générale les échantillons récoltés dans la nature R9, R20 et R38 ont un carraghenane dont le % en K1 est nettement plus faible que ceux des plantes en culture, récoltés en croissance rapide. L'échantillon R23 en croissance nulle (inhibée par NH_4) présente un % en K1 plus faible que celui des plantes de récolte.

b - Double fractionnement KCl avant et après modification alcaline

Le tableau 6 (3^{ème} partie) montre que le refractionnement de la fraction K1 après modification alcaline permet d'obtenir une fraction soluble F1 prédominante (55,9 %) par rapport à la fraction insoluble F2 (34,8 %) pour l'échantillon R42, alors que ce rapport est inversé (respectivement 28,8 % et 46,6 %) pour l'échantillon R38. Ainsi l'échantillon de croissance rapide R42 qui contient une quantité de fraction K1 beaucoup plus élevée que R38, contient, après modification alcaline, un pourcentage de fraction insoluble dans le KCl beaucoup plus faible que R38. L'explication de ceci pourrait être la suivante: un échantillon en croissance rapide synthétise beaucoup plus de omega de faible masse moléculaire qu'un échantillon en croissance lente. Ces omega de faible masse moléculaire sont solubles

dans le KCl, et sont responsables de la teneur élevée en K1 de R42. Nous avons émis l'hypothèse que la modification alcaline de K1 ne modifiait en rien cette dernière fraction, mais permettait l'hydrolyse de liens protéiques entre certains carraghenanes. L'apparition d'une fraction insoluble dans le KCl, F2, résulterait de sa simple séparation de la fraction restant soluble F1. Les spectres RMN ont montré que, dans l'échantillon R42, F1 était constitué entièrement de omega carraghenane (figure 3). Les spectres ^{13}C RMN des fractions F2 des échantillons R38 et R42, sont représentés dans la figure 20. Ces spectres sont identiques et constitués essentiellement par du omega carraghenane avec des quantités moindre de kappa et de beta. Ce dernier polymère est sensiblement aussi abondant que le kappa alors qu'on ne le trouve qu'à l'état de traces dans les polymères obtenus par d'autres types de fractionnement à l'exception des fractions d'élutions 0,5 et 1 M sur colonne D.E.A.E. Il semble donc que les échantillons en croissance rapide comme ceux en croissance lente contiennent des carraghenanes kappa et beta qui pour des raisons encore mal comprises (liaisons par l'intermédiaire de protéines) restent associés au omega carraghenane dans la fraction soluble dans le KCl. Ces kappa et beta carraghenane qui se dissocient du omega de la fraction K1 après modification alcaline, représentent une part relativement constante du polymère total quel que soit la vitesse de croissance de l'algue. Le omega carraghenane, qui reste soluble même

après modification alcaline (fraction F1), serait synthétisé de façon beaucoup plus abondante dans les plantes en croissance rapide que dans les plantes en croissance lente. Ceci explique que la teneur en F1 est beaucoup plus élevée dans les plantes en croissance rapide que dans les plantes en croissance lente

C - Conclusion

Les échantillons en croissance rapide possèdent les mêmes carraghenanes que les échantillons en croissance lente. La teneur en carraghenanes dans les deux cas est sensiblement la même. La seule différence observée consiste en une augmentation de la teneur en omega carraghenane chez les algues en croissance rapide. Il n'est pas possible de quantifier les pourcentages respectifs des différents types de carraghenanes. L'observation de l'intensité des signaux RMN permet cependant d'évaluer cette augmentation de la teneur en omega. Il y a augmentation en structure omega dans la mesure ou la fraction K1 qui est la plus riche en omega augmente chez les échantillons en croissance rapide. On peut également remarquer que seules les structures omega faisant partie de la fraction la plus soluble K1 augmentent, alors que les omega de K2 n'augmentent pas. Ces omega particulièrement solubles, qui augmentent chez les algues en

croissance rapide, pourraient être constitués par des polymères de faible masse moléculaire.

CINQUIEME PARTIE
ETUDE DES RELATIONS ENTRE LES CARRAGHENANES

CINQUIEME PARTIE - ETUDE DES RELATIONS ENTRE LES
CARRAGHENANES

A - Introduction

Au cours de cette étude nous nous sommes efforcés de séparer les carraghenanes en fonction de divers caractères physico-chimiques tels que la solubilité, la charge et la taille des molécules. Le but principal de ces fractionnements est de faire un inventaire des cas de coexistence entre plusieurs types de carraghenanes au sein d'une même fraction. Une telle démarche a déjà été entreprise lors de l'isolement et de la caractérisation des différents types de carraghenane que nous avons exposée précédemment. Comme nous l'avons dit alors, cette recherche de coexistence entre différents types de carraghenanes n'est effectuée que dans le but de repérer les molécules qui pourraient être des hybrides, constituées de 2 structures liées par liaison covalente. Nous pensons que l'existence de telles associations augmente la probabilité de l'existence de relations biosynthétiques entre les carraghenanes ainsi liés. Dans les recherches que nous exposons ci-dessous les carraghenanes ont été fractionnés en fonction de leurs masses moléculaires. Les échantillons ainsi traités le sont soit directement, soit après avoir subi un premier fractionnement basé sur les différences de propriétés

physico-chimiques (solubilité à froid, gélification en présence de K^+). La masse moléculaire des polymères d'une même fraction doit être prise en considération pour expliquer la coexistence ou non de ceux-ci au sein de cette fraction. La solubilité des carraghenanes, ainsi que leur aptitude à précipiter dans certains milieux est en effet affectée par leur masse moléculaire.

La séparation des polymères en fonction des masses moléculaires a été effectuée par tamisage moléculaire des échantillons sur gel sephacryl S400. Cette méthode n'est valable que si l'on admet que la densité de charges sur le polymère n'affecte pas sa migration sur un tel gel. Afin de vérifier la validité de cette affirmation, nous avons utilisé l'ensemble des fractions de l'échantillon R42, séparées par chromatographie d'échange d'ions sur un gel de D.E.A.E. sephadex (voir première partie).

On peut penser à priori, que dans une même fraction D.E.A.E., tous les polymères présentent sensiblement une même densité de charge et que les sous-fractionnements obtenus par passage de celle-ci sur le gel S400 (en milieu $LiCl$ 0,2 M) ne serait dû qu'à des différences de masses moléculaires. Dans le cas où de faibles différences de charge seraient responsables du sous-fractionnement par le gel S400, on devrait observer une relation entre la charge et le temps de rétention sur la colonne. Nous avons voulu vérifier ceci en effectuant des dosages de la teneur en SO_4 des différentes sous-fractions.

B - Protocole expérimental

Nous avons utilisé pour cette étude les échantillons de Rissoella R42 et R44.

1 - préparation des échantillons

L'échantillon de carraghénane R42 a été obtenu par extraction dans l'eau à 90° et précipitation par le CTAB de l'extrait obtenu. L'échantillon de carraghénane R44CE a été obtenu par "extraction à froid" et précipitation CTAB de l'extrait obtenu.

2 - fractionnement D.E.A.E.

L'échantillon R42 a été soumis à un fractionnement D.E.A.E. permettant d'obtenir les fractions R42 D05; R42 D1; R42 D2; R42 D3, correspondant aux éluions de la colonne par des solutions de NaCl respectivement 0,5 M; 1 M; 2 M; 3 M.

3 - chromatographie sur colonne S400

La technique utilisée a été décrite dans la partie "matériel et méthodes".

Nous avons utilisé une colonne remplie de 235 ml de gel Sephacryl S400. Cette colonne a été calibrée en utilisant du galactose et des dextrans de masse moléculaire compris entre 100 000 et 300 000. Les volumes d'éluion de ces deux étalons sont représentés dans la figure 21.

4 - analyse des fractions S400

Teneur en sucres totaux: (méthode au phénol sulfurique)

La mesure a été effectuée en sortie de colonne sans élimination préalable des sels minéraux.

5 - Hydrolyse par la kappa carraghenase:

Une aliquote de certaines fractions, non débarassées des sels minéraux, a été prélevée et hydrolysée par la kappa carraghenase. Les fractions soumises à ce traitement dans lesquelles apparaissent des oligosacharides sont celles qui contiennent des séquences kappa carraghenanes.

6 - Détection des oligomères de kappa carraghenane

Les fractions contenant des oligomères sont détectées par chromatographie sur couche mince CCM, ou par l'augmentation du pouvoir réducteur.

7 - Teneur en SO_4 et spectre RMN:

Certaines fractions ont été réunies, dialysées et lyophilisées pour analyse de la teneur en sulfate (méthode décrite dans la partie "matériel et méthode") et spectroscopie RMN.

C - Résultats

1 - Chromatographie sur colonne S400 des fractions D.E.A.E.

Les fractions 0,5 M, 1 M, 2 M, et 3 M, obtenues par fractionnement D.E.A.E. de l'échantillon R42 ont été

chromatographiées sur S400. Les courbes d'élution de chaque fraction sont représentées sur la figure 21.

La teneur en SO_4 de chaque fraction D.E.A.E. est représentée sur le tableau 9 et celle des sous fractionnement S400 de chaque fraction D.E.A.E. est mentionnée dans le tableau 18. On constate qu'il n'existe aucune relation entre les teneurs en SO_4 des sous fractions et leur position d'élution, quelles que soit les fractions D.E.A.E. considérées. On peut donc dire que la position d'élution des polymères que nous avons séparé sur colonne S400 est à priori indépendante de leur taux de sulfatation, et on peut considérer que cette position d'élution reflète leur masse moléculaire.

L'analyse des taux de sulfatation des différentes sous-fractions d'une même fraction D.E.A.E. ne permet de déceler aucune hétérogénéité, et notamment ne met en évidence dans la fraction 3 M aucune sous fraction "super-sulfatée" qui aurait pu être un indice de la présence d'unités alpha-D-galactose 6-sulfate.

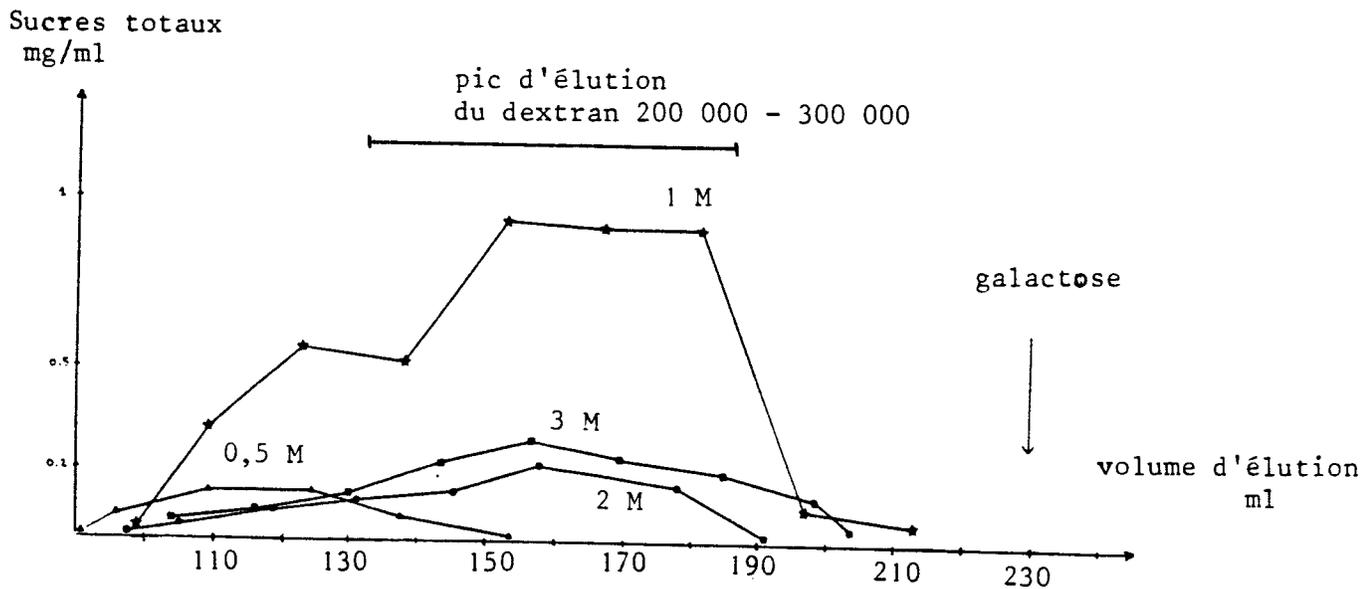


Figure 21- Courbe d'élution sur colonne S400 des fractions D.E.A.E de l'échantillon de carragenane R42 fraction éluée par NaCl 0.5 M (▲), NaCl 1 M (★), NaCl 2 M (■), NaCl 3 M (*).

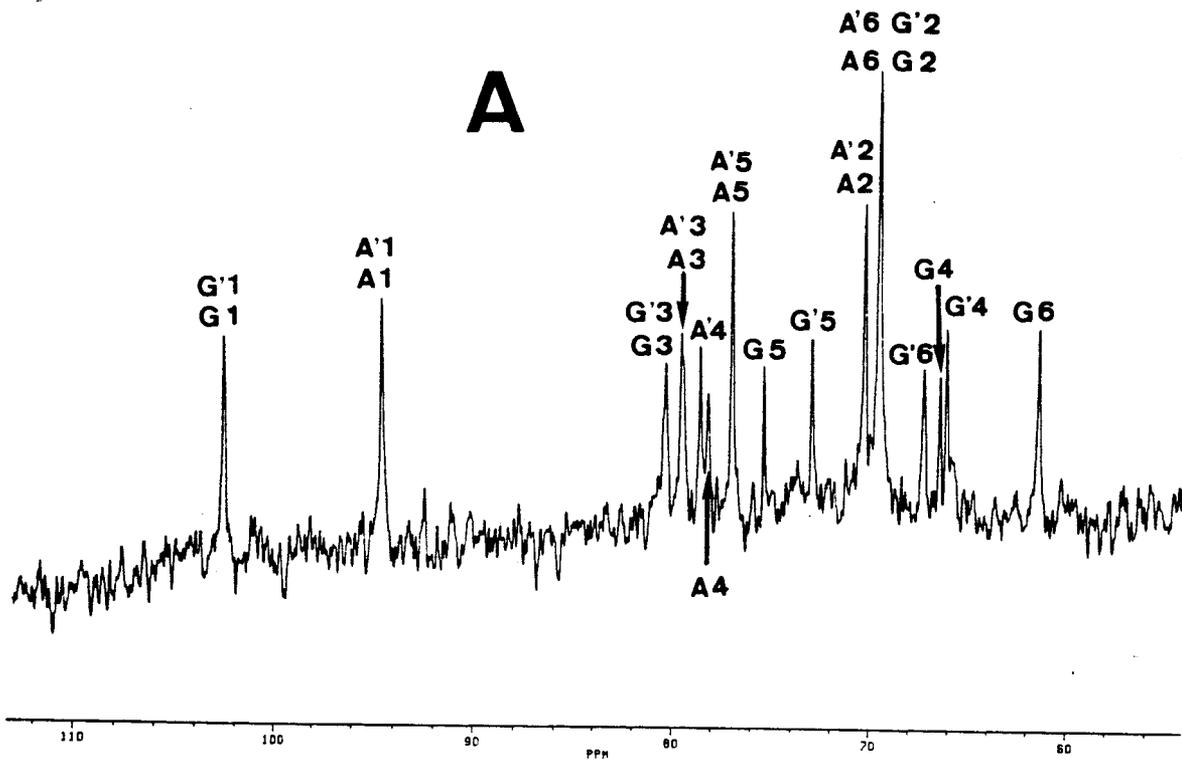
Vt= volume total du gel= 235 ml

Tableau 18

Teneur en SO_4 des sous-fractions S400 des fractions
d'élution D.E.A.E. de l'échantillon R42

fractions D.E.A.E. molarité d'élution NaCl	sous-fractions S400	% SO_4^a
0,5 M	82-103 ml	6,1
0,5 M	103-131 ml	11,0
0,5 M	131-161 ml	8,7
1,0 M	99-121 ml	16,8
1,0 M	121-150 ml	11,0
1,0 M	150-183 ml	14,2
1,0 M	183-213 ml	13,4
2,0 M	89-116 ml	36,3
2,0 M	116-170 ml	-
2,0 M	170-199 ml	-
3,0 M	98-132 ml	28,2
3,0 M	132-186 ml	32,5
3,0 M	186-212 ml	32,0

^a exprimé par rapport à la quantité de galactose total



	C1	C2	C3	C4	C5	C6
A'	94.6	70.2	79.6	78.7	76.9	69.5
G'	102.7	69.5	80.2	66.0	72.9	67.3
A	94.6	70.3	79.4	78.0	76.9	69.5
G	102.6	69.5	80.5	66.5	75.3	61.4

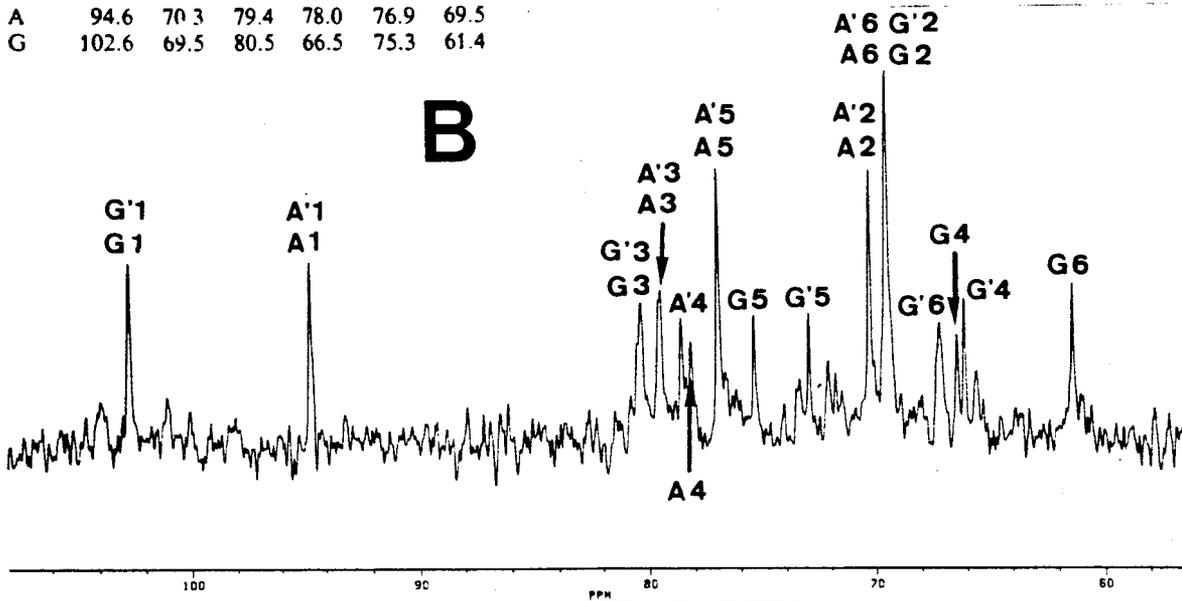
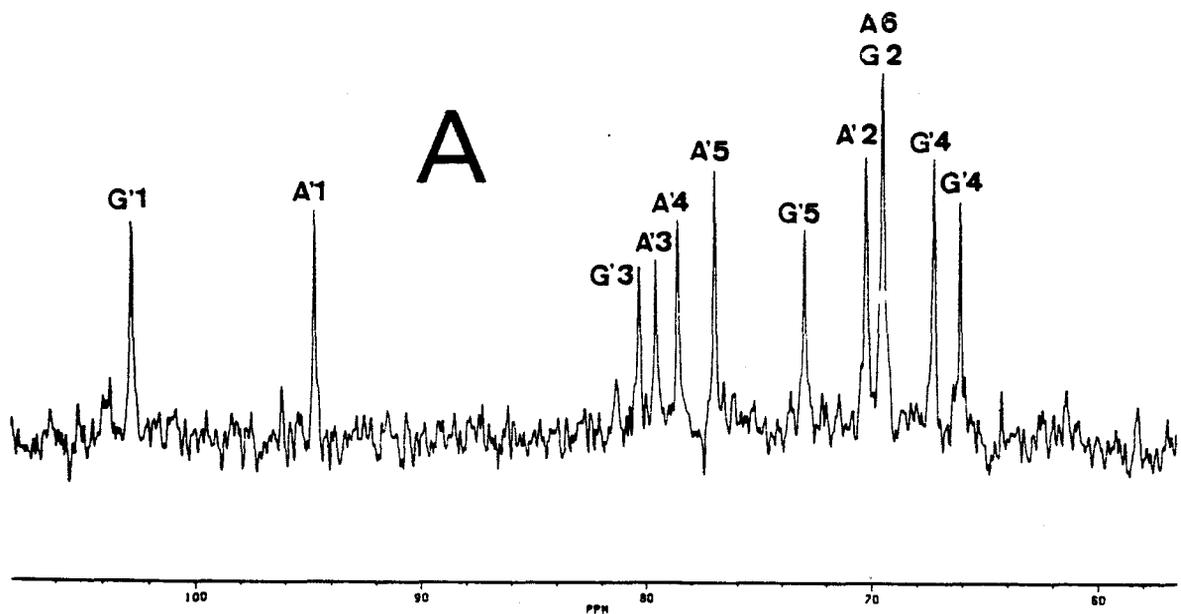


Figure 22 - Spectre RMN du ^{13}C des sous fractions S400 de la fraction D.E.A.E. 1 M du polymère extrait de l'échantillon



	C1	C2	C3	C4	C5	C6
A'	94.6	70.2	79.6	78.7	76.9	69.5
G'	102.7	69.5	80.2	66.0	72.9	67.3
A''	95.1	70.2	79.1	78.4	76.9	69.5
G''	102.7	69.8	78.7	74.0	74.8	61.3
A	94.6	70.3	79.4	78.0	76.9	69.5
G	102.6	69.5	80.5	66.5	75.3	61.4

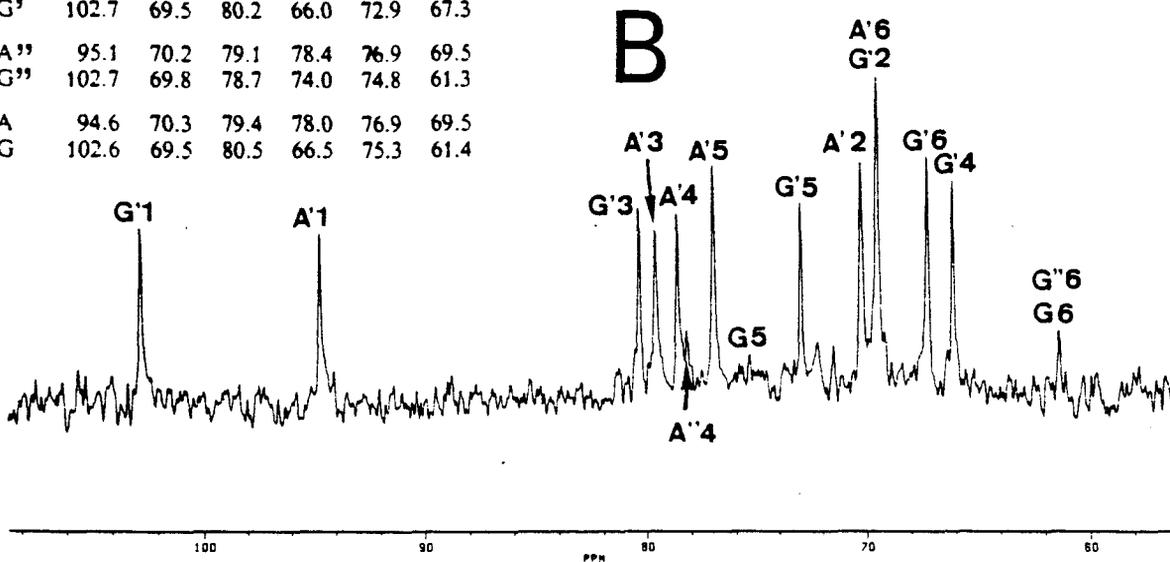


Figure 23 - Spectre RMN du ^{13}C des sous fractions S400 de la fraction D.E.A.E 2 M du polymère extrait de l'échantillon *R. verruculosa*, A = fr 95-148, B = fr 149-193

Les symboles suivants se rapportent respectivement aux unités répétitives galactose et 3,6 anhydrogalactose du beta (A, G), omega (A', G') et kappa (A'', G'') carraghenane

Les courbes d'élution des fractions D.E.A.E. 1 M, 2 M, et 3 M montrent une grande polydispersité des polymères . La courbe d'élution de la fraction 1 M présente cependant un épaulement au niveau des volumes d'élution les plus faibles. La courbe d'élution de la fraction D.E.A.E. 0,5 M ne recouvre que la zone correspondant aux volumes d'élutions les plus faibles. On peut remarquer que cette courbe d'élution se superpose presque exactement à l'épaulement de la courbe obtenue pour la fraction 1 M.

De cet ensemble de courbes celle de la fraction 0,5 M se distingue nettement des autres parce que son profil révèle qu'elle n'est constituée que de molécules de masses moléculaires élevés. Ces polymères de la fraction 0,5 M se distinguent de ceux des autres fractions qui présentent une polydispersité plus importante .

La courbe d'élution de la fraction 1 M présente un épaulement qui correspond à une discontinuité dans la répartition des masses moléculaires de ses constituants. Une telle discontinuité semble indiquer que cette fraction est constituée de deux sortes de molécules.

Les polymères des fractions D.E.A.E. ont été identifiés par spectroscopie RMN (figure 13). Les fractions 0,5 M et 1 M sont constituées de 2 carraghénanes, le ω et le β . Nous avons suggéré dans la discussion sur les relations entre ces polymères, que le β carraghénane était peut être lié au ω ce qui expliquerait qu'il ne puisse être

élué à l'eau. La courbe d'élution semble indiquer que ce polymère hybride, s'il existe, a une masse moléculaire élevée. Il a été montré par RMN que dans la fraction D.E.A.E. 1 M, le rapport ω/β est beaucoup plus élevé que dans la fraction 0,5 M. L'augmentation de ce rapport explique pourquoi la fraction 1 M a une teneur en SO_4 plus élevée que la fraction 0,5 M. Le polymère correspondant à l'épaule de la fraction 1 M, dont la masse moléculaire se rapproche de celui constituant la fraction 0,5 M, coexiste avec un polymère dont la distribution des masses moléculaires est distincte de celle de ce premier polymère. Celui-ci est caractérisé par une plus grande polydispersité. Le spectre ^{13}C RMN de la sous fraction S400 correspondant à l'épaule de la fraction 1M (volume d'élution 98 à 148 ml) désigné par R42 1M fr 98-148, ainsi que celui de la sous fraction correspondant au reste de la courbe d'élution (volume d'élution 149 à 216 ml) et désigné par R42 1M fr 149-246, sont représentés dans la figure 22. Les spectres des sous-fractions 1M fr 98-148 et 1M fr 149-216 sont presque identiques. Ces spectres sont caractérisés par des signaux correspondant à la structure ω d'intensité sensiblement égale aux signaux correspondant à la structure β . La fraction D.E.A.E. 1M, dont ces sous-fractions sont issues, était caractérisée par des signaux ω plus importants que les signaux β . Il est possible qu'il y ait eu une légère perte de ω lors du sous fractionnement.

La teneur en sulfate des fractions 1M fr 98-148 et 1M fr 149-216 étant sensiblement la même (tableau 18), il s'agit de structures hybrides beta-omega, apparemment de même composition, mais de masse moléculaire différente

La courbe d'élution de la fraction 2M montre que celle-ci est constituée de polymères présentant une polydispersité recouvrant toute la gamme d'élution permise par la colonne. Les sous fractions S400 correspondant aux volumes d'élution 95 à 148 ml ont été regroupées en une sous-fraction désignée par 2M fr 95-148, celles correspondant aux volumes d'élution 149 à 193 ml ont été regroupées en une sous-fraction 2M fr 149-193.

Les spectres ^{13}C Rmn des sous fractions 2M fr 95-148 et 2M fr 149-193 sont représentés dans la figure 23. Ces spectres montrent que les deux sous-fractions sont constituées presque exclusivement par du omega carraghenane, avec cependant quelques traces de kappa dans la sous-fraction 2M fr 149-193. La teneur en SO_4 dans les différentes sous fractions de la fraction D.E.A.E. 2 M reste sensiblement la même.

2 - Détection de kappa carraghenane dans les sous-fractions S400 des fractions D.E.A.E.

Seules les sous fractions provenant des fractions D.E.A.E. 2 M et 3 M ont été soumises à une hydrolyse par la kappa

carragenase afin de détecter les séquences kappa carragenanes de leurs polymères. Le tableau 19 montre le résultat de la chromatographie CCM de l'hydrolysat de chaque sous-fraction. La présence d'oligosaccharides en grande abondance est visible dans toutes les sous-fractions de la fraction 3 M. Seules les sous-fractions correspondant aux volumes d'éluion compris entre 145 ml et 178 ml de la fraction 2 M contiennent des traces d'oligosaccharides.

Tous les polymères de la fraction D.E.A.E. 3 M séparés sur S400 contiennent donc du kappa carragenane, alors que seules les sous fractions correspondant aux plus petites masses moléculaires, isolés de la fraction 2 M, contiennent des traces de kappa. Il est intéressant de noter que l'hydrolyse par la kappa carragenase a permis de détecter la présence de kappa carragenane dans les mêmes sous fractions D.E.A.E. que celles dont le spectre RMN indiquait des traces de kappa. Ces molécules de faibles masses moléculaires contenant des traces de kappa ne présentent pas, comme l'indique le tableau 18, des teneurs en sulfate différentes des autres sous fractions de la fraction 2 M. Elles ne peuvent donc pas être considérées comme directement responsables de la teneur en sulfate élevée de la fraction 2 M.

Tableau 19

Evaluation par chromatographie CCM de l'abondance des différents oligosaccharides obtenus par action de la kappa carragenase sur les sous-fractions S400 des fractions D.E.A.E. 2M et 3M du carragenane de l'échantillon R42

D.E.A.E. 2M			D.E.A.E. 3M		
fraction d'élution	dimère	tetramère	fraction d'élution	dimère	tetramère
105	-	-	103	+	+++
118	-	-	116	+	+++
132	-	-	130	+	+++
145	-	±	143	+	+++
159	±	+	156	+	+++
178	±	+	169	+	+++
			185	+	+++
			198	+	+++
			204	±	++

3 - Chromatographie S400 du carraghenane total - distribution des masses moléculaires du kappa carraghenane

La courbe d'élution sur colonne S400 du carraghenane total extrait de l'échantillon R42 est représentée sur la figure 24. Sur cette même figure sont représentés les pourcentages de sucres réducteurs, exprimés par rapport aux sucres totaux, obtenus après hydrolyse de chaque fraction par la kappa carraghenase. Ce pourcentage de sucres réducteurs permet d'obtenir une estimation de la teneur en kappa carraghenane dans les différentes fractions. La figure 24 montre que des structures kappa se rencontrent dans des fractions intermédiaires et qu'elles sont absentes de celles correspondant aux masses moléculaires les plus élevées et les plus faibles. Comme le montre l'analyse décrite au paragraphe précédent, la méthode de détection par la kappa carraghenase est plus sensible. Elle permet donc de déceler la présence de kappa carraghenane dans des fractions contenant de très faibles quantités de substrat. La non détection de kappa carraghenane dans une partie des fractions isolées du carraghenane total est donc significative.

Nous n'avons pas pu identifier les autres types de carraghenanes présents dans les fractions, la quantité de matériel dans chacune d'entre elle ne permettant pas de réaliser des analyses par RMN.

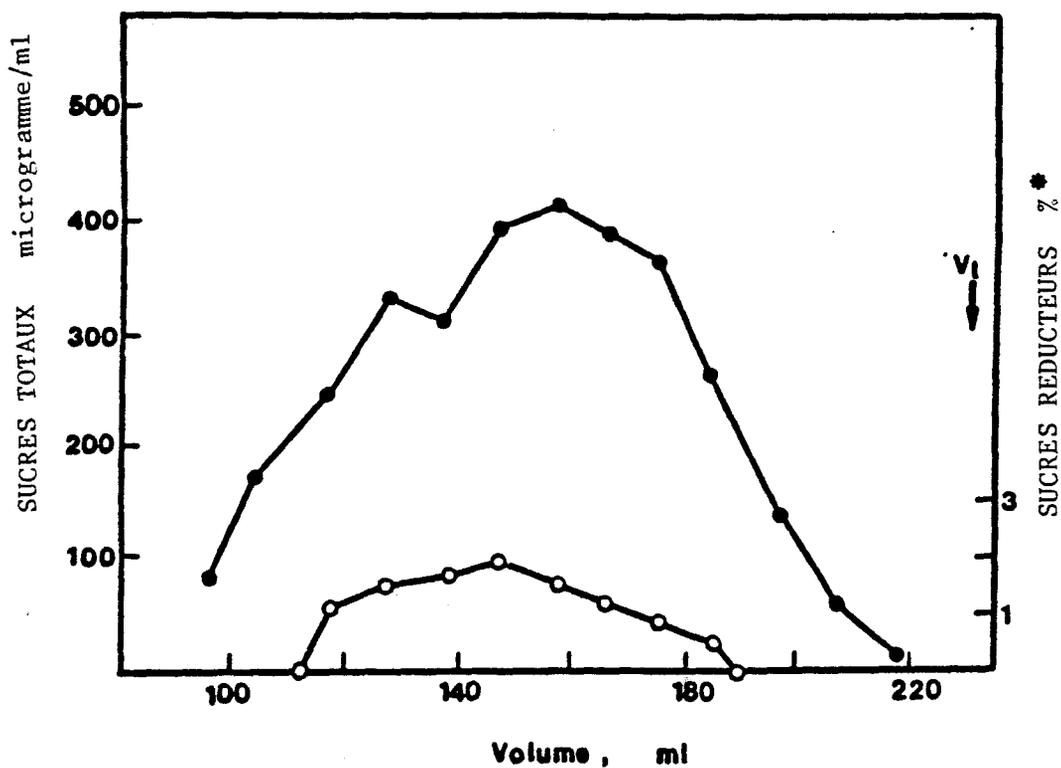


Figure 24- Courbe d'élution sur colonne Sephacryl S400 du carraghenane total de l'échantillon R42 de R. verruculosa.

● carraghenane total

○ teneur en sucres réducteurs obtenus par hydrolyse des fractions correspondantes par la kappa carraghenane.

V_t = volume d'élution du galactose.

* exprimé par rapport aux sucres totaux

D - Discussion

L'étude préliminaire des carraghenanes de Rissoella (3^{ème} partie) a permis de mettre en évidence un certain nombre de relations entre ces polymères:

Le beta carraghenane coexiste toujours avec le omega, mais jamais avec le kappa .

De telles relations sont pour nous significatives dans la mesure où le beta carraghenane, qui n'est pas sulfaté, devrait pouvoir être séparé facilement des 2 autres carraghenanes si les différentes structures ne sont pas liées. Les résultats concernant les relations entre le beta et le omega carraghenane d'une part et le beta et kappa carraghenane d'autre part doit être prise en considération dans toute hypothèse sur d'éventuelles relations biosynthétiques entre ces molécules, dans la mesure où l'on peut facilement concevoir un mécanisme permettant le passage direct de l'un à l'autre type de structure.

Le kappa carraghenane a également toujours été rencontré coexistant avec le omega quelle que soit la méthode de fractionnement utilisée.

Le fractionnement sur gel S400 a montré que ce polymère n'est présent que dans les fractions d'élution correspondant à des masses moléculaires intermédiaires. La courbe d'élution S400 du carraghenane total montre que les fractions dépourvues de kappa sont relativement peu abondantes. Les structures omega étant largement

prédominantes sur les kappa dans le carraghenane total, comme le montrent les analyses RMN, la quantité de ce polymère est supérieure à celle contenue dans les fractions dépourvues de kappa. Une partie du polymère omega doit donc coexister avec le kappa carraghenane. Le fractionnement sur gel S400 ne permet donc pas de séparer le kappa du omega, mais montre une plus grande polydispersité de ce dernier polymère.

Le fractionnement S400 de la fraction D.E.A.E. 3M ne permet pas non plus de séparer le kappa du omega.

On peut toutefois remarquer que la non dissociation de ces deux polymères est loin de signifier que les deux structures sont indissociables, dans la mesure où il n'est pas certain que les différents fractionnements utilisés aient été vraiment appropriés pour une telle séparation.

En ce qui concerne la recherche de nouveaux types de carraghenanes, les différents fractionnements effectués dans le cadre de la structure fine n'apportent rien de plus que ce qu'à permis de mettre en évidence la première partie de cette étude sur la mise en évidence des principaux carraghenanes. Le sous-fractionnement des fractions D.E.A.E. en fonction de la masse moléculaire et l'analyse de leur teneur en sulfate, n'a permis de mettre en évidence aucun carraghenane contenant des unités alpha-D-galactose 6-sulfate, qui auraient pu être des précurseurs du kappa carraghenane.

D'autres résultats, obtenus dans le cadre de cette étude fine des relations entre carraghénanes, ont permis de mettre en évidence une hétérogénéité dans la distribution des polymères de certaines fractions. Une telle hétérogénéité peut être mise en évidence dans la fraction D.E.A.E. 1 M, qui apparaît constituée de deux groupes de molécules, différant par la distribution de leurs masses moléculaires. Ces deux catégories de polymères contenus dans la fraction 1 M sont caractérisées par un rapport β/ω inférieur à 1. Parmi ces deux catégories, celle correspondant aux masses moléculaires les plus élevées présente une distribution de ces derniers assez proche de celle des polymères de la fraction D.E.A.E. 0,5 M. C'est ainsi que ces deux dernières catégories de molécules se distinguent des autres par le fait qu'elles ne sont représentées que par des molécules de grande taille. Nous pensons que les molécules de la fraction 0,5 M ainsi que celles de la fraction 1 M correspondant aux masses moléculaires élevées pourraient représenter deux étapes d'une même évolution biosynthétique au cours de laquelle un carraghénane hybride β - ω évoluerait vers le remplacement d'une des structures par l'autre sans changement de masse moléculaire. Un tel processus a déjà été imaginé par Rees pour la transformation du μ carraghénane en κ (Weigl et Yaphe, 1966a).

Une autre hétérogénéité, consiste en la détection par chromatographie sur couche mince de traces de κ

carraghenane dans les sous-fractions correspondant à de faibles masses moléculaires, isolées de la fraction 2 M.

La quantité de polymères contenus dans ces fractions n'a pas été suffisante pour que l'on puisse en faire l'analyse par spectroscopie RMN. Ces fractions représentent une partie du polymère correspondant au sous fractionnement fr 149-193 de la fraction D.E.A.E. 2 M. Ce dernier polymère, dont le spectre RMN est représenté sur la figure 23 montre également des traces de kappa.

Les structures kappa détectées dans la fraction 2 M doivent différer de la majeure partie des kappa que l'on retrouve dans la fraction 3 M. Ce qui expliquerait la présence de kappa dans la fraction 2 M pourrait être une conformation différente de ceux de la fraction 3M.

SIXIEME PARTIE
DISCUSSION GENERALE

SIXIEME PARTIE - DISCUSSION GENERALE

A - RAPPEL DES OBJECTIFS ET JUSTIFICATION DE LA STRATEGIE

L'étude des carraghenanes de R. verruculosa et de leur filiation biosynthétique est une entreprise que l'on aborde avec un regard très différent suivant que l'on conçoit cette recherche comme une simple tentative de découvrir de nouveaux types de carraghenanes ou comme l'acquisition de données permettant de comprendre le mécanisme général de mise en place de ce type de polymère dans la paroi.

Généralement, les espèces d'algues carraghenophytes contiennent des mélanges de molécules différant les unes des autres par des détails structuraux qui permettent de les distinguer mais aussi de les relier temporellement par l'intermédiaire d'une relation de biosynthèse. Dans tous les cas, les recherches doivent donc commencer par un inventaire exhaustif des différents types constituant l'extrait brut issu des échantillons de l'espèce étudiée.

La seconde étape n'est jamais évidente à concevoir car elle dépend évidemment des résultats de la première.

Historiquement, les rares recherches sur les relations biosynthétiques entre deux carraghenanes n'ont été entreprises que lorsque la présence simultanée de ces deux molécules dans les extraits des espèces d'algues étudiées pouvait laisser supposer que l'une était un précurseur de

l'autre. L'une des relations souvent observée a été la présence simultanée, dans l'extrait d'un même échantillon, de structures dont l'unité alpha était constituée par du galactose 6-sulfate ou par du 3,6 anhydrogalactose. Du fait que ces deux types de carraghenanes étaient toujours rencontrés simultanément, les biochimistes ont étudié quels liens pouvaient les réunir dans une même plante, et ont montré que d'une part les deux structures étaient liées (Greer et Yaphe, 1984^a), d'autre part qu'une enzyme permettait le passage de l'une à l'autre (Wong et Craigie, 1978)

A la suite de notre découverte précoce du omega carraghenane et de la mise en évidence des autres types de carraghenanes présents chez R. verruculosa, il a fallu entreprendre l'étude des relations entre ces structures, sans pouvoir comparer nos observations à des modèles analogues. Devant l'absence de références et l'impossibilité d'imaginer par comparaison un modèle ordonné dans le temps de la filiation entre ces molécules, nous avons décidé d'orienter nos recherches dans le but de déterminer les liens existant entre les différents types de carraghenanes à partir de leurs schémas de répartition intra et intermoléculaires.

Ainsi les deux étapes de notre recherche peuvent elles intervenir simultanément dans la mesure où la mise en évidence de nouveaux carraghenanes est basée sur des fractionnements permettant d'obtenir un enrichissement en ces molécules et que l'impossibilité de dissocier deux

polymères par ces mêmes techniques fournit un indice permettant de suspecter des relations biosynthétiques entre elles. En ce qui concerne ce dernier objectif la méthodologie choisie est basée sur l'hypothèse suivant laquelle l'observation de relations de coexistence entre différents types de carraghénane aurait une signification biosynthétique. Une telle démarche repose sur une hypothèse qui peut apparaître spéculative mais s'appuie également sur l'exemple d'autres molécules de carraghénanes pour lesquelles elle a été vérifiée (Greer and Yaphe, 1984). La confirmation de cette hypothèse ne correspond pas à la stratégie choisie pour cette étude car elle fait appel à d'autres voies d'investigations. Notre projet se limite donc à dresser un inventaire des relations de coexistence entre les polymères et à ne plus prendre en compte celles qui présentent des caractères tels qu'elles ne peuvent pas avoir de signification biosynthétique.

En nous référant aux travaux sur l'hybridation des carraghénanes (Greer and Yaphe, 1984^a), nous avons pensé que si des relations biosynthétiques existent entre ces carraghénanes, il y a de fortes chances pour que les molécules présentant ces relations soient liées par liaisons covalentes. Démontrer l'existence de telles liaisons n'est pas toujours facile dans la mesure où les molécules de carraghénanes ont tendances à s'associer par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques. Nous avons donc pris la précaution d'utiliser une force ionique élevée pour éviter

de telles associations. La non dissociation de deux polymères soumis à différents fractionnements n'est pas une preuve absolue de l'existence de liaisons covalentes entre leurs molécules. Lorsque l'on ne connaît pas parfaitement les propriétés physiques des polymères que l'on veut séparer, l'utilisation de méthodes de fractionnement basées sur des principes très différents augmente la signification d'une non dissociation. Les conclusions doivent cependant être formulées avec une grande précaution, et doivent garder une valeur relative.

Nous avons donc adopté cette démarche pour séparer les carraghenanes de Rissoella.

La diversité des méthodes de fractionnement que nous avons utilisé a en outre l'avantage de permettre la mise en évidence d'éventuels carraghenanes minoritaires. En effet, la séparation aboutit finalement à un enrichissement en ces molécules, et elles peuvent être détectées alors qu'elles étaient passées inaperçues auparavant.

B -VERIFICATION DES HYPOTHESES DE DEPART ET REFLEXIONS SUR LE MECANISME DE MISE EN PLACE DES COMPOSES PARIETAUX

1 - Composition en carraghenanes

Les spectres IR du carraghenane de R. verruculosa que nous avons obtenus dès le début de cette étude semblaient indiquer que ce polymère était de type kappa. La spectroscopie IR n'est cependant qu'une technique

approximative d'identification d'un phycocolloïde, et ne permet que d'écarter certaines hypothèses. Dans la seule étude publiée, à notre connaissance, sur le carraghenane de R. verruculosa, celui-ci est décrit comme étant principalement constitué de structures beta coexistant avec des structures kappa nettement moins abondantes (Combaut et al., 1985). Nos travaux ont montré que R. verruculosa contient surtout un carraghenane de type nouveau, que nous avons nommé omega, ainsi qu'un peu de kappa et des traces de beta.

Cette différence d'identification illustre bien les dangers d'une interprétation hâtive de tels spectres. Notre raisonnement s'appuie sur un spectre RMN identique à celui présenté par Combaut et al. Ces auteurs ne prennent en compte que les carbones anomériques pour l'identification des carraghenanes, alors que l'examen des autres signaux du spectre montre clairement qu'ils ne peuvent correspondre à ceux de la structure proposée. Notre identification du omega carraghenane est confortée par l'isolement de ce polymère dans une fraction dont le spectre RMN ne montre plus que les signaux que nous avons attribué à cette structure. La confusion avec une structure beta s'explique par le fait que celui-ci présente certains déplacements chimiques identiques à ceux de la structure omega.

Il nous paraît donc important de mentionner que l'identification d'un carraghenane par RMN ne peut se

suffire de la seule analyse des signaux correspondants aux seuls carbones anomériques.

2 - Filiation biosynthétique

La mise en évidence des structures omega et kappa dans le carraghenane de R. verruculosa nous a conduit à émettre l'hypothèse que celles-ci pouvaient dériver de précurseurs dans lesquels l'unité 3,6-anhydrogalactose était remplacée par du galactose 6-sulfate. D'après cette hypothèse les carraghenanes seraient formés par désulfatation progressive. Toutefois la découverte de beta carraghenane coexistant avec les deux autres catégories nous a permis d'envisager une autre possibilité: celle qui ferait du beta le précurseur du omega et du kappa.

Les résultats des expériences de fractionnement semblent confirmer cette hypothèse en ce qui concerne les relations entre le beta et le omega, qui constitueraient deux étapes d'une même filiation biosynthétique. Par contre de tels liens semblent ne pas exister entre le beta et le kappa. En dépit des efforts que nous avons déployé pour apporter une réponse à cette question, nous n'avons, à l'heure actuelle, aucun argument permettant de formuler une hypothèse sur une éventuelle filiation entre le kappa et les autres types de carraghenanes présents chez R. verruculosa.

Parmi les espèces d'algues qui ont fait l'objet d'une étude biochimique, aucune ne contient qu'un seul type de carraghenane. Les différents auteurs qui ont travaillé sur

ce sujet ont pris l'habitude de parler de carraghenanes et de leurs précurseurs en se référant à la formation du pont 3,6-anhydro par désulfatation du galactose 6-sulfate des unités 4-liées.

A ce propos on peut s'interroger sur le terme de l'évolution naturelle des carraghenanes comme de celui des autres polygalactanes algaux. Il semble que le "vieillissement" des cellules d'algues contenant de l'agar s'accompagne d'une désulfatation de la molécule et d'une formation de 3,6-anhydrogalactose (Craigie et Wen, 1984). Les résultats de notre étude plaident plutôt pour une évolution allant dans le sens de la sulfatation du polymère. Existe-t-il une raison physiologique pour laquelle le polymère de certaines espèces se désulfateraient alors qu'ils subiraient la transformation inverse chez d'autres?

3 - Mécanisme de la biosynthèse

Si l'on admet que l'hétérogénéité d'un polymère reflète son évolution, on peut envisager deux hypothèses en ce qui concerne le mécanisme de cette évolution:

L'hétérogénéité serait due à une différenciation du polymère par addition de séquences de structures différentes, soit à une évolution progressive de la structure de certaines séquences.

Le modèle de formation de omega carraghenane à partir du beta, s'il est vérifié, plaide plutôt en faveur du deuxième mécanisme. Nos résultats semblent en effet indiquer que les

molécules hybrides beta-omega, (si elles existent), qui ont les masses moléculaires les plus grandes sont aussi les plus riches en beta. Cette dernière structure semble n'exister que sous forme d'hybride avec le omega, ce qui, à notre avis, indique une structure évolutive. Le omega carraghenane, qui présente à l'état pur une grande polydispersité, constituerait un terme de l'évolution du carraghenane de Rissoella.

Un modèle de biosynthèse par transformation de séquences a été mis en évidence pour les kappa, iota et beta carraghenanes, isolés respectivement des espèces Hypnea musciformis (Greer et al., 1984), Eucheuma nudum (Greer et Yaphe, 1984b) et E. gelatinae (Greer et Yaphe, 1984a). La formation de ces polymères se ferait par désulfatation progressive de certaines séquences au sein d'une molécule de masse moléculaire élevée. Il est intéressant de remarquer que, chez R. verruculosa, cette transformation progressive de séquences se ferait par sulfatation du beta en omega carraghenane. Ainsi un même type de carraghenane pourrait se sulfater chez une espèce d'algue et se désulfater chez une autre. Les enzymes responsables de ce comportement différent restent en l'occurrence à découvrir.

4 - Localisation des carraghenanes

D'après certains auteurs (Ramus et Groves, 1972) la sulfatation d'un phycocolloïde interviendrait après la phase de polymérisation. On peut s'interroger sur le lieu de

cette sulfatation dans la cellule. S'il était possible de distinguer des carraghenanes cytoplasmiques des carraghenanes pariétaux, on disposerait d'un excellent argument pour démontrer le sens de la biosynthèse. Les expériences d'obtention de parois isolées ne permettent que d'affirmer avec certitude que les omega, kappa et beta carraghenanes sont bien des composés pariétaux, ce qui ne préjuge en rien de leur appartenance éventuelle à d'autres compartiments cellulaires.

5 - Physiologie de la production des carraghenanes

Les expériences sur Gracilaria tikvahiae montre que, en croissance rapide, cette espèce contient un plus fort pourcentage de précurseurs de l'agar (Craigie et Wen, 1984). D'après ces mêmes auteurs les températures élevées auraient le même effet que celui d'une croissance rapide. Il est d'ailleurs difficile de dissocier ces deux effets qui seraient responsables des variations saisonnières observées dans la composition des agar et des carraghenanes. Par analogie avec ce dernier système nous avons émis l'hypothèse que Rissoella en croissance rapide devait contenir plus de carraghenanes précurseurs que lorsqu'elle croît lentement. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les échantillons en croissance rapide sont plus riches en structure omega de faibles masses moléculaire (constituant la fraction K1alcF1) que les échantillons présentant des croissances lentes. Peut-on dire pour autant que le omega

serait précurseur d'autres carraghénanes? Nous ne le pensons pas. Ces structures omega, que nous considérons comme de plus petite taille que les omega des autres fractions en raison de leur grande solubilité, ne représentent qu'un pourcentage très faible du carraghénane total. Il se pourrait que ces structures proviennent d'une sulfatation de structures beta dont la polymérisation serait interrompue à l'état de courtes chaînes, chez l'algue en croissance rapide.

On peut, pour terminer, s'interroger sur la façon dont les variations de taille des molécules de carraghénane ou leur degré de sulfatation peuvent affecter la physiologie de la cellule algale, notamment en ce qui concerne les échanges hydriques. Une résistance accrue à la dessiccation a été invoquée pour expliquer que la paroi de certaines algues brunes était d'autant plus riche en polymères sulfatés qu'elles occupaient un emplacement élevé au dessus du niveau moyen de la mer (Quillet et de Lestang, 1972). Une telle constatation n'est cependant pas vérifiée dans le cas des algues tropicales (observations personnelles), pourtant exposées, dans certains cas, à une plus forte dessiccation.

C - ELABORATION D'UNE STRATEGIE FUTURE

L'étude du système carraghénane chez Rissoella et de sa biosynthèse n'est qu'une étape dans l'étude plus générale des différentes voies métaboliques permettant l'élaboration

de la paroi des algues rouges. Les carraghenanes que nous avons observés ne constituent qu'un élément important de la paroi de R. verruculosa. D'une façon générale, comme nous l'avons dit en introduction, nous ne savons presque rien chez ce type d'algues rouges des constituants coexistant avec les phycocolloïdes dans la paroi cellulaire. De ce point de vue notre expérience d'obtention de parois isolées a permis de développer une méthode permettant une désagrégation progressive de la paroi, qui devrait permettre à terme la mise en évidence ces autres constitutants.

Les résultats acquis, permettent non seulement de connaître les principaux constituants du système carraghenane de R. verruculosa, mais également de dégager un certain nombre d'hypothèses sur leur biosynthèse.

L'une des principales vérifications qu'il faudra effectuer est celle qui consiste à faire dériver le omega carraghenane du beta. On peut pour cela soit utiliser directement les méthodes habituelles pour la mise en évidence d'un processus biosynthétique (mise en évidence d'enzyme réalisant la transformation, marqueurs radioactifs), soit tenter d'isoler une enzyme hydrolysant spécifiquement le beta ou le omega carraghenane et de faire agir celle-ci sur les fractions dans lesquelles les deux polymères coexistent.

Une autre approche, permettant d'obtenir des informations sur la biosynthèse, a été esquissée avec l'analyse de la polydispersité des masses moléculaires des différents polymères coexistant dans certaines fractions. Cette voie

doit être poursuivie à l'aide de techniques de mesure des masses moléculaires plus rigoureuses et moins fastidieuses que celles que nous avons utilisées.

Ainsi nous pensons que l'étude du "produit fini" aide à comprendre le mécanisme de sa biosynthèse.

Si l'on dispose aujourd'hui de méthodes fiables pour déterminer les structures des différents carraghenanes, il n'existe pas de méthode générale permettant de déterminer avec certitude le mode de liaison entre ces structures, dans le cas de molécules hybrides. Ces molécules seraient formées par alternance de courtes séquences de différents types de carraghenanes. Il y aurait transformation progressive de certaines séquences d'une macromolécule homogène pour aboutir à une telle hétérogénéité. On peut supposer qu'il existe des enzymes capables de reconnaître certains sites de la molécule ce qui explique la discontinuité de la transformation. Quels sont les signaux de reconnaissance de ces sites? La structure tertiaire de la molécule intervient-elle dans le mécanisme de reconnaissance? Il y a là tout un aspect de la biosynthèse que l'on pourra commencer à explorer lorsque des méthodes permettant de connaître le mode d'alternance des différents types de carraghenanes, au sein d'une molécule hybride, auront été développées ((courbes de neutralisation, etc...)).

La connaissance de ce mode d'alternance est également essentielle pour comprendre la physiologie de la paroi. Deux molécules hybrides de carraghenanes présentant la même

composition mais disposées dans un ordre différent, doivent avoir des propriétés physiques très différentes. C'est ainsi que Rees a montré que dans les molécules de kappa, la présence de quelques séquences mu modifie totalement la structure tertiaire de la molécule et permet une plus grande rétention d'eau (Rees, 1969).

Les molécules de carraghenanes sont caractérisées par un enchaînement de structures remarquablement répétitives, présentant un nombre restreint de variations, ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude des facteurs agissant sur leur biosynthèse. A ce jour la plupart des recherches sur la structure de ces polymères se sont limitées à un inventaire des différents carraghenanes coexistant dans l'extrait d'une même espèce ou dans une même fraction de cet extrait. L'étude du mode d'alternance des différentes structures à l'intérieur d'une molécule de carraghenane permettra de savoir si la faible variabilité dans la composition de ce polymère se retrouve au niveau de l'organisation de ses constituants. Ainsi nous pensons que la physiologie de la paroi dépend autant de sa composition en polymères que de leur organisation intramoléculaire.

Bibliographie

- Akahane, T and Izumi, S. 1976. Sulfate groups of the mucilage of red seaweeds.
Agr. Biol. Chem. 40: 285-289
- Albersheim, P., Nevins, D.J., English, P.D. and Karr, A. 1967. A methods for the analysys of sugar in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography.
Carbohyd. Res., 5: 340-345
- Allsobrook, A.J.R., Nunn, J.R. and Parolis, H. 1971. Sulphated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. V. A polysaccharide from Acodes ulvoidea.
Carbohyd. Res., 16: 71-78
- Anderson, N.S., Dolan T.C.S. and D.A. Rees. 1968a. Carrageenans. Part III. Oxidative hydrolysis of methylated kappa carrageenan and evidence for a masked repeating structure.
J. Chem. Soc. (C), 596-601
- Anderson, N.S., Dolan T.C.S., Lawson C.J., Penman A. and D.A. Rees. 1968b. Carrageenans Part V. The masked repeating structures of lambda and mu carrageenans.
Carbohydr. Res. 7: 468-473
- Araki, C. 1966. Some recent studies on polysaccharides of agarophytes.
Int. Seaweed Symp. 5: 3-19
- Bellion, C. Hamer, G.K. and Yaphe, W. 1981. Analysis of kappa-iota hybrid carrageenans with kappa-carrageenase, iota-carrageenase and ^{13}C NMR.
Proc. Int. Seaweed Symp. 10: 379-384
- Bellion, C., Brigand, G., Prome, J-C. Welti D. and S. Bociek 1983. Identification et caractérisation des précurseurs biologiques des carraghenanes par spectroscopie de ^{13}C .
Carbohyd. Res. 119: 31-48
- Bird, KT, Hanisak, M.D. and J.H. Ryther. 1981. Chemical quality and production of agars extracted from Gracilaria tikvahiae grown in different nitrogen enrichment conditions.
Bot. Mar. 24: 441-444

- Cerezo, A.S. 1973. The carrageenans of Gigartina Skottsbergii S. et G. Part III. Methylation analysis of the fraction precipitated with 0.3-0.4 M potassium chloride. *Carbohyd. Res.* 26: 335-340
- Cheney, D., Mathieson, A. and Ragonese. 1979. Carrageenan yield in Chondrus crispus - Are all populations created equal? *J. Phycol.*, Suppl. to V. 15 p 18
- Christiaen, D., Stadler T., Ondarza M. and Verdus M.C. 1987. Structures and function of the polysaccharides from the cell wall of Gracilaria verrucosa (Rhodophyceae, Gigartinales). *Hydrobiologia* 151/152: 139-146
- Combaut, G., Piovetti, L., Canal, G. and Sancho, A. 1985. polysaccharide of the red alga Rissoella verruculosa. *Phytochemistry* 24: 1597-1599
- Craigie, J.S. and Leigh, C. 1978. Carrageenans and agars. In (J. Hellebust and J.S. Craigie, Eds.) Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods. Cambridge University Press, Cambridge pp. 109-131
- Craigie, J.S. and K.F. Wong. 1978. Carrageenan biosynthesis. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 9: 369-377
- Craigie, J.S. and Z.C. Wen. 1984. Effect of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from Gracilaria tikvahiae (Rhodophyceae). *Can. J. Bot.* 62: 1665-1670
- Craigie, J.S., Wen, Z.C. and J.P. Van der Meer; 1984. Interspecific, intraspecific and nutritionally determined variations in the composition of agars from Gracilariassp. *Bot. Mar.* 27: 55-61
- Cross, A.D. 1964. An introduction to practical infrared spectroscopy. Butterworths, London, pp. 1-140
- Darvill, A. and Albersheim, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors - a defence against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35 : 243-275
- Dawes, C.J. 1981. Biological studies of Florida Eucheuma (Rhodophyta, Gigartinales). IV. Seasonal biochemical variations in reproductive and vegetative plants of E. nudum J. Agardh from three sites. *Proc. int. seaweed Symp.* 8: 87-92
- Dewar E.T. and E.G. Percival. 1947. The polysaccharides of carrageen. Part II. The Gigartina stellata polysaccharide *J. Chem. Soc.*, 1622-1626

DiNinno, V and McCandless, E.L. 1978a. The immunochemistry of lambda-type carrageenans from certain red algae. Carbohyd. Res. 67: 235-241

DiNinno, V. and McCandless, E.L. 1978b. The chemistry and immunochemistry of carrageenans from Eucheuma and related algal species. Carbohyd. Res. 66: 85-93

DiNinno, V.L., Bell, R.A. and E.L. McCandless. 1978. Identification of 4,6-O-(1-carboxyethylene)-D-galactose by combined gas chromatography mass spectrometry. Biomed. Mass Spectrom. 5: 671-673

DiNinno, V. and McCandless, E.L. 1979. Immunochemistry of kappa-type carrageenans from certain red algae. Carbohyd. Res. 72: 157-163

DiNinno, V.L., McCandless, E.L. and R.A. Bell. 1979. Pyruvic acid derivative of carrageenan from a marine red algae (Petrocelis species). Carbohydr. Res. 71: C1-C4

Dolan, T.C.S. and D.A. Rees. 1965. The carrageenans. Part II. The positions of the glycosidic linkages and sulphate esters in lambda carrageenan. J. Chem. Soc., 3534-3539

Duckworth, M. and Yaphe, W. 1971. The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. Carbohyd. Res. 16: 189-197

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton J.K., Ribers, P.A. and Smith, R. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356

Ekstroem, L.G., Kuiniven, J. and Johansson G. 1983. Molecular weight distribution and hydrolysis behaviour of carrageenans. Carbohyd. Res. 116: 89-94

Evans, L.V., Callow, M.E. and Coughlan, S.J. 1978. Sulfated polysaccharide synthesis in Fucus (Phaeophyceae) zygotes. Proc. Int. Seaweed Symp. 9: 329-335

Eveleigh, M.J., Vollmer, C.M. and McCandless, E.L. 1978. Differentiation of lambda carrageenans from Rhodophyta with immunological and spectroscopic techniques. J. Phycol. 14: 89-91

- Gordon-Mills, E.M. and McCandless, E.L. 1975. Carrageenans in the cell walls of Chondrus crispus Stack. (Rhodophyceae, Gigartinales). I. Localization with fluorescent antibody. *Phycologia* 14, (4): 275-281
- Greer, C.W. 1984. A study of carrageenases from marine bacteria.
Ph.D. Thesis, McGill University
- 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 ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Bot. Mar.* 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 ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Bot. Mar.* 27: 479-484
- 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 ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohyd. Res.* 129: 189-196
- Heaney-Kieras, J., Rodén, L. and D. J. Chapman. 1977. The covalent linkage of protein to carbohydrate in the extracellular protein-polysaccharide from the red alga. Porphyridium cruentum. *Biochem. J.* 165: 1-9
- Hirase, S. and K. Watanabe. 1972. The presence of pyruvate residues in lambda carrageenan and a similar polysaccharide. *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.* 50: 332-336
- Hosford, S.P.C. and McCandless, E.L. 1975. Immunochemistry of carrageenans from gametophytes and sporophytes of certain red algae. *Can. J. Bot.* 53: 2835-2841
- Johnston, K.H. and McCandless, E.L. 1968. The immunologic response of rabbits to carrageenans, sulphated galactans extracted from marine algae. *J. Immunol.* 101: 556-562
- King, G.M. and Lauterbach, G.E. 1987. Characterization of carrageenan nitrogen content and its susceptibility to enzymatic hydrolysis. *Bot. Mar.* 30: 33-39

- Kylin, H. 1932. Die Florideenordnung Gigartinales. Lund Univ. Arsskr. N.F. Avd. 2, Bd 28 Nr. 8
- Kylin, H. 1956. Die Gattungen der Rhodophyceen. Gleerup, Lund. XV. 673 pp
- LaClaire II, J.W. and Dawes, C.J. 1976. An autoradiographic and histochemical localization of sulfated polysaccharides in Eucheuma nudum (Rhodophyta). J. Phycol. 12: 368-375
- Lahaye, M. and Yaphe, W. 1985. ^{13}C NMR spectral analysis of sulfated and desulfated polysaccharides of the agar type. Carbohyd. Res. 143 :240-245
- Lawson, C.J., Rees D.A., Stancioff D.J. and N.F. Stanley. 1973. Carrageenans. Part VIII. Repeating structures of galactan sulphates from Furcellaria fastigiata, Gigartina canaliculata, Gigartina chamissoi, Gigartina atropurpurea, Ahnfeltia durvillaei, Gymnogongrus furcellatus, Eucheuma cottonii, Eucheuma spinosum, Eucheuma isoforme, Eucheuma uncinatum, Agardhiella tenera, Pachymenia hymantophora and Gloiopeltis cervicornis. J. Chem. Soc. (Perkin), 2177-2182
- Lloyd, A.G., Dogson, K.S., Price, R.G. and Rose, F.A. 1961. Infrared studies on sulfate esters. II- Monosaccharid sulfates. Biochim. Biophys. Acta 46: 108-115
- Loewus, F., Wagner, G., Schiff, J.A. and Weistrop, J. 1971. The incorporation of ^{35}S -labeled sulfate into carrageenan in Chondrus crispus. Plant Physiol. 48: 373-375
- Mabeau, S. 1985. Contribution à l'étude de la structure et de la fonction de la paroi des algues brunes. Thèse IANA Paris-Grignon, 106 pp.
- Malfait, T., van Dael, H. and van Cauwelaert, F. 1987. Raman spectroscopic analysis of the sodium salt of kappa carrageenan and related compounds in solution. Carbohyd. Res. 163: 9-14
- Mathieson, A.C., Emerich Penniman, C. and E. Tveter-Gallagher. 1984. Phycocolloid ecology of underutilized economic red algae. Hydrobiologia, 116/117: 542-546
- McCandless, E.L. 1981. Biological control of carrageenan structure: effects conferred by the phase of life cycle of the carrageenophyte. Proc. Int. Seaweed Symp. 8: 1-18

- McCandless, E.L. and Craigie, J.S. 1979. Sulphated polysaccharides in red and brown algae. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 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 (Berl.)* 112: 201-212
- McCandless E.L., Craigie, J.S. and Hansen, J.E. 1975. Carrageenans in gametangial and tetrasporangial stages of Iridaea cordata (Gigartinales). *Can. J. Bot.* 53: 2315-2318
- McCandless, E.L. and Gretz, M.R. 1984. Biochemical and immunological analysis of carrageenans of the Gigartinales and Phylloporaceae. *Hydrobiologia* 116/117 :175-178
- Millard, P. and Evans, L.V. 1982; The fate of sulphate within capsular polysaccharide of the unicellular red alga Rhodella maculata. *J. exp. Bot.* 33: 854-864
- Mollion, J. 1977. Recherches sur les carragénanes et leur extraction: variations saisonnières du carragénane de Hypnea. Thèse de 3^{ème} cycle, Université de Lille, 70 pp.
- Mollion, J. 1978. Seasonal variations in carrageenan from Hypnea musciformis (Florideophyceae) in Senegal. *Proc. int. seaweed symp.* 9: 233-240
- Mollion, J. 1984. Seaweed cultivation for phycocolloid in the Mediterranean. *Hydrobiologia* 116/117: 288-291
- Mollion, J., Christiaen, D. and Richard, I. 1985. Screening red algae for phycocolloids. *Int. Phycol. Congress, 2, Copenhagen, abstract: 111*
- Mollion, J., Moreau, S. and Christiaen, D. 1986. Isolation of a new type of carrageenan from Rissoella verruculosa (Bert.) J. AG. (Rhodophyta, Gigartinales). *Bot Mar.* 29: 549-552
- Mollion, J., Karamanos, Y., Feghali, R. and Moreau, S. 1987. ¹³C NMR study of the heterogeneity of the carrageenan from Rissoella verruculosa (Bert.) J. Ag. (Rhodophyta). *Food Hydrocol.* 1 n° 5/6: 413-421
- Mollion, J., Morvan, H., Bellanger, F. and Moreau, S. 1988. ¹³C NMR study of the heterogeneity in the carrageenan system

from Rissoella verruculosa(Bert.) J. Ag. (Rhodophyta, Gigartinales).
Phytochemistry, sous presse

Mollion, J. Verdus, M.C., Stadler T., Morvan H. and Moreau S. 1988. Evidence for beta carrageenan in Rissoella verruculosa (Bert.) J. Ag. (Rhodophyta). The concept of hybrid molecules in carrageenan systems. in T. Stadler, Y. Karamanos, H. Morvan, M.C. Verdus, J. Mollion and D. Christiaen Eds.) Algal biotechnology. Elsevier Pub. (sous presse).

Montreuil, J. et Spik, G. 1963. Microdosage des glucides - monographie n° 1. Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux. Université de Lille I.

Nelson, N.J. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose
J. Biol. Chem. 153: 375-380

O'Neill A.N. 1955a. 3,6 anhydro-D-galactose as a constituent of kappa carrageenin.
J. Am. Chem. Soc. 77: 2837-2839

O'Neill, A.N. 1955b. Derivatives of 4-O-beta-D-galactopyranosyl- 3,6 anhydrogalactose from kappa carrageenin
J. Am. Chem. Soc. 77: 6324-6326

Painter, T.J. 1960. The polysaccharides of Furcellaria fastigiata. I. Isolation and partial mercaptolysis of a gel fraction.
Can J. Chem. 38: 112-118

Percival, E. 1978. Sulfated polysaccharides of the Rhodophyceae - A review.
pp. 213-224, In: R.G. Schweiger (Ed.) "Carbohydrate Sulfates", American Chemical Society, Washington, D.C. 294p

Penman, A. and D.A. Rees. 1973a. Carrageenans. Part IX. Methylation analysis of galactan sulphates from Furcellaria fastigiata, Gigartina canaliculata, Gigartina chamissoi, Gigartina atropurpurea, Ahnfeltia durvillaei, Gymnogongrus furcellatus, Eucheuma cottonii, Eucheuma spinosum, Eucheuma isoforme, Eucheuma uncinatum, Agardhiella tenera, Pachymenia hymantophora and Gloiopeltis cervicornis
J. Chem. Soc. (Perkin 1), 2182-2187

Penman, A. and D.A. Rees. 1973b. Carrageenans. Part X. Synthesis of 3,6-di-O-methyl-D-galactose, a new sugar from the methylation analysis of polysaccharides related to xi carrageenan.
J. Chem. Soc. (Perkin 1), 2188-2191

- Quillet, M. et de Lestang, G. 1972. Sur les radicaux "sulfuryl" des mucilages des algues marines. Bull. Soc. Sci. Anjou, N.S. 8: 55-66
- Ramus, J. and Groves, S.T. 1972. Incorporation of sulfate into the capsular polysaccharide of the red alga Porphyridium. J. Cell Biol. 54: 399-407
- Rees, D.A. 1963. The carrageenan system of polysaccharide. Part I. The relationship between the kappa and lambda component. J. Chem. Soc., 1821-1832
- Rees, D.A. 1969. Structure, conformation and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 24: 267-332
- Rees, D.A. 1972. Shapely polysaccharides. Biochem. J. 126: 257-273
- Rees, D.A., Steele, I.W. and Williamson, F.B. 1969. Conformational analysis of polysaccharides. III. The relation between stereochemistry and properties of some natural polysaccharide sulphates. J. Polymer Sci. 28: 261-276
- Rimington, C. 1931. The carbohydrate complex of the serum proteins. II. Improved method for isolation and redetermination of structure. Isolation of glucosaminodimannose from protein of ox blood. Biochem. J. 25: 1062
- Rochas, C. and Rinaudo, M. 1980. Structural and conformational investigation of carrageenans. Biopolymers 19 :2165-2175
- Rochas, C., Rinaudo, M. and Vincendon, M. 1983. Spectroscopic characterization and conformation of oligo kappa carrageenans. Int. J. Biol. Macromol. 5: 111-115
- Ryther, J.H., DeBoer, J.A. and Lapointe, B.E. 1978. Cultivation of seaweeds for hydrocolloids, waste treatment and biomass for energy conversion. Proc. Int. Seaweed Symp. 9: 1-16
- Scott, J.E. 1960. Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissue. Methods Biochem. Anal. 8 : 145-197
- Slonecker, J.H. 1972. Gas liquid chromatography of alditol acetates.

Methods Carbohydr. Chem. 6: 20-24

Smith, D.B. and Cook, W.H. 1953. Fractionation of carrageenin.

Archs. no. Biochem. Biophys. 45: 232-233

Stancioff, D.J. and N.F. Stanley. 1969. Infrared and chemical studies on algal polysaccharides.

Proc. Int. Seaweed Symp. 6: 595-609

Tillmans, J. and Philippi, K. 1929. The carbohydrate content of the important proteins of foodstuff and a colorimetric procedure for the determination of nitrogen free sugar in protein.

Biochem. Z. 215: 36-60

Turvey, J.R. 1978. Biochemistry of algal polysaccharides.

In Biochemistry of Carbohydrates II, ed. D.J. Manners, pp. 151-77. Baltimore: University Park. 259 pp.

Tveter-Gallagher, E., Cogburn, J.N., Mathieson, A.C. and Schiff, J.A. 1984. Location of carrageenan and incorporation of $^{35}\text{SO}_4$ into sulfur amino acids in the red alga Chondrus crispus.

Hydrobiologia 116/117: 488-492

Usov, A.I. 1984. NMR spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carrageenans and xylans.

Bot. Mar. 27: 189-202

Usov, A.I. and Arkhipova, V.S. 1981. Polysaccharides of algae. XXX. Methylation of kappa carrageenan type polysaccharides of the red seaweeds Tichocarpus crinitus (Gmel.) Rupr., Furcellaria fastigiata (Huds.) Lam. and Phyllophora nervosa (DC) Grev.

Biorgan. Khim. 7 :385-390 (in Russ.)

Usov, A.I. and Shashkov, A.S. 1985. Polysaccharides of algae. XXXIV: Detection of iota -carrageenan in Phyllophora brodiaei (Turn.) J. Ag. (Rhodophyta) using ^{13}C NMR spectroscopy.

Bot. Mar. 28: 367-373

Usov, A.I., Yarotsky, S.V. and A.S. Shashkov. 1980. ^{13}C NMR spectroscopy of red algal galactans.

Biopolymers. 19: 977-990

Vreeland, V., Zablackis, E. and Laetsch, W.M. 1988.

Monoclonal antibodies to carrageenan.

in (T. Stadler, M.C. Verdus, J. Mollion, Y. Karamanos H. Morvan and D. Christiaen Eds.) Algal Biotechnology. Elsevier Pub. sous presse

Vreeland, V. Zablackis, E., Doboszewski, B. and Laetsch, W.M. 1987. Molecular markers for marine algal polysaccharides. *Hydrobiologia* 151/152: 155-160

Weigl, J. and Yaphe, W. 1966a. The enzymic hydrolysis of carrageenan by *Pseudomonas carrageenovora*: purification of a kappa carrageenase. *Can J. Microbiol.*, 12: 939-947

Weigl, J. and Yaphe, W. 1966b. Glycosulfatase of *Pseudomonas carrageenovora*: desulfation of disaccharide from kappa carrageenan. *Can. J. Microbiol.* 12: 874-876

Weigl, J., Turvey, J.R. and Yaphe, W. 1966. The enzymic hydrolysis of kappa carrageenan with kappa carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora*. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 5: 329-332

Whyte, J.N.C., Englar, J.R., Saunders, R.G. and J.C. Lindsay. 1981. Seasonal variations in the biomass, quantity and quality of agar, from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria (verrucosatype)*. *Bot. Mar.* 24: 493-501

Whyte, J.N.C., Stephen, P.C., Hosford and Englar, J.R. 1985. Assignment of agar or carrageenan structures to red algal polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 140 :336-341

Wolfson, M.L. and Thompson, A. 1963. *Methods Carbohydr. Chem.*, 2: 65-68

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

Yaphe, W. and Arsenault, G.P. 1965. Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and of 3,6 anhydrogalactose in polysaccharides. *Anal. Biochem.* 13: 143-148

Yarotsky, S.V., Shashkov A.S. and A.I. Usov. 1977. Analysis of ^{13}C NMR spectra of some red seaweed galactans. *Bioorgan. Khim.* 3: 1135-1137

Yarotsky, S.V., Shashkov A.S. and A.I. Usov. 1978. Polysaccharides of algae. XXXV. Application of ^{13}C NMR structural analysis of kappa carrageenan group polysaccharides. *Bioorgan. Khim.* 4: 745-751

Zablackis, E. and G.A. Santos. 1986. The carrageenan of Catenella nipae Zanard., a marine red alga.
Bot. Mar. 29: 319-322



ANNEXE

Seaweed cultivation for phycocolloid in the Mediterranean

J. Mollion

Institut International d'Enseignement et de Recherche des Colloïdes Naturels, Université de Marseille, F-13014 Marseille, France

Keywords: seaweed, *Hypnea*, *Chondrus*, cultivation, nitrogen assimilation

Introduction

Hypnea musciformis from Senegal and French Corsica, and *Chondrus crispus* from French Bretagne have been cultivated during two consecutive summers, 1981 and 1982. The plants were cultivated in tanks at the CNEXO research station in Ghisonaccia, on the east coast of Corsica. The main purpose of the experiment was to demonstrate that the climatic conditions in Corsica allow the cultivation of both temperate and tropical species. In a previous experiment (unpublished results), the cultivation of these two species had to be abandoned owing to contamination by epiphytes. It was supposed that large quantities of fertilizer, used at low seaweed density, were responsible for this.

In this experiment, fertilizers were added proportionally to the increase of the seaweed density in the culture tanks to prevent growth of epiphytes.

Material and methods

The culture tanks are described in Fig. 1. Agitation was achieved by blowing air into the tanks from 0800 to 2000 h. Seawater was provided on a continuous-flow basis. The flow rates, expressed as water exchanges per day, are shown in Figs. 2 and 3. The origin and dates of inoculation in the tanks of the cultivated seaweeds are shown in Table 1.

Fertilization. Seawater was enriched by the addition of nutrients as two separate solutions: a major elements solution, with NaNO_3 1300 mM, NH_4Cl 200 mM, NaH_2PO_4 75 mM; and a trace elements

solution, with FeEDTA 20.66 mM, H_3BO_4 24.46 mM, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6.13 mM, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.51 mM, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.07 mM, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mM, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mM.

According to Ryther (1980), the addition of FeEDTA to the nutrient solution is essential for good growth, if the flushing rate in the culture tank is low. The nitrate concentration obtained in the tanks is shown in Figs. 2 and 3.

Prevention of epiphyte growth. The amount of nutrient has been supplied proportionally to the seaweed density to avoid any excess in the tanks that would benefit the epiphytes (Hughenin 1976). To prevent infestation by *Enteromorpha* spp., the culture tanks were shaded with a fly screen, as long as the culture density was low. To control the growth of diatoms, the seaweeds were treated with GeO_2 at a concentration of $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ for 10 h (Lewin 1966).

Light conditions. Tanks were covered with a fly screen at low culture density (Figs. 2, 3). Sunlight intensity decreased during both summers from July to October, but the sky remained clear. Bad weather was encountered only from 30 September to 7 October 1982.

Results

Effect of nutrients. Figure 2 shows that the production of *C. crispus* in the 1981 experiment was increased by raising the NO_3^- concentration to $18 \mu\text{M}$ or greater, but no such trend was obvious with *H. musciformis*. On the other hand, in the 1982 exper-

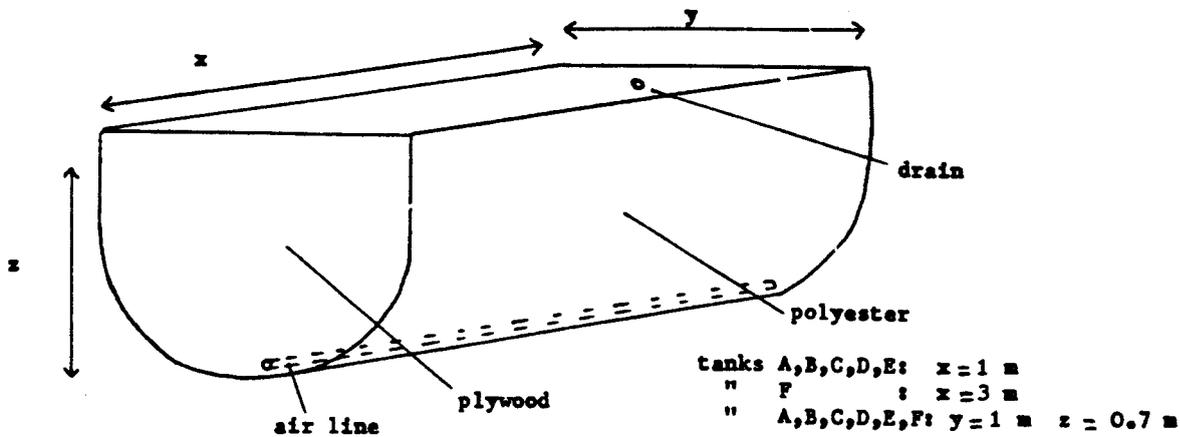


Fig. 1. Diagram of the culture tanks.

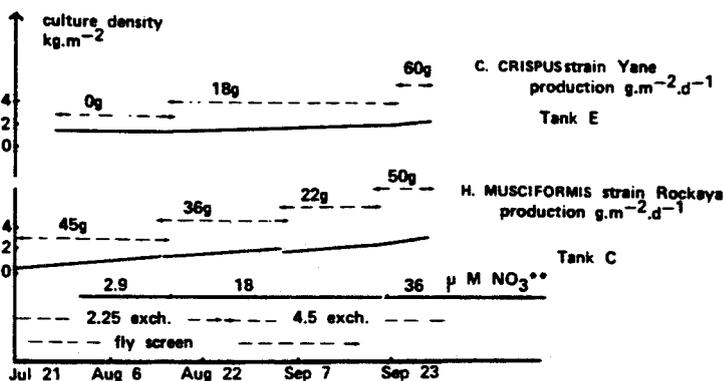


Fig. 2. Seaweed cultivation in 1981.

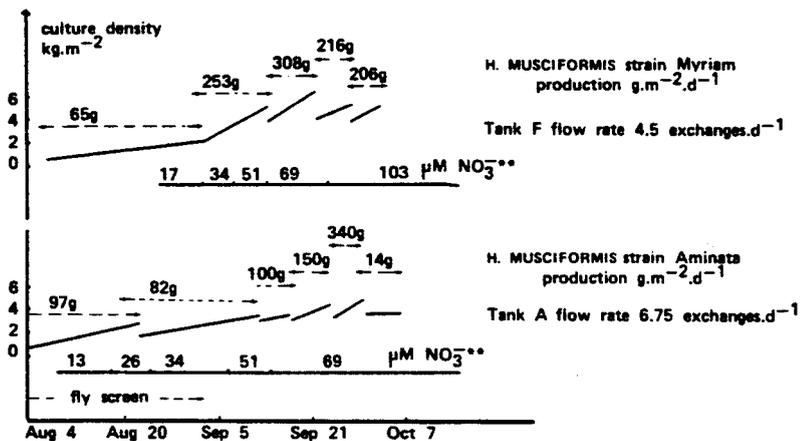


Fig. 3. Seaweed cultivation in 1982.

* Discontinuity of the growth curves reflects adjustment of culture density. Production is given in fresh weight.
 ** The pre-existing NO_3 concentration in seawater is considered to be zero.

Table 1. Origin and condition of inoculation of the cultivated seaweeds.

Species	Strain	Origin	Date	Conditions of inoculation		
				Tank	NO ₃ concentrations (μM)	Culture density (kg·m ⁻²)
<i>H. musciformis</i>	Rockaya	Senegal	17.vii.1981	C	0	0.2
	Rockaya	tank C	3.ix.1981	B transfer	5	0.2
	Irene	Ajaccio, Corsica	20.viii.1981	D	0	0.8
	Monique	Ajaccio, Corsica	29.vii.1981	D	2.9	0.65
	Isabelle	Sagone, Corsica	5.ix.1981	D	18	0.5
<i>C. crispus</i>	Yane	Bretagne	27.vii.1981	E	0	1.1
<i>H. musciformis</i>	Aminata	Senegal	28.vii.1982	A	0	0.6
	Myriam	Senegal	28.vii.1982	F	0	1

iment, an increase in the yield of *H. musciformis* was obtained when the NO₃ concentration was increased from 0 to 69 μM. At this highest NO₃ concentration, and with a culture density maintained between 3.1 and 4.9 kg·m⁻², a production of 340 g·m⁻², d⁻¹ (fresh weight), could be obtained in tank A.

Raising the NO₃ concentration to 103.8 μM, during the same experiment, was followed by a decrease in the yield, due to arrival of bad weather on 30 September 1982. Two attempts to cultivate *H. musciformis*, collected at the same location in Ajaccio, Corsica, failed. Strain Irene, receiving no nitrate, turned white after four days and died. Strain Monique, supplemented with nitrate, exhibited a darker color after four days, but became epiphytized after seven days, and died. The same plants left in their original habitat also turned white and died three weeks later.

Strain Isabelle, a *H. musciformis* from another location in Corsica, receiving relatively high nitrate concentration, grew rapidly for two weeks. It then became epiphytized and had to be discarded.

Control of epiphytes. The development of epiphytes was prevented by increasing the NO₃ concentration proportionally to the increase in the seaweed density in tanks A, C, E and F. *H. musciformis*, strain Rockaya, clean of epiphytes in tank C, was epiphytized by diatoms when transferred to tank B, at high NO₃ concentration. This diatom growth was stopped by treatment with GeO₂.

Factors influencing the development of epiphytes were studied in an experiment in which seawater was run at four exchanges per day in two tanks left without any cultivated seaweed. One of the tanks,

shaded with a fly screen, had its walls covered with diatoms after ten days. After the same period of time, the walls of the second tank, left unshaded, were covered with *Enteromorpha* spp. and very few diatoms.

Culture density. The highest culture density tested was 6.3 kg·m⁻², in tank F, and corresponded to the maximum yield. In all tanks the same proportionality between culture density and yield was found.

Flushing rate. The yields were almost the same in tank F, receiving 4.5 exchanges per day, and in tank A, receiving 6.75 exchanges per day.

Nitrogen uptake. A production rate of 308 g·m⁻²V d⁻¹ was obtained with *H. musciformis* in tank F. This is equivalent to an assimilation rate of 0.079 g-at N·d⁻¹, assuming that 3% of the dry weight of the plant is N, and that the dry weight/fresh weight ratio is 0.12. This N production was obtained with an input of 198.7 mmol NO₃⁻·d⁻¹, and 30.57 mmol NH₄⁺·d⁻¹ in the influent water. This is a total input of 0.229 g-at N·d⁻¹. The efficiency in the assimilation of nitrogen was 0.079/0.229 × 100 = 34.4%.

Table 2. Average temperature in the tanks.

Dates	1981	1982
15-31.vii.	23.0 °C	25.0 °C
1-14.viii.	24.1	24.7
15-31.viii.	23.0	24.7
1-14.ix.	22.9	23.0
14-30.ix.	22.7	23.0
1- 7.x.	-	21.2

Discussion

Climatic conditions of Corsica, during summer, allow the cultivation of a tropical species, *Hypnea musciformis*, and a temperate species, *Chondrus crispus*. Among the different strains of *H. musciformis* tested, only the plants coming from Senegal were successful. It seems that, in their original habitats, the strains from Corsica become unable to assimilate nitrogen, and die in the second half of the summer. These deficient plants showed a partial recovery, followed by infestation by epiphytes, when cultivated with addition of NO_3^- . The strains from Senegal, on the other hand, are found most of the year in their natural habitats, except for two short reproductive periods (Mollion, 1975).

The optimal parameters for best production of *H. musciformis* from Senegal are approximately $50\text{--}70\ \mu\text{M}\ \text{NO}_3^-$, and a culture density between 3 and $6.5\ \text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$. No direct measurement of nitrogen in the culture medium was made to evaluate the efficiency of the assimilation by the cultivated plants. An estimation of this efficiency has been obtained by comparing the seaweed production with the N load added to the culture medium. From this estimation of the efficiency, one can try to determine if the N load of the culture medium exceeds the assimilation ability of the plants. At $69\ \mu\text{M}\ \text{NO}_3^-$, *H. musciformis* showed an efficiency of 34.4% in the assimilation of the nitrogen added. Ryther *et al* (1982) have demonstrated that, in a closed culture system loaded initially at $2000\ \mu\text{M}\ \text{N}$, nutrient-starved *Gracilaria* assimilates 100% of nitrogen when it is supplied as NH_4^+ , and only 37% of this nitrogen supplied as NO_3^- . The 34.4% efficiency, obtained in our experiment, is rather high, considering that N was mostly NO_3^- , and that the water was continuously flushed. This indicates that more N could probably be assimilated if the influent seawater contained more NO_3^- .

The production performance of $340\ \text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ (fresh wt), obtained at the end of September with *H.*

musciformis, could be improved if a higher culture density had been available as early as July, when sunlight intensity was at a maximum. If a higher growth is expected in June-July, and no growth during the winter months, the production of $340\ \text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ could be an average over the year, equivalent to $1241\ \text{t}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{a}^{-1}$ fresh weight. *Chondrus crispus*, on the other hand, is better adapted to the winter light conditions. Only low NO_3^- concentrations were tested on this species. The results showed that *C. crispus* can survive the summer conditions.

From the performances achieved with *H. musciformis*, the prospect of growing this species on an industrial scale is not unrealistic. The ability of *H. musciformis* to survive the winter conditions in Corsica has first to be demonstrated.

Acknowledgment

This research was supported by the Iranex company, and by the CNEXO, who furnished us with facilities at its aquaculture station in Ghisonaccia. The technical assistance of Miss I. Richard was greatly appreciated.

References

- Hughenin, J. E., 1976. An examination of problems and potentials for future large scale intensive seaweeds culture systems. *Aquaculture* 9: 313-342.
- Lewin, J., 1966. Silicon metabolism in diatoms. V. Germanium dioxide, a specific inhibitor of diatom growth. *Phycologia* 6: 1-12.
- Mollion, J., 1975. Etude quantitative d'une formation végétale marine de l'infralittoral supérieur au Sénégal. *Bull. IFAN* 37A: 537-554.
- Ryther, J. H., 1980. Cultivation of macroscopic marine algae and freshwater aquatic weed. Prog. Rep. prepared for Solar Energy Res. Inst.
- Ryther, J. H., N. Corwin, T. A. De Busk & L. D. Williams. 1982. Nitrogen uptake and storage by the red alga *Gracilaria tikvahiae* (McLachlan, 1979). *Aquaculture* 26: 107-115.

SHORT COMMUNICATION

Isolation of a New Type of Carrageenan from
Rissoella verruculosa (Bert.) J. Ag. (Rhodophyta, Gigartinales)

J. Mollion*, S. Moreau** and D. Christiaen*

* *Université des Sciences et Techniques de Lille – Flandres Artois, Equipe Polysaccharides Pariétaux des Végétaux, U.E.R. de Biologie, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France*

and

** *I.N.S.E.R.M. unité 42, domaine du C.E.R.T.I.A. 59650 Villeneuve d'Ascq, France**Dedicated to the memory of Professor W. Yaphe*

(Accepted 7 July 1986)

Introduction

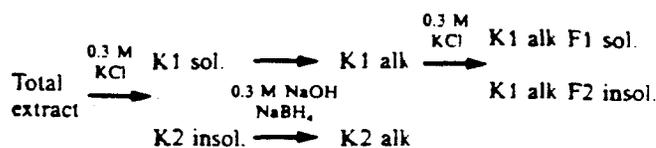
Rissoella verruculosa is a red alga that grows profusely in the Mediterranean, and was cultivated successfully in tanks on the island of Corsica (Mollion *et al.* 1985).

The alga has a cell wall with a high content of carrageenan, whose structure was described as kappa-like carrageenan (Combaut *et al.* 1985). ^{13}C NMR studies of the polysaccharide from samples collected in nature and in culture show a complex structure with kappa carrageenan as a minor component. We report the structure of carrageenan synthesized by *R. verruculosa* and the isolation, by KCl fractionation and alkali treatment, of a new type of carrageenan containing 3-O- β -D-galactose 6-sulphate linked to 4-O-3,6-anhydro- α -D-galactose.

Material and Methods

Samples R 38 and R 9 of *R. verruculosa* (Bert.) J. Ag. were collected on the coast of Corsica, France. A part of sample R 38 was cultivated in tanks at the France Aquaculture Marine Station, Ghisonaccia and collected after one month as sample R 42. The carrageenan was prepared by precipitation with cetyltrimethylammonium bromide (C.T.A.B.) as previously described (Mollion 1978) and fractionated by

a procedure based on gelation in 0.3 M KCl, separation of KCl soluble and insoluble fractions and treatment with alkali (Craigie and Leigh 1978). Alkali modification (Table I) of carrageenans converts 4-O- α -D-galactose 6-sulphate residues to 3,6 anhydro- α -D-galactose (3,6 AG). The formation of 3,6 AG increases the gelling properties of the molecule, and allows for separation of an additional KCl insoluble fraction as K1 alk F2 (Table I). Sulphate was determined by a turbidimetric method (Craigie and Leigh 1978), and anhydrogalactose with the resorcinol reagent (Yaphe and Arsenaault 1965).

Table I. Fractionation of *R. verruculosa* carrageenan.

Proton decoupled ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker AM 400 spectrometer at 100.62 MHz at 80°. The chemical shifts (ppm) were measured relative to internal dimethyl sulfoxide (39.6 ppm) and converted into values relative to external T.M.S. Distortionless enhancement by the polarization-transfer (DEPT) pulse technique was used (Doddrell *et al.* 1982).

Results and Discussion

Extraction and fractionation

The extraction yield and percentage of each fraction is shown in Table II. The 3,6 anhydrogalactose/SO₄ ratio of fraction K 2 alk, after alkali treatment of K 2, does not change, suggesting that fraction K 2 lacks precursors of 3,6 AG. Similar treatment of K 1 results in an increase in the ratio in fraction K 1 alk F 2. More research is necessary to confirm that this is due to 3,6 AG precursors.

Table II. Analysis of carrageenan fractions.

Fractions ^a	Samples		
	R 42 yield %	3,6 AG: SO ₄ ^b	R 38 R 9 yield %
total carrageenan	59.9		62.1 56.4
K 1 ^c	27.3	0.90	4.7 16.1
K 2 ^c	61.3	1.06	73.7 73.7
K 1 alk ^d	66.8	1.08	78.9 68.1
K 2 alk ^d	75.6	1.10	94.1
K 1 alk F 1 ^e	55.9	0.94	28.8
K 1 alk F 2 ^e	34.8	1.76	46.6

^a see Table I for description of fractions

^b molar ratio of 3,6 anhydrogalactose to total sulphate

^c KCl soluble and insoluble fraction: yield % of total extract

^d yield % recovered from alkali treated KCl soluble and insoluble fractions

^e yield of KCl soluble and insoluble fraction from alkali treated KCl soluble fraction of carrageenan

¹³C NMR analysis of carrageenan in different fractions

The ¹³C NMR spectrum of fraction R 42 K 1 alk F 1 (KCl soluble fraction) has 12 peaks (Fig. 2), suggesting that this fraction consists of disaccharide repeat units. The proposed structure (Fig. 1) of a neocarrabiose repeat unit containing 3-O-β-D-galactose 6-sulphate was deduced from the ¹³C NMR data. The ¹³C NMR chemical shifts of this structure (Table III) were very similar to the chemical shifts of beta carrageenan (Greer and Yaphe 1984) except for carbons C₆, C₅, C₄ of the galactose unit and for C₄ of the 3,6 AG unit.

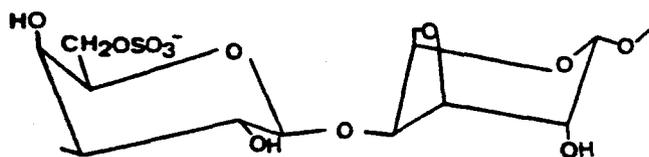
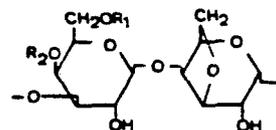


Fig. 1. Proposed structure of the repeat unit in carrageenan fraction R 42 K 1 alk F 1 from *R. verruculosa*.

Table III. ¹³C NMR chemical shifts for carrageenan fractions R 42 K 1 alk F 1 and R 42 K 2 from *R. verruculosa* and beta carrageenan, with the corresponding structures deduced from their assignments.

Carrageenan fractions	C1	C2	C3	C4	C5	C6
R 42 K 1 alk F 1 A	94.6	70.2	79.6	78.7	76.9	69.5
G	102.7	69.5	80.2	66.0	72.9	67.3
R 42 K 2 ^a A'	95.1	70.2	79.1	78.4	76.9	69.5
G'	102.7	69.8	78.7	74.0	74.8	61.3
beta ^b A"	94.6	70.3	79.4	78.0	76.9	69.5
G"	102.6	69.5	80.5	66.5	75.3	61.4



A - G' : R₁ = SO₃ R₂ = H
A' - G' : R₁ = H R₂ = SO₃
A'' - G'' : R₁ = H R₂ = H

^a this fraction also contains the shifts for A and G; chemical shifts for A' and G' are similar to those proposed for kappa carrageenan (Rochas *et al.* 1980).

^b beta carrageenan from *Eucheuma gelatinac* J. Ag. (Greer and Yaphe 1984).

^c The structure for AG and A'G' were also given for the polysaccharide from *Phyllophora nervosa* with ¹³C NMR chemical shifts similar to the values obtained for R 42 K 2 (Usov and Shashkov 1985).

The C₆ of the galactose unit exhibited a downfield shift of 5.9 ppm, indicating a C₆ sulphation on the galactose unit (Lahaye and Yaphe 1985). This substitution was confirmed by the upfield shift of Δδ = -2.4 ppm for C₅ and -0.5 ppm for C₄ of the galactose unit and by the downfield shift of +0.7 ppm for C₄ of the 3,6 AG unit. This proposed structure was further confirmed using a DEPT sequence allowing the determination of carbon bearing substitution. As expected the two C₆ carbons, bearing two protons, were detected as negative peaks in the DEPT spectrum. Thus the assignments of the two C₆ carbon atoms at 69.5 and 67.3 ppm are confirmed.

The spectrum of the KCl insoluble fraction of carrageenan fraction R 42 K 2 (Table I) contains 12 peaks assigned to the repeat unit in fraction R 42 K 1 alk F 1, and additional peaks with chemical shifts that have been attributed to kappa carrageenan (Rochas *et al.* 1980). A similar spectrum was reported (Yarotsky *et al.* 1978) for the carrageenan from *Phyllophora nervosa* (De Cand.) Grev. and described as hybrid carrageenan containing kappa repeat units and the disaccharide presented in Figure 1. Usov (Yarotsky *et al.* 1978) refers to this structure, confirmed by methylation studies (Usov and Arkhipova 1981), as an unusual representative of carrageenan of the kappa type.

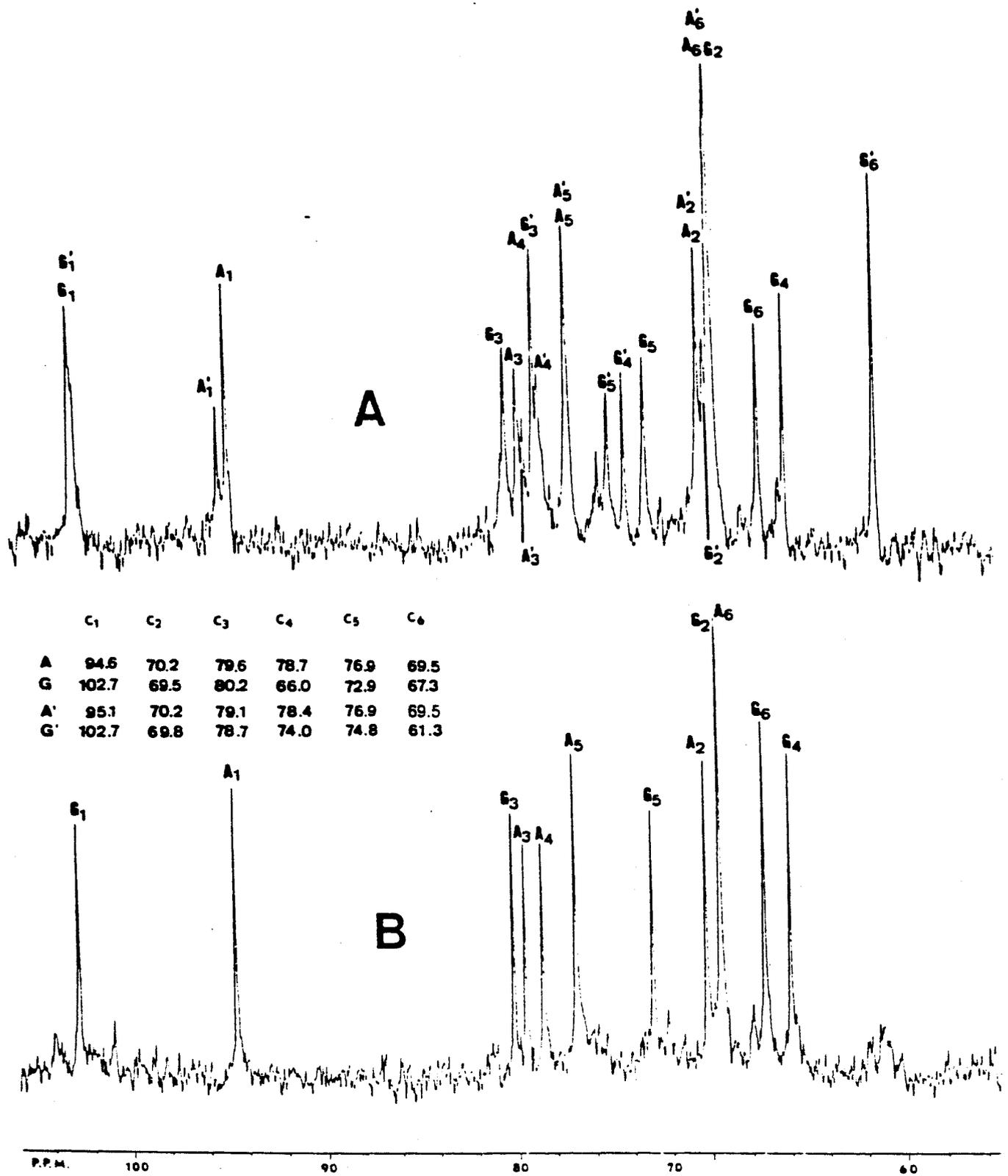


Fig. 2. ^{13}C NMR spectra of carrageenan from *R. verruculosa* (A) Fraction R 42 K 2 and (B) R 42 K 1 alk F1 (see Table I). G, A and G', A' respectively refer to galactose and 3,6 anhydrogalactose residues in disaccharide repeat unit of omega and kappa carrageenan (Table III).

We have isolated a carrageenan from *R. verruculosa* that lacks 3-O- β -D-galactose 4-sulphate and thus is not a member of the kappa group of carrageenans (McCandless and Craigie 1979). The carrageenan containing 3-O- β -D-galactose 6-sulphate (Fig. 1) re-

presents a new type of carrageenan and we suggest that it be called omega carrageenan. The ^{13}C NMR spectra of fraction R 42 K 2 alk, R 42 K 1 alk F2, R 38 K 2 and R 9 K 2 alk are identical to that obtained with R 42 K 2.

The carrageenan from *R. verruculosa* has an omega-kappa hybrid structure and not a kappa-beta (non sulphated neocarrabiose), as previously reported (Combault *et al.* 1985). Carrageenans with a mixed omega-kappa structure have a greater gelling capacity than polymers of omega carrageenan. The low gelling properties of the omega carrageenan accounts for its separation in the KCl soluble fraction K1 alk F1. The effect of 6-O-sulphation on the rheological properties of carrageenans remains to be investigated.

References

- Combault, G., L. Piovetto, G. Canal and A. Sancho. 1985. Polysaccharide of the red alga *Rissoella verruculosa*. *Phytochemistry* 24: 1597–1599.
- Craigie, J. S. and C. Leigh. 1978. Carrageenans and agars. In: (J. Hellebust and J. S. Craigie, eds) *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 109–131.
- Doddrell, D. M., D. T. Pegg and M. R. Bendall. 1982. Distortionless enhancement of NMR by the polarization transfert. *J. Magn. Resonance* 48: 109–131.
- Greer, C. W. and W. Yaphe. 1984. Characterization of hybrid (beta-kappa-gamma) carrageenan from *Euclima gelatinae* J. Agardh. (Rhodophyta, Solieriaceae) using carrageenases, infrared and ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Bot. Mar.* 27: 473–478.
- Lahaye, M., W. Yaphe and C. Rochas. 1985. ¹³C NMR spectral analysis of sulfated and desulfated polysaccharides of the agar type. *Carbohydr. Res.* 143: 240–245.
- McCandless, E. L. and J. S. Craigie. 1979. Sulfated polysaccharides in red and brown algae. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30: 41–53.
- Mollion, J. 1978. Seasonal variations in carrageenan from *Hypnea musciformis* (Florideophyceae) in Senegal. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 9: 233–240.
- Mollion, J., D. Christiaen and I. Richard. 1985. Screening red algae for phycocolloids. Abstracts of 2nd Int. Phycol. Congress, Copenhagen.
- Rochas, C., M. Rinaudo and M. Vincendon. 1980. Structural and conformational investigation of carrageenans. *Biopolymers* 19: 2165–2175.
- Usov, A. I. and V. S. Arkhipova. 1981. Polysaccharides of algae. XXX. Methylation of polysaccharides of the kappa carrageenan type from the red algae *Tichocarpus crinitus* (Gmel.) Rupr., *Furcellaria fastigiata* (Huds.) Lam. and *Phyllophora nervosa* (De Cand.) Grev. *Bioorgan. Khim.* 7: 385–390 (in Russian).
- Usov, A. I. and A. S. Shashkov. 1985. Polysaccharides of algae. XXXIV. Detection of iota carrageenan in *Phyllophora brodiaei* (Turn.) J. Ag. (Rhodophyta) using ¹³C NMR spectroscopy. *Bot. Mar.* 28: 367–373.
- Yaphe, W. and G. P. Arsenault. 1965. Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and of 3,6 anhydrogalactose in polysaccharides. *Anal. Biochem.* 13: 143–148.
- Yarotsky, S. V., A. S. Shashkov and A. I. Usov. 1978. Polysaccharides of algae. XXV. Application of ¹³C NMR spectroscopy for structural analysis of kappa carrageenan group polysaccharides. *Bioorgan. Khim.* 4: 745–751 (in Russian).

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr J. Craigie (N. R. C., Halifax, Canada) for his advice concerning extraction and fractionation procedure and Dr W. Yaphe (McGill University, Montreal, Canada) for his remarks on this manuscript. We express our gratitude to I. Richard (I. F. R. E. M. E. R., Paris, France) for experimental assistance in cultivation of seaweeds.

¹³C NMR study of the heterogeneity of the carrageenan from *Rissoella verruculosa* (Bert.) J.Ag. (Rhodophyta)

Jean Mollion, Yanis Karamanos, Rafic Feghali and Serge Moreau¹

Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, Equipe Polysaccharides Pariétaux des Végétaux, UFR de Biologie, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, ¹INSERM, Unité 42, Domaine du CERTIA, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

Abstract. The co-existence of ω - and κ -type polymers in the carrageenan system of *Rissoella verruculosa* led us to investigate the possible precursors for these structures. No highly sulphated carrageenan similar to what has been reported as precursor of most carrageenan was found. Isolation of a third component, β -carrageenan, is reported. Fractionation by DEAE chromatography shows that this latter polymer always co-exists with ω but is never found in the fractions containing κ . The significance of this co-existence, as a preliminary approach to establish biosynthetic relationships between these different carrageenans, is discussed.

Introduction

Carrageenans are a spectrum of polysaccharides with a common backbone of alternating α (1-3)-, β (1-4)-linked D-galactose residues. The repeat units are often substituted with ester sulphate groups and the 3,6-anhydrogalactose form of the 4-linked α -D-galactopyranosyl residue. In a previous study we reported the structure of a new type of carrageenan from the red seaweed *Rissoella verruculosa* (1). The name ω -carrageenan was given to this polymer, which is found with another carrageenan, designated as κ (2), as the main water-soluble molecules extracted from *R. verruculosa* (1).

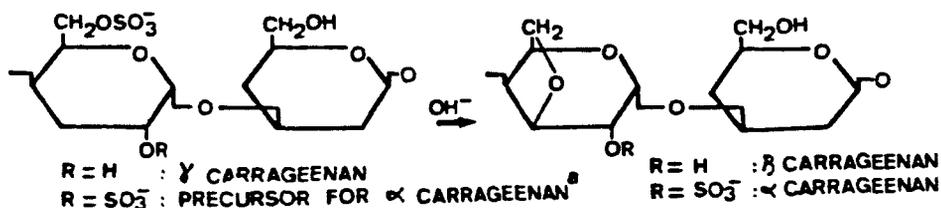
Classification on the basis of the sulphation pattern of the 3-linked β -D-galactopyranosyl residue (3-5) indicates that this carrageenan constitutes a new family, defined here as the ω family (Figure 1).

ω -Carrageenan could be isolated by KCl fractionation and alkali treatment as a soluble polymer and separated from an insoluble κ - ω mixed structure. Gravimetric measurement of the isolated ω and the comparison of the intensity of peaks for each type of polymer in the ¹³C NMR spectrum from the mixed structure show that ω -carrageenan is predominant over κ . The purpose of this study was to look for precursors for both ω and κ structures in the carrageenan extracted from *R. verruculosa*. It is generally agreed that, in the formation of most carrageenans, the 3,6-anhydrogalactose unit derives from a 6-sulphated galactose precursor, as described in Figure 1. Such a precursor for κ from other red algae was shown to be μ -carrageenan, a highly sulphated, cold extractable polymer (6).

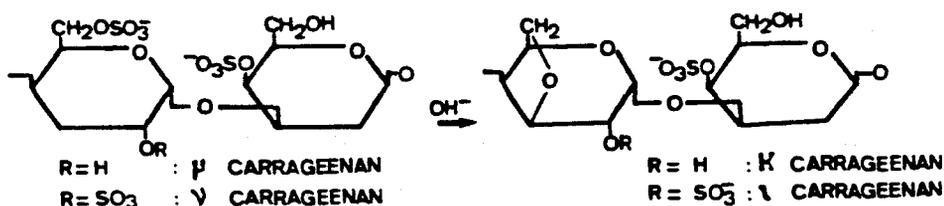
Different methods were used to obtain polymer enriched in 6-sulphated galactose precursor units.

One of the enrichment procedures is based on the increase in the solubility of the polymer when the 3,6-anhydrogalactose unit is replaced by a 6-sulphated galactose. This property allows carrageenan to be obtained bearing 4-linked, 6-sulphated galac-

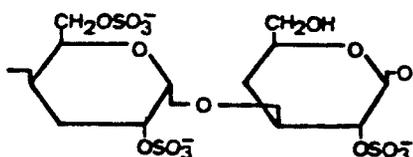
BETA FAMILY



KAPPA FAMILY

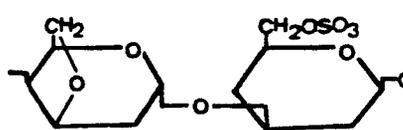


LAMBDA FAMILY



λ CARRAGEENAN

OMEGA FAMILY



ω CARRAGEENAN

^a THIS CARRAGEENAN WAS DESIGNATED AS DELTA CARRAGEENAN (11). THIS NAME WAS ALSO GIVEN TO A STRUCTURE REFERED AS "DEVIANT IOTA" (12)

Fig. 1. Repeating disaccharide structures of carrageenan and the desulphation of the 6-sulphated galactose units into 3,6-anhydrogalactose.

tose by a pre-extraction process at 20°C, the rest of the carrageenan bearing 3,6-anhydrogalactose and remaining insoluble.

Another enrichment procedure is based on the lower gel strength obtained in the presence of K^+ , when the 3,6-anhydrogalactose is replaced by a 6-sulphated galactose unit. This allows fractionation of the carrageenan into a KCl-soluble fraction, enriched in 6-sulphated galactose precursor and a KCl-insoluble fraction. We could not find any carrageenan bearing this type of precursor structure after enrichment by these two procedures.

Another technique to isolate the most charged polymer is of fractionation on DEAE Sephadex. No carrageenan bearing 4-linked, 6-sulphated galactose could be found.

We report the results from the separation and the isolation by this technique of the β structure, a third component in the carrageenan system from *R. verruculosa*.

Materials and methods

Extraction

Sample R42 of *R. verruculosa* (Bert.) J. Ag. was obtained from a tank cultivation experiment as previously described (1). The carrageenan was prepared by precipitation with cetyltrimethylammonium bromide (7), and fractionated by a procedure based on gelation in 0.3 mol/dm³ KCl.

KCl fractionation

Fractionation of sample R42 by 0.3 mol/dm³ KCl allows separation of a soluble fraction, referred to as R42 K1, from an insoluble R42 K2 fraction.

DEAE Sephadex A-25 fractionation

DEAE Sephadex was prepared in the chloride form by washing with 0.5 mol/dm³ HCl, 0.5 mol/dm³ NaOH and 0.5 mol/dm³ HCl. The gel was then rinsed extensively with distilled water.

A solution of carrageenan (130 mg) in distilled water (30 ml) was added to 50 ml of Sephadex gel in a sintered glass funnel. The following concentrations of sodium chloride were used sequentially to elute the polysaccharide fractions: 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 mol/dm³. The temperature of the eluent was maintained at 50°C. Appropriate fractions were combined, dialysed and freeze dried.

Hydrolysis of carrageenan by α -carrageenase

Carrageenan (0.25% w/v) was dissolved in 0.05 mol/dm³ sodium phosphate buffer, pH 7.5, and hydrolysed for 24 h at 30°C with an excess of α -carrageenase obtained from the bacterium *Pseudomonas carrageenovora* provided by Dr Yaphe. The α -carrageenan degradation was evaluated by migration of sugars using TLC.

¹³C NMR spectroscopy

Proton-decoupled ¹³C NMR spectra (110.62 MHz) were recorded on a Bruker AM 400 spectrometer at 80°C, using a 5-mm dual probe. The chemical shifts (p.p.m.) were measured relative to internal dimethyl sulfoxide (39.6 p.p.m.) and converted into values relative to external TMS.

Analytical measurements

Total carbohydrate was measured by the phenol-sulphuric acid method, using galactose as a standard (8).

Sulphate was determined by a turbidimetric method (9).

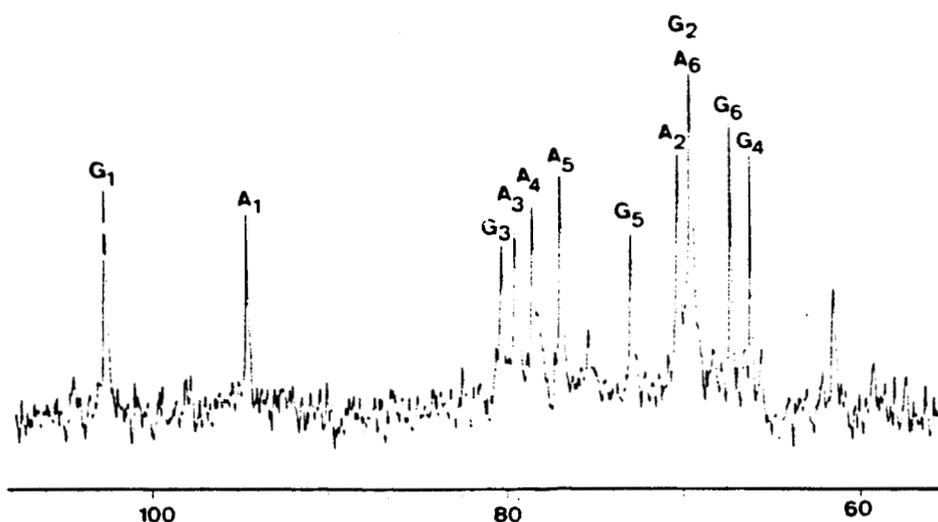


Fig. 2. ^{13}C NMR spectrum of the polymer obtained by cold extraction of *R. verruculosa*. G and A refer respectively to the galactose and 3,6-anhydrogalactose units.

Results

Analysis of the polymer obtained by cold extraction

CTAB precipitation of the cold extract from sample R44 yielded a polymer representing 18% of the dry weight of the plant before extraction.

The ^{13}C NMR spectrum from this polymer (Figure 2) shows that it contains mostly ω -carrageenan, with traces of β . The absence of α structure as inferred from the NMR analysis was confirmed by the failure to undergo hydrolysis following addition of α -carrageenase. The presence of carrageenan bearing 4-linked, 6-sulphated galactose residues would result in a chemical shift in the 103–105 p.p.m. range in the NMR spectrum for the C-1 of the 4-linked α -D-galactopyranosyl residue (5,10).

Such a chemical shift is totally absent from the spectrum of the cold-extractable polymer.

KCl fractionation of total carrageenan

The 0.3 mol/dm^3 KCl-soluble R42 K1 fraction and the 0.3 mol/dm^3 KCl-insoluble R42 K2 respectively represent 27.3% and 61.3% of the total carrageenan. The ^{13}C NMR spectra of the polymers from these fractions are shown in Figure 3. The latter spectrum is interpreted as resulting from a mixture of predominantly ω -carrageenan with a lesser amount of α , whereas the spectrum of R42 K1 consists almost entirely of ω with traces of α .

As no chemical shift was found in the 103–105 p.p.m. range, we can assume that no 4-linked, 6-sulphated galactose unit is present in the fractions, at least at the level of detection permitted by the NMR technique.

DEAE fractionation of total carrageenan

No polysaccharidic fractions were obtained on elution by H_2O or with ionic strengths

Heterogeneity of carrageenan

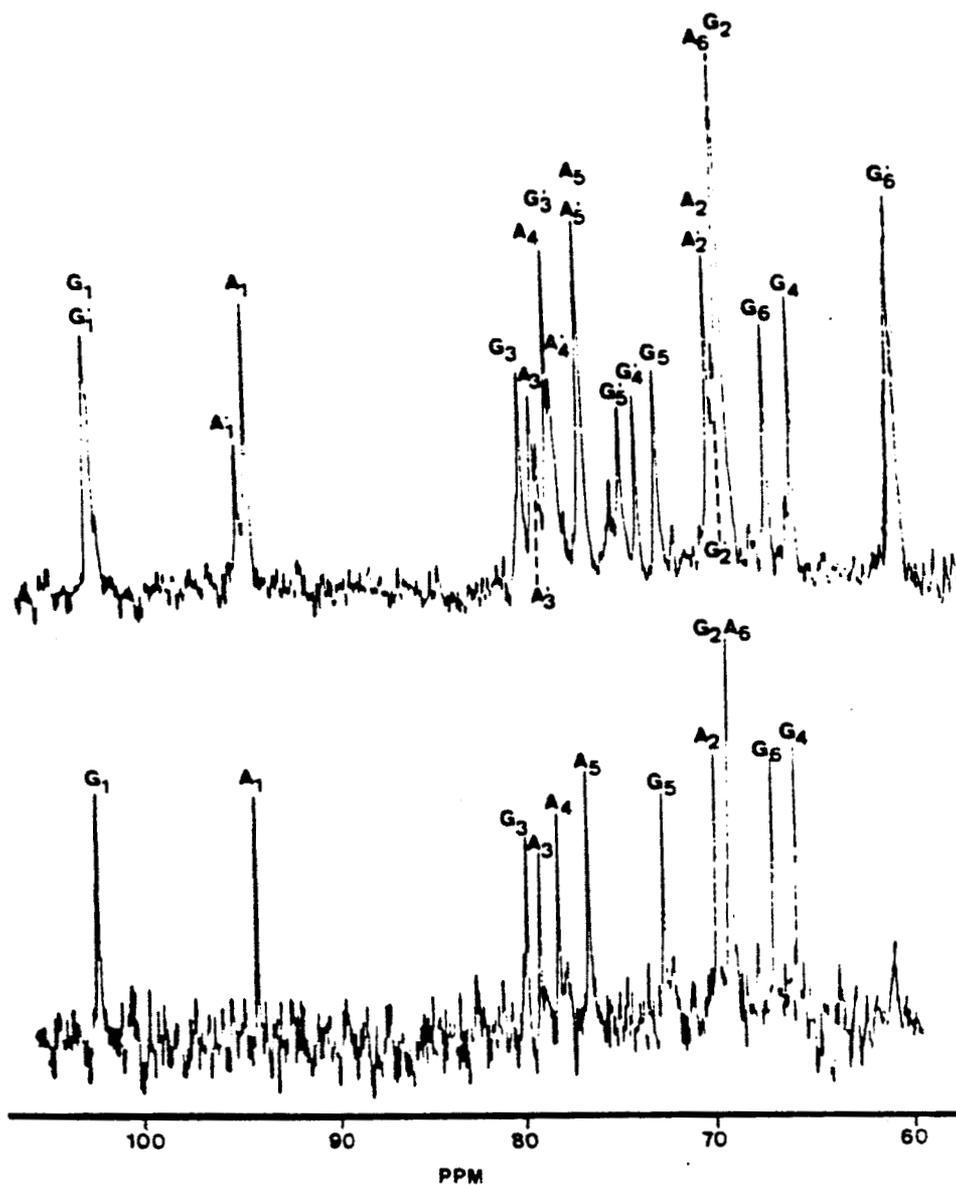


Fig. 3. ^{13}C NMR spectra of fractions R42 K1 and R42 K2 from the carrageenan of *R. verruculosa*. G, A and G', A' respectively refer to the galactose and 3,6-anhydrogalactose residues in the disaccharide repeat unit of ω - and α -carrageenan

below 0.2 mol/dm^3 NaCl. The quantities of eluted polysaccharides obtained sequentially in the 0.5 mol/dm^3 , 1 mol/dm^3 , 2 mol/dm^3 and 3 mol/dm^3 NaCl fractions are shown in Table I. Boiling the DEAE gel for 3 min was necessary to remove polysaccharidic material at an ionic strength above 2 mol/dm^3 NaCl. In a parallel experiment, verification was made that the DEAE A 25 gel did not yield any polysaccharide when eluted under the same conditions. Insolubilization of the carrageenan at this ionic strength may be the reason for its retention on the column at 40°C .

Table I. Amount of material obtained at different ionic strengths by DEAE fractionation of the carrageenan sample R42 from *R. verruculosa*

Fraction (mol/dm ³)	Percentage of total carrageenan
0.5	6.5
1	16.5
2	14.5
3	48.0
	85.5 Percentage yield

The ¹³C NMR spectra for the different fractions are shown in Figure 4 and their SO₄ values in Table II.

The spectra of the 0.5 and 1 mol/dm³ NaCl fractions contain 12 peaks assigned to the repeat unit of ω-carrageenan (1) and additional peaks with chemical shifts that have been assigned to β-carrageenan (4).

Quantitative estimation of the size of different peaks relative to both structures shows that β-carrageenan prevails over ω in the 0.5 mol/dm³ fraction, whereas an inverse ratio is observed in the 1 mol/dm³ fraction.

NMR studies of the 2 and 3 mol/dm³ fractions show that the former contains pure ω-carrageenan, with chemical shifts as shown in Table III, and the latter both ω and α structures. Detection of α-carrageenanase confirms the presence of this polymer in the 3 mol/dm³ fraction. Traces of oligosaccharides were detected in the 2 mol/dm³ fraction after hydrolysis with α-carrageenanase. It shows that α-carrageenan might be present in the 2 mol/dm³ fraction, although in quantities too small to be detected by NMR spectroscopy.

SO₄ content increases with ionic strength in the 0.5 to 2 mol/dm³ fractions and then decreases in the 3 mol/dm³ fraction.

Discussion

No highly sulphated carrageenans, similar to those described as precursor for major carrageenans, could be isolated by the different fractionation procedures used in this study.

Cold extraction yielded a polymer containing mostly ω structures, with traces of β. The absence of α-carrageenan in the cold extract indicates a lower solubility of this polymer, as compared with ω, or an absence of low mol. wt representatives of this type of carrageenan in *R. verruculosa*.

DEAE fractionation allows isolation of β-carrageenan, a third representative of this type of molecule, in addition to ω and α previously described in the extract from *R. verruculosa*.

Whether this β structure could be a precursor for both ω and α structures should be considered.

The presence of hybrid γ-, β- and α-carrageenan in *Eucheuma gelatiniae* was demonstrated by Yaphe who suggested that β could be the precursor for α (4).

This biosynthetic pathway in which sulphated carrageenans derive from the non-sulphated β-carrageenan is quite opposite to the desulphation concept generally argued for biosynthesis of carrageenan (Figure 1).

Heterogeneity of carrageenan

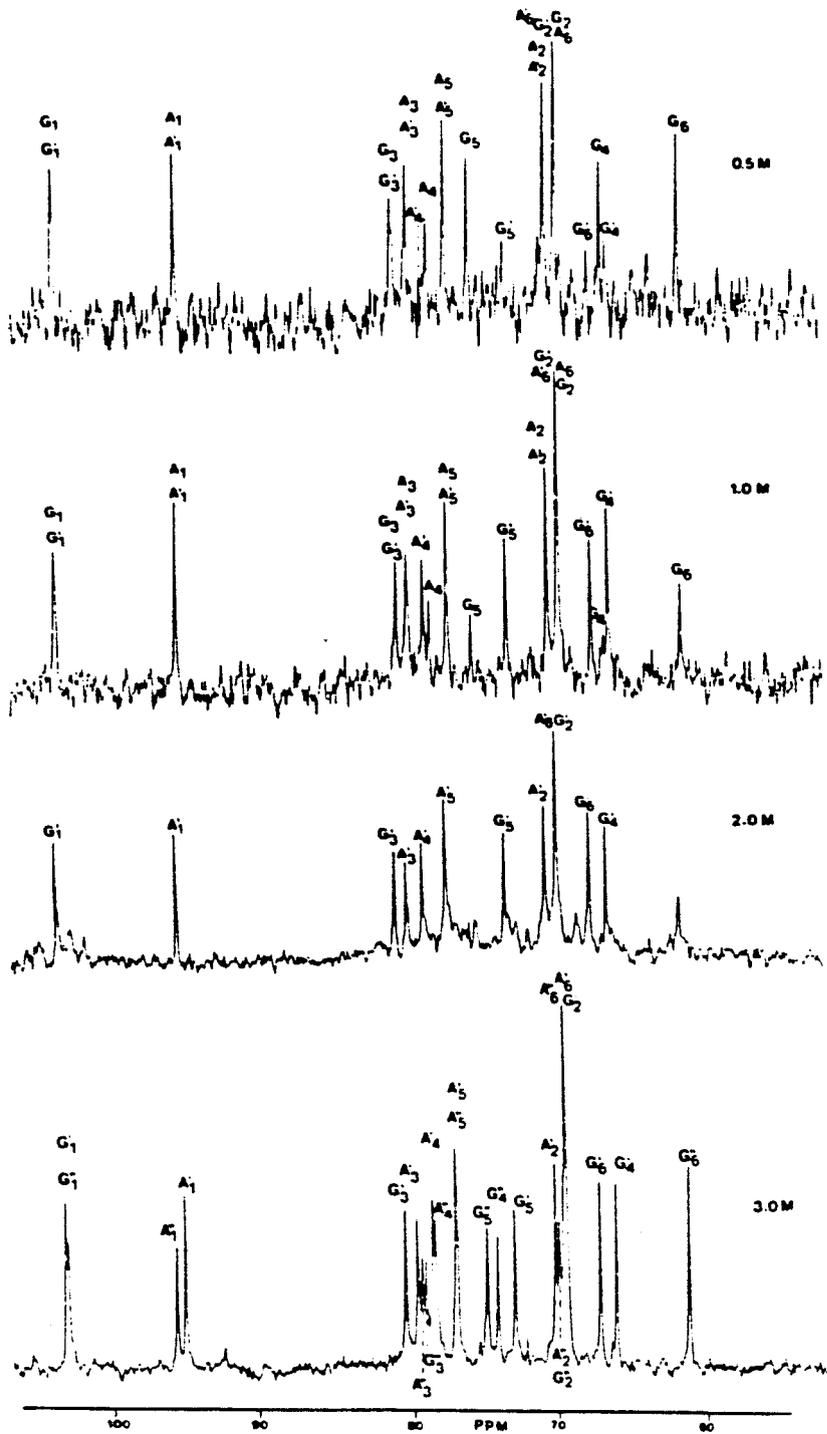


Fig. 4. ^{13}C NMR spectra of fractions obtained at different ionic strengths by DEAE fractionation of carrageenan sample R42 from *R. verruculosa*. The following symbols refer respectively to the galactose and 3,6-anhydrogalactose repeat units of β - (A,G), ω - (A',G') and α - (A'',G'') carrageenan.

Table II. SO₄ content of different DEAE fractions from carrageenan sample R42

Fraction (mol/dm ³)	SO ₄ ^a (%)
0.5	15.0
1	17.0
2	28.1
3	17.9

^aPercentage relative to total carbohydrate in the fraction.

Table III. ¹³C NMR chemical shifts for the polymer obtained in DEAE 2 mol/dm³ fraction from carrageenan sample R42

Unit	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
A ^a	94.6	70.2	79.6	78.7	76.9	69.5
G ^a	102.7	69.5	80.2	66.0	72.9	67.3

^aA and G refer respectively to galactose and 3,6-anhydrogalactose repeat units, as described in ω -carrageenan (1).

One approach to the biosynthesis of these polymers is the observation that a carrageenan structure is often bound to its precursor within the same molecule. Blocks of repetitive carrageenan structures alternate with precursor units, forming long chains of what was referred to as hybrid carrageenan by Yaphe (4). This implies that both structures cannot be separated by any fractionation procedure unless hydrolysis occurs.

We were unable to separate β - from ω -carrageenan by DEAE fractionation. No β could be found in the fraction eluted by solutions with ionic strength lower than 0.5 mol/dm³ NaCl.

One can therefore assume that this neutral polymer is bound to the charged ω -carrageenan either by covalent linkage or through electrostatic association. The results obtained in this study concerning the relationship between the two polymers reinforce the probability of β - and ω -carrageenan being part of the same biosynthetic filiation.

The SO₄ content of the DEAE fractions increases with ionic strength of elution between 0.5 and 2 mol/dm³ NaCl, and reflects the decrease in β content. The sulphation level in the 3 mol/dm³ fraction, containing α - and ω -carrageenan, is lower than in the 2 mol/dm³ fraction, containing almost exclusively ω . These structures contain only one SO₄ group per disaccharide unit. This would give a 25% theoretical value for SO₄ content in α - or ω -carrageenan. Desulphation of the polymer in the 3 mol/dm³ fraction cannot be detected by NMR studies and cannot play a significant role in explaining the low SO₄ values observed. No explanation can be given from this study to account for the high SO₄ value in the 3 mol/dm³ fractions.

α -Carrageenan does not co-exist with β in the fractions obtained from DEAE. The possibility that α derives from β is therefore very unlikely. The quantity of the polymer precursor to α may be very small which explains why they could not be seen on the NMR spectra.

More fractionations should be carried out until potential precursors for α can be isolated in sufficient quantity to permit NMR identification.



Heterogeneity of carrageenan

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr W. Yaphe for providing the bacterium *Pseudomonas carrageenovora*. We thank H. Morvan for helpful discussions and P. Lesecq for technical assistance.

References

1. Mollion, J., Moreau, S. and Christiaen, D. (1986) *Bot. Mar.*, **29**, 549-552.
2. Combaut, G., Piovetto, L., Canal, C. and Sancho, A. (1985) *Phytochemistry*, **24**, 1597-1599.
3. Percival, E. (1978) In Schweiger, R.G. (ed.), *Carbohydrate Sulfates*. American Chemical Society, Washington, DC, pp 213-224.
4. McCandless, E.L. and Craigie, J.S. (1979) *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, **30**, 41-53.
5. Greer, C.W. and Yaphe, W. (1984) *Bot. Mar.*, **28**, 473-478.
6. Bellion, C., Brigand, G., Prome, J.C., Welti, D. and Bociek, S. (1983) *Carbohydr. Res.*, **119**, 31-48.
7. Mollion, J. (1978) *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **9**, 233-240.
8. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
9. Craigie, J.S. and Leigh, C. (1978) In Hellebust, J. and Craigie, J.S. (eds), *Handbook of Physiological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 109-131.
10. Bellion, C., Hammer, G.K. and Yaphe, W. (1981) *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **10**, 379-384.
11. Zablackis, E. and Santos, G.A. (1986) *Bot. Mar.*, **29**, 319-322.
12. Dawes, C.J., Stanley, N.F. and Stancioff, D.J. (1977) *Bot. Mar.*, **20**, 137-147.