

UTILISATION D'ENZYMES POUR LA CARACTERISATION  
DES CARRAGHENANES KAPPA ET IOTA

par

Christine Bellion

Thèse présentée à la Faculté des Etudes Supérieures  
en vue de l'obtention du  
Philosophiae Doctore (Microbiologie)

Département de Microbiologie et d'Immunologie  
Université McGill  
Montréal - Canada

Août 1979



CARRAGHENASES KAPPA ET IOTA

TITRE DE LA THESE: Utilisation d'enzymes pour la caractérisation des carraghénanes kappa et iota.

NOM DE L'AUTEUR : Christine BELLION.

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE ET IMMUNOLOGIE.

GRADE POSTULE : Ph.D.

### RESUME

Huit cultures bactériennes d'origine océanique ayant la propriété d'hydrolyser l'extrait polyosidique de l'algue rouge Eucheuma spinosum (carraghénane iota) ont été isolées. Il s'est avéré qu'une seule de ces souches (culture #1) synthétise une enzyme montrant une spécificité marquée pour le carraghénane iota, la carraghénase iota. Les autres souches ont une faible activité de carraghénase iota et dégradent préférentiellement le carraghénane kappa présent dans le polyside d'E. spinosum, prouvant le caractère hybride de l'extrait polyosidique.

La carraghénase iota (souche #1) et la carraghénase kappa synthétisée par Pseudomonas carrageenovora ont été utilisées pour étudier les caractères hybrides de plusieurs extraits d'algues rouges. La distribution des masses molaires des hydrolysats a été déterminée sur colonne de gel SEPHAROSE CL-4B. La présence de carraghénanes kappa et (ou) iota a été détectée par spectroscopie de R.M.N. du  $^{13}\text{C}$  dans les fractions dégradées et résistantes des hydrolysats, permettant de mettre en évidence un spectre d'hybrides kappa/iota partant d'Eucheuma cottonii (kappa dominant) allant jusqu'à Eucheuma spinosum (iota dominant), en passant par Ahnfeltia concinna et Ahnfeltiopsis gigartinoïdes qui contiennent des pourcentages de kappa et iota pratiquement égaux. La méthode de spectroscopie de R.M.N. du  $^{13}\text{C}$  a également été utilisée pour caractériser les di et tétraholosides purifiés de carraghénanes iota et kappa.

## ABSTRACT

Eight strains of marine bacteria, which degraded the polysaccharide extracted from the red algae, Eucheuma spinosum (iota carrageenan) were isolated. An enzyme preparation with specific iota carrageenase activity was obtained only from strain #1. Enzyme preparations from the other strains contained mainly kappa carrageenases with a trace of iota carrageenase activity. The kappa carrageenases degraded kappa units in the polysaccharide, showing that it was a hybrid iota/kappa polymer.

Iota and kappa carrageenases prepared from strain #1 and Pseudomonas carrageenovora respectively, were used to hydrolyse kappa and iota hybrid carrageenans obtained from several species of red algae. The enzymic hydrolysates were fractionated by molecular weight, on a column of Sepharose CL-4B. The presence of kappa and/or iota carrageenans in enzyme resistant fractions and in low molecular weight components was determined by  $^{13}\text{C}$  N.M.R. spectroscopy. All the carrageenans were hybrids, with Eucheuma cottonii containing mainly kappa, Ahnfeltia concinna and Ahnfeltiopsis gigartinoides a mixture of kappa and iota, and Eucheuma spinosum predominantly iota carrageenan.  $^{13}\text{C}$  N.M.R. spectra of pure di and tetrasaccharides from iota and kappa carrageenans are presented.

## REMERCIEMENTS

Ce paragraphe a toujours une petite note officielle que j'aimerais ne pas supprimer, mais à laquelle je voudrais ajouter une teinte de simplicité. La plupart des gens que je remercie sont devenus mes amis, et quels que soient les mots que j'utilise, ils n'exprimeront jamais ce que je ressens.

Je remercie beaucoup le Dr Yaphe de m'avoir reçue dans son laboratoire, de m'avoir guidée et supportée pendant trois ans...

Je remercie le Dr Hamer, qui, malgré son travail personnel, a pris le temps d'analyser et d'interpréter les spectres de R.M.N. des oligosides synthétisés par "mes" enzymes, le Dr Bhattacharjee qui m'a aidée par ses conseils et dont les travaux précédents en R.M.N. m'ont été très utiles.

Je remercie spécialement le Dr Gill, ancien directeur intérimaire du département de Microbiologie de Mc Gill, pour m'avoir donné la possibilité de côtoyer et d'apprécier la "Science internationale", le Dr Devoe, actuel directeur, pour m'avoir permis de terminer ma thèse dans son département.

Je remercie Margaret Gomersall pour son aide morale et technique, Hélène Champagne pour m'avoir aidée à terminer mes expériences, le Dr Mc Candless (Université de Mc Master, Ontario) et le Dr Santos (Université d'Hawaï) pour les échantillons qu'elles m'ont procurés.

Enfin, merci à toute l'équipe de squash du département qui m'a donné la possibilité de dépenser mon trop plein d'énergie sur les courts de l'université.

TABLE DES MATIERES

	Page
REMERCIEMENTS .....	i
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
LISTE DES FIGURES .....	x
A/ - INTRODUCTION .....	1
B/ - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	2
I: LES CARRAGHENANES .....	2
I-1 Introduction .....	2
I-2 Structure des carraghénanes .....	3
a. Carraghénanes kappa ( $\kappa$ ) et mu ( $\mu$ ), furcella- rane .....	3
b. Carraghénanes iota ( $\iota$ ) et nu ( $\nu$ ) .....	5
c. Hybrides kappa et iota, carraghénane "deviant- iota" ( $\delta$ ) .....	7
d. Carraghénane lambda ( $\lambda$ ) et carraghénane ksi ( $\xi$ ) .....	9
I-3 Influence de la structure des carraghénanes et de leur conformation moléculaire sur leurs proprié- tés physiques .....	11
a. Solubilité .....	11
b. La double hélice et le réseau tridimensionnel	12
c. Influence de l'irrégularité de la séquence des résidus dans une chaîne polyosidique, sur le réseau tridimensionnel .....	13
d. Action des cations sur le gel .....	14
e. Influence des groupements sulfates sur la texture du gel .....	14
I-4 Les carraghénanes dans l'algue .....	16
a. Localisation .....	16
b. Influence du cycle biologique sur la produc- tion de carraghénane .....	16
c. Le rôle des polyosides dans l'algue .....	17

	Page
II: LES ENZYMES .....	19
II-1 Utilité des enzymes dans la détermination des structures .....	19
II-2 Utilisation des enzymes dans la détermination des structures .....	19
III: ANALYSE DES POLYOSIDES D'ALGUES ROUGES EN SPECTROSCOPIE R.M.N. (RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE) AU CARBONE 13 .....	25
IV: TAXONOMIE DES BACTERIES D'ORIGINE OCEANIQUE .....	27
V: UN NOUVEAU CRITERE DE CLASSIFICATION DES ALGUES ROUGES	29
C/ - MATERIEL ET METHODES .....	31
I: LES CULTURES BACTERIENNES .....	31
I-1 Origine .....	31
I-2 Isolement .....	31
I-3 Conservation .....	32
I-4 Culture en milieu liquide .....	32
a. Conditions .....	32
b. Mesure de production de biomasse et mesure de pH .....	32
b.1 Mesure de biomasse par densité optique .	32
b.2 Mesure de biomasse par la technique des poids secs .....	33
b.3 Mesure de pH en cours de croissance ....	33
II: VERIFICATION DE L'ACTIVITE DES PREPARATIONS D'ENZYMES	34
II-1 Enzymes extracellulaires présentes dans le milieu de culture .....	34
II-2 Enzymes intracellulaires .....	34
a. Traitement aux ultra-sons .....	35
b. Traitement au Triton X-100 et au chlorure de lithium .....	35
III: PREPARATION D'ENZYME EXTRACELLULAIRE - CONCENTRATION PAR PRECIPITATION AU SULFATE D'AMMONIUM .....	36
IV: PREPARATION DES OLIGOSIDES DE CARRAGHENANES .....	37
IV-1 Hydrolyse enzymatique et précipitation à l'éthanol .....	37
IV-2 Séparation des oligosides sur gel Sephadex .....	37

	Page
V: CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE .....	38
VI: ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES POIDS MOLECULAIRES D'E- CHANTILLONS DE CARRAGHENANES AVANT ET APRES TRAITEMENT ENZYMATIQUE .....	39
VI-1 Préparation des hydrolysats .....	39
VI-2 Chromatographie sur gel Sepharose CL-4B .....	39
VII: DOSAGES .....	41
VII-1 Carbohydrates - Méthode au phéno1 sulfurique (Dubois et coll. - 1956) .....	41
VII-2 Dosage de l'activité enzymatique par la méthode viscosimétrique .....	41
a. Principe .....	41
b. Matériel .....	42
c. Méthode .....	42
d. Définition d'une unité enzymatique .....	43
e. Exploitation de la courbe $t = \frac{\eta_{rel}}{K} = f(t)$ .....	44
VIII: SPECTROSCOPIE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (R.M.N.) AU CARBONE 13 .....	45
D/ - RESULTATS .....	46
I: DESCRIPTION DES CULTURES SUR MILIEU SOLIDE H <sub>1</sub> .....	46
I-1 Sur agar .....	46
I-2 Sur carraghénane kappa .....	46
I-3 Sur carraghénane iota .....	46
a. Cultures #1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 .....	46
b. Culture #7 .....	47
c. Culture #9 .....	47
II: DESCRIPTION DES CULTURES SUR MILIEU LIQUIDE .....	50
II-1 Culture #1: croissance et production d'enzyme, paramètres influençant la production d'enzyme ..	50
a. Production d'enzyme en fonction de la croissance .....	50
b. Paramètre influençant la production d'enzyme extracellulaire .....	53
b.1 Concentration en carraghénane iota dans le milieu de culture .....	53

	Page
b.2 Influence de la température d'incubation .....	53
b.3 Influence du tampon .....	56
II-2 Courbes de croissance des souches #2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9. Production d'enzyme extracellu- laire .....	56
III: QUELQUES PROPRIETES DES ENZYMES .....	63
III-1 Activité de l'enzyme #1 en fonction du pH .....	63
III-2 Précipitation des enzymes par le sulfate d'ammonium .....	63
IV: ANALYSE QUALITATIVE DE L'ACTIVITE DES ENZYMES SYNTHÉ- TISEES PAR LES CULTURES #1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ET 9, APRES CROISSANCE SUR CARRAGHENANE IOTA .....	65
IV-1 Enzymes extracellulaires .....	65
a. Analyse des hydrolysats par chromatographie sur couche mince .....	65
b. Fractions résistantes des hydrolysats .....	67
IV-2 Enzymes intra-cellulaires .....	69
a. Activité des extraits intra-cellulaires des cultures après lyse des cellules aux ultra- sons .....	69
b. Recherche d'enzymes fixées sur les parois cellulaires des bactéries de la souche #1 ..	74
V: INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LE RENDEMENT DES HY- DROLYSES DE CARRAGHENANE IOTA PAR LES ENZYMES EXTRA- CELLULAIRES #5 ET #1 DU CARRAGHENANE KAPPA PAR LA SOUCHE #9 .....	75
VI: SEPARATION ET PURIFICATION DES OLIGOSIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE, SUR GEL DE SEPHADEX .....	78
VI-1 Séparation des oligosides de l'hydrolysat #5 de carraghénane iota .....	78
VI-2 Séparation des oligosides de l'hydrolysat #1 du carraghénane iota .....	80
VI-3 Séparation des oligosides de l'hydrolysat #9 du carraghénane kappa .....	80
VII: IDENTIFICATION DES OLIGOSIDES .....	84
VII-1 Par résonance magnétique nucléaire du carbone 13 .....	84

	Page
a. Extraits polyosidiques non dégradés .....	84
a.1 <i>Eucheuma cottonii</i> (carraghénane kappa)	84
a.2 <i>Eucheuma spinosum</i> (carraghénane iota)	84
a.2.1 Echantillon #712503 .....	84
a.2.2 Echantillon #31210 .....	88
b. Spectres R.M.N. des oligosides .....	88
b.1 Spectre de l'oligoside $K_1$ (sulfate de néocarrabiose kappa) .....	88
b.2 Spectre de l'oligoside $K_2$ (disulfate de néocarratétraose kappa) .....	91
b.3 Spectre de l'oligoside $I_3$ (tétrasulfate de néocarratétraose iota) purifié à partir de l'hydrolysats #1 de carraghénane iota ( <i>E. spinosum</i> ) .....	93
b.4 Spectre des oligosides $I_2$ isolés de l'hydrolysats #5 de l'extrait polyosidique d' <i>E. spinosum</i> .....	95
b.5 Spectre des oligosides $I_3$ isolés de l'hydrolysats #5 de l'extrait polyosidique d' <i>E. spinosum</i> .....	97
VII-2 Détermination du degré de polymérisation par chromatographie sur plaque .....	100
VIII: SPECIFICITE DES ENZYMES .....	103
VIII-1 Activité des enzymes extracellulaires #1 et #9 sur différentes familles de polyosides: agar et carraghénanes .....	103
a. Agar .....	103
b. Carraghénanes iota et kappa .....	103
b.1 Enzyme #1 .....	103
b.2 Enzyme #9 .....	110
VIII-2 Activité des enzymes #2, 3, 4, 5, 6 et 7 sur les carraghénanes kappa et iota, spécificité des enzymes .....	116
IX: EFFET DES ENZYMES #1 ET #9 SUR LA DISTRIBUTION DES MASSES MOLAIRES DES HYDROLYSATS D' <i>EUCHEUMA SPINOSUM</i> , <i>EUCHEUMA COTTONII</i> , <i>FURCELLARIA FASTIGIATA</i> , <i>AHNFELTIA CONCINNA</i> , <i>AHNFELTIOPSIS GIGARTINOIDES</i> .....	119
IX-1 Calibration de la colonne de Sepharose CL-4B et optimisation des conditions expérimentales .....	119

	Page
IX-2 Chromatographie sur colonne de Sepharose CL-4B des polyosides hydrolysés et non hydrolysés ....	124
a. <u>Eucheuma spinosum</u> (carraghénane iota, échantillon #31210) .....	124
b. <u>Eucheuma cottonii</u> (carraghénane kappa) .....	126
c. <u>Furcellaria fastigiata</u> .....	129
d. <u>Ahnfeltia concinna</u> .....	129
e. <u>Ahnfeltiopsis gigartinoïdes</u> .....	132
X: PRODUCTION, PURIFICATION DU DIHOLOSIDE DE CARRAGHENANE IOTA. CARACTERISATION PAR SPECTROSCOPIE DE R.M.N. DU <sup>13</sup> C .....	136
E/ - DISCUSSION .....	140
I: DEGRADATION BACTERIENNE DES CARRAGHENANES .....	140
II: PARAMETRES AFFECTANT LA PRODUCTION ET L'ACTIVITE DE LA CARRAGHENASE IOTA PAR LA SOUCHE #1 .....	142
II-1 Effet de la température sur la production de carraghénase iota .....	142
II-2 Effet de la concentration de carraghénane iota dans le milieu de culture .....	142
II-3 Activité en fonction du pH .....	143
II-4 Influence de la température sur les rendements d'hydrolyse .....	143
III: ACTIVITE ET SPECIFICITE DES ENZYMES SYNTHETISEES PAR LES SOUCHES #1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ET 9 .....	144
III-1 La carraghénase kappa de <u>Pseudomonas carrageenovora</u> (enzyme #9) .....	144
a. Activité .....	144
b. Spécificité .....	146
III-2 La carraghénase iota synthétisée par la souche #1 .....	147
a. Activité .....	147
b. Spécificité .....	148
III-3 Les enzymes #2, 3, 4, 5, 6 et 7 .....	150
IV: PURIFICATION ET ANALYSE PAR SPECTROSCOPIE DE R.M.N. DU <sup>13</sup> C, DES OLIGOSIDES .....	151

	Page
V: NATURE HYBRIDE DES OLIGOSIDES .....	152
V-1 Polyoside extrait d' <u>Eucheuma spinosum</u> .....	152
V-2 Polyoside extrait d' <u>Eucheuma cottonii</u> .....	154
V-3 Polyoside extrait de <u>Furcellaria fastigiata</u> .....	154
V-4 Polyoside extrait d' <u>Ahnfeltia concinna</u> et <u>Ahnfeltiopsis gigartinoides</u> .....	155
a. Hybrides kappa-iota .....	155
b. Présence éventuelle de carraghénane nu .....	156
F/ - CONCLUSION .....	159
G/ - ANNEXE .....	161
H/ - BIBLIOGRAPHIE .....	170

LISTE DES TABLEAUX

	Page
1. Culture #1 - Production de biomasse et d'enzyme extra-cellulaire en cours de croissance sur carraghénane iota ....	51
2. Culture #1 - Effet de la concentration du substrat dans le milieu de culture, sur la production d'enzyme .....	54
3. Culture #1 - Effet de la température d'incubation sur la production d'enzyme .....	55
4. Valeurs de la densité optique (D.O.) et du pH des milieux et de culture, en cours de croissance .....	57-58
5.	
6. Influence du pH sur l'activité enzymatique de la culture #1	64
7. Distribution des oligosides dans les hydrolysats, suivant l'activité des enzymes. Valeurs de $R_{GAL}$ de ces oligosides .	68
8. Pourcentage de fractions résistantes (poids/poids) de carraghénanes après hydrolyse enzymatique .....	70
9. Influence de la température d'hydrolyse sur le pourcentage de fraction résistante des carraghénanes après hydrolyse enzymatique .....	76
10. Tableau récapitulatif des déplacements chimiques (en p.p.m.) des carbones no 1 des poly et oligosides de carraghénanes iota et kappa .....	99
11. Oligosides de carraghénane kappa. Corrélation $R_m = \log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right) = f(D.P.)$ .....	102

LISTE DES FIGURES

	Page
1. Culture #1 sur gel d'agar .....	48
2. Culture #1 sur gel de carraghénane iota .....	48
3. Culture #9 sur gel de carraghénane iota .....	48
4. Culture #1 - Courbes de croissance (sur carraghénane iota), de pH et de production d'enzyme .....	52
5. Culture #1 - Effet de la concentration du substrat dans le milieu de culture, sur la production d'enzyme	54
6. Culture #1 - Effet de la température d'incubation sur la production d'enzyme .....	55
7, 8 et 9. Enzymes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 - Courbes de crois- sance, production d'enzyme extracellulaire .....	59-60-61
10. Influence du pH sur l'activité enzymatique de la culture #1 .....	64
11. Chromatogrammes des carraghénanes kappa et iota hydro- lysés par les enzymes extracellulaires #1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 9 .....	66
12. Chromatogramme sur couche mince. Activité enzymatique de l'extrait intracellulaire des cultures #1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 .....	71
13. Chromatogrammes d'hydrolysats de carraghénanes iota et kappa .....	73
14. Influence de la température d'hydrolyse sur le pour- centage de fraction résistante des carraghénanes après hydrolyse enzymatique .....	77
15. Chromatogramme sur plaque des fractions collectées après passage sur colonne de Sephadex G-25 fine de l'hydrolysats #5 de carraghénane iota .....	79
16. Chromatogramme des fractions collectées après passage sur colonne de Sephadex G-50 superfine de l'hydroly- sat #1 de carraghénane iota .....	81
17. Séparation sur colonne de Sephadex G-50 superfine des oligosides de l'hydrolysats #1 de carraghénane iota ..	81

	Page
18. Chromatogramme des fractions collectées après passage sur colonne de Sephadex G-25 fine de l'hydrolysate #9 de carraghénane kappa (k) .....	82
19. Séparation sur colonne de Sephadex G-25 fine des oligosides de l'hydrolysate #9 de carraghénane kappa ....	82
20. Spectre R.M.N. de l'extrait polyosidique d' <u>Eucheuma cottonii</u> (carraghénane kappa: K) .....	85
21 et 22. Spectres R.M.N. de l'extrait polyosidique d' <u>Eucheuma spinosum</u> - échantillons #712503 et #31210 (carraghénanes iota: I et kappa: K) .....	86-87
23. Spectre R.M.N. de l'oligoside K <sub>1</sub> (sulfate de néocarribose kappa) .....	89
24. Spectre R.M.N. de l'oligoside K <sub>2</sub> (disulfate de néocarratétraose kappa) .....	92
25. Spectre R.M.N. de l'oligoside I <sub>3</sub> (tétrasilfate de néocarratétraose iota) .....	94
26. Spectre R.M.N. des oligosides I <sub>2</sub> isolés de l'hydrolysate #5 de l'extrait polyosidique d' <u>Eucheuma spinosum</u> .....	96
27. Spectre R.M.N. de l'oligoside I <sub>3</sub> isolé de l'hydrolysate #5 de l'extrait polyosidique d' <u>Eucheuma spinosum</u> .....	98
28. Chromatogramme d'hydrolysats de carraghénane kappa, hydrolyse incomplète .....	101
29. Oligosides de carraghénane kappa. Corrélation $R_m = \log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right) = f(D.P.)$ .....	102
30. Spectre R.M.N. de la fraction soluble dans l'éthanol, de l'hydrolysate #1 de carraghénane iota ( <u>E. spinosum</u> ) .....	104
31 et 32. Spectres R.M.N. de la fraction non soluble dans l'éthanol, de l'hydrolysate #1 du polyoside extrait d' <u>Eu-cheuma spinosum</u> - échantillons #712503 et #31210 ....	105
33. Chromatogramme de l'hydrolysate #1 de l'extrait polyosidique d' <u>E. cottonii</u> .....	108
34. Spectre R.M.N. de la fraction soluble dans l'éthanol, de l'hydrolysate #1 du polyoside extrait d' <u>Eu-cheuma cottonii</u> .....	109

	Page
35. Spectre R.M.N. de la fraction soluble dans l'éthanol, de l'hydrolysate #9 de carraghénane kappa ( <u>E. cottonii</u> )	111
36. Spectre R.M.N. de la fraction insoluble dans l'éthanol, de l'hydrolysate #9 du polyside extrait d' <u>Eu-cheuma cottonii</u>	112
37. Spectre R.M.N. de la fraction soluble dans l'éthanol, de l'hydrolysate #9 du polyside extrait d' <u>Eu-cheuma spinosum</u>	113
38. Spectre R.M.N. de la fraction non soluble dans l'éthanol, de l'hydrolysate #9 du polyside extrait d' <u>Eu-cheuma spinosum</u>	115
39. Chromatogramme des hydrolysats de carraghénane iota "purifié", dégradé par les enzymes #1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 9	117
40. Calibration de la colonne Sepharose CL-4B	120
41. Colonne Sepharose CL-4B: corrélation entre $\frac{V_e}{V_0}$ et $\log \overline{M_w}$	121
42. Influence de la concentration de NaCl dans l'éluant sur le volume d'éluion du néocarratétrase kappa	122
43. Influence des traitements enzymatiques sur la distribution des masses molaires du polyside extrait d' <u>Eu-cheuma spinosum</u>	125
44. Influence des traitements enzymatiques sur la distribution des masses molaires du polyside extrait d' <u>Eu-cheuma cottonii</u>	127
45. Influence des traitements enzymatiques sur la distribution des poids moléculaires du polyside extrait de <u>Furcellaria fastigiata</u>	128
46 et 47. Spectres R.M.N. des extraits polyosidiques des algues <u>Ahnfeltia concinna</u> et <u>Ahnfeltiopsis gigartinoides</u>	130-131
48. Influence des traitements enzymatiques sur la distribution des masses molaires du polyside extrait d' <u>Ahnfeltia concinna</u>	133
49. Influence des traitements enzymatiques sur la distribution des masses molaires du polyside extrait d' <u>Ahnfeltiopsis gigartinoides</u>	134

	Page
50. Chromatogramme sur plaque des fractions collectées après passage sur colonne de Sephadex G-25 fine de l'hydrolysât #5 de carraghénane iota "purifié" .....	137
51. Spectre R.M.N. de l'oligoside I <sub>2</sub> isolé de l'hydrolysât #5 de carraghénane iota "purifié" (tétrasulfate de néocarratétriose iota) .....	138
52. Spectres de R.M.N. du carbone 13 du polyside extrait d' <u>Ahnfeltia concinna</u> , avant traitement (spectre B) et après traitement alcalin (spectre A) .....	157
53 et 54. Observation au microscope électronique des cultures bactériennes #1 et #9 - Agrandissement ×15 000 .....	168

## A/ - INTRODUCTION

Depuis l'Antiquité les extraits polyosidiques d'algues rouges, agar et carraghénanes, ont été utilisés comme produits gélifiants dans l'alimentation. Mais il a fallu attendre notre siècle pour qu'une recherche plus approfondie nous apporte les éléments nécessaires expliquant la nature différente des extraits. Plusieurs méthodes d'approche ont été utilisées: la plus ancienne, la chimie, puis l'enzymologie dont nous allons parler, et la plus récente, l'immunologie.

Les méthodes enzymatiques se sont développées à partir de la découverte de bactéries capables de dégrader l'agar et les carraghénanes. Cette dégradation est le résultat de l'action hydrolysante d'enzymes synthétisées par les cultures bactériennes.

HUMM (1946) a été le premier à montrer que ces cultures peuvent dégrader différemment les extraits polyosidiques suivant leur nature.

Effectivement, il a été établi depuis, que les souches bactériennes peuvent synthétiser des enzymes ayant la possibilité d'hydrolyser spécifiquement l'agar, les agarases (ISHIMATSU et coll. - 1954, YAPHE - 1957), et les carraghénanes, les carraghénases (YAPHE et BAXTER - 1955). De plus, il a été découvert que les carraghénases peuvent différencier les carraghénanes suivant leur nature; ceux-ci ont été classés en 3 principaux groupes suivant leur degré de sulfatation: kappa, iota et lambda.

Une enzyme capable de dégrader le carraghénane kappa a été purifiée par WEIGL et YAPHE (1966). Une autre enzyme synthétisée par le même microorganisme, ayant la propriété d'hydrolyser le carraghénane lambda, a été purifiée par JOHNSTON (1973).

Le but de notre étude est d'isoler une ou des souches bactériennes capables de dégrader le carraghénane iota et de caractériser l'activité de leurs enzymes.

B/ - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I: LES CARRAGHENANES

I-1 INTRODUCTION

Les carraghénanes, comme l'agar, constituent une famille de polyosides contenant des groupes sulfates que l'on rencontre uniquement chez certaines algues d'origine océanique, les Rhodophycées.

La principale différence que présentent ces polyosides avec la famille de l'agar vient du fait que la structure moléculaire des premiers est un enchaînement de galactose de série D, alors que celle de l'agar présente une alternance D, L.

Les études faites sur les carraghénanes sont relativement récentes. Elles ont commencé au siècle dernier, mais ce n'est qu'en 1953 que la présence de différentes fractions a été mise en évidence: SMITH et COOK séparent la "carraghénine" de l'algue rouge Chondrus crispus en deux fractions, l'une soluble dans le chlorure de potassium, l'autre insoluble. La première est appelée carraghénane lambda ( $\lambda$ ), la seconde carraghénane kappa (K).

La structure de ces molécules était peu connue. La présence de galactose a été prouvée avant 1880, mais il a fallu attendre 1955 (O'NEIL) pour mettre en évidence la présence d'anhydrogalactose dans la chaîne polyosidique du carraghénane K. Cet auteur met en évidence la présence de D-galactose, d'anhydro-D-galactose et d'esters sulfates dans le rapport suivant 6:5:7, et réussit à isoler le diholoside  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-anhydro-3-6-galactose (appelé ensuite carrabiose).

Depuis, de nombreuses études ont été menées à l'aide de méthodes chimiques (ANDERSON et coll. - 1968 - (b) - 1973) et physico-chimiques (ANDERSON et coll. - 1968 - (a) -, STANCIOFF et coll. - 1969 -, BRYCE et coll. - 1974 -, BHATTACHARJEE et coll. - 1978 -).

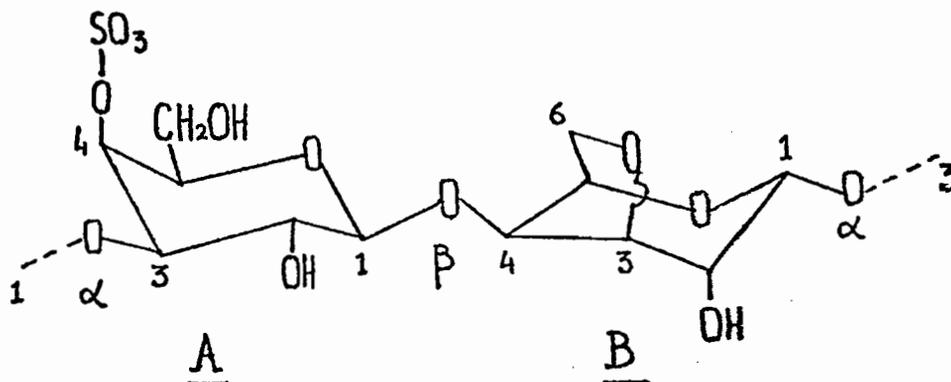
Plusieurs carraghénanes ont été définis suivant leur structure moléculaire (REES - 1969). Tous ont en commun avec l'agar, l'alternance de liaisons  $\beta(1 \rightarrow 4)$  et  $\alpha(1 \rightarrow 3)$  entre les résidus.

## I-2 STRUCTURE DES CARRAGHENANES

La structure de chaque carraghénane a été ainsi définie par REES (1969).

### a. Carraghénanes kappa ( $\kappa$ ) et mu ( $\mu$ ), furcellarane

La fraction K est la moins riche en groupes sulfates des carraghénanes. Elle porte seulement un groupement sulfate par diholoside. La chaîne polyosidique est une séquence de sulfate-4- $\beta$ -D-galacto-pyranosyl-1-4-anhydro-3-6- $\alpha$ -D-galactose liés les uns aux autres en 1-3.

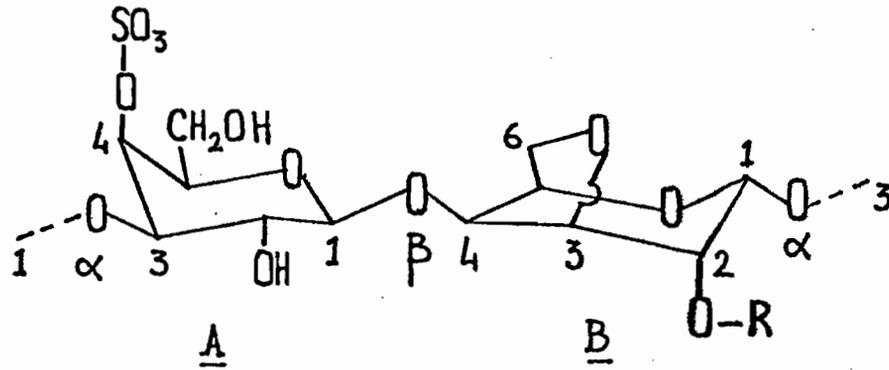


Structure idéale du carraghénane K

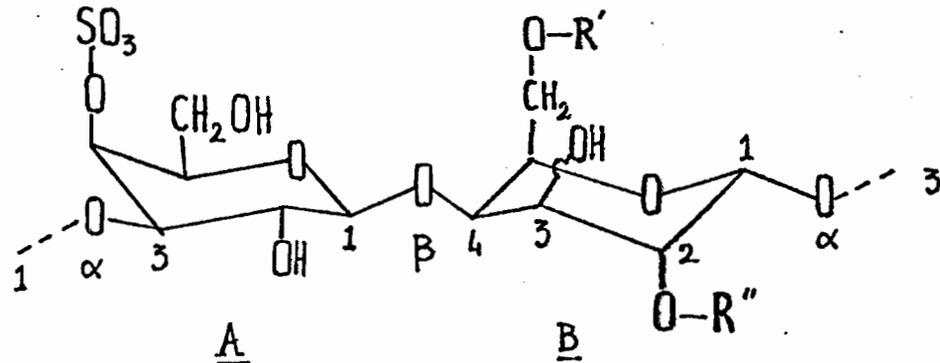
Un autre polyoside appelé dans la littérature furcellarane (PAINTER - 1960) a une structure de base identique à la précédente, avec une différence cependant: environ 50% des résidus A ne contiennent pas de groupes sulfates.

Quelques anomalies peuvent exister dans la régularité de la séquence du carraghénane K: en plus des deux résidus précédents A et B, PAINTER (1966) met en évidence dans la fraction Kappa de l'algue Chondrus crispus, la présence de sulfate-6-D-galactose, de sulfate-2-D-anhydro-3-6-galactose. Ce résultat est confirmé par ANDERSON et coll. (1968-a-) et PENMAN et coll. (1973-c-). Pour eux, pratiquement tous les résidus A sont

sulfatés en position 4 et quelques anhydro-galactoses peuvent être remplacés par d'autres résidus: un sur sept est remplacé par du sulfate-2-D-anhydro-galactose (figures suivantes), 4% par du sulfate-6-galactose et environ 1% par du sulfate-2-6 galactose.



- ① R = H structure idéale du carraghénane K
- ② R = SO<sub>3</sub> un résidu sur sept (carraghénane iota dont nous parlons plus loin)



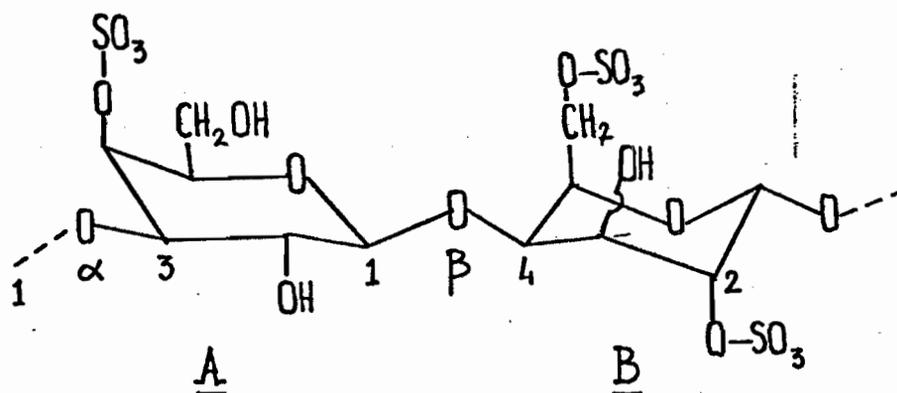
- ③ R' = SO<sub>3</sub> et R'' = H : 4% des cas (carraghénane μ)
- ④ R' = SO<sub>3</sub> et R'' = SO<sub>3</sub> : 1% (carraghénane ν dont nous parlons plus loin)

Structures présentes dans le polyside de *Chondrus crispus*

La structure ③ a été appelée carraghénane mu (μ) (REES - 1969), et peut être dominante dans une chaîne polysidique. Le produit est alors soluble en présence de chlorure de potassium contrairement à la fraction K qui précipite (Mc CANDLESS et coll. - 1973). Cette fraction μ a longtemps été appelée le "troisième composé des carraghénanes" chez *Chondrus crispus* (ANDERSON et REES - 1966). Par un traitement alcalin au borohydrure, les



groupes sulfate de la chaîne. Ils trouvent également quelques résidus B (un sur dix) sous forme de disulfate-2-6 D-galactose.



Structure du carraghénane nu ( $\nu$ )

Cette structure a été appelée par REES (1969) carraghénane nu ( $\nu$ ). La chaîne iota peut être suffisamment "contaminée" par des résidus  $\nu$  pour que l'on puisse parler d'hybrides i/ $\nu$ . Un tel polyside a été isolé de l'algue Eucheuma uncinatum (STANCIOFF et STANLEY - 1969 -, LAWSON et coll. - 1973). Cette fraction  $\nu$  est équivalente à celle du carraghénane  $\mu$  dans la fraction K: le pont anhydride 3-6 est remplacé par le sulfate en position 6. Comme pour la fraction  $\mu$ , le résidu B 6-sulfate donne naissance à un pont anhydride 3-6, après traitement alcalin à la borohydrine.

Dans le cas présent, la seule différence est que le résidu B porte en plus un groupe sulfate en position 2; le produit résultant du traitement alcalin est donc le disulfate-2-6-anhydro 3-6 galactose qui est le résidu B de la fraction iota. LAWSON et REES (1970) ont émis l'hypothèse que le carraghénane  $\nu$  est le précurseur de la fraction iota. Depuis, DI NINNO et Mc CANDLESS (1979) ont postulé que le carraghénane  $\nu$  est aussi le précurseur du carraghénane kappa.

La présence de résidus  $\nu$  dans une chaîne à dominante iota ou kappa, joue un rôle dans la structure du gel. Nous le verrons plus loin.

c. Hybrides kappa et iota, carraghénane "deviant-iota" ( $\delta$ )

Nous avons déjà noté que la séquence régulière d'un même motif diholosidique dans une chaîne moléculaire de carraghénane n'existe pas. Il y a toujours "contamination".

Les critères de pureté d'un carraghénane K et d'un iota seraient donc, pour le premier une très forte proportion d'anhydro-D-galactose neutre et pour le second une forte proportion de sulfate-2-anhydro-D-galactose.

Un carraghénane K doit avoir un rapport moléculaire galactose/anhydro 3-6 galactose/sulfate (G/A/S) tendant vers 1/1/1. Un carraghénane iota doit avoir un rapport tendant vers 1/1/2. En raison de la présence de résidus non conformes aux structures idéales évoquées plus haut, ces rapports ne sont jamais atteints. Les polyosides ayant une composition très proche des rapports précédents sont ceux extraits d'Eucheuma cottonii et d'Eucheuma spinosum. Le rapport G/A/S du premier est 1.00/0.87/1.00 (ANDERSON et coll. - 1973) ce qui laisse supposer que ce polyoside a une structure très proche de la fraction idéale kappa. Le rapport du second est 1.00/0.85/1.94 (ANDERSON et coll.), 1.00/0.71/1.97 (BLACK et coll. - 1965), résultats qui font penser que la structure est très proche de celle d'un carraghénane iota idéal. JOHNSTON (1973) réussit à dégrader très faiblement la chaîne iota d'E. spinosum à l'aide d'une kappa-carraghénase, ce qui indiquerait que quelques résidus kappa existent dans la séquence.

Entre ces deux extrêmes, kappa: E. cottonii et iota: E. spinosum se trouvent une série d'hybrides. ANDERSON et coll. (1968-a) ont extrait de l'algue Gigartina radula un polyoside dont le rapport G/A/S est 1.00/0.9/1.68; il contient 35 à 45% d'anhydro 3-6 galactose (représentatif de la fraction K) et 40 à 50% de sulfate-2-anhydro 3-6 galactose (iota). Il semblerait donc que cet extrait contient presque autant de résidus kappa que de résidus iota.

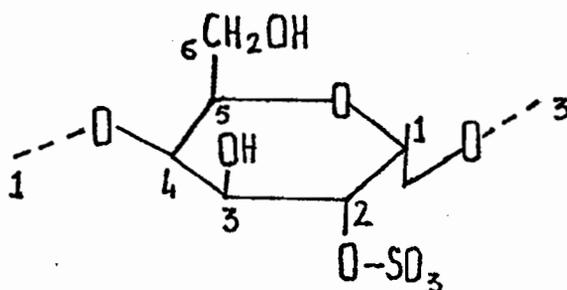
D'autres algues rouges ont été étudiées par STANCIOFF et STANLEY (1969). STANCIOFF (1965) a mis au point une méthode de fractionnement des extraits polyosidiques à l'aide du chlorure de potassium (leaching method) plus précise que celle de SMITH et COOK (1953). Certaines fractions pré-

sentent des propriétés intermédiaires entre celles d'un carraghénane kappa et d'un iota. Leur analyse par spectroscopie d'infra-rouge montre qu'elles contiennent des résidus anhydro-sulfatés en 2 (pic à  $805\text{ cm}^{-1}$ ). Le rapport moléculaire G/A/S a une valeur intermédiaire à ceux des carraghénanes kappa et iota idéaux.

Ces mêmes extraits ont été analysés par la suite et il a été prouvé qu'il s'agissait d'hybrides i/K contenant aussi des résidus  $\mu$  et  $\nu$ : Gigartina stellata, G. pistillata (BLACK et coll. - 1965 -, ANDERSON et coll. - 1968 - a), G. tenella (HIRASE et coll. - 1972), G. skottbergii (CEREZO - 1967), G. canaliculata, G. chamissoi, Eucheuma isiforme, Ahnfeltia durvillaei (PENMAN et REES - 1973 - a, LAWSON et coll. - 1973), Ahnfeltia concinna (SANTOS et DOTY - 1975, BHATTACHARJEE et coll. - 1979).

Lors de leurs analyses, LAWSON et coll. (1973) ont identifié de nouvelles structures et ont été obligés d'introduire de nouveaux termes dans la classification des carraghénanes. C'est ainsi qu'apparaissent en plus des termes kappa, iota, lambda, mu, nu, ceux de "deviant-iota" ( $\delta$ ) et de Ksi ( $\xi$ ).

LAWSON et REES ont regroupé sous le nom de "deviant iota" les chaînes polysidiques contenant des résidus B sulfate-2- $\alpha$ -D-galactose (qui remplaceraient donc l'anhydro-galactose).



"deviant iota" - Résidu B

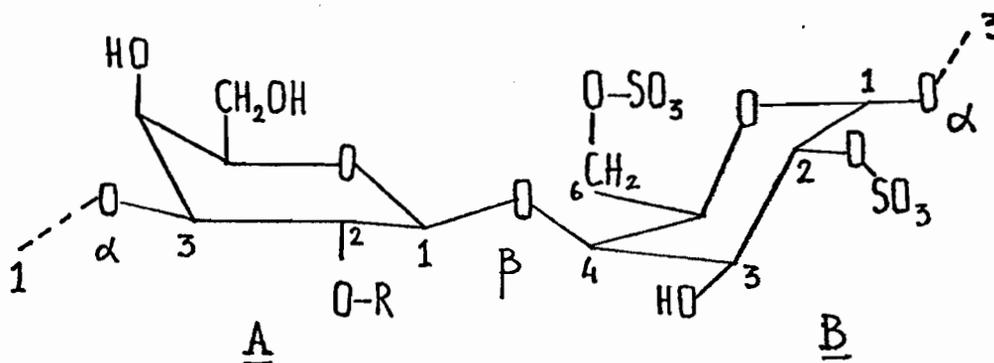
Cependant l'analyse de leurs résultats montre que les polysides qu'ils appellent "deviant iota", présentent tous une hybridation K, i,  $\mu$  ou  $\nu$ .

Prenons l'exemple d'Ahnfeltia durvillaei qui contient 24% d'anhydro 3-6- $\alpha$ -D-galactose (kappa), 12% de sulfate-2-anhydro 3-6- $\alpha$ -D-galactose (iota), 7% de disulfate-2-6- $\alpha$ -D-galactose ( $\nu$ ), 7% de sulfate-2  $\alpha$ -D-galactose (deviant), de 5% de sulfate-4  $\beta$ -D-galactose (lié en 3), 5% de  $\beta$ -D-galactose neutre (lié en 3).

Nous sommes obligés de constater que, devant de tels résultats, nous nous trouvons en difficulté pour définir un critère de classification. Tous les carraghénanes sont des hybrides. Nous proposons cependant de les classer en les appelant par le nom de la fraction dominante suivi du nom des fractions en pourcentage moindre.

d. Carraghénane lambda ( $\lambda$ ) et carraghénane ksi ( $\xi$ )

Nous avons vu que le terme carraghénane  $\lambda$  a été attribué à la fraction qui reste soluble en présence de KCl (SMITH et COOK - 1953). Depuis, DOLAN et coll. (1965) et REES (1969) ont donné une nouvelle définition du carraghénane  $\lambda$  d'après sa structure moléculaire; contrairement aux fractions i et K, le carraghénane  $\lambda$  ne contient pas de pont anhydride. Le diholoside proposé par Rees est le suivant: sulfate-2- $\beta$ -D-galacto-pyranose (1 $\rightarrow$ 4) disulfate-2-6- $\alpha$ -D-galacto-pyranose. La chaîne  $\lambda$  idéale est composée d'une séquence régulière de ces diholosides liés en 1-3. Cependant, le sulfate en 2 sur le  $\beta$ -galactose peut être quelquefois remplacé par H.

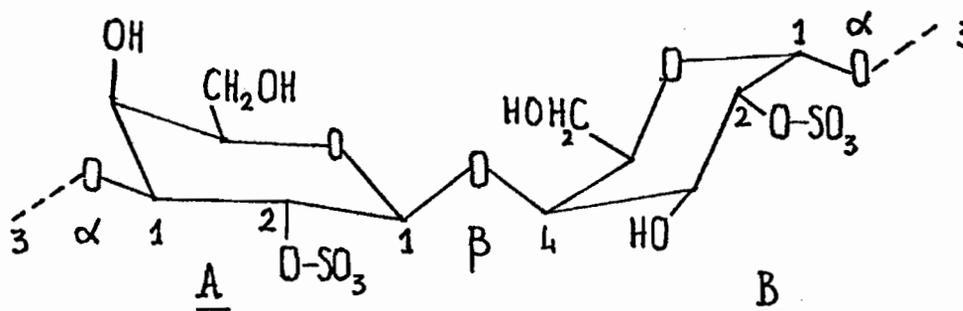


Structure du carraghénane lambda ( $\lambda$ )

- ① R = SO<sub>3</sub> → Carraghénane  $\lambda$
- ② R = H → peut exister dans la chaîne  $\lambda$

PERNAS et coll. (1967) s'interrogent sur la validité d'une classification kappa et lambda. Etant donné qu'il existe en fait une gamme de polyosides dont la teneur en groupes sulfate varie du kappa idéal au lambda idéal, sans jamais atteindre les valeurs limites, ils préfèrent parler de fraction lambda après avoir défini un critère de pureté qui est une très faible teneur en anhydro galactose (2%).

LAWSON et coll. (1973), PENMAN et REES (1973-a-b), en analysant les fractions non solubles dans KCl, de certaines algues, ont confirmé le caractère hybride des fractions  $\lambda$ , et ont mis en évidence l'existence de nouveaux résidus différents du kappa et du lambda. Ce fait les a amenés à définir un autre carraghénane: Ksi ( $\xi$ ) qui serait le sulfate-2- $\beta$ -D-galacto-pyranose (1-4) sulfate-2- $\alpha$ -D-galacto-pyranose.



Structure du carraghénane  $\xi$

Ce carraghénane diffère du  $\lambda$  par l'absence de sulfate en 6 sur le résidu B.

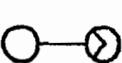
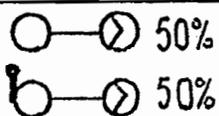
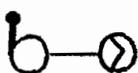
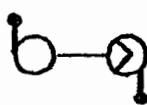
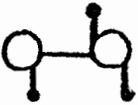
Nous pouvons conclure que presque toutes les structures sont possibles dans une chaîne polyosidique de carraghénane. Il faut cependant remarquer que si le résidu B change souvent de structure, le résidu A est la plupart du temps le même dans une famille donnée. Ces variations de structure engendrent des changements dans les propriétés de ces polyosides.

### I-3 INFLUENCE DE LA STRUCTURE DES CARRAGHENANES ET DE LEUR CONFORMATION MOLECULAIRE SUR LEURS PROPRIETES PHYSIQUES

La structure macromoléculaire et les charges éventuelles de ces polysides leur donnent la possibilité de conférer aux produits dans lesquels ils sont dissous une consistance plus ou moins épaisse allant jusqu'à la gélification. Ces propriétés sont directement liées à la composition chimique des molécules.

#### a. Solubilité

Ainsi, la fréquence des groupes sulfate et la présence d'anhydro-galactose ont une influence sur la solubilité des molécules. Plus le polyside est riche en groupes sulfate et moins il contient d'anhydro-galactose, plus il est soluble. Si l'on considère le spectre des galactanes, en partant de l'agarose qui est neutre jusqu'au carraghénane lambda qui a la plus forte teneur en groupes sulfate et qui ne contient pas d'anhydro-galactose, on constate que la solubilité augmente de l'agarose au carraghénane lambda.

		carraghénanes				
		Agarose	Furcellarane	Kappa	Iota	Lambda
structure						
nombre de sulfates par dioside		0	1 sur 50% des diosides	1	2	3
solubilité						

-  galactose
-  anhydrogalactose
-  radical sulfate

DEA et coll. (1975) ont donné les valeurs approximatives que doivent atteindre les concentrations de ces polysides en solution aqueuse pour former un gel.

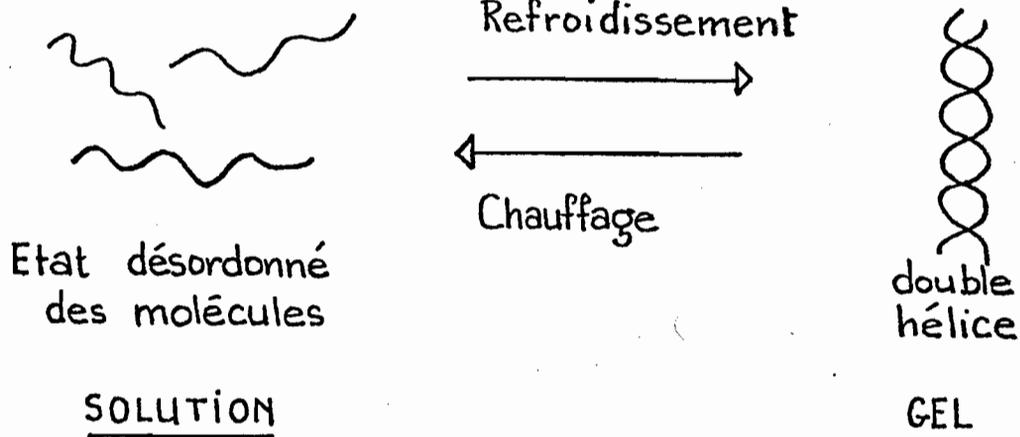
	Furcellarane	carraghénane k	carraghénane i
concentration approximative pour obtenir la gélification	~0.4%	~1.5%	~2.5%

b. La double hélice et le réseau tridimensionnel

REES et son équipe ont étudié le phénomène de gélification au niveau moléculaire: la formation d'un gel lors du refroidissement des solutions de carraghénanes serait due à la formation d'un réseau tridimensionnel qui emprisonne le liquide dans ses alvéoles.

L'analyse aux rayons X du comportement des polysides lors de la gélification (ARNOTT et coll. - 1974) et le traitement mathématique des conformations les plus probables (ANDERSON et coll. - 1969) ont permis d'expliquer les variations du pouvoir rotatoire de ces solutions, observées lors du chauffage et du refroidissement (Mc KINNON et coll. - 1969, REES et coll. - 1969).

Le modèle de réseau tridimensionnel du gel proposé par REES est le suivant: les molécules polyosidiques forment une double hélice lors de la gélification.



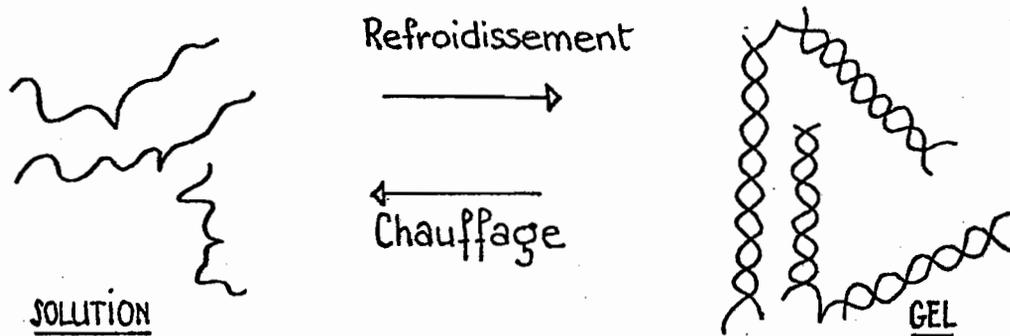
La répartition des groupements sulfates sur les molécules des carraghénanes kappa et iota et la présence d'anhydro-galactose leur permettent de former la double hélice. Les sulfates sont tous situés à l'extérieur de la spirale et les deux molécules sont reliées par liaisons hydrogènes à l'intérieur de la spirale. Cette structure spatiale est semblable à celle des acides nucléiques.

Dans les molécules de carraghénane lambda, la présence du groupe sulfate sur le carbone #6 du résidu B et l'absence d'anhydro-galactose (page 9), les empêchent de former la double hélice. Ceci explique le fait que le carraghénane lambda ne forme pas de gel et possède seulement des propriétés épaississantes.

c. Influence de l'irrégularité de la séquence des résidus dans une chaîne polyosidique, sur le réseau tridimensionnel

Nous avons vu que la régularité de la chaîne kappa ou iota peut être interrompue par la présence d'un résidu mu ou nu, qui a un sulfate supplémentaire. La présence de ces résidus rompt la continuité de la double hélice.

REES les appelle les "kink residues" (REES - 1969). Leur présence provoquerait des coudes dans les doubles hélices.



#### d. Effet des cations sur le gel

Il est possible de durcir un gel de carraghénane kappa en présence d'ions potassium (à la limite, on peut obtenir un précipité) (Méthode de fractionnement de SMITH et COOK (1953)). Les ions  $K^+$  peuvent s'imbriquer dans les spires et neutralisent partiellement les groupes sulfate. Les doubles hélices forment alors des agrégats. L'eau est expulsée, engendrant la synérèse.

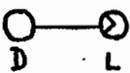
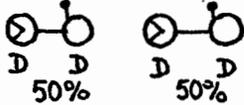
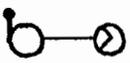
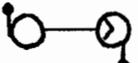
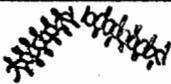
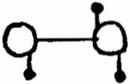
D'autres ions et polycations ont une action identique sur le carraghénane kappa, bien que moindre, tels les cations calcium, césium et rubidium, et les protéines (à un pH inférieur à leur point isoélectrique).

Certaines molécules, telles les galactomannanes, peuvent augmenter le pouvoir gélifiant du carraghénane kappa, mais n'ont aucun effet sur le iota (DEA et coll. - 1972-1975). Ces mélanges sont fréquemment utilisés dans l'industrie alimentaire.

#### e. Influence des groupements sulfates sur la texture du gel

Plus les sulfates sont nombreux à l'extérieur des doubles hélices, plus la répulsion est grande entre elles et plus le gel est élastique. Les alvéoles ainsi formées permettent de piéger l'eau. Par contre, dans le cas de l'agarose, dont les molécules sont neutres, les doubles hélices forment

un réseau dense et les molécules d'eau sont expulsées du gel (synérèse).

	Structure	Réseau tridimensionnel	Propriétés physiques	Charge
Agarose			SYNÉRÈSE Gel ferme	NEUTRE
Furcellarane				
carraghénane kappa				
iota			Gel élastique	
lambda		la double hélice ne se forme pas PAS DE GEL	solution épaisse	fortement chargé

○ : Galactose

⊙ : Anhydrogalactose

⋮ : groupe sulfate

Ce tableau permet de voir la relation qui existe entre la structure des polysides et leurs propriétés.

D'autres polyosides semblent présenter le même mécanisme de gélification (double hélice) tels l'acide hyaluronique, la chondroïtine et ses dérivés sulfates, le sulfate de kératane (REES et coll. - 1969) et le porphyrane. ATKINS et coll. (1969) ont même mis en évidence la formation d'une hélice à 3 brins chez un xylane.

Des propriétés des carraghénanes découle leur utilisation dans l'industrie, où ils sont de plus en plus utilisés comme agents de texture. Mais il ne faut pas oublier que dans leur milieu naturel, l'algue, ils jouent aussi un rôle important.

#### I-4 LES CARRAGHENANES DANS L'ALGUE

##### a. Localisation

La cellulose, qui est un constituant important chez les algues et plus généralement chez les plantes, se trouve en faible proportion chez les algues rouges. Ce glucane est alors remplacé par des galactanes.

Les principales recherches sur la localisation des carraghénanes dans les tissus des algues ont été effectuées sur Chondrus crispus. GORDON et Mc CANDLESS (1973), GORDON-MILLS et Mc CANDLESS (1975) ont montré par différentes méthodes (coloration, microscopie électronique, microscopie à polarisation, spectroscopie R.X. et immuno-fluorescence) que les carraghénanes étaient les constituants principaux des parois cellulaires et se trouvaient aussi en forte proportion dans la matrice inerte intercellulaire.

##### b. Influence du cycle biologique sur la production de carraghénane

La même équipe a mis en évidence un fait très important (Mc CANDLESS et coll. - 1973): les carraghénanes kappa et lambda que l'on croyait être mélangés chez Chondrus crispus, ne sont pas synthétisés simultanément. Leur synthèse suit le cycle biologique de l'algue.

Les pieds sporophytes (diploïdes) synthétisent le carraghénane lambda et lui seul, tandis que les gamétophytes (haploïdes) synthétisent

le kappa. Il faut noter que les gamétophytes mâles synthétisent le carraghénane kappa en plus grande quantité. Celui synthétisé par les plants femelles est moins pur: on y trouve du carraghénane nu (HOSFORD et Mc CANDLESS - 1975).

La transférase, enzyme catalysant l'apport d'un groupement sulfate sur chaque dioside de la chaîne précurseur, aurait donc une spécificité différente suivant que le plant est gamétophyte ou sporophyte.

Cette hétérogénéité entre les deux parties du cycle biologique de Chondrus crispus est confirmée par la technique de l'immunofluorescence (GORDON-MILLS et Mc CANDLESS - 1975). D'autres algues de la famille des Gigartinaceae (à laquelle appartient C. crispus), qui ont été analysées, présentent toutes cette hétérogénéité (HOSFORD et Mc CANDLESS - 1975).

Il est évident que dans le domaine industriel, cette découverte est d'un intérêt notoire; la société américaine Marine Colloids a sélectionné un mutant de Chondrus crispus (souche T 4) dont le cycle biologique reste haploïde (NEISH - 1977). L'algue produit donc constamment du carraghénane kappa (en quantité variable suivant les saisons).

Des études en cours essaient d'optimiser cette production en installation pilote.

DAWES et coll. (1977) ont étudié la structure du carraghénane iota synthétisé par les algues Euclima (Solieriaceae). Mais ils n'ont trouvé aucune différence entre les pieds sporophytes et gamétophytes. De même aucune différence n'a pu être montrée chez Hypnea musciformis (Hypneaceae) (HOSFORD et Mc CANDLESS - 1975).

Gigartinaceae, Solieriaceae, Hypneaceae font partie du même ordre: les Gigartinales. Seules les Gigartinaceae semblent présenter l'hétérogénéité de synthèse des carraghénanes en fonction du cycle biologique.

#### c. Le rôle des polyosides dans l'algue

REES a mis en évidence un des rôles probables joués par les polyosides en tant que constituants des algues. En analysant des échantillons

de porphyrane extraits d'algues (Porphyra) poussant en eaux calmes et en eaux agitées (REES et CONWAY - 1962), il constate qu'il y a une relation entre la quantité d'anhydrogalactose contenue dans le porphyran et l'environnement de l'algue. Plus le milieu est agité, plus la quantité d'anhydro galactose augmente; le polyside aurait donc un rôle dans la protection de l'algue contre les éléments.

Mais ce rôle joué par les polysides n'est pas le seul, et REES (1962) donne une bonne revue des éventuels rôles physiologiques de ces macromolécules:

... "Ces polysides ont probablement de nombreuses fonctions à remplir telles celle de barrière échangeuse de cations entre le protoplasme et le milieu extérieur; celle de réserve d'eau de mer (emprisonnée dans la structure du gel), diminuant ainsi les dangers de dessiccation et de chocs osmotiques, auxquels sont exposées les cellules à marée basse; celle d'un tampon qui protégerait la cellule contre l'action destructrice des vagues."

## II: LES ENZYMES

### II-1 UTILITE DES ENZYMES DANS LA DETERMINATION DES STRUCTURES

L'hydrolyse enzymatique est une méthode très utile dans l'étude des structures moléculaires.

Les conditions d'hydrolyse sont beaucoup moins drastiques que celles utilisées lors des dégradations chimiques (pH - température); et les produits obtenus ne subissent pas de modifications secondaires, telle l'élimination de groupes sulfates des carraghénanes lors d'une méthanolyse.

De plus, l'hydrolyse enzymatique est beaucoup plus spécifique qu'une dégradation chimique. Une enzyme, une fois son mode d'action bien défini, peut être utilisée pour mettre en évidence un type de structure et un seul. Ainsi une enzyme peut attaquer une liaison  $\beta$ -1-4 dans un carraghénane et laisser intacte la liaison  $\alpha$ -1-3.

### II-2 UTILISATION DES ENZYMES DANS LA DETERMINATION DES STRUCTURES

GRAN, en 1902, est le premier à isoler une bactérie ayant la propriété d'hydrolyser l'agar. Depuis, HUMM (1946) a décrit une vingtaine de micro-organismes dégradant non seulement l'agar mais d'autres extraits d'algues. L'activité préférentielle de ces bactéries pour l'un ou l'autre de ces extraits a amené HUMM à conclure qu'ils étaient de nature différente malgré leurs propriétés gélifiantes, semblables à celles de l'agar.

C'est ainsi qu'il regroupe les algues testées en 3 catégories: la première comprenant plusieurs Gracilaria, Chondrus crispus et Hypnea musciformis, la seconde Eucheuma isiforme, Aghardhiella tenera et Gymnogongrus griffithsiae, la troisième Gigartina acicularis.

Depuis, il a été prouvé que Chondrus crispus et Hypnea musciformis contenaient du carraghénane kappa (YAPHE - 1959 -, HOSFORD et Mc CANDLESS - 1975) alors que E. isiforme et A. tenera ont été identifiés comme hybrides contenant principalement du carraghénane iota (PENMAN et REES - 1973 - a).

Nous n'avons trouvé aucune référence sur Gymnogongrus griffithsiae mais un autre Gymnogongrus: G. furcellatus a été analysé et sa composition est similaire à E. isiforme et A. tenera. Le fait que Gigartina acicularis ait été classée dans une autre catégorie que C. crispus et H. musciformis est étonnant: plusieurs travaux ont prouvé que G. acicularis contenait du carraghénane kappa (YAPHE - 1955-1959). L'explication que nous pourrions apporter est la suivante: G. acicularis analysé par HUMM est exclusivement extrait de pieds sporophytes ne contenant pas, ou très peu (comme nous l'avons vu), de carraghénane kappa à cette étape du cycle biologique. Ce qui pourrait être confirmé par le fait que l'addition de KCl pratiqué par HUMM sur l'échantillon n'a provoqué aucun changement des propriétés mécaniques du gel. Cependant, un doute subsiste sur la nature de ce polyside (extrait de G. acicularis): le carraghénane lambda a des propriétés épaississantes et non des propriétés gélifiantes comme celles de l'échantillon de HUMM.

Toutes les souches utilisées par HUMM sauf une avaient été sélectionnées d'après leur propriété d'hydrolyser l'agar commercial. Effectivement, toutes hydrolysent plus ou moins les polysides extraits des Gracilaria, qui sont des agarophytes. La souche n'hydrolysant pas l'agar commercial n'hydrolyse ni les Gracilaria (agar) ni C. crispus, ni H. musciformis, ni G. acicularis (carraghénanes kappa et lambda), mais provoque la liquéfaction des extraits d'algues de la seconde catégorie: E. isiforme, A. tenera, G. griffithsiae. Cette souche produit probablement une enzyme hydrolysant spécifiquement le carraghénane iota.

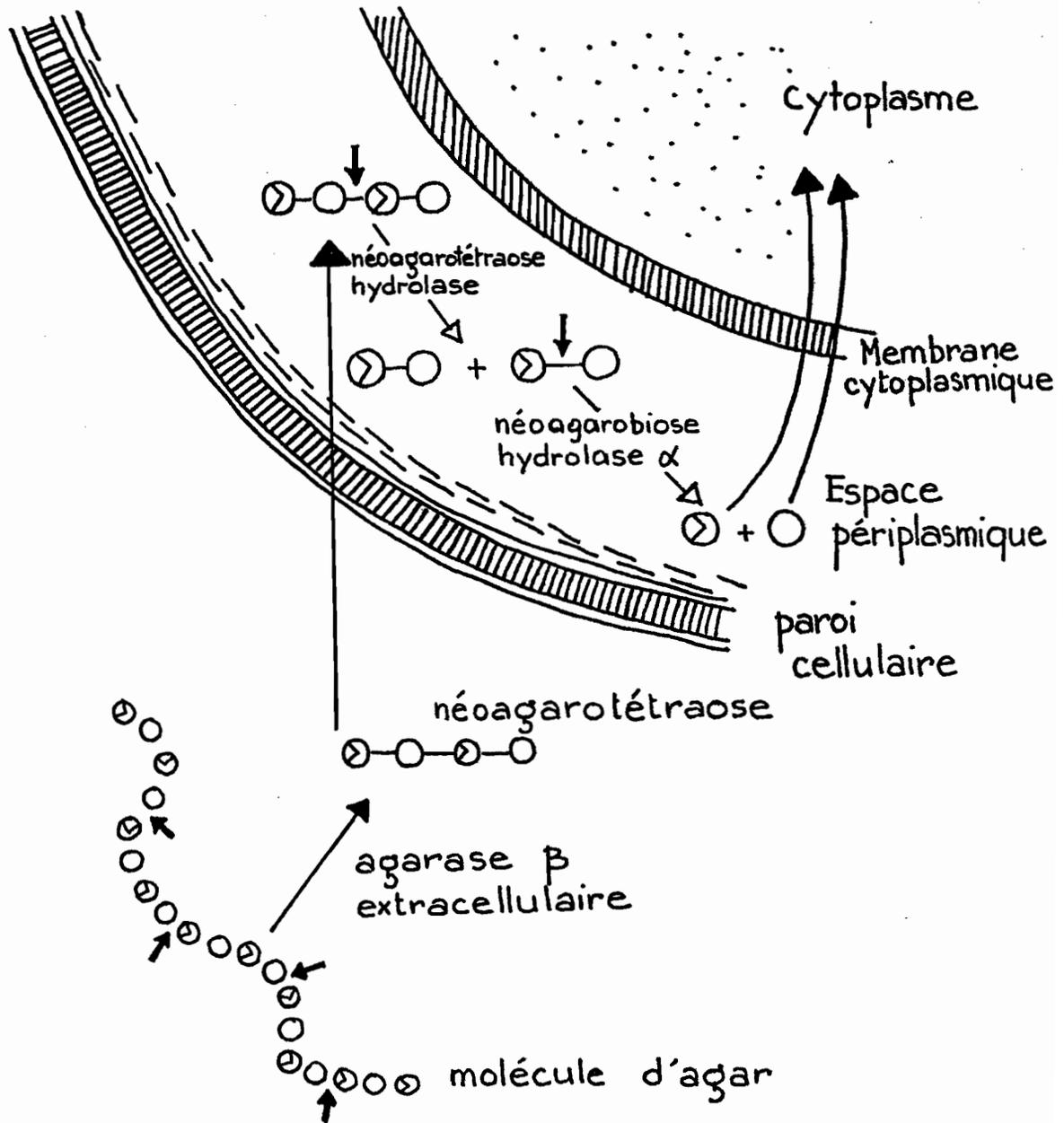
C'est le seul microorganisme sur lequel nous ayons trouvé une telle information, bien qu'elle soit peu précise.

En 1954, ISHIMATSU et coll. isolent une agarase bactérienne et l'utilisent pour déterminer la structure de l'agar. Ces travaux seront poursuivis par ARAKI (1957) et YAPHE (1957).

YAPHE et ses collaborateurs ont ensuite élucidé le mécanisme de dégradation de l'agar par la bactérie Pseudomonas atlantica (YOUNG et coll. - 1972, DAY et YAPHE - 1975, GROLEAU et YAPHE - 1977).

Trois différentes enzymes ont pu être isolées. L'une, appelée  $\beta$ -agarase est extracellulaire et dégrade le polyside en hydrolysant les liaisons  $\beta$ , produisant essentiellement un tétraholoside, le néoagarotétraose. Celui-ci est ensuite dégradé par une autre enzyme localisée dans l'espace périplasmique et principalement attachée à la membrane cytoplasmique. Cette enzyme est appelée néoagarotétraose hydrolase; elle élève la liaison  $\beta$  du tétraoside pour donner naissance à deux molécules de néoagarobiose; celles-ci sont ensuite hydrolysées par une néoagarobiose hydrolase  $\alpha$  (située aussi dans l'espace périplasmique), en galactose et anhydro-3-6-galactose. Ces monomères sont alors probablement capables de traverser la membrane cytoplasmique et d'être métabolisés par la cellule.

# Dégradation de l'agar par Pseudomonas atlantica.



○ Galactose

⊙ Anhydrogalactose

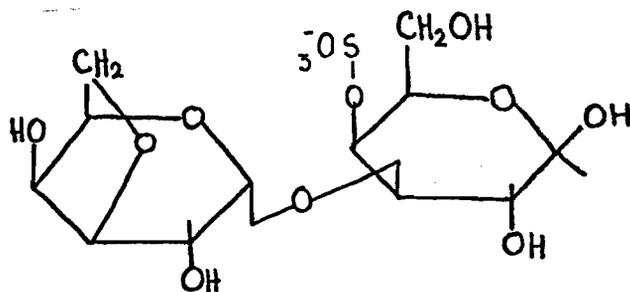
→ point d'attaque des enzymes

En 1972, CORPE a étudié la dégradation de l'agar et du carraghénane (sans spécifier s'il s'agissait de carraghénane kappa ou iota) par 6 souches bactériennes. Il est intéressant de noter que lorsqu'une de ces bactéries a la propriété de dégrader le carraghénane, elle n'hydrolyse pas l'agar et réciproquement. Les enzymes synthétisées sont donc spécifiques de l'une ou de l'autre de ces familles de galactanes. Le milieu de culture utilisé par CORPE contient du glucose et ne contient aucun polyside. Il semblerait donc que les enzymes soient constitutives des souches, et non inductibles.

En 1955, YAPHE isole une bactérie ayant la double propriété d'hydrolyser les carraghénanes kappa et lambda, et l'appelle Pseudomonas carrageenovora. WEIGL (1966-b) a montré que ces propriétés étaient dues à deux enzymes différentes et a purifié la carraghénase kappa.

JOHNSTON et Mc CANDLESS (1973) ont poursuivi l'étude et purifié la carraghénase lambda. Ces enzymes sont inductibles et lorsque la souche se multiplie sur un milieu contenant du carraghénane lambda presque pur, la quantité de carraghénase kappa est minimale.

Les produits d'hydrolyse de la carraghénase kappa ont été identifiés (WEIGL et coll. - 1966-a). L'enzyme élève les liaisons  $\beta$  de la chaîne. Les liaisons  $\alpha$ -1-3 restant intactes, le plus petit oligoside obtenu est le diholoside appelé sulfate de néocarrabiose.



sulfate de néocarrabiose

Depuis, BHATTACHARJEE et coll. (1977) ont réalisé une étude préliminaire sur l'hydrolysate de carraghénane kappa en adaptant la spectroscopie de R.M.N. (résonance magnétique nucléaire) du carbone 13, à l'identification des oligosides formés par hydrolyse. La suite de cette étude est présentée dans cette thèse.

Très récemment, Mc LEAN et coll. (1979) ont utilisé une nouvelle méthode pour purifier la carraghénase kappa (synthétisée par Pseudomonas carrageenovora). Ils ont aussi utilisé la spectroscopie de R.M.N. pour identifier les oligosides.

Les produits d'hydrolyse de la carraghénase lambda n'ont pas été identifiés. Seule leur constante de migration (Rf) sur plaque de chromatographie a été calculée (JOHNSTON - 1973).

WEIGL et YAPHE (1966 - c) ont également isolé de Pseudomonas carrageenovora une enzyme intracellulaire capable d'hydrolyser les groupes sulfates du néocarrabiose-4 sulfate (diholoside de carraghénane kappa) en néocarrabiose. Cette désulfatase fait probablement partie de la voie de dégradation du carraghénane par la souche bactérienne.

Aucune carraghénase iota n'a jamais été décrite dans la littérature. La seule référence que nous ayons trouvée est celle de HUMM (précitée).

### III: ANALYSE DES POLYOSIDES D'ALGUES ROUGES EN SPECTROSCOPIE DE R.M.N. AU CARBONE 13 (RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE)

Depuis ces dernières années, la spectroscopie de R.M.N. se révèle être une méthode rapide et précise permettant d'identifier les structures de certains polysides.

Au même moment, deux équipes, BHATTACHARJEE et coll. (1978) et YAROTSKY et coll. (1977) ont interprété les spectres R.M.N. du carbone 13 de l'agarose, du carraghénane kappa et du carraghénane iota. L'atome de carbone 1 du D-galactose résonne de la même façon chez les carraghénanes iota, kappa et l'agar, le pic qui lui est assigné est commun à tous leurs spectres. Les radicaux sulfates sont trop éloignés de ce carbone pour perturber son environnement. Le carbone 1 de l'anhydrogalactose résonne différemment suivant le degré de sulfatation de la molécule. Les groupements sulfates sont suffisamment proches pour perturber sa résonance. Le déplacement du signal correspondant à ce carbone est donc différent suivant la teneur en sulfates de la molécule.

Aucun résultat satisfaisant n'a pu être obtenu à partir du carraghénane lambda (BHATTACHARJEE - communication personnelle).

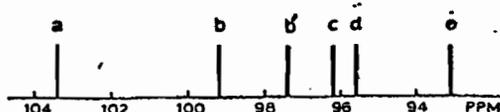
La seconde équipe (USOV et coll. - 1978 - a et b) a pu confirmer, par cette méthode, les structures identifiées par analyse chimique chez différents extraits d'algues: galactanes sulfatés, mannanes, xylanes. Elle a ainsi corrélié la nature des spectres de R.M.N., la structure des résidus en présence (tels le D-galactose, L-galactose, anhydro-galactose D et L, etc.) et la position de substituants (sulfate et méthyl) sur ces résidus (SHASHKOV et coll. - 1978).

La première équipe (HAMER et coll. - 1977) a identifié les produits de l'hydrolyse enzymatique de l'agarose; la méthode permet non seulement de déterminer le degré de polymérisation des oligosides obtenus, mais aussi de déterminer laquelle des liaisons:  $\beta$ -1-4 ou  $\alpha$ -1-3 a été hydrolysée.

Très récemment, Mc LEAN et coll. (1979) ont analysé les oligosides obtenus par hydrolyse enzymatique du carraghénane kappa (enzyme produite par Pseudomonas carrageenovora).

BHATTACHARJEE et YAPHE (1979) proposent le diagramme suivant pour l'identification de l'agar et des carraghénanes kappa et iota.

Classification of different types of agars and carrageenans by characteristic  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. signals. \*



Characteristic signals (stick-diagram) in the anomeric region of  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. spectra for different agars and carrageenans (see Table 1). Chemical shift values (15,17); a, 103.4 - 103.6 p.p.m. (102.3 - 102.6 p.p.m.); b, 99.2 p.p.m. (98.2 - 98.3 p.p.m.) b', 97.6 p.p.m. (96.6 p.p.m.); c, 96.1 - 96.4 p.p.m. (95.1 p.p.m.); d, 95.6 p.p.m. (94.6 p.p.m.); e, 93.1 p.p.m.; the chemical shift values in parenthesis are reported by Usov *et al* (19); the constant difference of about 1.0 p.p.m. between two sets of data is attributed to the variation in methods for spectral measurement; the chemical shift of 97.6 p.p.m. for the signal b' is calculated from the reported value (96.6 p.p.m.) for comparison on the same scale.

	Anomeric Signal	
	$\beta$ -Galactopyranosyl residue	3,6-anhydro- $\alpha$ -galactopyranosyl residue
Agar <sup>1</sup>	a	b
Agar sulfate <sup>2</sup>	a	b'
Furcellaran <sup>3</sup>	a	c d
Phyllopharan <sup>4</sup>	a	c d
kappa-Carrageenan <sup>5</sup>	a	c
iota-Carrageenan <sup>6</sup>	a	e
Hybrid-carrageenan <sup>7</sup> (kappa-iota)	a	c e

1, Ahnfeltia plicata; Gracilaria foliifera; Gracilaria bursapastoris; Porphyra umbilicalis. 2, Odonthalia corymbifera. 3, Furcellaria fastigiata. 4, Phyllophora nervosa. 5, Euचेuma striatum. 6, Euचेuma spinosum. 7, Chondrus crispus (traces of iota-type), Ahnfeltia concinna.

\* Photocopie des travaux de BHATTACHARJEE et YAPHE (1979)

#### IV: TAXONOMIE DES BACTERIES D'ORIGINE OCEANIQUE

La majorité des bactéries isolées de l'océan se révèlent être des bactéries hétérotrophiques, à coloration de Gram négative, munies de flagelles.

Suivant leur capacité de fermenter ou non les oses, elles peuvent être classées en deux groupes (BAUMANN et coll. - 1972). Celles ayant la propriété de fermenter les oses ont été récemment regroupées dans le genre Beneckea (BAUMANN et coll. - 1971). Celles n'ayant pas la propriété de les fermenter sont sujet à polémique. Dans le passé, plusieurs d'entre elles ont été identifiées à des genres déjà existants, tels Pseudomonas, Achromobacter, Alcaligenes, Vibrio, Flavobacterium et Arthrobacter (BRISOU - 1955, PFISTER et coll. - 1965).

Depuis, la détermination du pourcentage de guanine-cytosine (G + C%) contenu dans l'acide desoxyribonucléique (ADN) et la morphologie des flagelles ont permis une meilleure classification. Les groupes ayant des flagelles péritriches (G + C% = 53.7 à 67.8% (pourcentage molaire) (BAUMANN et coll. - 1972), G + C% = 49 à 67% (moles) (LEIFSON et coll. - 1969), ont été classés dans le genre Alcaligenes.

Ceux ayant des flagelles polaires ont été séparés en deux genres suivant leur pourcentage G + C (BAUMANN - 1972): Pseudomonas (G + C% = 57.8 à 64.7% (moles)) et un nouveau genre: Alteromonas (G + C% = 43.2 à 48% (moles)).

Auparavant les Pseudomonas d'origine océanique regroupaient tous les groupes de bactéries Gram négatives, catalase et oxidase positives, ne fermentant pas les oses et ayant un ou plusieurs flagelles polaires (BERGEY - 1974). Le nouveau groupe Alteromonas a les mêmes caractéristiques et diffère principalement par son taux G + C.

C'est ainsi que la bactérie Pseudomonas atlantica qui a la propriété d'hydrolyser l'agar (YAPHE - 1966), et dont nous avons parlé précédemment, a été reclassée récemment dans les Alteromonas après la détermination de son pourcentage G + C (LEE et coll. - 1977). Il en est de même pour plusieurs cultures bactériennes.

LEE et coll. (1977) ont proposé un début de classification à l'intérieur du genre Alteromonas, suivant quelques tests biochimiques.

Depuis la création de ce nouveau genre, de nombreuses souches bactériennes ont été identifiées comme en faisant partie. Il n'est pas rare que ces souches aient la propriété d'hydrolyser l'agar (bien que cette propriété ne soit pas utilisée dans leur taxonomie). Aucun renseignement n'est généralement donné sur l'hydrolyse des carragénanes par ces bactéries.

## V: UN NOUVEAU CRITERE DE CLASSIFICATION DES ALGUES ROUGES

Les algues ont été classées en 4 groupes principaux: les algues bleues, vertes, rouges et brunes, suivant la composition de leur pigments et suivant certains critères physiologiques (BOLD et WYNNE - 1978).

A l'intérieur de chaque groupe, la classification est basée principalement sur des critères morphologiques et histologiques. Il semblerait que ces critères ne suffisent pas pour établir une bonne classification. Dans le cas des algues rouges, il est vraisemblable que certains critères biochimiques devraient être pris en considération, telle la composition des parois cellulaires de l'algue.

En 1957, STOLOV et SILVA regroupent certains genres et espèces d'algues rouges suivant la nature du polyoside constituant leur paroi cellulaire; en 1957, la nature chimique de ces polyosides est peu connue et STOLOV propose trois groupes basés sur leurs propriétés physiques: agars, carraghénanes et gélanes.

Plus tard, YAPHE (1959) utilise deux enzymes spécifiques: une agarase (produite par Pseudomonas atlantica), et une carraghénase kappa (Pseudomonas carrageenovora) pour déterminer la nature de ces polyosides. Il prouve ainsi la présence d'agar ou de carraghénane chez 30 espèces appartenant à 6 ordres sur sept des Rhodophyceae. Ce résultat l'incline à penser que la nature du polyoside est un critère de classification intéressant.

En 1978, Mc CANDLESS reprend cette idée et présente le problème posé chez certaines familles dans lesquelles se trouvent à la fois des agarophytes et des carraghénophytes. Le problème devient encore plus complexe dans la famille des Phylloporaceae, dans laquelle non seulement les genres appartiennent aux deux groupes, mais où on trouve dans un même genre (Ahnfeltia) deux espèces qui sont carraghénophytes: A. durvillaei (STANCIOFF et STANLEY - 1969, PENMAN et REES - 1973-a) et A. concinna (SANTOS et DOTY - 1975) et une espèce, Ahnfeltia plicata, qui appartient aux agarophytes (YAPHE - 1959).

Depuis, BHATTACHARJEE et coll. (1979) ont analysé en spectroscopie de R.M.N. les polyosides d'A. plicata et d'A. concinna. Ils ont confirmé ces résultats et ont mis en évidence chez A. concinna la présence de carraghénanes iota et kappa en quantités à peu près égales. Ces résultats sont appuyés par ceux de l'hydrolyse enzymatique du polyoside: il est dégradé par la carraghénase kappa de Pseudomonas carrageenovora et par la carraghénase iota que nous avons caractérisée (BHATTACHARJEE et coll. - 1977). A l'heure actuelle les phycologistes pensent créer une nouvelle espèce chez les Phylloporaceae et appeler les Ahnfeltia carraghenophytes: Ahnfeltiopsis.

En conclusion, la composition chimique des parois cellulaires de l'algue, semble être un bon critère dont il faut tenir compte dans la classification des algues rouges. Il reste cependant un énorme travail à fournir quant à l'identification de la structure des polyosides de toutes les Rhodophyceae.

C/ - MATERIEL ET METHODES

I: LES CULTURES BACTERIENNES

I-1 ORIGINE

Toutes les souches bactériennes avec lesquelles nous avons travaillé sont d'origine océanique. Pour plus de facilité, nous les avons numérotées de 1 à 8. La culture #9 que nous citerons souvent est une souche isolée par YAPHE (1955), appelée Pseudomonas carrageenovora (YAPHE - 1959).

La souche #1 a été isolée à partir de plants d'Eucheuma spinosum poussant sur le rivage d'Hawaï dans 10 à 20 cm d'eau. Les cultures #2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ont été isolées à partir de mélange d'algues californiennes en décomposition. Ces algues nous ont été fournies par le Dr I. ABBOT (Hopkins Marine Station - Université Stanford - Californie - U.S.A.). La souche #9 fait partie de la collection personnelle du Dr YAPHE (Université Mc Gill).

I-2 ISOLEMENT

Les échantillons d'algues en décomposition nous sont parvenus en suspension dans quelques millilitres d'eau de mer. Après agitation, plusieurs gouttes de liquide ont été prélevées et étalées sur boîtes de Pétri contenant du milieu H<sub>1</sub> (dont la composition est décrite dans l'annexe) solidifié par 1.2% de carraghénane iota.

Les boîtes ont été placées dans un incubateur à 22°C pendant une semaine. Au bout de 24 heures, les colonies autour desquelles nous pouvions observer une liquéfaction du carraghénane ont été prélevées et isolées sur boîtes d'agar avec vérification de leur propriété hydrolysante sur boîtes de carraghénane iota. Toutes les 24 heures, nous avons vérifié si de nouvelles colonies dégradant le carraghénane apparaissaient.

### I-3 CONSERVATION

Les souches sont lyophilisées et conservées à  $-5^{\circ}\text{C}$ . Parallèlement, une culture de chaque souche est maintenue sur tube d'agar incliné (milieu  $\text{H}_1$ , agar: 1.2%) à  $4^{\circ}\text{C}$ .

### I-4 CULTURE EN MILIEU LIQUIDE

#### a. Conditions

Pendant la première partie de nos travaux concernant la souche #1 (détermination des conditions optimales de croissance), nous avons utilisé comme inoculum la suspension (dans 2 ml de milieu  $\text{H}_1$ ) d'une culture de 24 heures sur tube d'agar solide incliné. Cette suspension est inoculée dans un erlen-meyer d'un litre contenant 400 ml de milieu  $\text{H}_1$ .

Nous avons ensuite standardisé nos conditions: un fil de platine d'une culture de 24 heures sur tube d'agar est utilisée pour inoculer dans un erlen de 125 ml contenant 20 ml de milieu  $\text{H}_1$  (carraghénane: 0.25%). Le flacon est placé à  $22^{\circ}\text{C}$  dans un incubateur à table agitante (PSYCHROTHERM - NEW BRUNSWICK Scientific Co. - vitesse de rotation: 150 r.p.m.). Au bout de 9 à 10 heures, 2 ml de cette culture sont inoculés dans un erlen d'un litre contenant 200 ml de milieu  $\text{H}_1$  (0.25% de carraghénane) (taille de l'inoculum: 1%). Les flacons sont incubés dans les mêmes conditions que le flacon de 125 ml.

Lors de l'expérience corrélant la croissance des cellules et la synthèse d'enzyme par la souche #1, nous avons inoculé 900 ml de milieu  $\text{H}_1$  contenant 1 g de carraghénane iota (volume de l'erlen = 4 litres) à l'aide d'un inoculum de 100 ml préalablement incubé à  $22^{\circ}\text{C}$  dans un erlen de 500 ml pendant 10 heures (milieu  $\text{H}_1$  - 0.1% de carraghénane iota). La culture est alors placée à  $22^{\circ}\text{C}$  sur table agitante.

#### b. Mesure de production de biomasse et mesure de pH

##### b.1 Mesure de biomasse par densité optique

Les mesures de densité optique en cours de croissance sont

faites sur des échantillons de 3 ml à l'aide d'un spectrophotomètre SPECTRONIC 70 - BAUSCH and LOMB - à 660 nm.

#### b.2 Mesure de biomasse par la technique des poids secs

Nous avons dû utiliser cette technique pour la souche #1 qui floccule en cours de phase exponentielle. Le volume des échantillons à prélever est plus important que pour une mesure par densité optique. Ceci explique pourquoi nous avons utilisé un litre de culture au lieu de 200 ml pour cette manipulation.

A intervalle régulier, trois fois 12 ml de milieu sont prélevés. Chaque échantillon est centrifugé à 18 000 g pendant 15 minutes à 4°C (centrifugeuse SORVALL - RC - 2). Le surnageant est aussitôt congelé pour le dosage ultérieur de l'activité enzymatique. Chaque culot est lavé deux fois avec une solution de NaCl à 2.5% puis filtré sur filtre Millipore taré (diamètre des pores: 0.45  $\mu$ ). Les filtres sont séchés à 80°C pendant 12 heures et stockés dans un dessiccateur avant d'être pesés. La biomasse à un temps donné de la croissance sera la valeur moyenne calculée des 3 échantillons.

#### b.3 Mesure du pH en cours de croissance

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre BECKMAN - expandomatic SS-2.

## II: VERIFICATION DE L'ACTIVITE DES PREPARATIONS D'ENZYMES

Pour vérifier l'activité des enzymes intra et extra-cellulaires, un microhydrolysate est préparé dans les alvéoles d'une plaque pour tests sérologiques: on ajoute et on mélange 0.05 ml de préparation d'enzyme à 0.15 ml de solution de carraghénane (0.5% dissous dans de l'eau distillée). Les alvéoles sont alors couvertes de ruban adhésif pour empêcher l'évaporation. La nature de l'hydrolysate est vérifiée 18 à 24 heures plus tard par chromatographie sur couche mince.

Les préparations enzymatiques ainsi testées sont de natures diverses: le milieu de culture contenant l'enzyme extra-cellulaire, les extraits intra-cellulaires et les préparations d'enzyme extra-cellulaire concentrées au sulfate d'ammonium.

### II.1 ENZYMES EXTRA-CELLULAIRES PRESENTES DANS LE MILIEU DE CULTURE

Pour tester l'activité d'un milieu de culture, nous avons procédé comme suit: quelques millilitres de milieu sont centrifugés, le surnageant est dialysé en présence de tampon TRIS 0.005 M pH = 7.5 pendant quelques heures et une goutte de la préparation est testée comme décrit précédemment.

### II.2 ENZYMES INTRA-CELLULAIRES

Pour tester la nature des éventuelles enzymes intra-cellulaires, nous avons traité les cellules aux ultra-sons. Ceux-ci cassent les parois cellulaires et provoquent la libération du contenu cellulaire. Nous avons aussi testé l'effet d'un détergent, le Triton X-100 et d'un sel, le chlorure de lithium. Le Triton, qui solubilise les membranes bactériennes, est souvent utilisé pour extraire les protéines fixées sur la membrane (HARTMANN et coll. - 1974). Le traitement au chlorure de lithium est beaucoup moins drastique que celui au Triton; il provoque une augmentation de la force ionique du milieu, d'où un changement de perméabilité des membranes et la libération de certaines protéines (INGRAM - 1973). Ce sel est soluble dans l'eau à très fortes concentrations, d'où son utilité.

a. Traitement aux ultra-sons

Les cellules, après centrifugation du milieu de culture (200 ml), sont lavées deux fois dans une solution saline (solution de MacLeod - voir annexe) à 4°C, et sont remises en suspension dans un volume minimal (10 à 15 ml) de tampon TRIS 0.005 M, pH = 7.5 (4°C). Elles sont ensuite lysées par traitement aux ultra-sons pendant 3 minutes dans un bain de glace (SONIFIER - cell disruptor - W-350 - BRANSON Sonic Power Co. - Subsidiary of SMITHLINE Corporation). La suspension est alors centrifugée pendant 15 mn à 18 000 g à 4°C et le surnageant dialysé dans du tampon TRIS 0.01 M pH = 7.5 (4 litres) pendant 15 heures; l'activité enzymatique du dialysat est testée par la méthode précédente.

b. Traitement au Triton X-100 et au chlorure de lithium

Ces deux traitements ont été effectués sur les cellules intactes et sur les débris cellulaires après lyse des cellules aux ultra-sons. Les débris cellulaires sont lavés deux fois dans une solution saline (MacLeod) à 4°C et remis en suspension dans un volume minimal de tampon TRIS 0.01 M, pH = 7.5 (10 à 15 ml) contenant soit du Triton (0.2% ou 0.02%), soit du chlorure de lithium (6 M ou 3 M).

Les suspensions de cellules ou de débris cellulaires sont placées dans un bain de glace, agitées pendant 20 mn puis centrifugées à 18 000 g. Le surnageant est dialysé pendant 15 heures dans du tampon TRIS 0.01 M, pH = 7.5 (4 litres) et son activité enzymatique est testée.

### III. PREPARATION D'ENZYME EXTRA-CELLULAIRE - CONCENTRATION PAR PRECIPITATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

Le milieu de culture (inoculé suivant nos conditions standard), après 15 heures d'incubation, est centrifugé à 18 000 g (température: 4°C). Le surnageant est centrifugé une seconde fois dans les mêmes conditions. (Lors de la préparation de quantités importantes d'enzyme, 5 fois 200 ml du milieu sont utilisés). L'enzyme contenue dans le surnageant est alors précipitée par le sulfate d'ammonium (65% de saturation pour la souche #1, 70% pour les autres cultures - voir annexe) dans un bain de glace. Dès que le sel est dissous par agitation lente (30 mn), la solution est centrifugée pendant 30 mn à 18 000 g (température: 4°C). Le culot est remis en suspension dans un volume minimal (5 ml pour 200 ml de milieu de culture) de tampon TRIS 0.005 M pH = 7.5 et dialysé pendant 6 à 7 heures à 4°C (solution de dialyse: 2 litres de tampon TRIS, 0.005 M, pH = 7.5, renouvelés toutes les deux heures).

Le dialysat est alors centrifugé, une goutte est prélevée pour vérifier l'activité de l'enzyme, et la solution est congelée.

#### IV: PREPARATION DES OLIGOSIDES DE CARRAGENANES

##### IV.1 HYDROLYSE ENZYMATIQUE ET PRECIPITATION A L'ETHANOL

A 20 ml d'une solution de carraghénane (0.5%) sont ajoutés 2 ml de solution d'enzyme concentrée. Le pH est vérifié (pH = 7 à 7.5). La température d'hydrolyse est de 25°C pour toutes les enzymes sauf l'enzyme #1 (40°C). 48 heures plus tard, l'hydrolyse est arrêtée par addition d'éthanol (2 volumes). La fraction non dégradée (ou partiellement dégradée) du polyside précipite et est séparée des oligosides de faibles poids moléculaires restés en solution, par centrifugation à 18 000 g pendant 15 mn. Le culot est séché à 50°C pendant 15 heures et pesé. Le surnageant est concentré sous vide au rotavapor, remis en suspension dans quelques millilitres d'eau distillée, testé sur plaque de chromatographie sur couche mince et lyophilisé.

##### IV.2 SEPARATION DES OLIGOSIDES SUR GEL DE DEXTRANES (SEPHADEX)

20 mg d'hydrolysat lyophilisé (fraction soluble dans l'éthanol) sont placés sur une colonne de Sephadex (Pharmacia - Suède) G-25 fine ou G-50 superfine (suivant la nature de l'hydrolysat). Le volume de l'échantillon est de 2 ml.

Caractéristiques des colonnes: diamètre 2.6 cm, longueur du lit de gel = 40 cm, volume vide des colonnes G-50 superfine:  $V_0 = 68$  ml, et G-25 fine:  $V_0 = 76$  ml.

Les fractions (2 ml) sont collectées à l'aide d'un collecteur de fractions ULTRORAC LKB-7000 (Suède) et analysées par chromatographie sur couche mince. Leur contenu en oses est déterminé par la méthode au phénol-acide sulfurique de DUBOIS et coll. (1956) décrite plus loin. Les tubes contenant un oligoside pur sont mélangés, concentrés sous vide à 30°C et lyophilisés. Le critère de pureté que nous utilisons est l'obtention d'une seule tache en chromatographie sur couche mince, pureté qui sera ensuite testée par spectroscopie de R.M.N.

V: CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Différentes qualités de plaques ont été testées: cellulose micro-cristalline, silicagel, cellulose MN 300 et cellulose CC-41 (Whatman). Les trois premiers sont commercialisés par Hachery, Nagel et Co. Différentes combinaisons de solvants ont été essayées (Butanol, pyridine, eau: 2/1/1, Butanol, acide acétique, eau: 4/1/2, Butanol, éthanol, eau: 1/1/1, 2/2/1, 3/2/2.5, 3/2/2, 3/2/1). Les rapports sont donnés en volumes.

La meilleure résolution a été obtenue sur plaques de cellulose MN 300 et sur cellulose WHATMAN CC.41. éluées par un mélange Butanol, éthanol, eau 3/2/2.5.

La cellulose MN 300 est préparée par addition de 190 ml d'eau distillée à 30 g de poudre. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un mixer virtis "45" modèle super 30 et ensuite, étalé sur plaques de verre (20 cm x 20 cm) à l'aide d'un appareil "automatic T.L.C. coater" CAMAG 21602 (épaisseur de la cellulose = 300  $\mu$ ).

Les plaques de cellulose CC-41 sont préparées de la même façon, seules changent les proportions du mélange (60 g de poudre pour 160 ml d'eau distillée).

## VI: ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES MASSES MOLAIRES D'ECHANTILLONS DE CARRAGHENANES AVANT ET APRES TRAITEMENT ENZYMATIQUE

### VI-1 PREPARATION DES HYDROLYSATS

A 5 ml d'une solution à 0.5% de carraghénane est ajouté 1 ml de solution concentrée d'enzyme. Le pH est vérifié (pH = 7 à 7.5). La température d'hydrolyse est de 25°C. 24 heures plus tard, un autre millilitre de solution d'enzyme est ajouté à la solution; 120 heures après la première addition d'enzyme, l'hydrolysate est testé sur plaque de chromatographie et lyophilisé.

### VI-2 CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE SEPHAROSE CL-4B

Nous avons étudié la distribution des masses molaires des hydrolysats à 50°C, par chromatographie sur gel de SEPHAROSE CL-4B (Pharmacia - Suède). La colonne utilisée est une colonne à double paroi, permettant dans l'enveloppe extérieure, la circulation d'eau à 50°C (colonne Pharmacia K16-40). L'eau circule à l'aide d'une pompe; elle est chauffée à 50°C dans un bain-marie à l'aide d'une résistance chauffante. Un thermostat permet de garder la température constante.

Les caractéristiques de la colonne sont les suivantes: diamètre 1.6 cm, hauteur du gel dans la colonne 33 cm. Etant donnée la température de travail (50°C), le solvant et l'échantillon doivent être dégazés avant le passage sur la colonne.

Pour ce faire, l'éluant est porté à ébullition et l'échantillon placé dans un bain-marie bouillant, pendant 10 mn. L'éluant utilisé est une solution de NaCl 0.5 M ajustée à pH = 7.0 à l'aide d'une solution de soude 0.0025 M.

Un millilitre d'échantillon contenant 2 mg d'hydrolysate lyophilisé dilué dans la solution de NaCl et NaOH, est placé sur la colonne et élué à un débit d'environ 10 ml/heure. Des fractions de 1.15 ml sont collectées à l'aide du collecteur ULTRORAC LKB-7000 (Suède). Les oses sont dosés

dans chaque fraction par la méthode de Dubois et coll. (1956).

Des dextrans de différentes masses molaires (DX 2000, DX 250, DX 70, DX 40, DX 10, Pharmacia - Suède), du glucose et du néocarratétrase kappa, nous ont permis de calibrer la colonne.

VII: DOSAGES

VII-1 OSES: METHODE AU PHENOL-ACIDE SULFURIQUE (Dubois et coll. - 1956)

A un échantillon de 2 ml contenant de 10 à 100 µg de galactose, ajouter 0.05 ml d'une solution à 80% (poids/poids) de phénol. Ajouter 5 ml d'acide sulfurique concentré. Agiter le mélange au vortex. Lire la densité optique à 485 nm. La coloration est stable pendant 1 heure. Le D-galactose est utilisé comme référence.

VII-2 DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE PAR LA METHODE VISCOSIMETRIQUE - VISCOSIMETRE D'OSTWALD

a. Principe

Son principe est de suivre la diminution de la viscosité du substrat (carraghénane) en présence d'enzyme, en fonction du temps. Le viscosimètre d'Ostwald est un tube comportant deux graduations. La viscosité de la solution est directement proportionnelle à son temps d'écoulement entre ces deux graduations et à sa densité.

$$\eta = k \times t \times d$$

où  $\eta$  est la viscosité de la solution,

$k$  est la constante caractéristique du tube,

$t$  est le temps d'écoulement de la solution à analyser entre les 2 graduations,

$d$  est la densité de la solution.

Nous parlerons en général de viscosité relative

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0}$$

$\eta_0$  étant la viscosité du tampon utilisé pour la dilution du polyside, en l'occurrence le tampon TRIS, 0.1 M, pH = 7.2

d'où 
$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{k \times t \times d}{k \times t_0 \times d_0} = \frac{t \times d}{t_0 \times d_0}$$

$t_0$  et  $d_0$  étant respectivement le temps d'écoulement et la densité du tampon.

Le rapport  $\frac{d}{t_0 \times d_0}$  est constant pour une concentration de substrat donnée et pour un tampon donné.

$$\frac{d}{t_0 \times d_0} = K \Rightarrow \boxed{\eta_{rel} = K \times t} .$$

Il suffit donc de mesurer  $t$ , et le rapport nous donne la valeur de la viscosité à une constante près. Tous nos résultats seront exprimés en utilisant la valeur  $t = \frac{\eta_{rel}}{K}$ .

#### b. Matériel

Le tube viscosimétrique d'Ostwald que nous utilisons a les caractéristiques suivantes: le temps d'écoulement du tampon TRIS 0.1 M, pH = 7.2 varie de 69 à 70 secondes.

Pendant les mesures, la température doit être parfaitement constante. Le tube viscosimétrique est donc placé dans un bain muni d'un thermostat dont la température est contrôlée à l'aide d'un thermomètre ayant une précision de  $\pm 0.2^\circ\text{C}$ . La température à laquelle nous avons décidé de travailler est  $30^\circ\text{C}$ .

Le substrat est une solution de carraghénane iota (E. spinosum #31210) diluée à 0.15% dans un tampon TRIS 0.1 M, pH = 7.2. Cette solution est préalablement équilibrée à  $30^\circ\text{C}$ , ainsi que le tampon TRIS 0.1 M, pH = 7.2, utilisé ultérieurement pour diluer l'enzyme.

#### c. Méthode

Chaque échantillon est décongelé à température ambiante juste avant d'être analysé. Il est conservé dans un bain de glace.

Les volumes de solution enzymatique et de substrat utilisés dans le tube viscosimétrique sont les suivants:

- 4 ml de solution de carraghénane (0.15% dans du tampon TRIS 0.1 M, pH = 7.2)
- 0.9 ml du même tampon.

Le tout est mélangé en faisant buller de l'air dans le tube à l'aide d'une poire. Au temps 0, 0.1 ml de solution enzymatique préalablement diluée ou non suivant le cas, est ajouté et mélangé de la même manière que précédemment. Pour une dilution finale au  $\frac{1}{10^e}$ , la solution enzymatique ajoutée au substrat n'est pas diluée. Pour une dilution finale au  $\frac{1}{100^e}$ , elle est préalablement diluée au  $\frac{1}{10^e}$ .

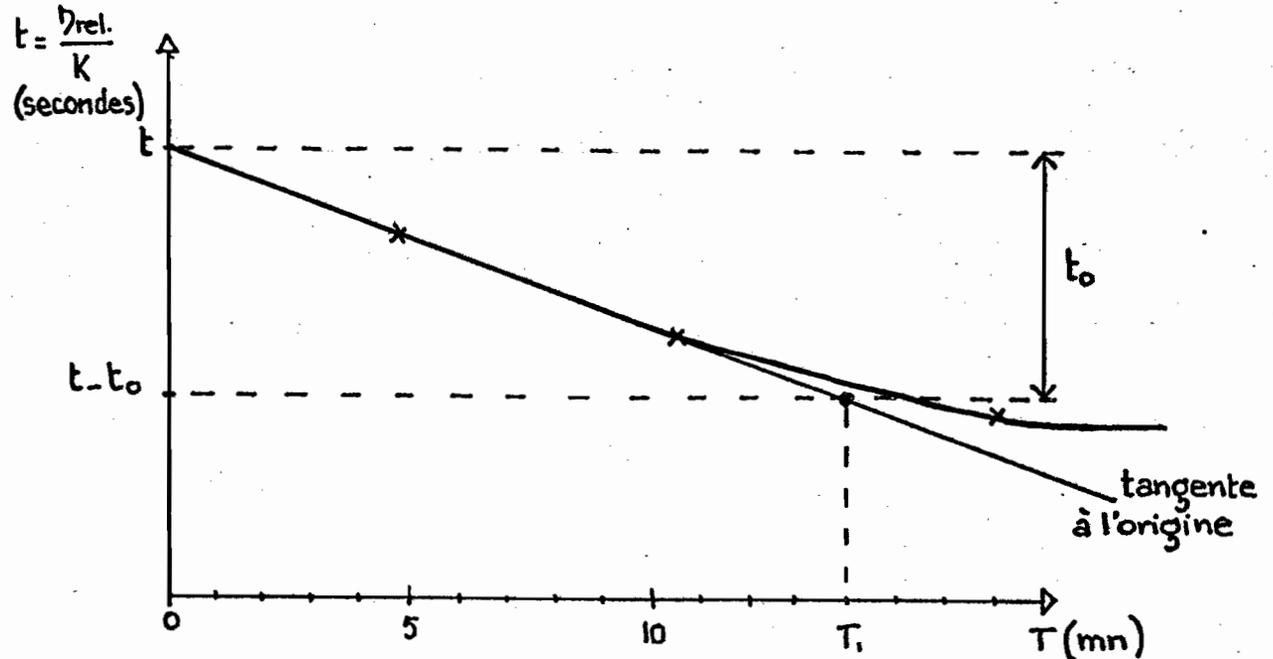
Toute activité enzymatique est calculée à partir de la vitesse initiale de réaction enzyme-substrat. Cette vitesse est représentée par la tangente à l'origine, de la courbe représentant la variation de  $\frac{\eta_{rel}}{K} = t$  en fonction du temps T (durée de l'hydrolyse).

Pour que les résultats soient exploitables, il faut donc diluer suffisamment l'enzyme afin que le début de la courbe soit une droite. Le temps reporté en abscisse (T) est le temps noté au début de la mesure plus la demi-valeur du temps d'écoulement de la solution.

#### d. Définition d'une unité d'activité enzymatique

Nous définissons une unité d'activité enzymatique comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour provoquer à 30°C, et au bout de 10 mn, une baisse de viscosité d'une solution de carraghénane à 0.15% (dans du tampon TRIS - pH = 7.2, 0.1 M), égale à une unité de viscosité relative.

e. Exploitation de la courbe  $t = \frac{\eta_{rel}}{K} = f(t)$



T = temps noté au début de la mesure, additionné de la demi-valeur du temps d'écoulement

Soit  $E_0$  le nombre d'unités d'activité enzymatique contenues dans l'échantillon donnant cette courbe. D'après la définition d'une unité,  $E_0 = \frac{10}{T_1}$ .

VIII: SPECTROSCOPIE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (R.M.N.) AU  
CARBONE 13

Le spectromètre utilisé est un appareil BRUKER WP-80/DS FT (20.1 MHz). Les échantillons sont dilués dans de l'eau deutérée à une concentration comprise entre 30 et 80 mg/ml.

La gamme des spectres utilisée est de 1.2 à 1.5 KHz et l'angle de pulsation de  $60^{\circ}$  à  $80^{\circ}$  (ce qui équivaut à un temps de réponse de 4 à 5.5  $\mu$ s). Les durées de répétition (repetition times) sont comprises entre 0.682 et 0.819 secondes et le nombre de passages (number of scans) de 40 000 à 290 000.

Les températures auxquelles les produits ont été analysés varient suivant leur degré de polymérisation: les oligosides ont été analysés à  $35^{\circ}\text{C}$ , les fractions résistantes (après hydrolyse enzymatique) à  $50^{\circ}\text{C}$  et les polymères non dégradés à  $90^{\circ}\text{C}$ .

Les mesures de déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont effectuées par rapport à un étalon interne: le méthanol, puis recalculées par rapport au triméthylsilane (TMS). (Le déplacement chimique du méthanol,  $\delta_{\text{MeOH}}$ , a été calculé par rapport au TMS utilisé en étalon externe,  $\delta_{\text{MeOH}} = 50.1$  p.p.m.).

L'erreur sur  $\delta$  varie suivant que les produits analysés sont des polysides ou des oligosides. Elle est de  $\pm 0.2$  p.p.m. pour les premiers et de  $\pm 0.04$  p.p.m. pour les seconds. Les résultats publiés précédemment par BHATTACHARJEE et coll. (1977-1978-1979), HAMER et coll. (1977) sont sujets à une légère modification. Les auteurs ont calculé les valeurs de déplacements chimiques en utilisant  $\delta_{\text{MeOH}} = 50.35$  p.p.m. Toutes leurs valeurs doivent donc être diminuées de 0.2 p.p.m.

Lors de l'interprétation des spectres, nous nous intéresserons uniquement à la région comprise entre 110 et 90 p.p.m. dans laquelle résonnent les atomes de carbone no 1 des résidus galactose et anhydrogalactose.

Parmi les autres pics entre 90 et 60 p.p.m., seul le pic sortant aux environs de 62 p.p.m. a été identifié, il correspond au carbone no 6 des résidus galactose. Un signal apparaît parfois à 61 p.p.m., il correspond au tampon TRIS contaminant la préparation.

D/ - RESULTATS

I: DESCRIPTION DES CULTURES SUR MILIEU SOLIDE H<sub>1</sub>

Les souches ont été cultivées sur boîtes de Pétri contenant le milieu H<sub>1</sub> solidifié par 1.2% de polyoside (agar, carraghénane kappa ou carraghénane iota). Les colonies ont une apparence différente suivant les cultures et suivant le polyoside utilisé.

I.1 SUR AGAR (Bacto-agar)

Seule la souche #7 se différencie des cultures #1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 et 9. Ses colonies sont rondes ou irrégulières et de couleur jaune d'or. Les colonies des autres cultures sont rondes, régulières, brillantes, convexes, de couleur blanc crème. Les cultures #1, #7 et #8 poussent plus lentement que les autres.

Au bout d'une dizaine de jours de culture, les colonies #1 restent collées à l'agar et s'entourent d'une zone grisâtre. Mais aucune des souches ne liquéfie le gel ni ne forme de dépression autour des colonies.

I.2 SUR CARRAGHENANE KAPPA (Eucheuma cottonii, échantillon #482409)

Les colonies ont les caractéristiques précitées. Seule la culture #7 provoque une très légère déformation du gel autour des colonies. Les autres ne provoquent ni liquéfaction, ni dépression.

I.3 SUR CARRAGHENANE IOTA (Eucheuma spinosum, échantillon #582409)

Toutes les souches provoquent une liquéfaction du gel. Cependant nous avons observé quelques différences entre elles.

a. Cultures #1, 2, 3, 4, 5, 6, 8

Chaque colonie pousse en pellicule fine et ronde (figures 3 et 3'), sous laquelle le gel se liquéfie. Les colonies 2, 4 et 8 présentent un point blanc crème au centre. Les colonies 1, 5 et 6 envahissent

très rapidement la surface du gel qui est alors complètement liquéfié. Le même processus se produit pour les autres souches, mais plus lentement. Le gel hydrolysé par la culture #1 est beaucoup plus liquide que le gel hydrolysé par les autres souches.

b. Culture #7

Les colonies se multiplient en pellicule de forme très irrégulière, sous laquelle et autour de laquelle le gel se liquéfie. Elles diffusent très peu sur la surface du gel. Leur couleur est jaune d'or.

c. Culture #9 (Pseudomonas carrageenovora)

Elle pousse très lentement sur carraghénane iota. Au bout de 24 heures, on observe une légère dépression autour de minuscules colonies rondes, beiges. Puis ces colonies diffusent très lentement dans le gel (figures 2 et 2'); au niveau de la zone de diffusion, le gel se transforme en solution épaisse.

Figure 1 : culture #1 sur gel d'agar

Figure 2 : culture #1 sur gel de carraghénane iota

Figure 3 : culture #9 sur gel de carraghénane iota

-les gels sont préparés dans le milieu de culture H<sub>1</sub>

-concentration des polyosides : 1.2%



Figure 1

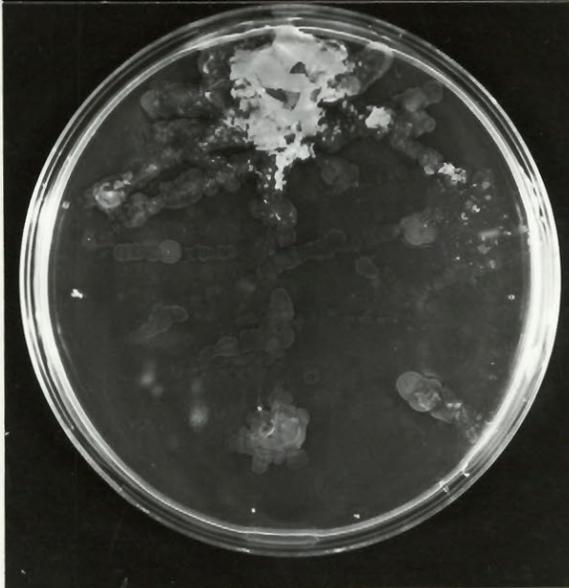


Figure 2



Figure 3

Agrandissements des figures 1, 2 et 3.

Figure 1' : culture #1 sur gel d'agar

Figure 2' : culture #1 sur gel de carraghénane iota

Figure 3' : culture #9 sur gel de carraghénane iota



Figure 1'

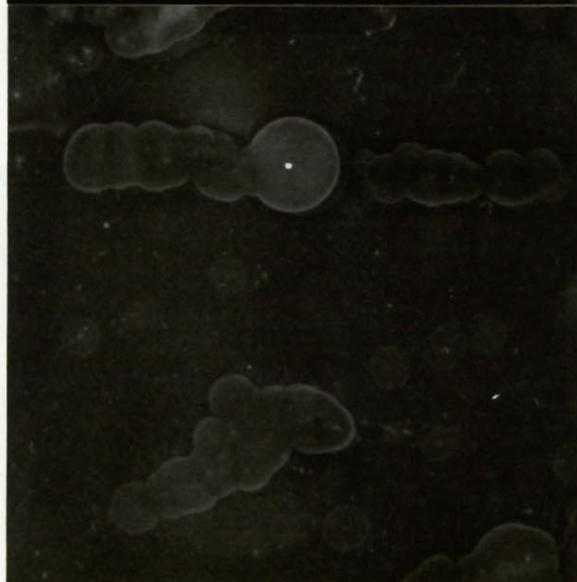


Figure 2'



Figure 3'

## II: DESCRIPTION DES CULTURES SUR MILIEU LIQUIDE

Les courbes de croissance sur carraghénane iota (échantillon #582407) ont été relevées pour chaque culture, ainsi que la variation du pH du milieu, en cours de croissance. (Les conditions de croissance sont décrites dans le paragraphe Matériel et Méthodes). Nous avons également déterminé, en fonction du temps, l'apparition d'enzymes provoquant la liquéfaction d'une solution de carraghénane iota.

Pour les souches #2 à 8, ce test est fait de visu. Pour la souche #1, l'activité enzymatique est dosée par viscosimétrie.

### II.1 CULTURE #1: CROISSANCE ET PRODUCTION D'ENZYME - PARAMETRES INFLUENCANT LA PRODUCTION D'ENZYME

#### a. Production d'enzyme en fonction de la croissance.

La culture #1 floccule en cours de phase exponentielle de croissance. Nous n'avons donc pu utiliser la méthode spectrophotométrique (mesure de densité optique) usuelle pour déterminer la production de biomasse. Nous avons utilisé la méthode des poids secs. La concentration du carraghénane iota dans le milieu de culture est de 0.1%, la température de croissance 20°C, et le volume de milieu 1 litre.

Les valeurs de biomasse et d'enzyme extra-cellulaire produites en fonction du temps sont reportées dans le tableau 1. L'enzyme est dosée par viscosimétrie à pH = 7.6; les résultats sont exprimés en unités enzymatiques par ml de milieu de culture, telles que définies dans la description de la méthode. La biomasse est exprimée en mg par ml de milieu de culture.

La figure 4 nous montre que la production d'enzyme atteint une valeur maximale aux  $\frac{3}{4}$  de la phase exponentielle de croissance. L'enzyme est ensuite inactivée en phase stationnaire, tandis que le pH, dont la valeur diminuait depuis le début de la production d'enzyme, augmente de nouveau.

	Temps (heures)	pH	biomasse en mg/ml	activité enzymatique en unités/ml
	0	7.23	0.051	17
	2h30	7.2	0.059	-
	3h00	-		32
	6h00	7.04	0.089	-
	8h00	6.94	0.110	95
	10h00	6.91	0.141	158
	12h00	6.88	0.160	172
	14h00	-	-	118
	16h00	6.92	0.167	40
	16h45	6.99	-	20
	18h00	7.02	-	-
	21h30	7.08	0.160	-
	22h45	-	-	15
	25h	7.14	0.154	-
	28h	7.16	0.153	18

Tableau 1

Culture #1. Production de biomasse  
et d'enzyme extracellulaire  
en cours de croissance sur carraghénane iota

Fig. 4 - Culture #1 - Courbes de croissance  
(sur carraghénane iota), de pH et de production d'enzyme

légende: ●—● biomasse

○—○ pH

●---● activité enzymatique

température de croissance : 20°C

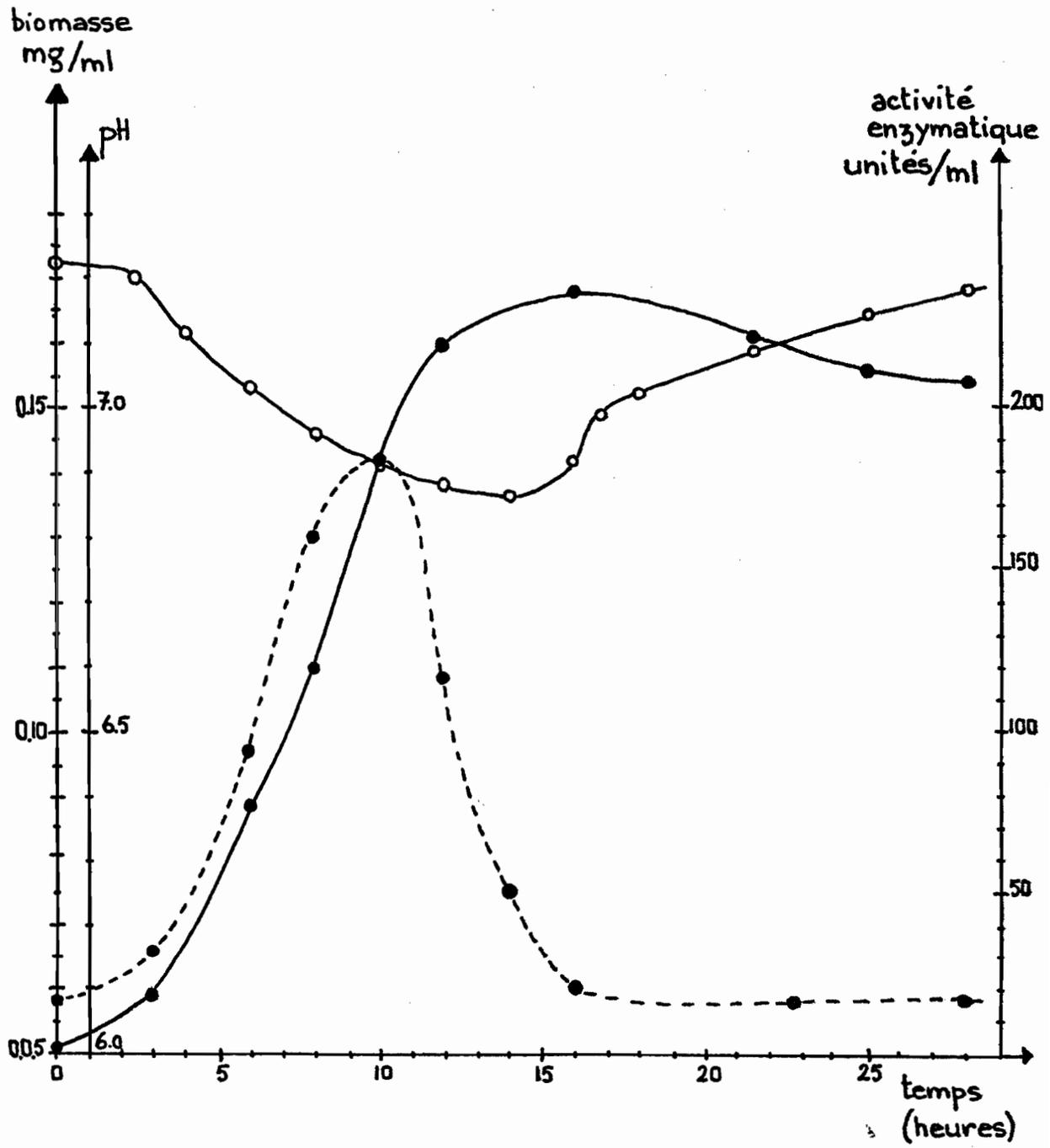


Figure 4

b. Paramètres influençant la production d'enzyme extra-cellulaire.

Nous avons étudié l'influence de trois paramètres sur la production d'enzyme extra-cellulaire par la culture #1: l'influence de la concentration du carraghénane iota (substrat) dans le milieu de culture (à température d'incubation constante), l'influence de la température d'incubation (à concentration en substrat constante) et l'influence d'un tampon dans le milieu de culture.

b.1 Concentration du carraghénane iota dans le milieu de culture.

Nous avons inoculé la souche #1 dans plusieurs flacons contenant chacun une concentration différente de carraghénane iota (0%, 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5%). Dans chaque cas la courbe de production d'enzyme présente la même allure que précédemment (figure 4). Nous avons conservé les valeurs correspondant à la production maximale et les avons reportées sur graphe en fonction de la concentration du substrat correspondante (figure 5). Nous reportons aussi dans le tableau de valeurs (tableau 2) le temps  $\zeta$ , temps au bout duquel la production d'enzyme est maximale pour une concentration donnée de substrat. Le volume de milieu utilisé est 400 ml, la température d'incubation, 20°C.

La production d'enzyme est nulle ou non détectable à concentration de substrat nulle. Elle augmente rapidement jusqu'à une concentration de 0.1%, valeur au-dessus de laquelle elle tend à se stabiliser.

b.2 Influence de la température d'incubation.

Nous avons procédé de la même manière que précédemment: à chaque température correspond une valeur maximale de production d'enzyme que nous avons reportées sur graphe en fonction de la température correspondante (figure 6). Nous reportons également la valeur du temps  $\zeta$  que nous avons défini dans le paragraphe précédent.

La concentration du carraghénane iota dans le milieu de culture est de 0.1%. Nous avons testé les températures suivantes: 15°, 19°, 23°, 30°, 35°C. Nous observons que la production d'enzyme décroît linéairement avec l'augmentation de température, dans la gamme des valeurs choisies.

concentration en substrat (%)	production maximale d'enzyme (u./ml)	$\bar{\sigma}$ - temps (heures)
0	0	-
0.025	35	8
0.10	75	14
0.25	89	18
0.50	105	27

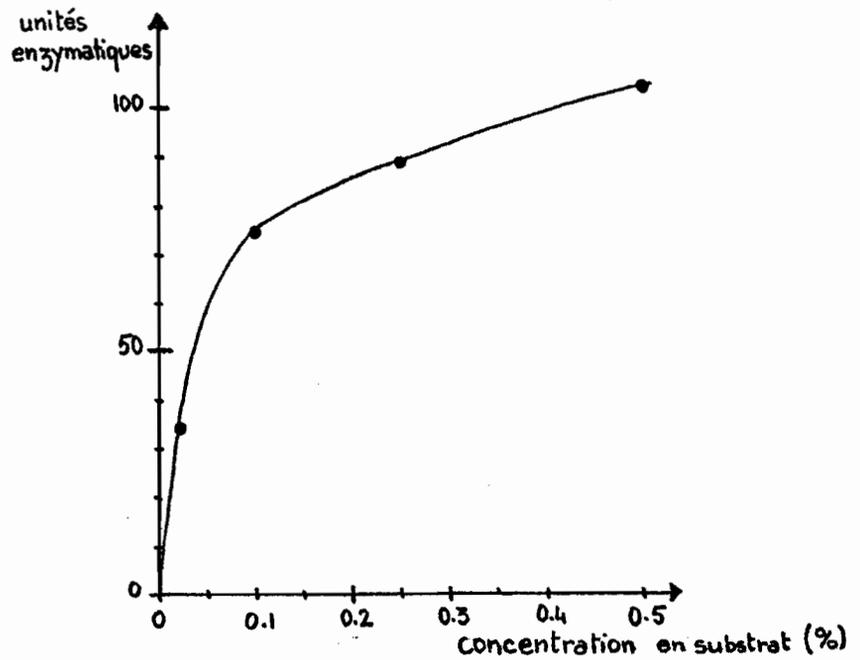


Tableau 2 et Figure 5 : culture #1 -  
Effet de la concentration du substrat dans le milieu  
de culture, sur la production d'enzyme.

température (°C)	production maximale d'enzyme (u./ml)	τ-temps (heures)
15°	116	35 h
19°	90	17 h 30
23°	75	14 h
30°	45	13 h
35°	11	7 h 30

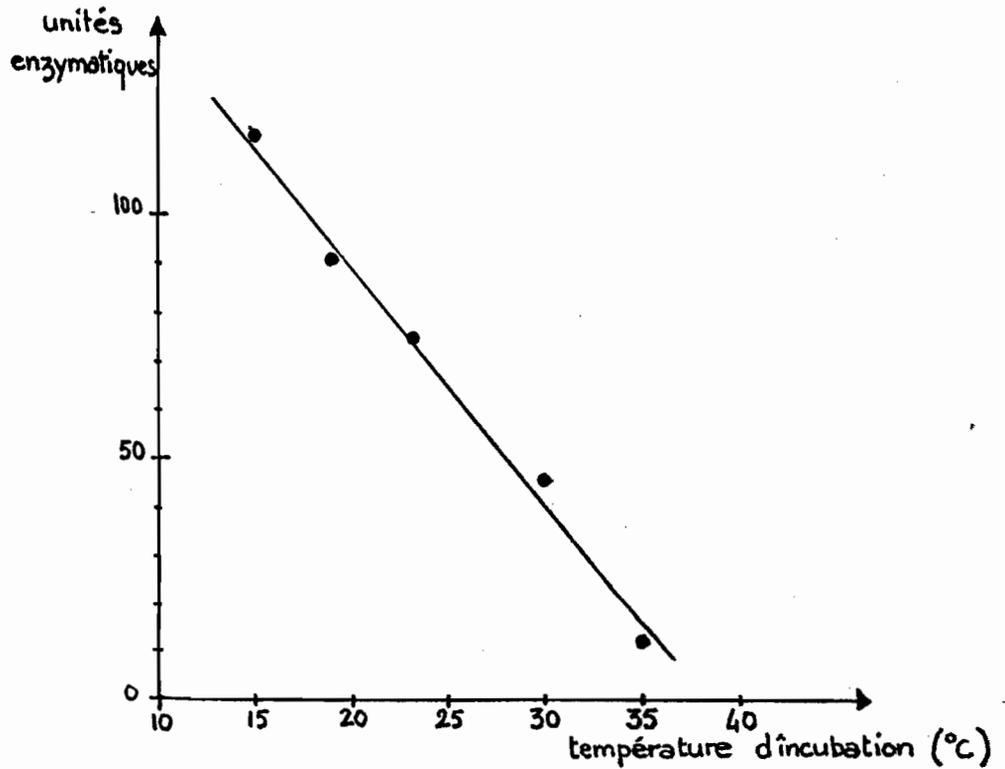


Tableau 3 et Figure 6 : culture #1.  
Effet de la température d'incubation  
sur la production d'enzyme.

La valeur du temps  $\zeta$  décroît également: l'augmentation de température active la croissance de la souche.

### b.3 Influence du tampon.

Nous avons testé l'influence de différents tampons (0.1 N, pH = 7.2) dans le milieu de culture: tampon phosphate, tampon HEPES (N-2-Hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonic acid) et tampon TRIS (Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane).

Le tampon phosphate précipite en présence de carraghénane iota, probablement à cause des ions calcium présents dans l'extrait polysidique; le tampon HEPES ralentit la croissance de la souche #1; le tampon TRIS n'a aucun de ces inconvénients mais doit être utilisé à une molarité de 0.1 M pour que son influence se fasse sentir sur la production d'enzyme (augmentation de 20%). A cette concentration, le tampon contamine les préparations d'enzymes extra-cellulaires et perturbe l'interprétation ultérieure des spectres de R.M.N. du carbone 13 (résonance magnétique nucléaire) des hydrolysats préparés avec ces enzymes.

## II.2 COURBES DE CROISSANCE DES SOUCHES #2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 - PRODUCTION D'ENZYME EXTRA-CELLULAIRE

Les souches sont inoculées dans 200 ml de milieu H<sub>1</sub> contenant 0.25% de carraghénane iota (Eucheuma spinosum - échantillon #582407) suivant les conditions standard décrites dans le paragraphe Matériel et Méthodes. La croissance est mesurée par densité optique. Les valeurs sont reportées dans les tableaux suivants (tableaux 4 et 5). Les figures 7, 8 et 9 représentent les courbes de croissance et les variations de pH pour chaque souche. L'activité enzymatique est reportée en signe positif ou négatif suivant que l'enzyme est présente ou absente. L'intensité de la liquéfaction de la solution de carraghénane iota, par le milieu de culture centrifugé, est figurée par la présence d'un ou plusieurs signes positifs.

L'allure générale des courbes de variation du pH est la même pour les souches #2, 3, 4, 5, 6 et 9; après une légère baisse, en cours de phase exponentielle, le pH remonte en phase stationnaire. Les cultures

Tableaux 4 et 5 - Valeurs de la densité optique (D.O.)  
et du pH des milieux de culture en cours de croissance

- milieu de culture H<sub>1</sub> (0.25% carraghénane iota)
- température : 22°C

		culture #2		culture #3		culture #4	
	Temps (heures)	pH	D.O. 660nm	pH	D.O. 660nm	pH	D.O. 660nm
	0	7.00	0.1	7.10	0.06	7.08	0.06
	2h00	6.78	0.14	6.69	0.17	6.67	0.17
	4h00	6.63	0.38	6.59	0.44	6.55	0.45
	6h15	7.1	0.95	6.96	0.92	7.03	0.95
	8h30	7.11	1.05	7.14	1.1	7.14	1.1
	10h30	7.12	1.15	7.20	1.1	7.20	1.15
	13h00	7.26	1.1	7.04	1.1	—	1.15
	15h30	7.62	1.2	7.20	1.1	—	1.1
	17h30	7.73	1.2	7.60	1.1	7.45	1.1
	19h45	7.83	1.28	7.76	1.1	7.70	1.1
	22h00	7.93	1.15	7.87	1.1	7.81	1.1
	24h00	7.96	1.2	7.94	1.1	7.89	1.1
		culture #5		culture #6		culture #7	
	Temps (heures)	pH	D.O. 660nm	pH	D.O. 660nm	pH	D.O. 660nm
	0	7.08	0.06	7.04	0.11	7.08	0.06
	2h00	6.55	0.19	6.71	0.16	7.32	0.06
	4h00	6.62	0.55	6.61	0.42	7.15	0.09
	6h15	7.06	1.00	7.13	1.0	6.82	0.14
	8h30	7.14	1.30	7.17	1.1	6.64	0.23
	10h30	7.16	1.4	7.3	1.25	6.56	0.34
	13h00	—	1.4	7.34	1.3	6.38	0.60
	15h30	7.35	1.4	7.56	1.3	6.37	1.05
	17h30	7.45	1.4	7.71	1.3	6.42	1.20
	19h45	7.63	1.4	7.80	1.3	6.13	1.25
	22h00	7.69	1.4	7.84	1.3	5.55	1.25
	24h00	7.80	1.35	7.95	1.25	5.30	1.3

Tableau 4 - Valeurs de la densité optique (D.O.) et du pH des milieux de culture en cours de croissance

	culture #8			culture #9		
	Temps	pH	D. O. 660nm	Temps (heures)	pH	D.O. 660nm
	0	7.06	0.07	0	-	0.07
	2h00	7.05	0.07	2h00	7.46	0.07
	4h00	6.90	0.12	4h00	7.32	0.10
	6h30	6.74	0.22	6h00	7.05	0.20
	8h30	6.75	0.35	8h00	7.00	0.38
	11h	6.82	0.66	14h00	7.21	0.80
	13h	6.85	1.09	16h00	7.40	1.00
	15h	6.75	1.80	18h00	7.36	1.15
	17h	6.49	2.0	20h00	7.42	1.25
	19h30	5.25	2.0	22h00	7.76	1.30
	21h30	-	2.0	25h45	8.20	1.30
	24h00	5.2	2.0			

culture #9 - croissance sur carraghénane KAPPA (0.25%)

Temps (heures)	pH	D. O. 660nm
0	6.2	0.04
1h45	6.25	0.06
3h30	6.38	0.16
5h45	-	0.68
7h00	-	1.02
8h15	6.6	1.40
9h45	6.68	1.70
13h30	6.72	1.70
15h15	6.75	1.70
19h15	-	1.80
21h45	7.1	1.85
23h15	7.25	1.90
24h30	7.45	1.90

Tableau 5

Figures 7, 8 et 9 - Enzymes 2,3,4,5,  
6,7, 8 et 9 - Courbes de croissance -  
production d'enzyme extracellulaire -

●—● courbe de croissance

○—○ courbe de pH

+ présence d'enzyme extracellulaire

- absence d'enzyme

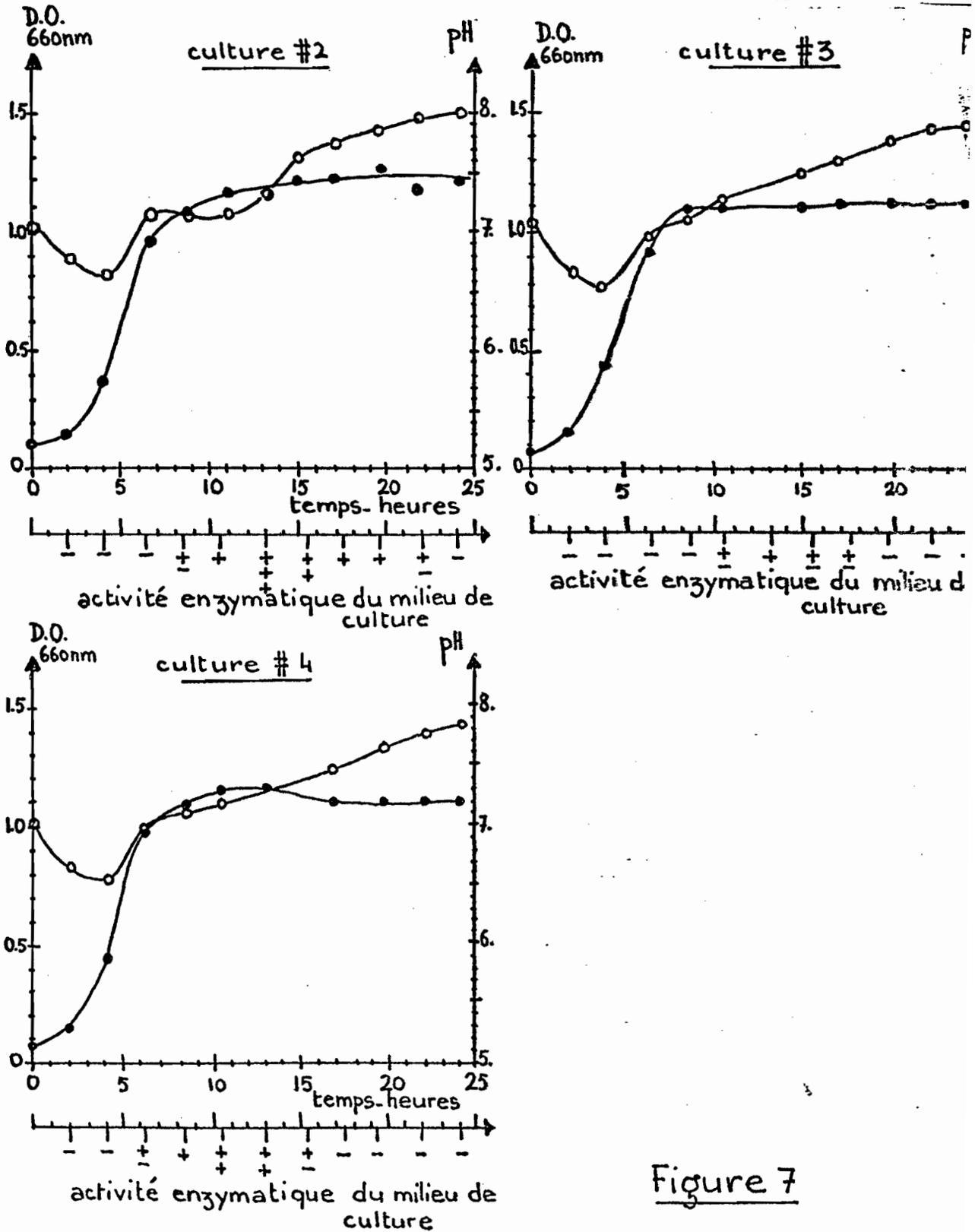


Figure 7

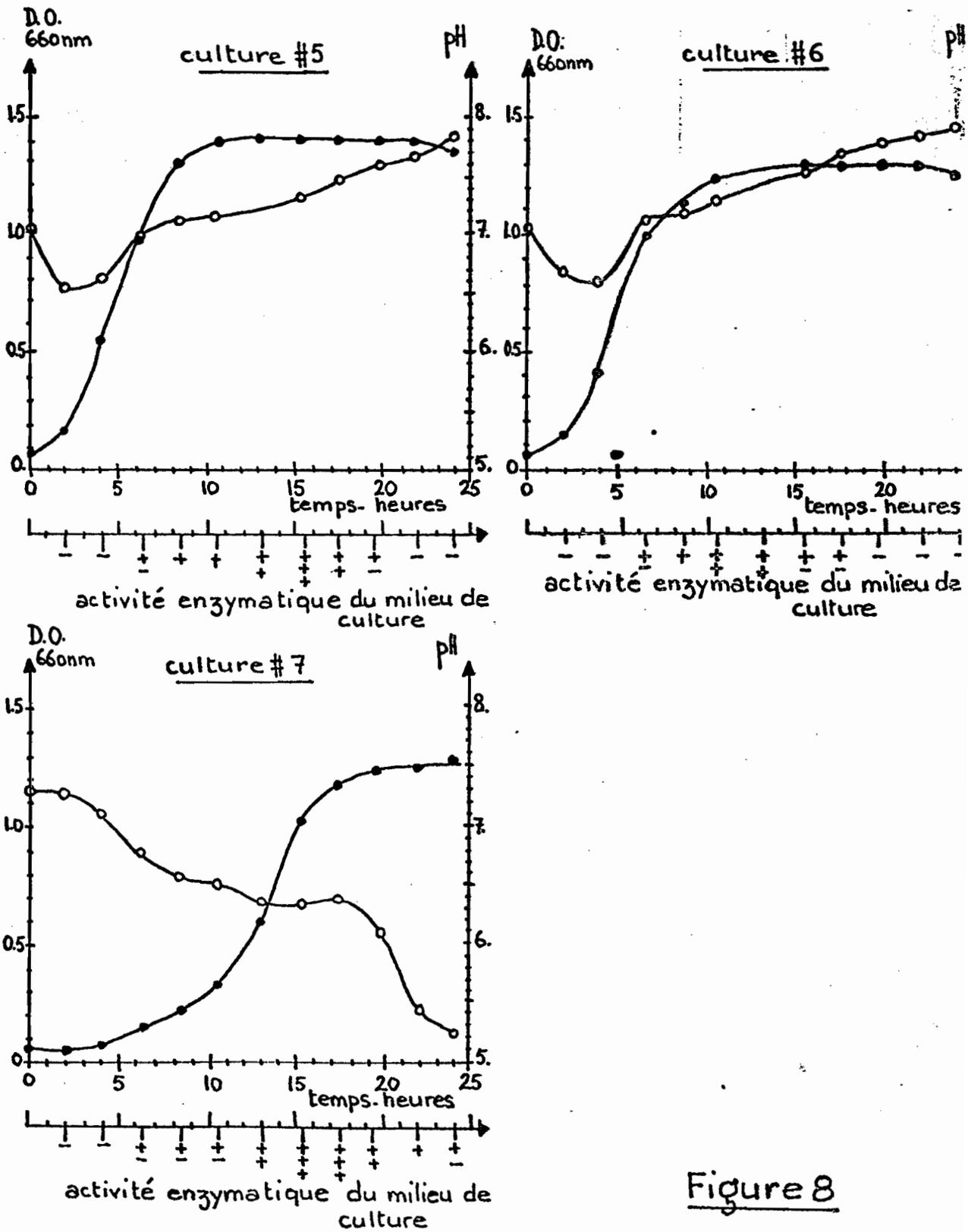


Figure 8

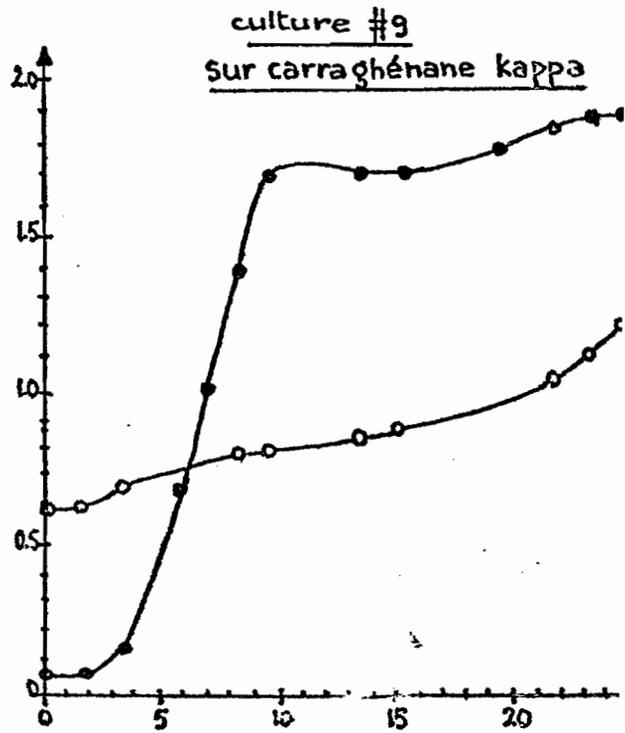
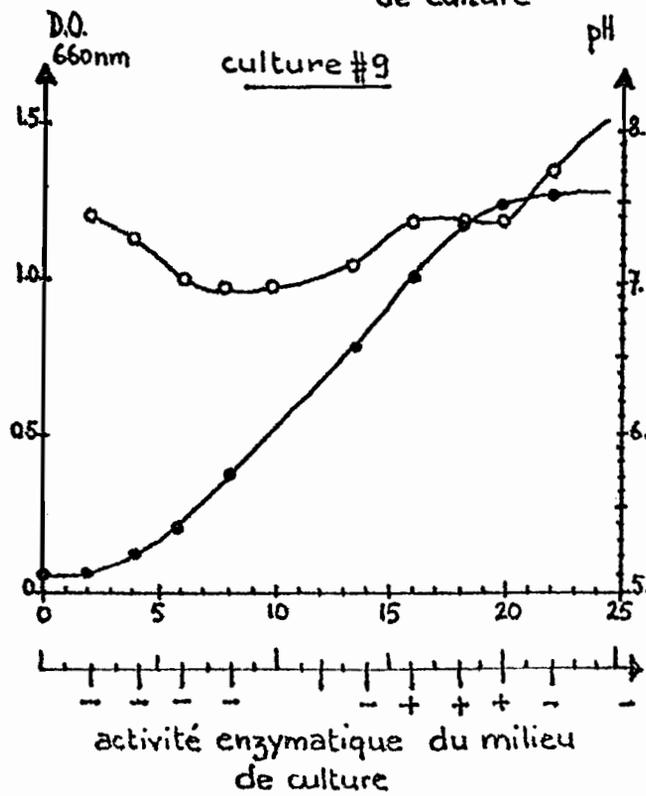
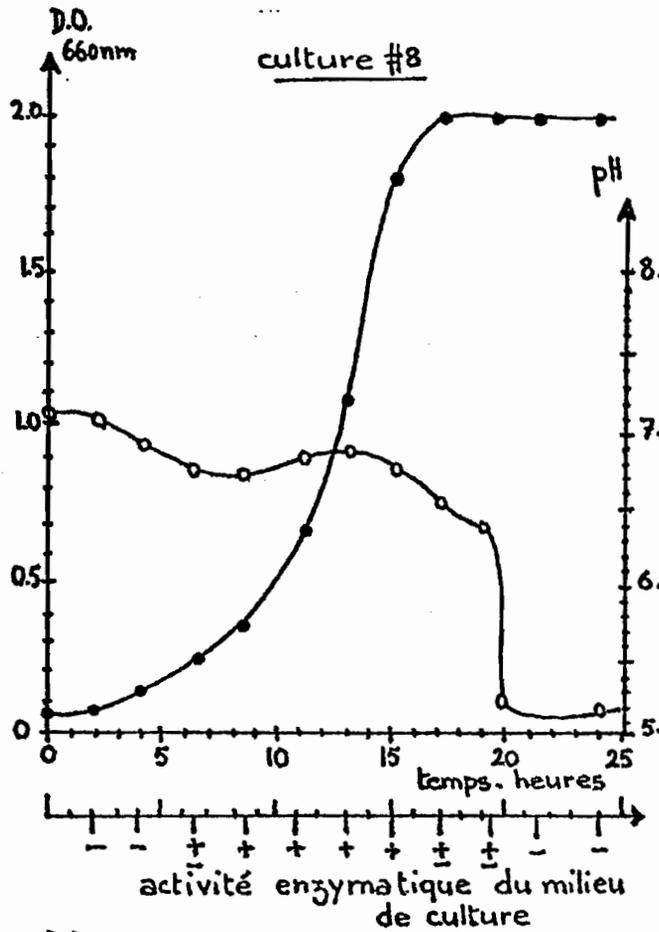


Figure 9

#7 et #8 se différencient des autres par une chute brusque du pH dès que la croissance atteint la phase stationnaire.

Ces deux souches, ainsi que la souche #9, se multiplient plus lentement que les précédentes. Les cultures #7 et #8 atteignent la phase stationnaire après environ 17 heures de croissance, #9 après 20 heures, alors que la moyenne est d'environ 8 heures pour #2, 3, 4, 5 et 6. La souche #8 est celle qui produit le plus de biomasse.

Seule la croissance de la souche #9 a été étudiée sur carraghénane kappa. Les conditions d'inoculation et la concentration du carraghénane sont les mêmes que précédemment. Nous remarquons que la croissance sur kappa est beaucoup plus rapide que sur iota et que la biomasse produite sur kappa est plus importante.

Toutes les souches produisent des enzymes capables de liquéfier le carraghénane iota. Ces enzymes apparaissent en cours de phase exponentielle pour la plupart et disparaissent en phase stationnaire. La liquéfaction du substrat est plus ou moins intense suivant la souche bactérienne; nous avons estimé l'activité des enzymes en comparant visuellement la liquéfaction des échantillons après 48 heures d'hydrolyse. Nous avons ainsi classé les souches suivant l'activité relative de leurs enzymes. La plus active est la souche #7 suivie dans l'ordre par #5, 2, 4, 6, 8, 3, la dernière étant la souche #9.

### III: QUELQUES PROPRIETES DES ENZYMES

#### III-1 ACTIVITE DE L'ENZYME #1 EN FONCTION DU pH

Nous avons utilisé plusieurs solutions de substrat (carraghé-  
nane iota: 0.15% dans du tampon TRIS 0.1 M) ayant chacune un pH différent  
(5.6, 6.2, 7.1, 7.6, 8.1, 8.6, 9.2, 9.8) et avons mesuré, par viscosimétrie,  
l'activité de l'enzyme #1 sur ces substrats. L'activité de la solution  
enzymatique utilisée est de 40 unités viscosimétriques par ml (mesurée dans  
les conditions standard décrites dans le paragraphe Matériel et Méthodes).

Les valeurs de pH reportées dans le tableau suivant sont celles  
des solutions substrats mesurées à 30°C. Il a été vérifié que l'addition de  
0.1 ml de solution d'enzyme ne provoquait aucune variation de pH et que  
celui-ci restait constant au cours de l'hydrolyse.

La courbe obtenue (figure 10) présente un maximum à pH = 7.6.

#### III-2 PRECIPITATION DES ENZYMES PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

Les enzymes produites par les cultures #1, 2, 3, 4, 5, 6, 7  
et 9 précipitent après addition de sulfate d'ammonium (70% de saturation).

Les essais de précipitation de l'enzyme extra-cellulaire de  
la culture #8 se sont avérés négatifs. Deux concentrations de sulfate  
d'ammonium ont été testées: 70% et 40%, ne donnant pas plus de résultats  
l'une que l'autre.

pH	5.6	6.25	7.1	7.6	8.1	8.6	9.2	9.8
activité enzymatique unités/ml	13	23	27	50	40	30	22	13

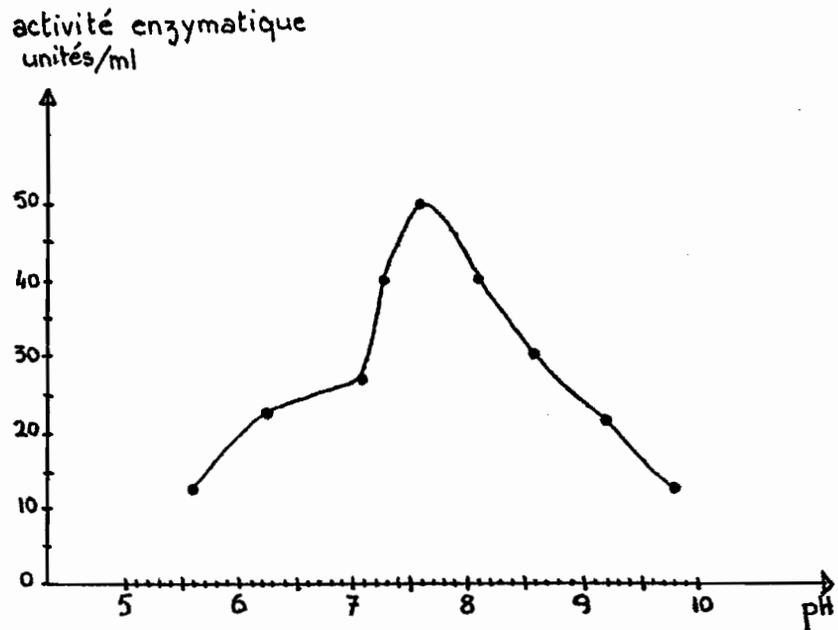


Tableau 6 et Figure 10 - Influence du pH sur l'activité enzymatique de la culture #1

IV: ANALYSE QUALITATIVE DE L'ACTIVITE DES ENZYMES SYNTHETISEES PAR LES CULTURES #1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ET 9 APRES CROISSANCE SUR CARRAGHENANE IOTA

IV-1 ENZYMES EXTRA-CELLULAIRES

L'activité des enzymes (après précipitation par le sulfate d'ammonium et dialyse) synthétisées par les cultures #1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 9 a été testée sur solutions de carraghénane kappa et de carraghénane iota.

Les hydrolysats obtenus sont analysés par chromatographie sur couche mince, la fraction non dégradée est précipitée à l'éthanol, séchée et pesée.

- a. Analyse des hydrolysats par chromatographie sur couche mince.

Lors de notre présentation, l'enzyme synthétisée par une culture et l'hydrolysat obtenu à l'aide de cette enzyme auront le même numéro que la souche correspondante.

La figure 11 nous montre le chromatogramme des hydrolysats #1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 9 de carraghénanes kappa et iota. Nous obtenons une bonne séparation des oligosides. Chacun est représenté par une tache à laquelle nous avons attribué une lettre et un numéro: K pour les taches obtenues à partir des hydrolysats de carraghénane kappa; I pour celles obtenues à partir de carraghénane iota. Les indices 1, 2, 3, 4 et 5 (qui n'ont aucun rapport avec le numéro des cultures) différencient les taches d'un même hydrolysat en fonction de leur distance à l'origine.

Nous avons calculé la valeur  $R_{GAL}$  ( $R_{GAL} = \frac{\text{distance de migration de la tache X}}{\text{distance de migration du galactose}}$ ) pour chacun des oligosides. Les distances sont mesurées du centre de la tache à l'origine.

Les hydrolysats #2, 3, 4, 5, 6 et 9 ont des chromatogrammes identiques quelle que soit la nature du substrat (kappa ou iota) (figure 11).

Figure II - Chromatogrammes des carraghénanes  
kappa et iota hydrolysés par les enzymes extra-  
cellulaires # 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 9

- Chromatographie sur plaque de cellulose MN300

- solvant : butanol / éthanol / eau (3/2/2.5)

( le numéro des enzymes correspond au numéro  
respectif de la culture par laquelle elles sont  
synthétisées )

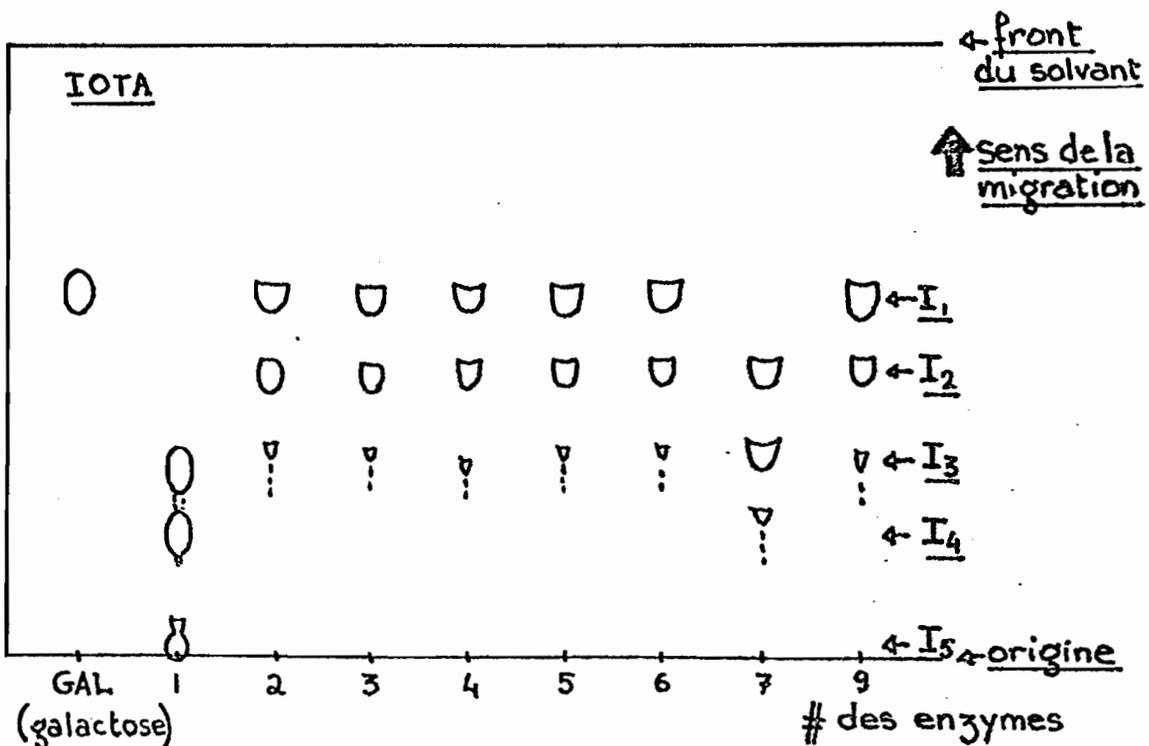
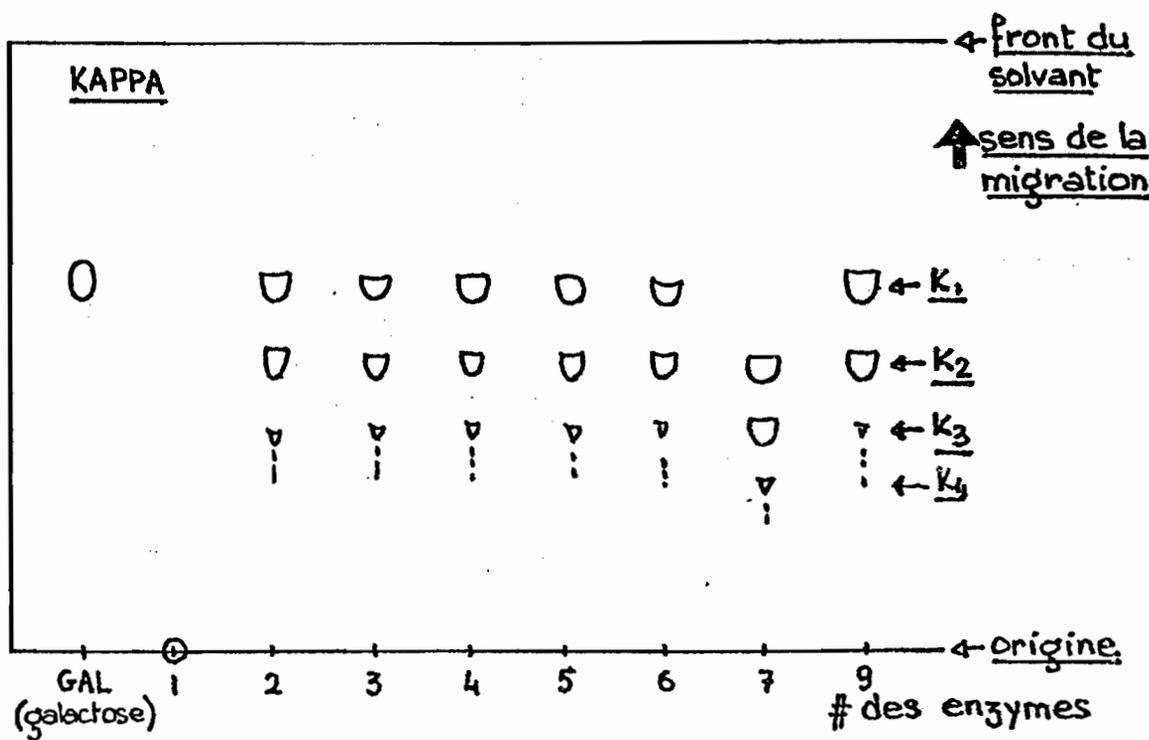


Figure II - Chromatogrammes des carraghénanes kappa et iota hydrolysés par les enzymes #1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 9.

Trois taches sont présentes dans les 2 cas:  $K_1$  ( $R_{GAL} = 0.97 - 1.0$ ),  $K_2$  ( $R_{GAL} = 0.73 - 0.75$ ),  $K_3$  ( $R_{GAL} = 0.51 - 0.54$ ), et  $I_1$  ( $R_{GAL} = 0.97 - 1.0$ ),  $I_2$  ( $R_{GAL} = 0.73 - 0.75$ ),  $I_3$  ( $R_{GAL} = 0.51 - 0.54$ ). Les chromatogrammes des hydrolysats #1 et #7 ont une distribution différente: certaines taches sont absentes. Pour l'hydrolysat #1, aucun oligoside ne migre dans le cas du carraghénane kappa; dans le cas du carraghénane iota, les taches  $I_1$  et  $I_2$  sont absentes; la tache correspondant à  $I_3$  est beaucoup plus intense que pour les autres hydrolysats; deux nouvelles taches apparaissent:  $I_4$  ( $R_{GAL} = 0.32 - 0.34$ ) et  $I_5$ .

Les hydrolysats #7 des carraghénanes iota et kappa sont identiques. Trois taches sont présentes dans les deux cas:  $K_2$ ,  $K_3$ ,  $K_4$  et  $I_2$ ,  $I_3$ ,  $I_4$ . Le tableau suivant (tableau 7) corrèle les oligosides et la valeur respective de  $R_{GAL}$  avec leur présence éventuelle dans les hydrolysats, suivant les enzymes utilisées.

Pour chaque oligoside, nous avons reporté deux valeurs de  $R_{GAL}$ . Ce sont les deux valeurs extrêmes mesurées au cours de cette étude. La légère variation de ces valeurs peut être due à des différences de concentration. Nous avons remarqué que la présence de tampon TRIS, ou de sels, affecte également la migration des oligosides. Les taches des hydrolysats de carraghénane kappa sont toujours plus intenses que celles obtenues pour le carraghénane iota. Cette différence est encore plus marquée pour l'hydrolysat #1. (La concentration doit être augmentée pour avoir des taches de la même intensité que celles des hydrolysats kappa).

Le chromatogramme de l'hydrolysat #8 n'est pas reproduit ici, étant donné que nous n'avons pu concentrer l'enzyme (par précipitation par le sulfate d'ammonium). Nous avons cependant testé l'activité du milieu de culture de la souche #8 et le chromatogramme obtenu après hydrolyse du carraghénane iota semble être identique à ceux des hydrolysats #2, 3, 4, 5, 6 et 9

#### b. Fractions résistantes des hydrolysats.

Les hydrolysats sont préparés par addition d'enzyme en large excès et incubés à 25°C, sauf l'hydrolysat #1 de carraghénane iota, qui est préparé à 40°C. La raison du choix de ces températures est donnée plus loin.

Tableau 7 - Distribution des oligosides  
dans les hydrolysats suivant l'activité des enzymes -  
- Valeurs de  $R_{GAL}$  de ces oligosides -

$$R_{GAL} = \frac{\text{distance de migration de l'oligoside X}}{\text{distance de migration du galactose}}$$

+ : oligoside présent dans l'hydrolysat

- : oligoside absent dans l'hydrolysat

± : trace d'oligoside

- les enzymes sont synthétisées par les cultures bactériennes ayant le même numéro.
- les hydrolysats sont préparés dans les conditions décrites dans le paragraphe Matériel et Méthodes.

Carra- ghénane	oligo- sides	R <sub>GAL</sub>	enzymes		
			#1	#2,3,4, 5,6,9	#7
<u>KAPPA</u>	K <sub>1</sub>	0.97-1.0	-	+	-
	K <sub>2</sub>	0.73-0.75	-	+	+
	K <sub>3</sub>	0.51-0.54	-	±	+
	K <sub>4</sub>	0.34-0.36	-	-	±
<u>IOTA</u>	I <sub>1</sub>	0.97-1.0	-	+	-
	I <sub>2</sub>	0.73-0.75	-	+	+
	I <sub>3</sub>	0.51-0.54	+	±	+
	I <sub>4</sub>	0.34-0.36	+	-	±
	I <sub>5</sub>	0	+	-	-

Tableau 7

Toutes les fractions résistantes après précipitation à l'éthanol (2 volumes) ont été séchées à 50°C et pesées.

Le carraghénane kappa présente une fraction résistante de 20% à 25% quand il est hydrolysé par les enzymes #2, 3, 4, 5, 6, 7 et 9. Hydrolysé par la souche #1, ce même carraghénane a une fraction résistante de 90%.

Trois échantillons de carraghénane iota ont été testés. Les trois présentent une fraction résistante d'environ 70% quand ils sont hydrolysés par les enzymes 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 9. Lors de l'hydrolyse par l'enzyme #1, les 3 échantillons ont environ 30% de fraction résistante. Les valeurs sont données dans le tableau 8.

Certaines de ces fractions non dégradées ont été analysées en spectroscopie de R.M.N. du carbone 13, comme nous le verrons plus loin.

## IV.2 ENZYMES INTRA-CELLULAIRES

- a. Activité des extraits intra-cellulaires des cultures après lyse des cellules aux ultra-sons.

L'activité des extraits intra-cellulaires (non concentrés) de toutes les cultures (croissance sur carraghénane iota), après hydrolyse des cellules aux ultra-sons, a été testée sur plusieurs substrats: carraghénane iota, hydrolysats #1 du carraghénane iota et l'oligoside  $K_1$  (préparé par chromatographie sur colonne).

Les hydrolysats sont analysés de la même manière que précédemment, par chromatographie sur plaque.

Sur tous les chromatogrammes apparaît un nouvel oligoside (DS) ayant un  $R_{GAL}$  compris entre 1.08 et 1.11. La tache correspondant à DS est très faible dans le cas des hydrolysats du polymère iota. Elle est très nette lorsque les substrats employés sont l'oligoside  $K_1$  ou l'hydrolysats #1 du carraghénane iota ( $I_3, I_4, I_5$ ) (figure 12).

enzymes carraghénanes	#1	#9	#2.3.4.5.6.7
<u>IOTA</u> <u>Eucheuma spinosum</u> # 31210	25%	77%	—
<u>E. spinosum</u> #582407	26%	89%	—
<u>E. spinosum</u> #712503	33%	74%	68 à 70%
<u>KAPPA</u> <u>E. cottonii</u> #482407	90%	20%	18 à 23%

Tableau 8 - Pourcentage de fractions résistantes (poids/poids) de carraghénanes après hydrolyse enzymatique.

-les enzymes sont indifféremment induites sur carraghénane kappa ou iota (0.25% - milieu H<sub>1</sub> - température de croissance : 22°C)

-Températures d'hydrolyse :

- enzyme #1 : 40°C
- enzyme #9 : 25°C

Figure 12 - Chromatogramme sur couche mince - Activité enzymatique de l'extrait intracellulaire des cultures #1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9

GAL : galactose

A : oligoside K<sub>1</sub> (référence)

B : oligoside K<sub>1</sub> + extrait intracellulaire (de la culture #1, ou 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9)

C : hydrolysats #1 de carraghénane iota (référence)

D : hydrolysats #1 de carraghénane iota + extrait intracellulaire (de la culture #1, ou 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9)

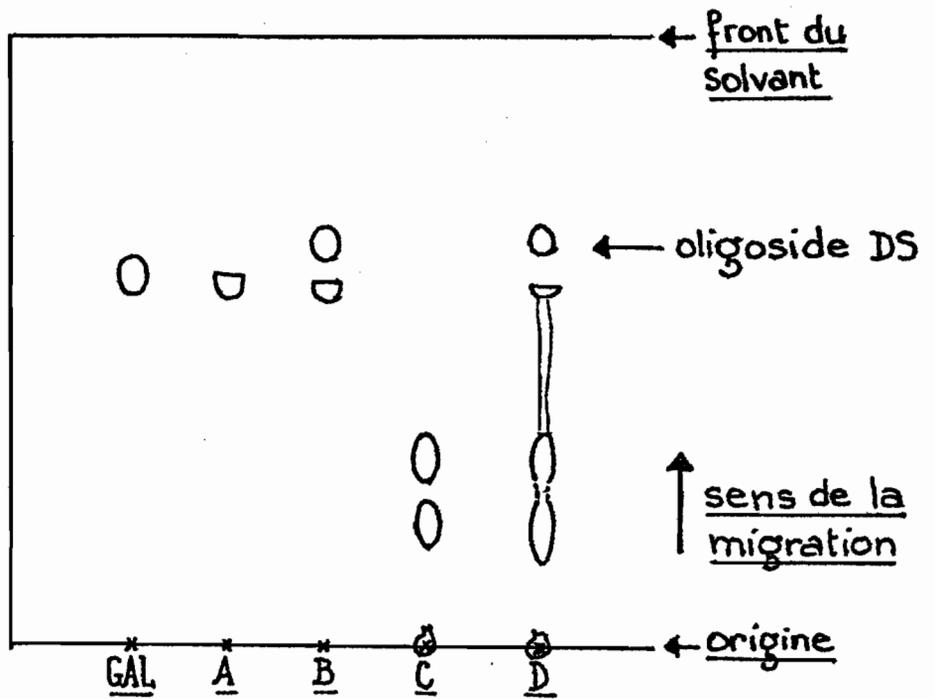


Figure 12

Dans ce dernier cas, apparaît une traînée entre DS et  $I_3$ , montrant la présence d'oligosides de masses molaires intermédiaires.

Lorsque les hydrolysats sont chromatographiés en présence de chlorure de céthyl pyridinium (1%), les oligosides migrent à la vitesse du front du solvant sauf l'oligoside DS, dont le  $R_{GAL}$  est très peu affecté.

Nous avons concentré l'enzyme contenue dans l'extrait intra-cellulaire de la culture #1 (70% de sulfate d'ammonium). La préparation enzymatique dégrade les carraghénanes iota et kappa (apparition d'oligosides sur plaque de chromatographie). Les chromatogrammes obtenus étant difficiles à interpréter, nous avons testé la préparation sur une solution d'oligoside  $K_1$  et sur l'hydrolysat #1 du carraghénane iota. Dans le premier cas,  $K_1$  est partiellement dégradé en DS. Le résultat obtenu dans le deuxième cas est présenté figure 13 (hydrolysat D). Ce chromatogramme nous montre une bonne résolution de la traînée que nous obtenions précédemment: il apparaît clairement une série d'oligosides, ayant un  $R_{GAL}$  intermédiaire entre celui des oligosides DS et  $I_3$ .

La figure 13 est la photo d'une plaque de chromatographie sur laquelle nous avons fait migrer du galactose (A), un hydrolysat #9 du carraghénane kappa (B), un hydrolysat #1 du carraghénane iota (C), l'hydrolysat #1 (iota) traité par l'enzyme intra-cellulaire #1 (D) et du néoagarobiose (E) (préparé par hydrolyse enzymatique d'agar). L'oligoside DS a une constante de migration ( $R_{GAL} = 1.08 - 1.11$ ) très proche du néoagarobiose ( $R_{GAL} = 1.14 - 1.16$ ). Cet oligoside DS a les mêmes caractéristiques que l'oligoside que WEIGL a obtenu en 1966 en traitant l'oligoside  $K_1$  à l'aide de l'extrait intra-cellulaire de Pseudomonas carrageenovora (culture #9). Il a prouvé que cet oligoside était le diholoside désulfaté de carraghénane ou anhydro 3-6-D-galactopyranosyl- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-galactopyranose.

Figure 13 - Chromatogrammes d'hydrolysats  
de carraghénanes iota et kappa

A : Galactose (référence)

B : hydrolysat #9 de carraghénane kappa

C : hydrolysat #1 de carraghénane iota

D : hydrolysat #1 de carraghénane iota  
traité par l'enzyme intracellulaire #1

E : néoagarobiose

(l'enzyme synthétisée par une culture, et l'hydrolysat  
obtenu à l'aide de cette enzyme ont le même numéro  
que la souche concernée)

- Chromatographie sur plaque de cellulose MN300

- solvant : butanol / éthanol / eau (3/2/2.5)

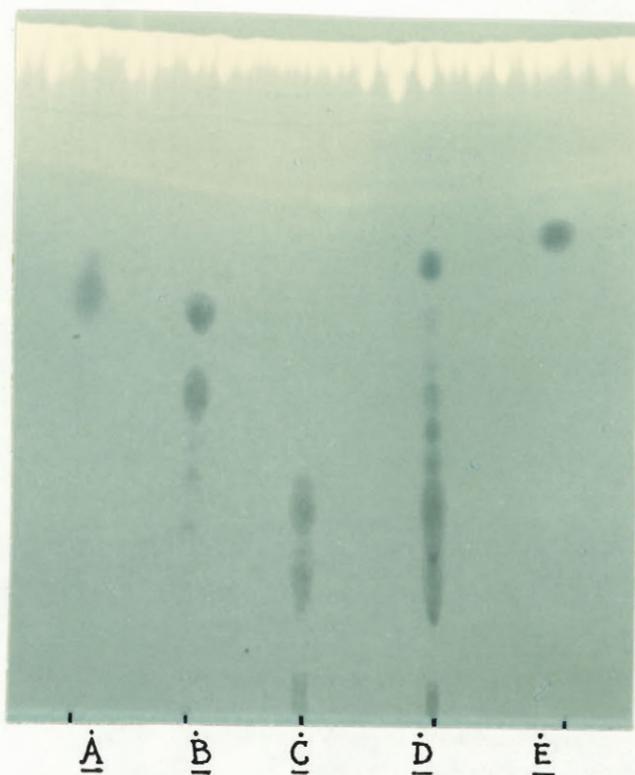


Figure 13

b. Recherche d'enzymes fixées sur les parois cellulaires des bactéries de la souche #1.

Nous avons fait subir aux cellules intactes et aux débris cellulaires (obtenus après lyse par ultra-sons) les traitements par le chlorure de lithium et par le Triton, décrits dans le paragraphe Matériel et Méthodes.

Les préparations ont été testées sur carraghénane iota et sur différents oligosides purifiés sur colonne de Sephadex (oligosides  $K_1$ ,  $K_2$ , DS,  $I_3$ ). Toutes liquéfient le carraghénane iota, hydrolysent l'oligoside  $K_1$  en DS, n'ont aucune action sur DS et ne semblent pas en avoir sur  $K_2$  et  $I_3$ .

V - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LE RENDEMENT DES HYDROLYSES DE CARRAGHENANE IOTA PAR LES ENZYMES EXTRA-CELLULAIRES #5 et #1 ET DU CARRAGHENANE KAPPA PAR LA SOUCHE #9

Nous avons étudié l'influence de la température (20°, 25°, 30°, 41°, 50°, 60°, 65°C) sur le rendement de plusieurs hydrolyses de carraghénanes. Les hydrolysats sont préparés dans les conditions standard décrites dans le paragraphe Matériel et Méthodes. Chaque solution de carraghénane est incubée à une température donnée, 30 mn avant l'addition d'enzyme. L'enzyme est ajoutée en excès. La fraction résistante est extraite après 48 heures d'hydrolyse, séchée et pesée. Dans le tableau suivant (tableau 9) sont reportées les valeurs des pourcentages de ces fractions, en fonction de la température, pour les hydrolysats #1 et #5 de carraghénane iota et #9 de carraghénane kappa. L'échantillon de carraghénane iota utilisé est l'échantillon #582407 (voir annexe).

La figure 14 nous montre que:

- (a) la température a un effet très important sur l'hydrolyse du carraghénane iota par l'enzyme #1, le rendement étant maximum à 40°C.
- (b) les valeurs du pourcentage des fractions résistantes des hydrolysats #1 et #5 ne sont affectées par la température qu'au delà de 40°C.

Tableau 9 - Influence de la température  
d'hydrolyse sur le pourcentage de fraction  
résistante des carraghénanes après hydrolyse  
enzymatique.

- Hydrolyse du carraghénane iota par  
les enzymes #1 et #5 (induites elles-même  
sur carraghénane iota)

- Hydrolyse du carraghénane kappa par  
l'enzyme #9 (induite sur carraghénane kappa)

Tempé- rature °C	carraghénane iota		carraghénane kappa
	hydrolysat #1	hydrolysat #5	hydrolysat #9
20°	70%	70%	—
25°	58%	72%	20%
30°	45%	73%	21%
41°	25%	75%	23%
50°	50%	83%	47%
60°	83%	88%	—
65°	—	—	68%

Tableau 9

Figure 14 - Influence de la température d'hydrolyse sur le pourcentage de fraction résistance des carraghénanes après hydrolyse enzymatique.

x—x hydrolysat #1 de carraghénane iota

●—● hydrolysat #5 de carraghénane iota

○—○ hydrolysat #9 de carraghénane kappa

Les enzymes #1 et #5 sont induites sur carraghénane iota, l'enzyme #9 sur carraghénane kappa.

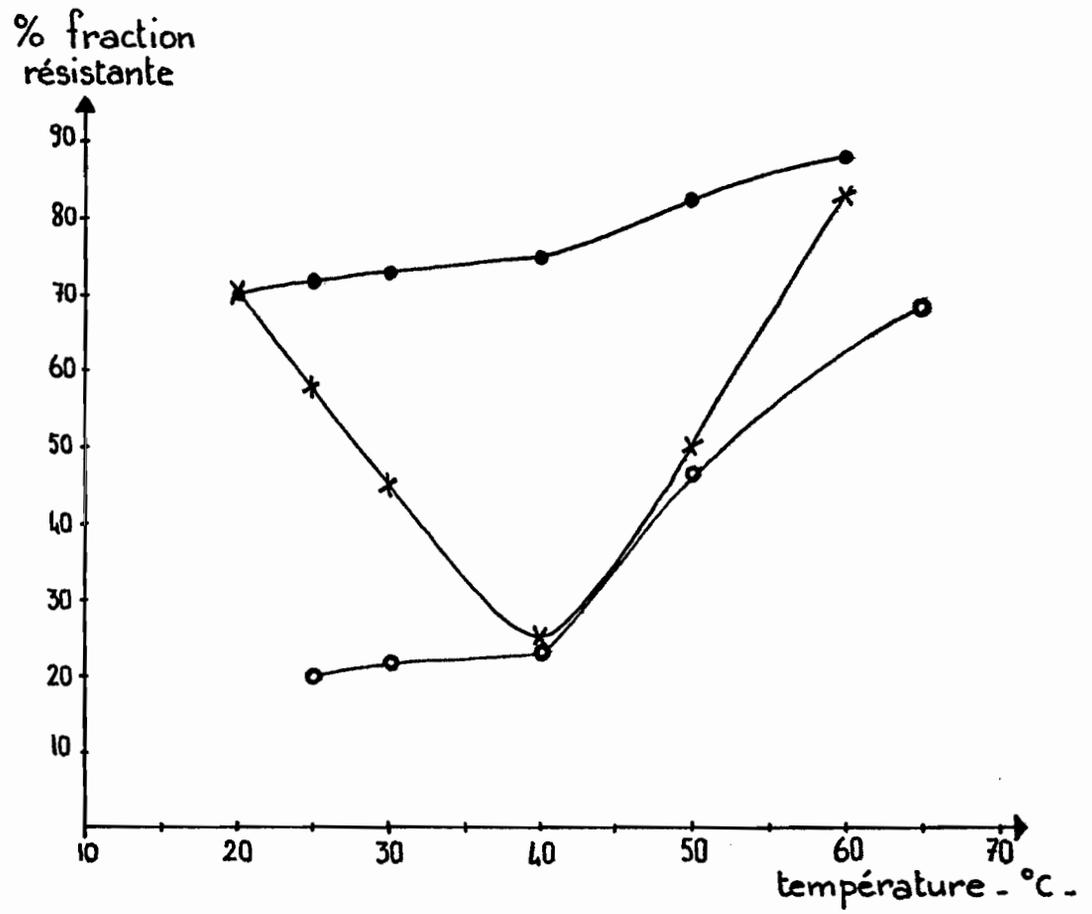


Figure 14

VI - SEPARATION ET PURIFICATION DES OLIGOSIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE, SUR GEL DE SEPHADEX

Afin d'élucider la nature des oligosides obtenus par hydrolyse enzymatique, nous avons séparé et purifié par chromatographie sur gel les oligosides de trois différents hydrolysats:

- l'hydrolysat #5 de carraghénane iota;
- l'hydrolysat #1 de carraghénane iota;
- l'hydrolysat #9 de carraghénane kappa.

Nous rappelons que l'enzyme synthétisée par une culture et l'hydrolysat obtenu à l'aide de cette enzyme ont le même numéro que la souche correspondante.

VI.1 SEPARATION DES OLIGOSIDES DE L'HYDROLYSAT #5 DE CARRAGHENANE IOTA

Les oligosides sont séparés sur colonne de Sephadex G-25 fine (dont les caractéristiques sont décrites dans le paragraphe Matériel et Méthodes) et les fractions collectées, analysées qualitativement par chromatographie sur couche mince.

La figure 15 nous montre le chromatogramme des fractions. Nous rappelons (cf. tableau 7) que l'hydrolysat #5 de carraghénane iota est composé de trois principaux oligosides  $I_1$  ( $R_{GAL} = 0.97 - 1.0$ ),  $I_2$  ( $R_{GAL} = 0.73 - 0.75$ ),  $I_3$  ( $R_{GAL} = 0.51 - 0.54$ ).

Au tube 43, commence à apparaître l'oligoside  $I_3$ , dont la concentration augmente jusqu'au tube 48 pour disparaître au tube 50. Il est accompagné d'oligosides de masse molaire plus élevée, qui forment une traînée à partir de l'origine. Nous pouvons également observer la présence d'une autre tache  $I'_3$ , plus petite, en forme de calotte, migrant très légèrement au-dessus de  $I_3$ .

Au tube 45 commence à apparaître l'oligoside  $I_2$  ( $R_{GAL} = 0.73 - 0.75$ ). En observant bien la tache représentant  $I_2$ , on peut remarquer qu'elle se

Figure 15 - Chromatogramme sur plaque  
des fractions collectées après passage sur colonne de  
Sephadex G-25 fine de l'hydrolysât #5 de carraghénane iota

- GAL: galactose

- H<sub>5</sub>: hydrolysât #5 de carraghénane iota (référence)

Conditions de la chromatographie sur plaque :  
plaque de cellulose MN 300

solvant : butanol / éthanol / eau : 3/2/2.5

Conditions de la chromatographie sur colonne :

volume des fractions = 2ml

diamètre de la colonne = 2.6cm

longueur du gel dans la colonne = 40cm

volume vide de la colonne = 76 ml

éluant : eau distillée

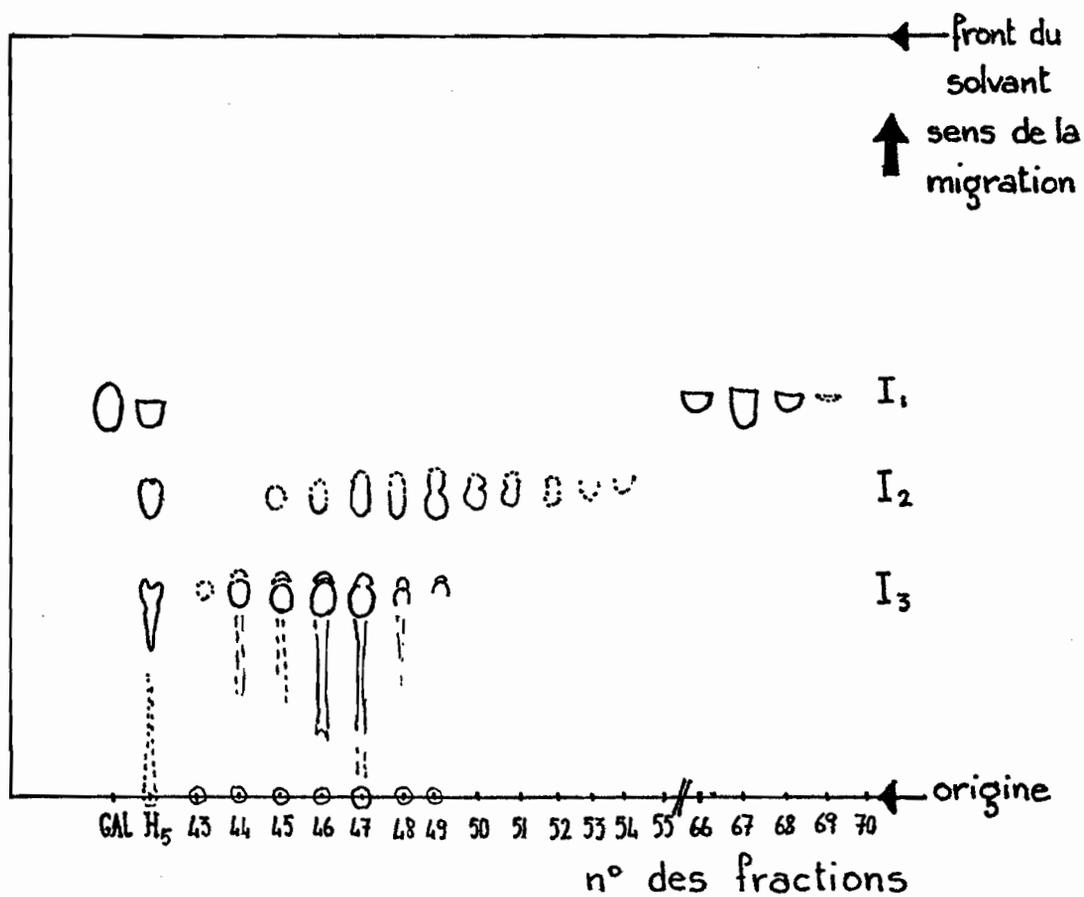


Figure 15

dédoublé et qu'elle semble être la combinaison de deux taches très proches l'une de l'autre.

L'oligoside  $I_1$  ( $R_{GAL} = 0.97 - 1.0$ ) apparaît au tube 66 et n'est pas dédoublé.

Par passage répété sur la colonne, nous avons pu isoler les différents oligosides  $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$  qui ont ensuite été analysés en spectroscopie de R.M.N. du carbone 13.

## VI.2 SEPARATION DES OLIGOSIDES DE L'HYDROLYSAT #1 DU CARRAGHENANE IOTA

Les oligosides de l'hydrolysat #1 sont séparés sur colonne de Sephadex G-50 super fine. (Les caractéristiques de la colonne sont décrites dans le paragraphe Matériel et Méthodes). Le contenu des fractions est analysé qualitativement par chromatographie sur plaque (figure 16) et quantitativement par la méthode au phénol-acide sulfurique (figure 17). La figure 17 présente deux principaux pics I et II. Le pic I correspond à des oligosides de masse molaire élevée ne migrant pas, ou très peu, sur plaque de chromatographie. Entre les pics I et II apparaît l'oligoside  $I_4$ . Le pic I correspond à l'oligoside  $I_3$  pratiquement pur. L'oligoside  $I_3$  a pu être purifié par passages répétés sur la colonne, mais l'oligoside  $I_4$  est resté contaminé par d'autres oligosides de masse molaire plus élevée.

## VI.3 SEPARATION DES OLIGOSIDES DE L'HYDROLYSAT #9 DU CARRAGHENANE KAPPA

Les oligosides de l'hydrolysat #9 ont été séparés et purifiés sur colonne de Sephadex G-25 fine dont les caractéristiques sont décrites dans le paragraphe Matériel et Méthodes. Le contenu des fractions collectées est analysé quantitativement par la méthode au phénol-acide sulfurique (figure 19) et qualitativement par chromatographie sur plaque (figure 18). La figure 18 nous présente 3 pics distincts que l'on peut identifier aisément à l'aide du chromatogramme (figure 19). Le premier pic, I (tubes 38 à 50), correspond à un mélange d'oligosides de masse molaire élevée (qui

Figure 16 - Chromatogramme des fractions collectées après passage sur colonne Sephadex G-50 superfine de l'hydrolysat #1 de carraghénane iota

- GAL = galactose
- #1 = hydrolysat #1 de carraghénane iota
- chromatographie sur plaque de cellulose MN300
- solvant : butanol / éthanol / eau (3/2/2.5)
- F.S. = front du solvant

Figure 17 - Séparation sur colonne Sephadex G-50 superfine des oligosides de l'hydrolysat #1 de carraghénane iota.

- volume des fractions : 2ml
- diamètre de la colonne : 2.6cm
- longueur du gel dans la colonne : 40cm
- volume vide : 68ml
- éluant : eau distillée

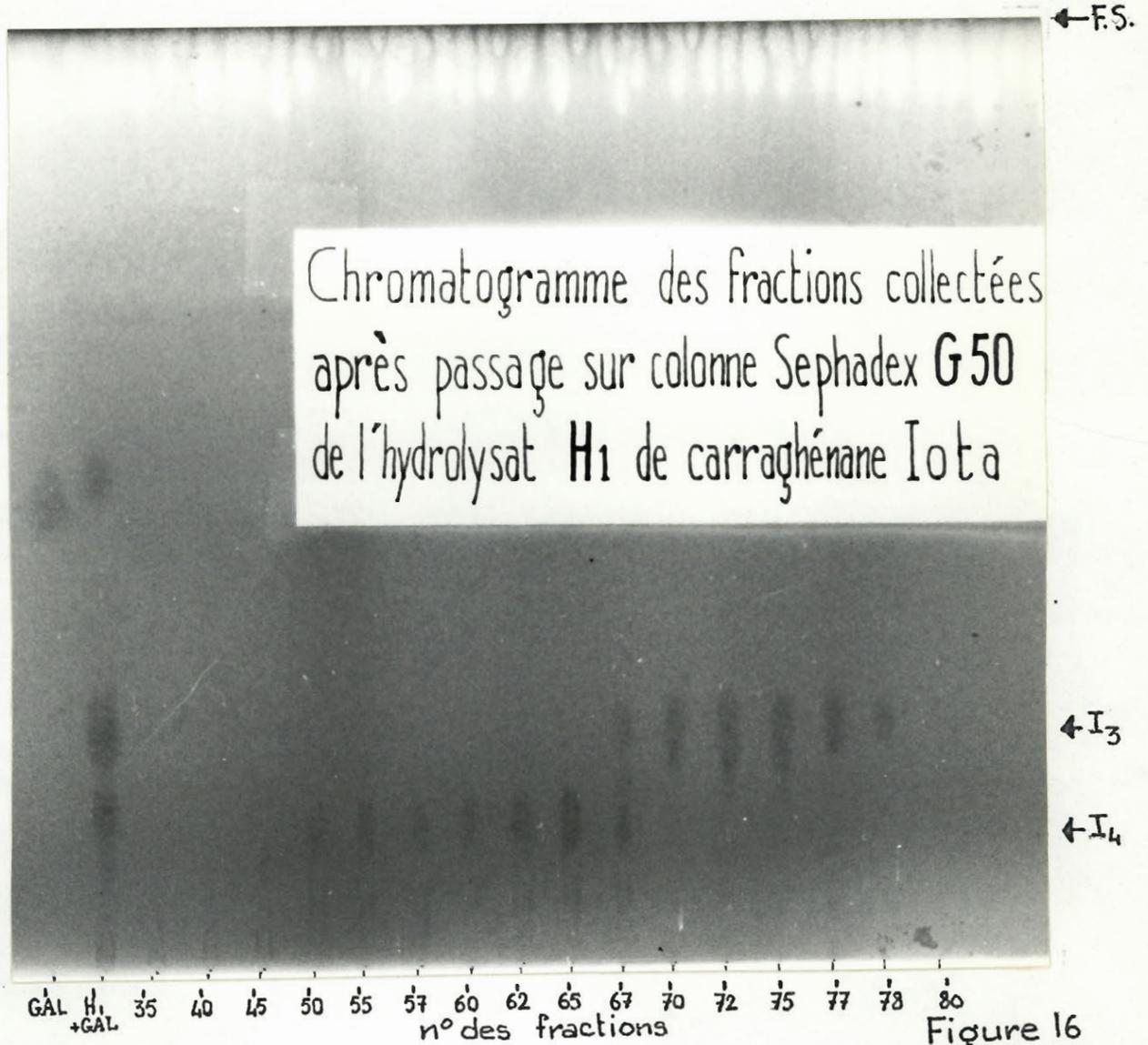


Figure 16

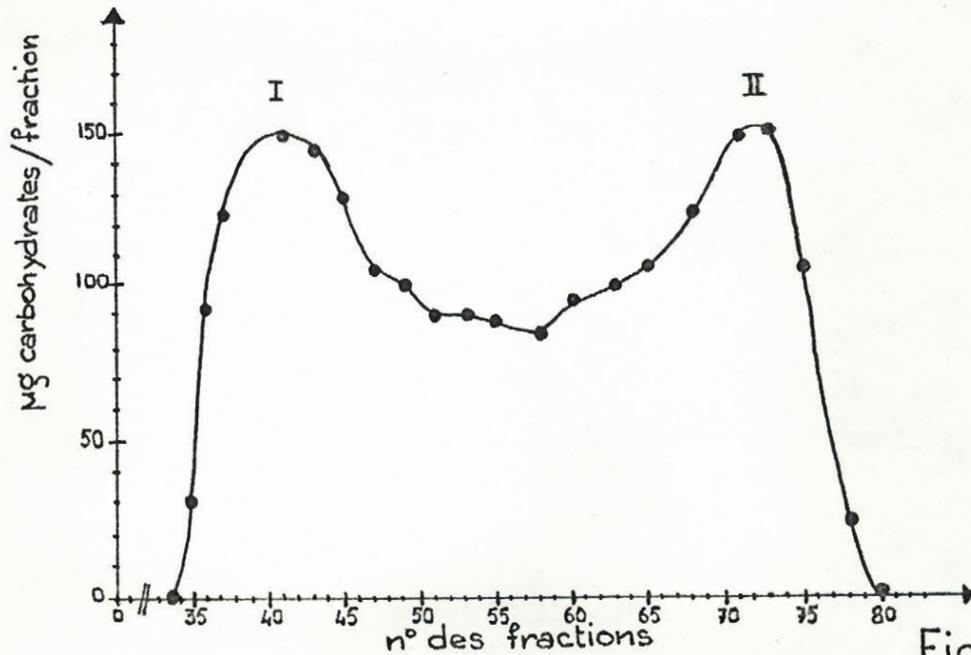


Figure 17

Figure 18 - Chromatogramme des fractions collectées après passage sur colonne Sephadex G.25 fine de l'hydrolysat #9 de carraghénane kappa (K)

- GAL : galactose
- K : hydrolysat #9 de carraghénane kappa
- chromatographie sur plaque de cellulose MN300
- solvant : butanol / éthanol / eau (3/2/2.5)
- F.S. : front du solvant

Figure 19 - Séparation sur colonne Sephadex G.25 fine des oligosides de l'hydrolysat #9 de carraghénane kappa.

- volume des fractions : 2ml
- diamètre de la colonne : 2.6cm
- longueur du gel dans la colonne : 40cm
- volume vide : 76ml
- éluant : eau distillée

← F.S.

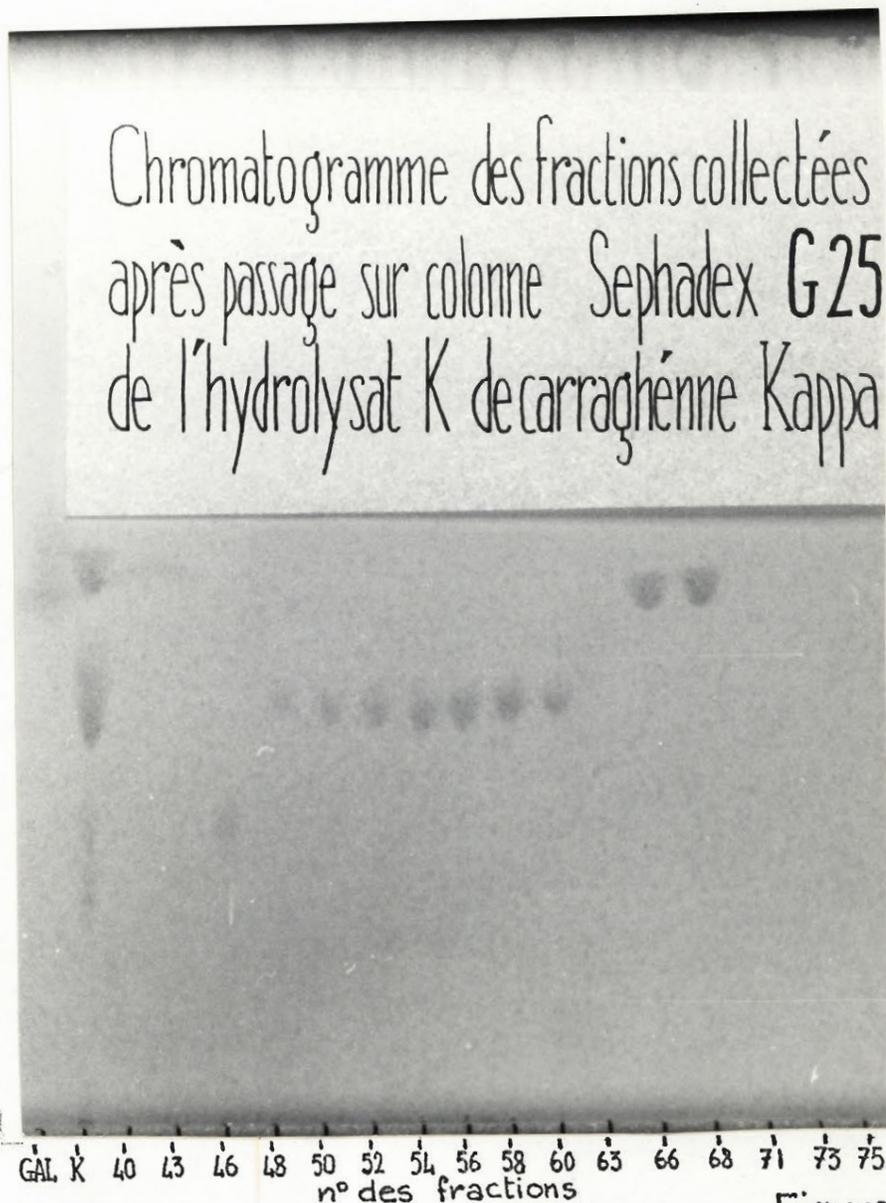


Figure 18

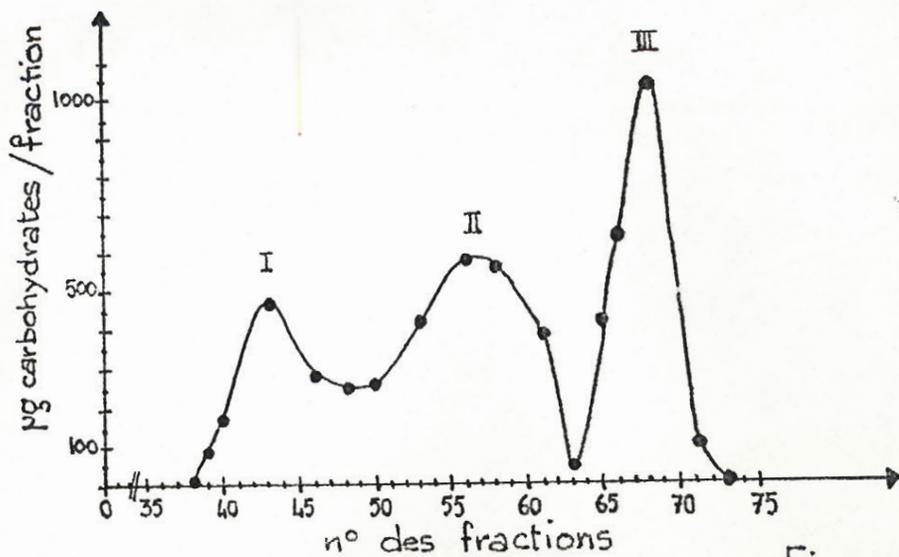


Figure 19

ne sont pas visibles sur la photo) et de l'oligoside  $K_3$ . Le deuxième pic, II (tubes 50 à 63), correspond à l'oligoside  $K_2$ , et le troisième, III (tubes 63 à 73), à l'oligoside de  $K_1$ .

Après avoir rechromatographié séparément les fractions II et III, les oligosides purs sont lyophilisés et pesés.

A partir de 20 mg d'hydrolysate, nous obtenons 6 mg d'oligoside  $K_1$ , 8.6 mg d'oligoside  $K_2$  (moyennes de plusieurs expériences), ce qui correspond à un rapport  $\frac{\text{poids de } K_2}{\text{poids de } K_1} = 1.43$ , rapport dont la valeur est confir-

mée par celle, calculée, du rapport de l'aire des pics I et III:

$$\frac{\text{aire du pic II}}{\text{aire du pic III}} = 1.33.$$

## VII: IDENTIFICATION DES OLIGOSIDES

### VII-1 PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU CARBONE 13

Avant d'analyser les spectres des oligosides purs, nous allons présenter les spectres des polysides non dégradés qui nous ont servi à préparer les oligosides.

Nous rappelons que lors de l'analyse de tous les spectres qui va suivre, nous n'interprétons que les signaux de résonance des atomes de carbone no 1; ils se trouvent dans la zone du spectre comprise entre 90 et 110 p.p.m. Toutes les valeurs de déplacement chimique venant de la littérature sont corrigées (cf. Matériel et Méthodes - page 45).

#### a. Extraits polyosidiques non dégradés

##### a.1 Eucheuma cottonii (carraghénane kappa)

Le spectre de l'extrait d'Eucheuma cottonii (figure 20) présente entre 90 et 110 p.p.m., 2 pics bien définis, le premier à 103.17 p.p.m. ( $Kg_1$ ) et le second à 95.90 p.p.m. ( $Ka_1$ ). La présence simultanée de ces deux signaux est caractéristique du carraghénane kappa: le pic à 103.17 p.p.m. correspond au carbone 1 des résidus sulfate-4-D-galactopyranosyl ( $Kg_1$ ) dont la valeur ( $\delta$ ) du déplacement chimique reportée dans la littérature est  $\delta = 103.2$  p.p.m. (valeur corrigée, cf. Matériel et Méthodes - page 45); le pic à 95.90 p.p.m. correspond au carbone 1 des résidus anhydro-3-6-D-galactopyranosyl ( $Ka_1$ ) de carraghénane kappa (littérature  $\delta = 96.0$  p.p.m.).

##### a.2 Eucheuma spinosum (carraghénane iota)

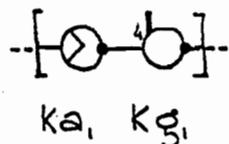
Nous avons analysé deux échantillons (#712503 et -31210, cf. Annexe) d'extrait polyosidique non dégradé d'Eucheuma spinosum.

###### a.2.1 Echantillon #712503

Sur le spectre R.M.N. de l'échantillon #712503 (figure 21) trois pics apparaissent dans la région comprise entre 90 et 110 p.p.m. Les signaux les plus intenses sortent à 103.04 p.p.m. ( $Ig_1, Kg_1$ ) et 92.76 p.p.m. ( $Ia$ ). Leur présence simultanée prouve que le polyside est un carraghénane

Figure 20 - Spectre R.M.N. de l'extrait polysidique d' Euchemma cottonii

(carraghénane kappa : K)



schémas de la molécule

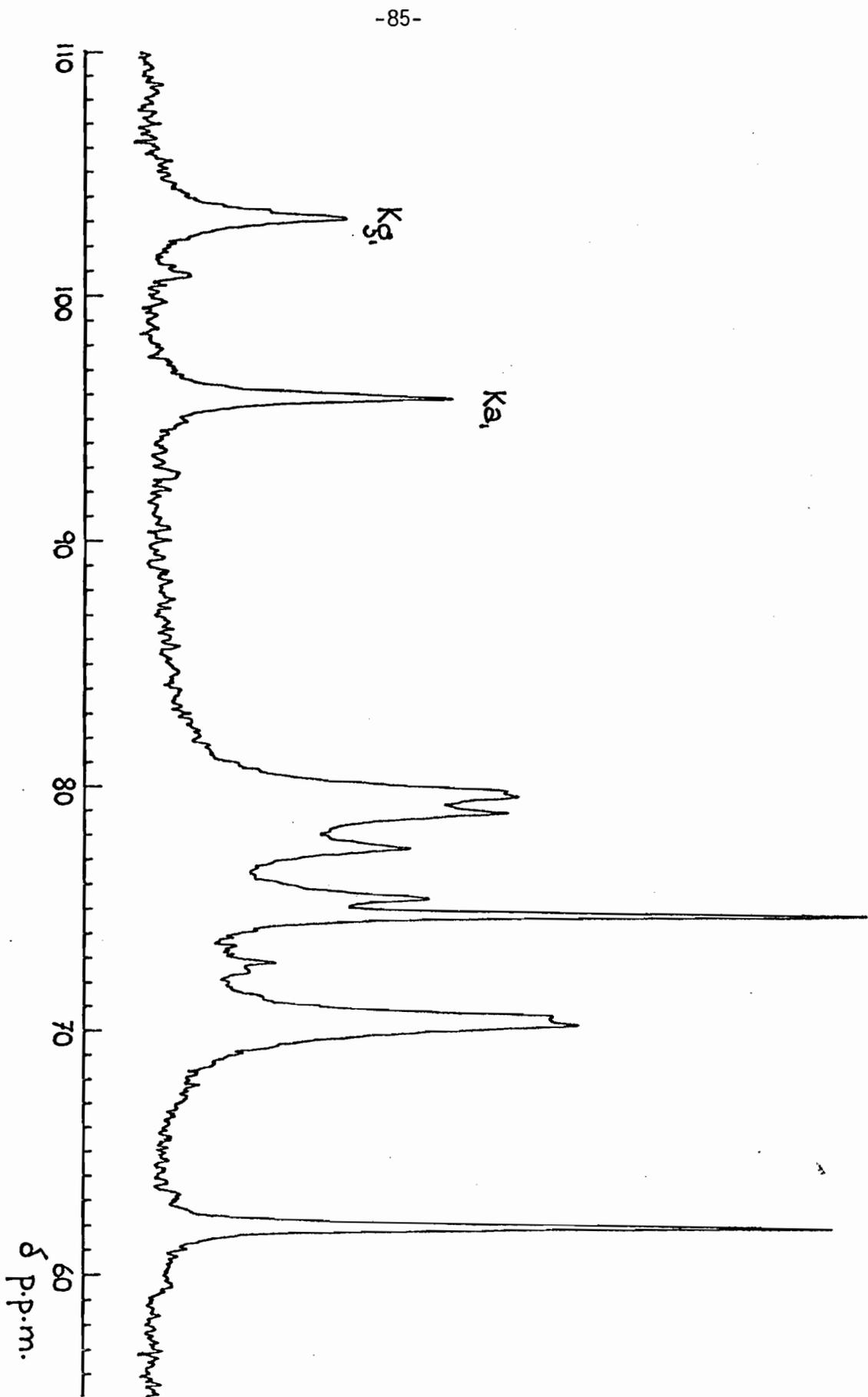
pics	$\delta$ p.p.m.
Kg <sub>i</sub>	103.17
Ka <sub>i</sub>	95.90

Kg<sub>i</sub>: atome de carbone n°1 des résidus sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranosyl (4b)

Ka<sub>i</sub>: atome de carbone n°1 des résidus anhydro 3-6-galactopyranosyl (3)

$\delta$ : déplacements chimiques relatifs au triméthylsilane (TMS)

Figure 20



Figures 21 et 22 - Spectres R.M.N. de l'extrait polysidique d'Eucheuma spinosum  
- échantillons #712503 et #31210 - (carraghénanes iota : I, et kappa : K)



pics	$\delta$ p.p.m. #712503	$\delta$ p.p.m. #31210
Ig <sub>1</sub> - Kg <sub>1</sub>	103.04	102.84
Ka <sub>1</sub>	95.93	—
Ia <sub>1</sub>	92.77	92.78

Ia<sub>1</sub> : atome de carbone n°1 des résidus sulfate-2 anhydro 3-6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl (⊖)

Ig<sub>1</sub> : atome de carbone n°1 des résidus sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranosyl (iota) (⊙)

Ka<sub>1</sub> : \_\_\_\_\_ anhydro 3-6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl (⊖)

Kg<sub>1</sub> : \_\_\_\_\_ sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranosyl (kappa) (⊙)

$\delta$  : déplacements chimiques relatifs au TMS

Figure 21 - échantillon # 712503

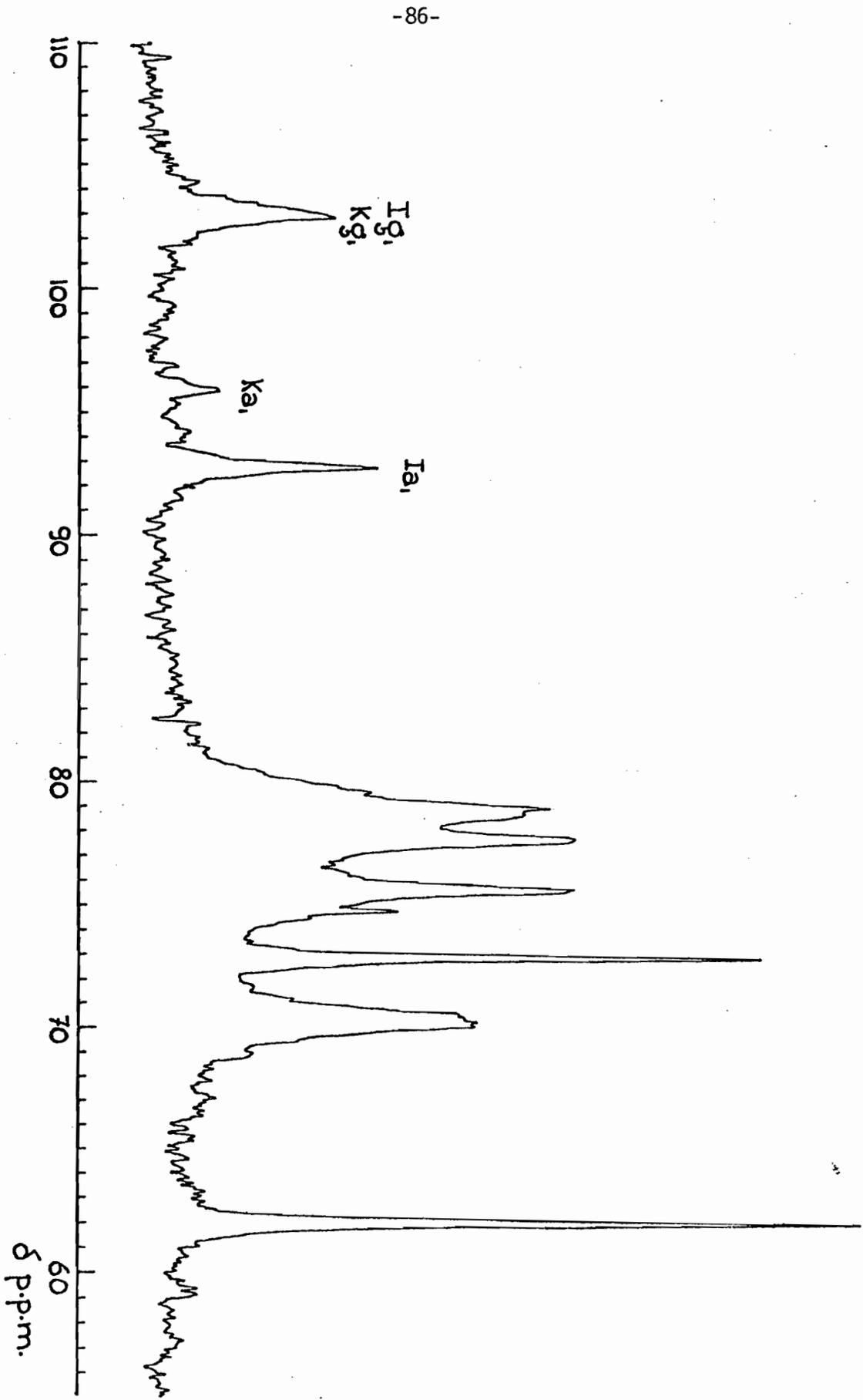
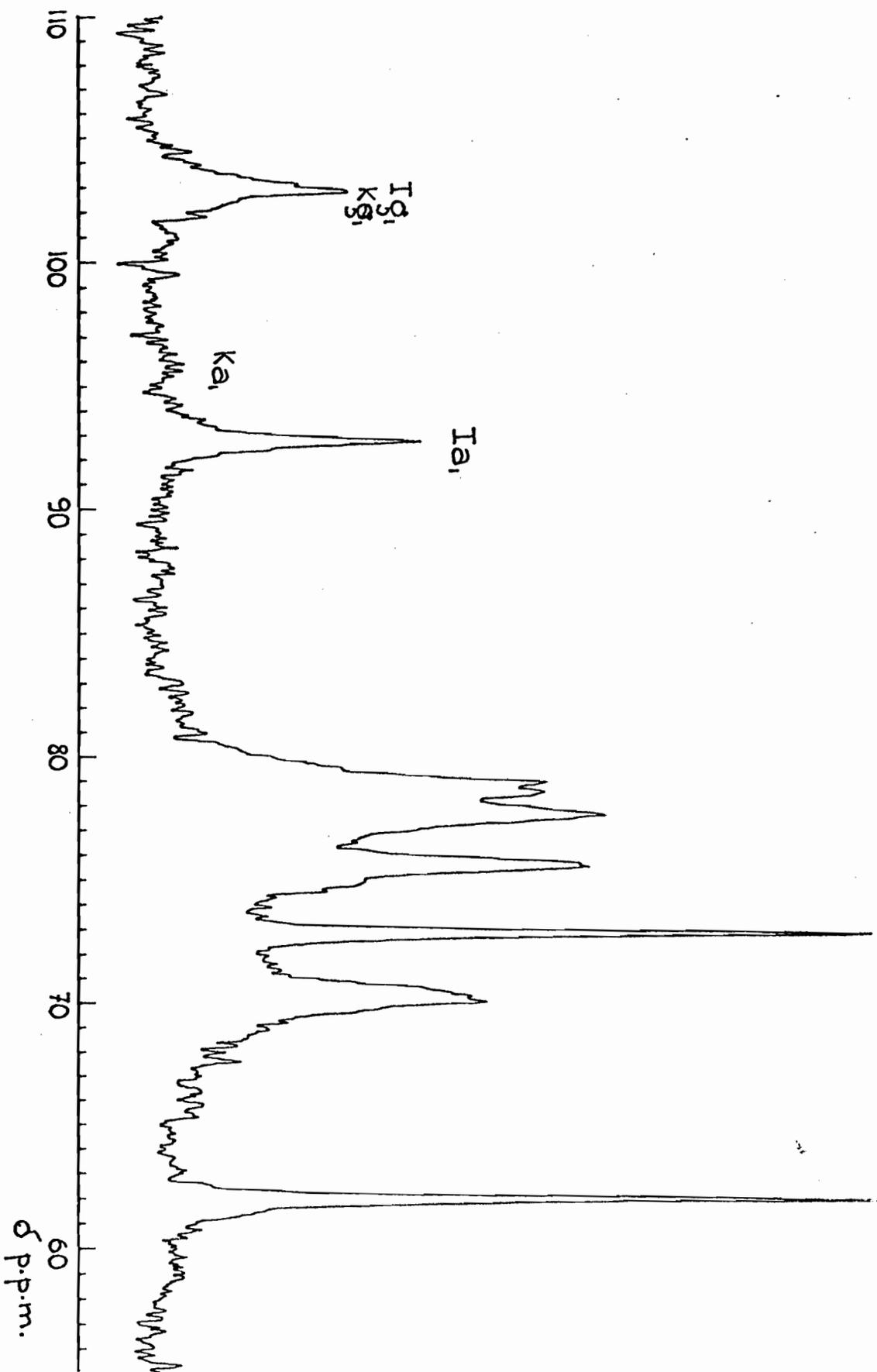


Figure 22 - échantillon #31a10

-87-



iota;  $I_{g_1}$  ( $\delta = 103.04$  p.p.m.) correspond au carbone 1 des résidus sulfate-4-D-galactopyranosyl (littérature,  $\delta = 103.0$  p.p.m.) et  $I_{a_1}$  ( $\delta = 92.76$  p.p.m.) correspond à celui des résidus sulfate-2-anhydro-3-6-D-galactopyranosyl (littérature,  $\delta = 92.9$  p.p.m.).

Entre ces deux pics apparaît un troisième,  $K_{a_1}$ , ( $\delta = 95.93$  p.p.m.) de faible intensité correspondant au carbone 1 de l'anhydrogalactose de carraghénane kappa (littérature,  $\delta = 96.0$  p.p.m.). Le signal correspondant aux résidus galactose kappa ( $K_{g_1}$ ) (littérature,  $\delta = 103.2$  p.p.m.) n'est pas résolu du pic à  $103.0$  p.p.m.

De ces observations nous pouvons conclure que l'échantillon #712503 est un carraghénane iota dont les chaînes sont contaminées par des résidus kappa. Le pourcentage de carraghénane kappa présent a été calculé en utilisant les intégrales correspondant aux pics. La valeur du pourcentage est 20% (calculée par Dr HAMER).

#### a.2.2 Echantillon #31210 (E. spinosum)

Le spectre de l'échantillon #31210 est semblable (figure 22) à celui que nous venons de décrire. La quantité de carraghénane kappa en présence semble cependant être bien moindre. Le pic à  $96.0$  p.p.m. ( $K_{a_1}$ ) est à peine visible.

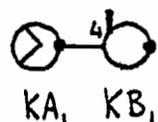
#### b. Spectres R.M.N. des oligosides

Nous avons interprété les spectres des oligosides  $K_1$  et  $K_2$  obtenus à partir de l'hydrolysate #9 de carraghénane kappa (E. cottonii), de l'oligoside  $I_1$  obtenu à partir de l'hydrolysate #1 de carraghénane iota (E. spinosum) et des oligosides présentant des taches dédoublées,  $I_2$  et  $I_3$  obtenus à partir de l'hydrolysate #5 de carraghénane iota; le spectre de l'oligoside  $I_1$  obtenu à partir de l'hydrolysate #5 de carraghénane iota n'a pu être interprété: la préparation était trop contaminée par la présence de tampon TRIS.

##### b.1 Spectre de l'oligoside $K_1$ (sulfate de néocarrabiose kappa)

Le spectre de l'oligoside  $K_1$  (figure 23) présente entre 110

Figure 23 - Spectre R.M.N. de l'oligoside K<sub>1</sub> (sulfate de néocarrabiose kappa)



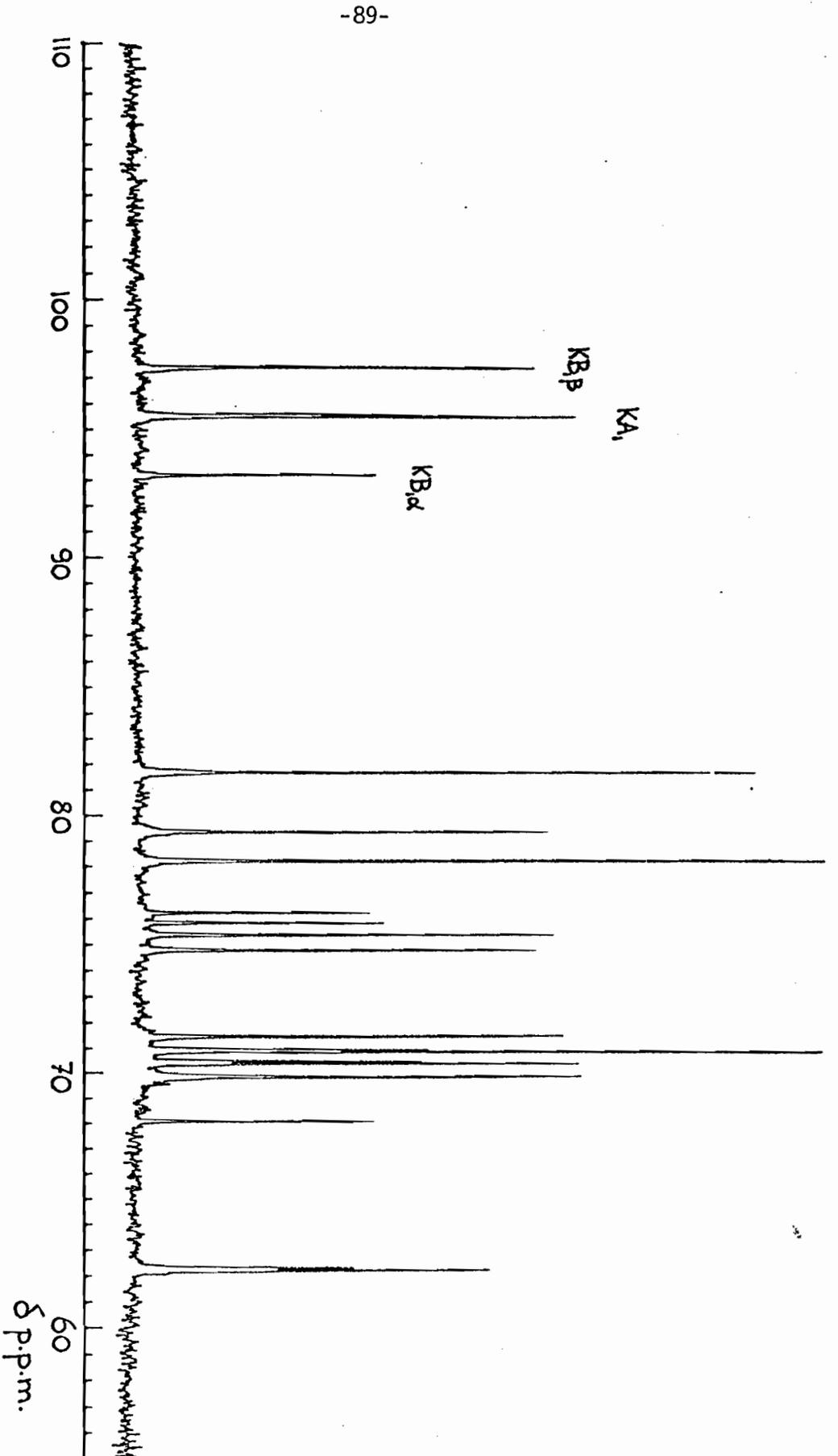
pics	$\delta$ p.p.m.	intégrales
KB <sub>1</sub> $\beta$	97.37	29.8
KA <sub>1</sub>	95.51	45.7
KB <sub>1</sub> $\alpha$	93.17	17.1

KA<sub>1</sub> : carbone n°1 des résidus anhydro 3-6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl (⊖)

KB<sub>1</sub> $\alpha$  et KB<sub>1</sub> $\beta$  : carbones n°1 des résidus sulfate-4 D galactose (anomères  $\alpha$  et  $\beta$ ) (⊕)

$\delta$  : déplacements chimiques relatifs au TMS

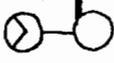
Figure 25

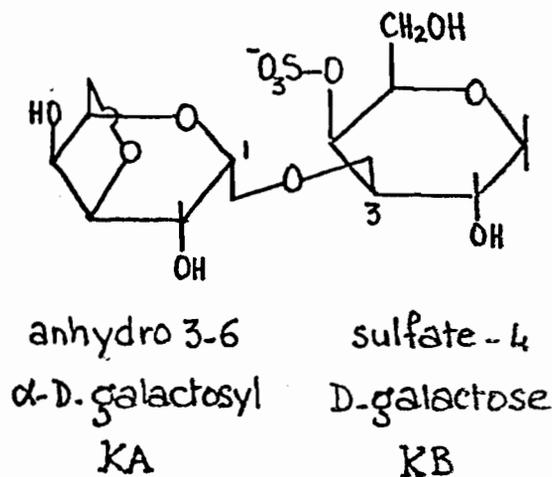


et 90 p.p.m., trois pics ( $KB_{1\beta}$ ;  $KA_1$ ;  $KB_{1\alpha}$ ) dont les valeurs de déplacements chimiques sont respectivement 97.37 p.p.m., 95.51 p.p.m. et 93.17 p.p.m. Le pic à 95.51 p.p.m. ( $KA_1$ ) existait déjà dans le spectre du carraghénane kappa non dégradé ( $KA_1$  - figure 20) et correspond aux résidus anhydro-3-6-galactopyranosyl. Le signal est ici légèrement dédoublé.

Le pic présent à 103.21 p.p.m. (correspondant aux résidus sulfate-4-D-galactopyranosyl sur le spectre du carraghénane kappa non dégradé est absent; il est remplacé par deux nouveaux pics  $KB_{1\beta}$  (97.37 p.p.m.) et  $KB_{1\alpha}$  (93.17 p.p.m.), suggérant que tous les résidus galactoses sont à l'extrémité réductrice de l'oligoside: un signal représente l'anomère  $\beta$  ( $KB_{1\beta}$ ) et l'autre représente l'anomère  $\alpha$  ( $KB_{1\alpha}$ ). Nous avons noté plus haut que le signal à 95.51 p.p.m. ( $KA_1$ ) était légèrement dédoublé. Ceci est dû à l'influence des deux anomères  $\alpha$  et  $\beta$  du galactose sur le carbone 1 de l'anhydro-galactose.

Le rapport de l'intégrale au pic représentant les résidus anhydro-galactose sur celle des pics représentant les résidus galactose dans leurs deux conformations a une valeur égale à 1.02. L'oligoside contient donc le même nombre de résidus anhydro-galactose et galactose (rapport théorique: 1.00).

Nous pouvons déduire de ces observations que l'oligoside  $K_1$  est le sulfate de néocarrabiose kappa ou anhydro-3-6- $\alpha$ -D-galactopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3) sulfate-4-D-galactopyranose (KA - KB, .



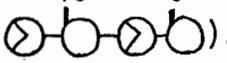
sulfate de néocarrabiose kappa

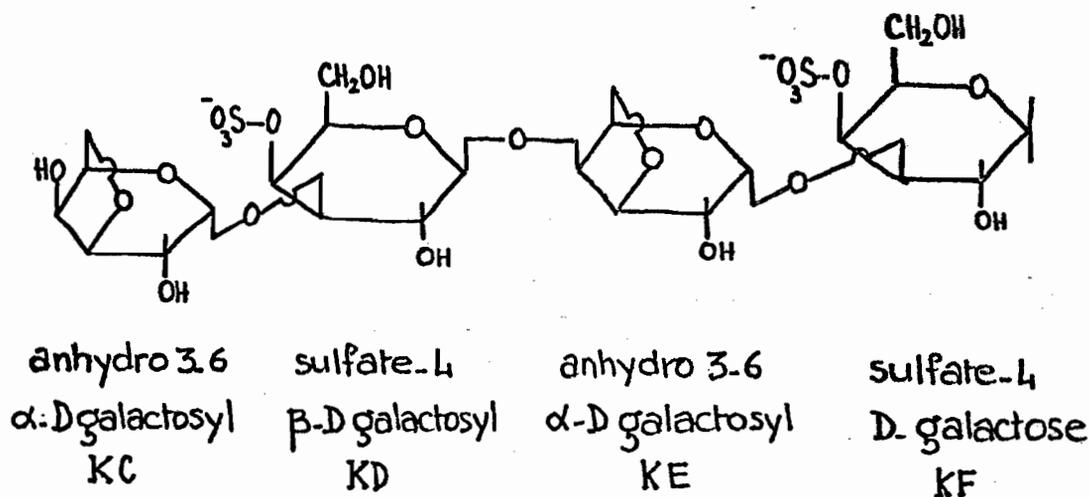
b.2 Spectre de l'oligoside  $K_2$  (disulfate de néocarratétrase kappa)

Sur le spectre de l'oligoside  $K_2$  (figure 24) quatre signaux apparaissent entre 90 et 110 p.p.m. Le pic à 95.51 p.p.m. ( $KC_1$ ,  $KE_1$ ) correspond aux résidus anhydro-galactose de carraghénane kappa. Les deux pics à 97.34 p.p.m. ( $KF_{1\beta}$ ) et à 93.16 p.p.m. ( $KF_{1\alpha}$ ) correspondent à des résidus galactose placés à l'extrémité réductrice de l'oligoside.

Le pic à 103.21 p.p.m. ( $KD_1$ ) suggère que tous les résidus galactose ne sont pas réducteurs. L'oligoside a donc un degré de polymérisation supérieur à 2.

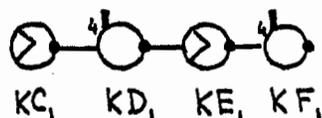
Le rapport de l'intégrale du pic à 103.21 p.p.m. ( $KD_1$ ) sur la somme des intégrales des quatre pics a pour valeur 0.26. Ceci suggère que l'oligoside est un tétraholoside (valeur théorique: 0.25).

L'oligoside est donc le disulfate de néocarratétrase kappa ou anhydro-3-6- $\alpha$ -D-galactopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3) sulfate-4- $\beta$ -D-galactopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4) anhydro-3-6- $\alpha$ -D-galactopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3) sulfate-4-D-galactopyranose (KC - KD - KE - KF, ).



disulfate de néocarratétrase kappa

Figure 24 - Spectre R.M.N. de l'oligoside K<sub>2</sub> (disulfate de néocarratétrase kappa)



structure de la molécule

pics	$\delta$ p.p.m.	intégrales
KD <sub>1</sub>	103.21	43.6
KF <sub>1</sub> $\beta$	97.34	25.7
KC <sub>1</sub> , KE <sub>1</sub>	95.51	85.8
KF <sub>1</sub> $\alpha$	93.16	13.8

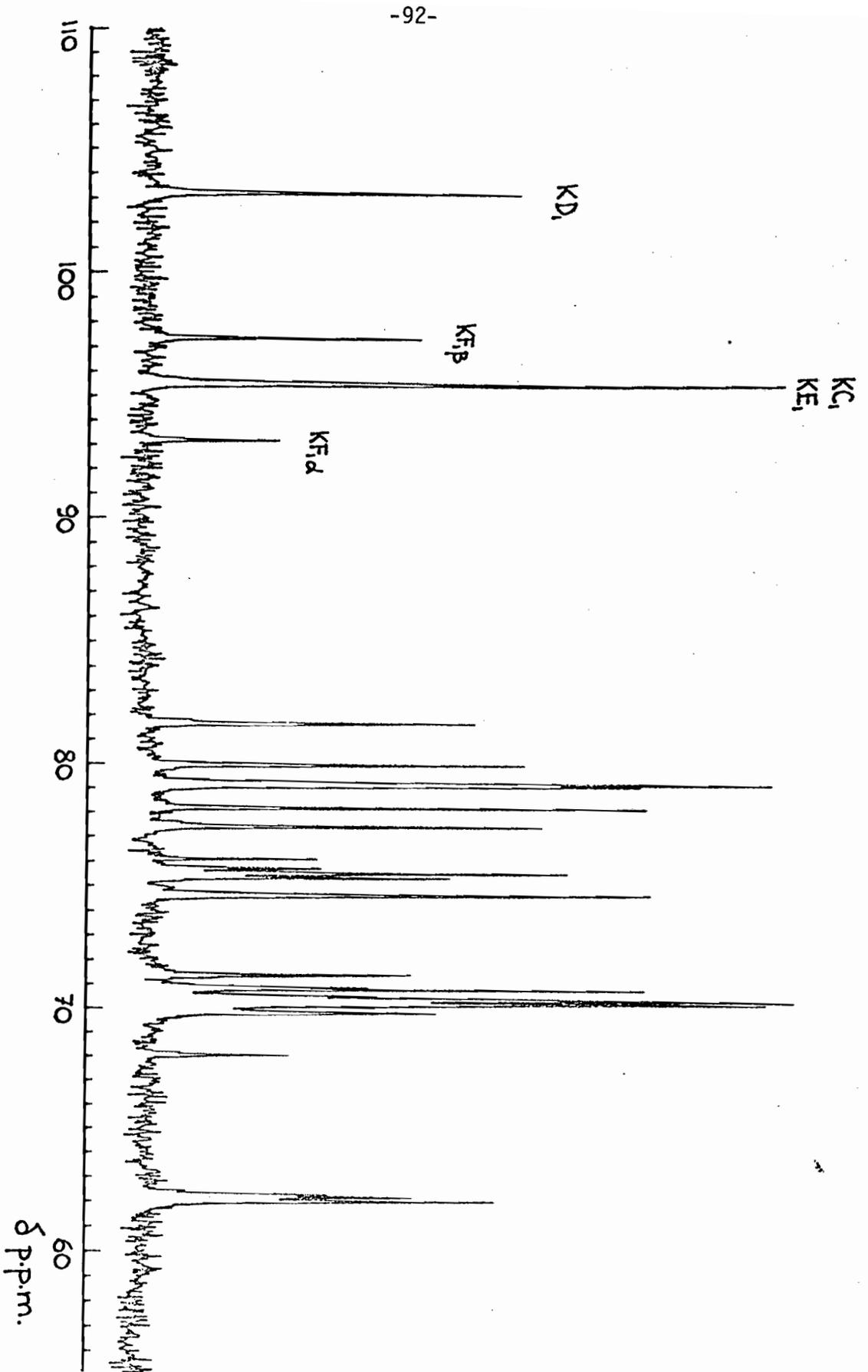
KD<sub>1</sub> : carbone n° des résidus sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranosyl (4b)

KC<sub>1</sub> et KE<sub>1</sub> : \_\_\_\_\_ anhydro 3,6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl (0)

KF<sub>1</sub>  $\alpha$  et KF<sub>1</sub>  $\beta$  : \_\_\_\_\_ sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranose (anomères  $\alpha$  et  $\beta$ ) (4b)

$\delta$  : déplacements chimiques relatifs au TMS

Figure 24



b.3 Spectre de l'oligoside  $I_3$  (tétrasulfate de néocarratétrase iota) purifié à partir de l'hydrolysats #1 de carraghénane iota (*E. spinosum*)

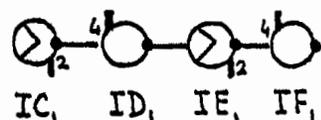
Le spectre R.M.N. de l'oligoside  $I_3$  purifié à partir de l'hydrolysats #1 de carraghénane iota présente quatre pics dans la zone comprise entre 110 et 90 p.p.m. Le signal légèrement dédoublé à 92.62 p.p.m. (IC, IE) est caractéristique des résidus anhydro-galactose de carraghénane iota (cf. figure 21,  $Ia_1$ ,  $\delta = 92.77$  p.p.m.). La valeur du déplacement chimique du pic IC, IE, est légèrement inférieure à celle du pic  $Ia_1$ ; ceci est dû à la nature oligosidique de la molécule que nous étudions.

Le signal à 102.96 p.p.m. ( $ID_1$ ) correspond aux résidus galactose non réducteurs de carraghénane iota (cf. figure 21,  $Ig_1$ ,  $\delta = 103.04$  p.p.m.).

Les pics à 97.30 p.p.m. ( $IF_{1\beta}$ ) et 92.97 p.p.m. ( $IF_{1\alpha}$ ) correspondent respectivement aux anomères  $\beta$  et  $\alpha$  des résidus galactose placés à l'extrémité réductrice de l'oligoside.

Le rapport de l'intégrale du pic  $ID_1$  sur la somme des intégrales des 4 pics est égal à 0.22 suggérant que l'oligoside est un tétraholoside (rapport théorique: 0.25).

Figure 25 - Spectre R.M.N. de l'oligoside I<sub>3</sub> (tétrasulfate de néocarrotétraose iota)



structure de la molécule

pics	$\delta$ p.p.m.	intégrales
ID <sub>i</sub>	102.96	35.3
IF <sub>i</sub> $\beta$	97.31	30.4
IF <sub>i</sub> $\alpha$	92.97	17.0
IC, IE	92.62	72.5

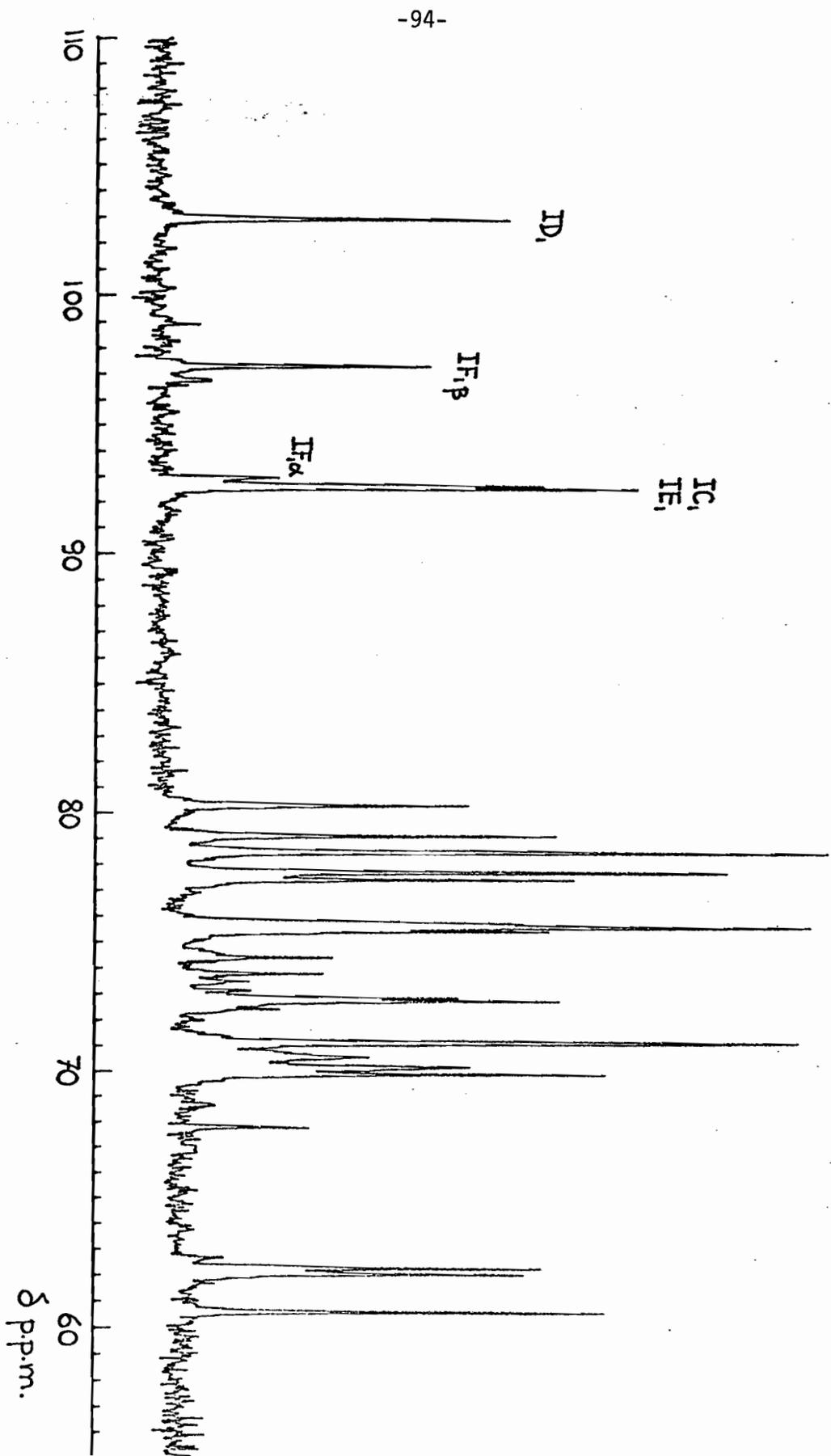
ID<sub>i</sub> : carbone n°1 des résidus sulfate-4  $\beta$ -D. galactopyranosyl (<sup>4b</sup>)

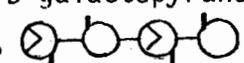
IC<sub>i</sub> et IE<sub>i</sub> : \_\_\_\_\_ sulfate-2 anhydro 3-6  $\alpha$ -D galactopyranosyl ( $\alpha_2$ )

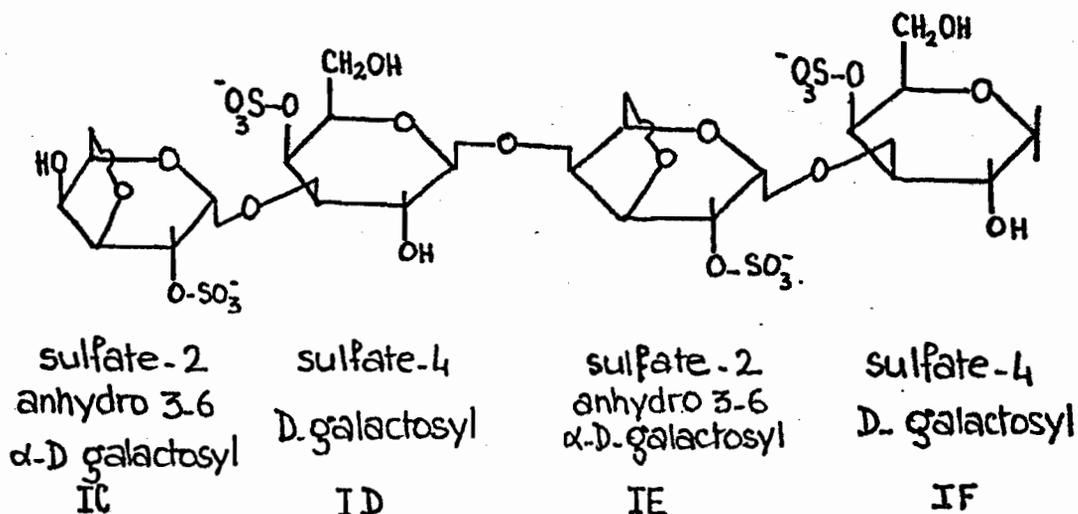
IF<sub>i</sub>  $\alpha$  et IF<sub>i</sub>  $\beta$  : \_\_\_\_\_ sulfate-4  $\beta$ -D. galactopyranose (anomères  $\alpha$  et  $\beta$ ) (<sup>4b</sup>)

$\delta$  : déplacements chimiques relatifs au TMS.

Figure 25



L'oligoside  $I_3$  est donc le tétrasulfate de néocarratétraose iota, ou sulfate-2-anhydro-3-6- $\alpha$ -D-galactopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3) sulfate-4- $\beta$ -D-galactopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4) sulfate-2-anhydro-3-6- $\alpha$ -D-galactopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3) sulfate-4-D-galactopyranose (IC - ID - IE - IF, ).



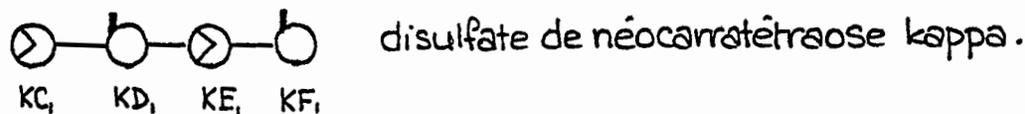
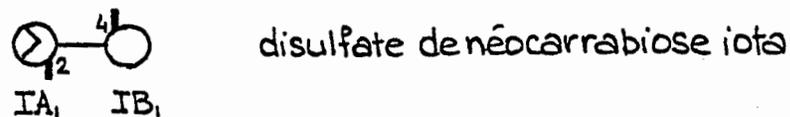
tétrasulfate de néocarratétraose iota

b.4 Spectre des oligosides  $I_2$  isolés de l'hydrolysat #5 de l'extrait polyosidique d'E. spinosum

Nous rappelons qu'en chromatographie sur plaque, la tache correspondant à  $I_2$  se dédouble (figure 15): deux oligosides sont probablement présents.

Sur le spectre R.M.N. (figure 26) nous observons 6 pics entre 110 et 90 p.p.m. Les pics à 103.22 p.p.m. ( $KD_1$ ), 97.34 p.p.m. ( $KF_{1\beta}$ ), 95.51 p.p.m. ( $KC_1$ ,  $KE_1$ ) et 93.17 p.p.m. ( $KF_{1\alpha}$ ) prouvent la présence d'un oligoside de carraghénane kappa de degré de polymérisation supérieur à deux (cf. figure 24, tétraholoside kappa,  $\delta$  = 903.21 p.p.m., 97.34 p.p.m., 95.51 p.p.m. et 93.17 p.p.m.). Le rapport de l'intégrale du pic  $KD_1$  sur celle du pic ( $KC_1$ ,  $KE_1$ ) est de 0.57, ceci suggère que l'oligoside est le tétraholoside lui-même (rapport théorique = 0.5). Ce résultat confirme l'analyse en chromatographie sur couche mince (le  $R_f$  moyen de la tache dédoublée est égal au  $R_{GAL}$  du tétraholoside kappa:  $K_2$ ,  $R_{GAL}$  = 0.73, 0.75).

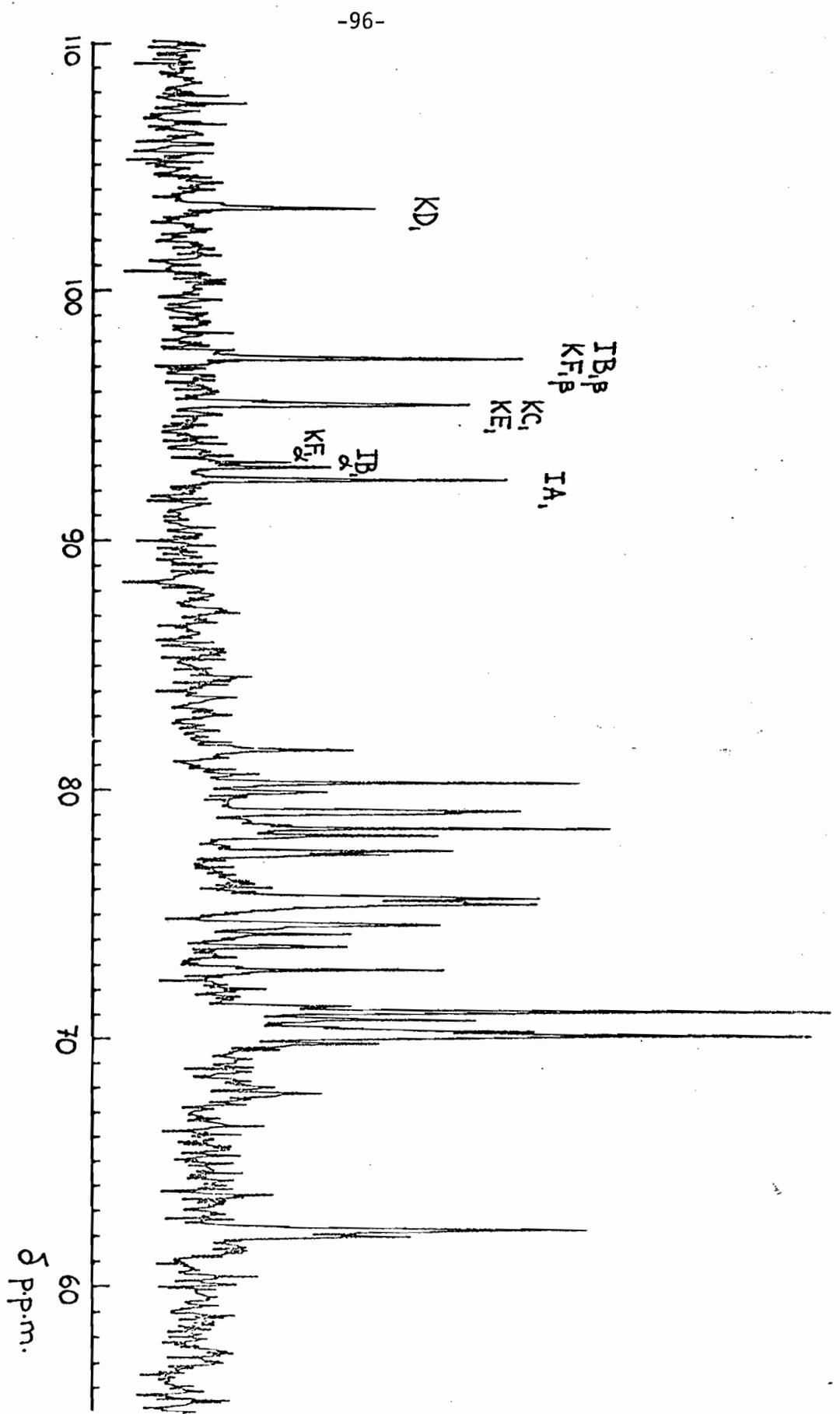
Figure 26 - Spectre R.M.N. des oligosides I<sub>2</sub> isolés de l'hydrolysat #5 de l'extrait polysidique d' Eucheuma spinosum



pics	$\delta$ p.p.m.	intégrales
KD <sub>1</sub>	103.22	0.29
IB <sub>1<math>\beta</math></sub> , KF <sub>1<math>\beta</math></sub>	97.34	-
KC <sub>1</sub> , KE <sub>1</sub>	95.51	0.51
KF <sub>1<math>\alpha</math></sub>	93.17	-
IB <sub>1<math>\alpha</math></sub>	92.97	-
IA <sub>1</sub>	92.47	-

- IA<sub>1</sub> : carbone n°1 des résidus sulfate-2 anhydro 3-6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl (iota) ( $\text{O}_2$ )  
 IB<sub>1 $\alpha$</sub>  et IB<sub>1 $\beta$</sub>  : \_\_\_\_\_ sulfate-4 D-galactopyranose (iota) anomères  $\alpha$  et  $\beta$ . (4 $\text{O}$ )  
 KC<sub>1</sub> et KE<sub>1</sub> : \_\_\_\_\_ anhydro 3-6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl (kappa) ( $\text{O}$ )  
 KD<sub>1</sub> : \_\_\_\_\_ sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranose (kappa) (4 $\text{O}$ )  
 KF<sub>1 $\alpha$</sub>  et KF<sub>1 $\beta$</sub>  : \_\_\_\_\_ sulfate-4 D-galactopyranose (kappa) anomères  $\alpha$  et  $\beta$ . (4 $\text{O}$ )  
 $\delta$  : déplacements chimiques relatifs au TMS

Figure 26



Les pics à 97.34 p.p.m. ( $IB_{1\beta}$ ), 92.97 p.p.m. ( $IB_{1\alpha}$ ) et 92.47 p.p.m. ( $IA_1$ ) prouvent l'existence d'un oligoside iota;  $IB_{1\beta}$  correspond à l'anomère  $\beta$  du galactose réducteur,  $IB_{1\alpha}$  à l'anomère  $\alpha$  et  $IA_1$  à l'anhydro-galactose (cf. spectre du tétraholoside de carraghénane iota, figure 24). L'absence de pic à 103.0 p.p.m. laisse supposer que l'oligoside iota est le diholoside. Ceci expliquerait le léger déplacement du signal de l'anhydro-galactose  $\delta = 92.47$  p.p.m. par rapport à celui que nous avons trouvé pour le tétraholoside iota  $\delta = 92.62$  p.p.m. (qui lui-même est légèrement différent de celui du polymère  $\delta = 72.76$  p.p.m.).

Le dédoublement de la tache  $I_2$  est donc expliqué: le diholoside de carraghénane iota et le tétraholoside de carraghénane iota ont approximativement le même  $R_{GAL}$ .

L'enzyme #5 dégrade donc le carraghénane kappa présent dans l'extrait d'Eucheuma spinosum et une partie du carraghénane iota.

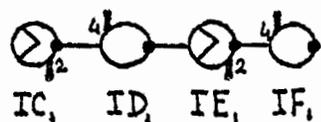
#### b.5 Spectre des oligosides $I_3$ isolés de l'hydrolysat #5 de l'extrait polyosidique d'E. spinosum

Le spectre des oligosides  $I_3$  isolés de l'hydrolysat #5 de l'extrait d'E. spinosum est présenté figure 27. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) des signaux et la valeur du rapport des intégrales sont absolument identiques à celles du néocarratétrase tétrasulfate iota (cf. figure 27,  $ID_1$ ,  $\delta = 102.97$  p.p.m.;  $IF_{1\beta}$ ,  $\delta = 97.34$  p.p.m.;  $IF_{1\alpha}$ ,  $\delta = 92.97$  p.p.m.;  $IC_1$ ,  $IE_1$ ,  $\delta = 92.62$  p.p.m.). Ceci suggère que l'autre oligoside en présence (visible en chromatographie sur plaque:  $I'_3$ , figure 15) est en concentration extrêmement faible par rapport au tétraholoside  $I_3$ .

Ce résultat confirme la double activité de carraghénases iota et kappa de la préparation enzymatique #5.

Pour conclure cette analyse de spectroscopie de R.M.N., nous avons regroupé dans un tableau (tableau 10) les valeurs des déplacements chimiques caractéristiques des oligosides et polymères de carraghénane kappa et iota.

Figure 27 - Spectre R.M.N. de l'oligoside I<sub>3</sub> isolé de l'hydrolysat #5 de l'extrait polyosidique de *Eucheuma spinosum*.



tétrasulfate de néocarratétrase iota

pics	$\delta$ p.p.m.	intégrales
ID <sub>1</sub>	102.97	1.1
IF <sub>1<math>\beta</math></sub>	97.34	0.9
IF <sub>1<math>\alpha</math></sub>	92.97	0.7
IC <sub>1</sub> , IE <sub>1</sub>	92.62	2.5

IC<sub>1</sub>, IE<sub>1</sub> : carbonen°1 des résidus sulfate-2 anhydro 3.6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl ( $\alpha_2$ )

ID<sub>1</sub> : ————— sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranosyl ( $\beta$ )

IF<sub>1 $\alpha$</sub>  et IF<sub>1 $\beta$</sub>  : ————— sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranose (anomères  $\alpha$  et  $\beta$ )

$\delta$  : déplacements chimiques relatifs au TMS.

Figure 27

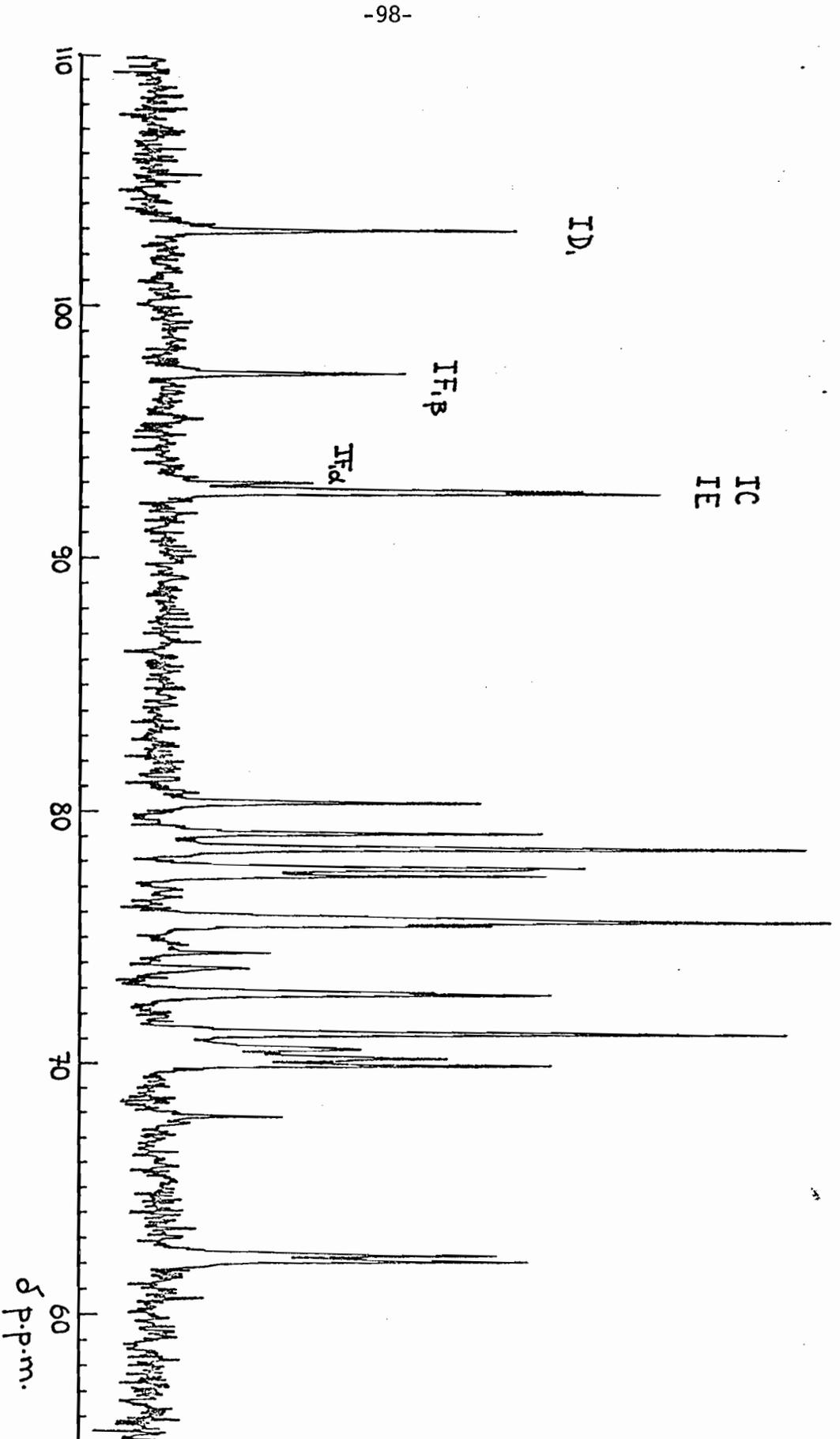


Tableau 10

Tableau récapitulatif des déplacements chimiques  
(en p.p.m.) des carbones n°1 des poly et oligosides  
de carraghénanes iota et kappa.

Résidus	diholoside A-B		tétraholoside C-D-E-F		polymère --(a-g) <sub>n</sub> --	
	Kappa ⓐ-ⓑ	Iota ⓐ-ⓑ	Kappa ⓐ-ⓑ-ⓐ-ⓑ	Iota ⓐ-ⓑ-ⓐ-ⓑ	Kappa [ⓐ-ⓑ] <sub>n</sub>	Iota [ⓐ-ⓑ] <sub>m</sub>
D, g	—	—	103.2	103.0	103.2	103.0
A, C, E, a.	95.5	92.5	95.5	92.6	96.0	92.7
B <sub>β</sub> , F <sub>β</sub>	97.3	97.3	97.3	97.3	—	—
B <sub>α</sub> , F <sub>α</sub>	93.2	93.0	93.2	93.0	—	—

- ⓐ anhydro 3-6 α-D-galactopyranosyl
- ⓑ sulfate-2 α-D-galactopyranosyl
- ⓐ sulfate-4 β-D-galactopyranosyl  
ou sulfate-4 D-galactopyranose (anomères de β)

## VII-2 DETERMINATION DU DEGRE DE POLYMERISATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PLAQUE

Après hydrolyse incomplète du carraghénane kappa par l'enzyme #9 (addition d'une solution diluée d'enzyme à la solution de carraghénane), nous observons, en chromatographie sur plaque de cellulose, la présence d'oligosides de masse molaire plus élevée que le diholoside  $K_1$  ( $R_{GAL} = 0.97 - 1.0$ ) et le tétraholoside  $K_2$  ( $R_{GAL} = 0.73 - 0.75$ ) (figure 28).

Nous avons calculé le Rf de chaque oligoside ( $Rf = \frac{\text{distance de migration de l'oligoside X}}{\text{distance de migration du front du solvant}}$ ) et avons corrélié (figure 29) le Rf et l'hypothétique degré de polymérisation (D.P.) de chaque oligoside par la relation de Martin (PATAKI - 1966)

$$R_m = \log\left(\frac{1}{Rf} - 1\right) = f(D.P.).$$

Pour que cette relation soit vérifiée, la fonction  $R_m = f(D.P.)$  doit être représentée par une droite. Sachant que les deux oligosides migrant le plus loin sur la plaque étaient le diholoside sulfate de néocarrabiose ( $K_1$ , D.P. = 2) et le tétraholoside disulfate de néocarrabiose ( $K_2$ , D.P. = 4), nous avons attribué aux 5 autres oligosides des D.P. pairs augmentant de 2 unités au fur et à mesure qu'ils se rapprochaient de l'origine. La figure 29 nous montre que la fonction  $R_m = f(D.P.)$  est effectivement une droite.

Le système cellulose MN 300 et Butanol/éthanol/eau (3/2/2.5) nous permet donc de séparer des oligosides de carraghénane kappa ayant les degrés de polymérisation suivants: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14.

Nous n'avons pu obtenir une aussi bonne séparation des oligosides de carraghénane iota ayant un D.P. supérieur à 6. Ceux-ci ont tendance à former une traînée sur la plaque de chromatographie et les différents oligosides ne peuvent être discernés les uns des autres. Ceci est probablement dû à la présence du groupe sulfate supplémentaire sur le carbone 2 de l'anhydro-galactose. Plus un sucre est chargé, plus il tend à former une traînée en chromatographie sur plaque, et donc plus il est difficile de le séparer des autres composés.

Figure 28 - Chromatogramme d'hydrolysats  
de carraghénane kappa - hydrolyse incomplète.

GAL : Galactose

A : carraghénane kappa hydrolysé par l'enzyme #7

B : carraghénane kappa hydrolysé par l'enzyme #9

chromatographie sur plaque de cellulose MN300  
solvant : butanol/éthanol/eau (3/2/2.5)

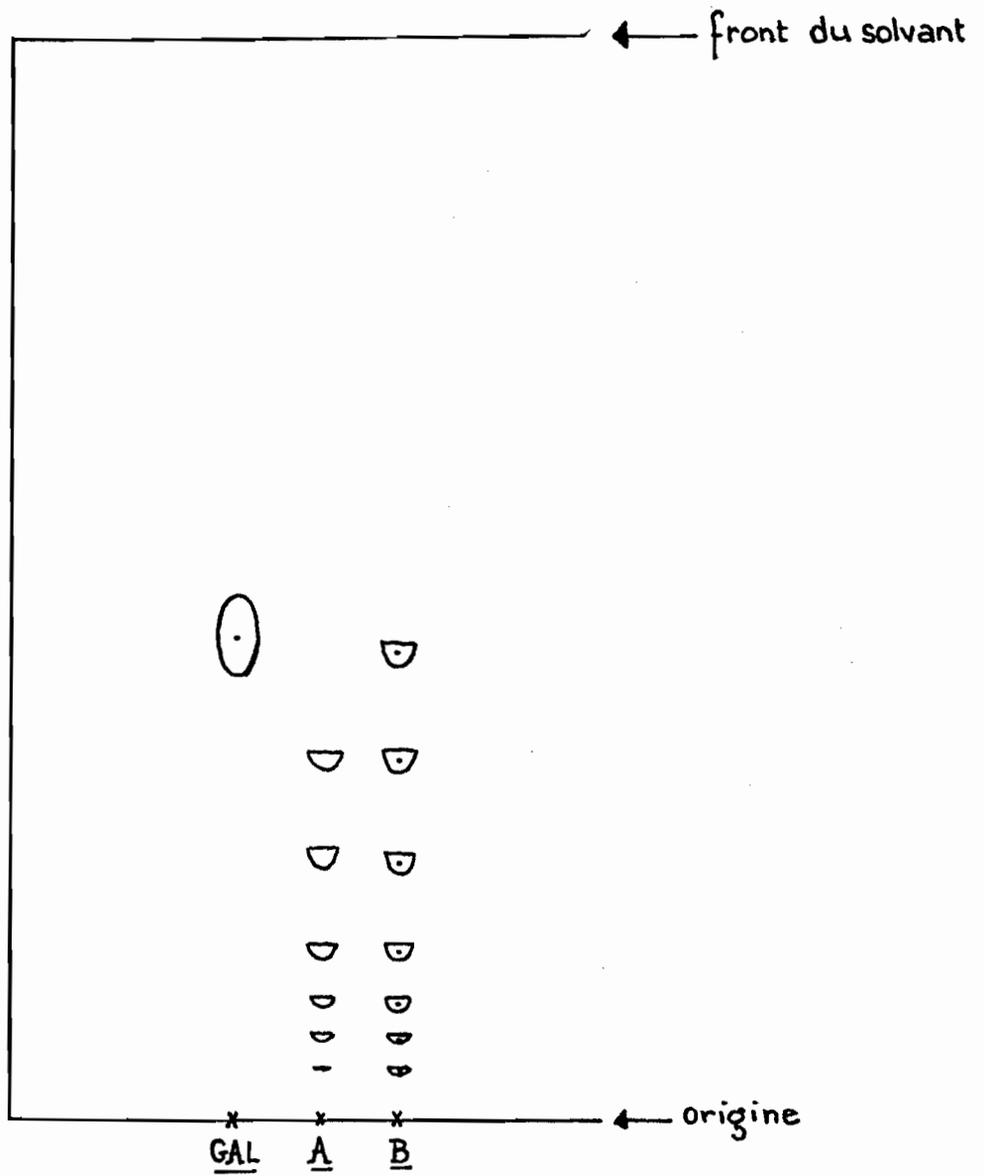


Figure 28

Tableau II et figure 29

Oligosides de carraghénane kappa

Corrélation  $R_m = \log \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right) = f. (D.P.)$

D.P. : degré de polymérisation

degré de polymérisation (D.P.)	$R_f$	$R_m$
2	0.435	0.106
4	0.335	0.298
6	0.236	0.510
8	0.157	0.731
10	0.114	0.891
12	0.078	1.070
14	0.050	1.278

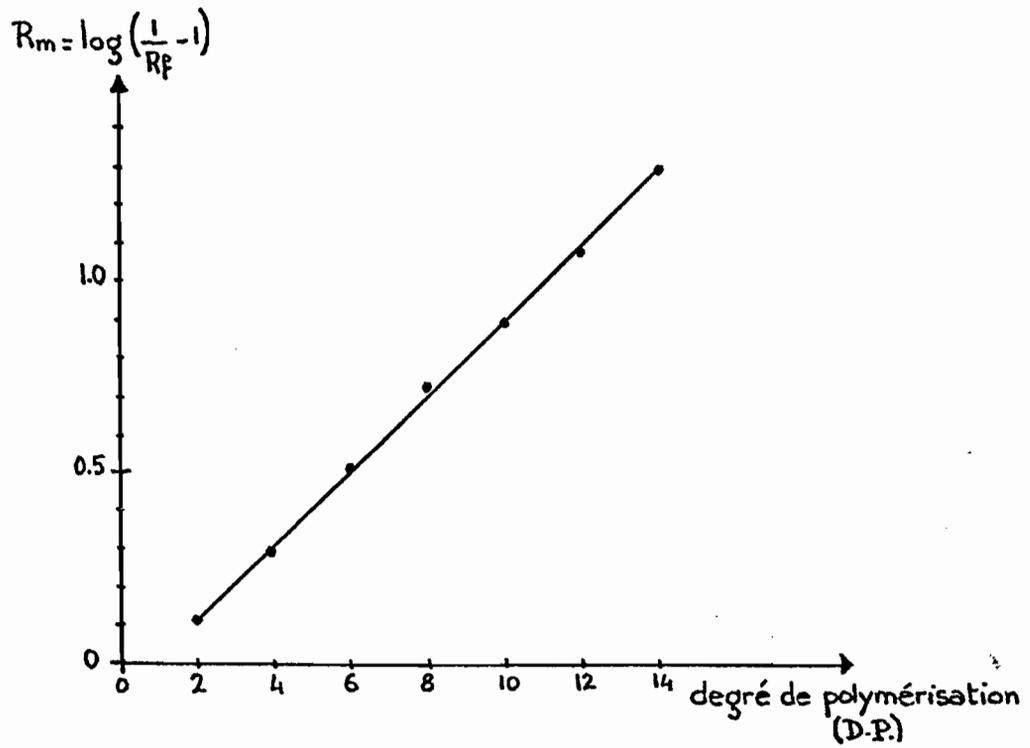


Tableau II et figure 29

## VIII: SPECIFICITE DES ENZYMES

### VIII-1 ACTIVITE DES ENZYMES EXTRACELLULAIRES #1 ET #9 SUR DIFFERENTES FAMILLES DE POLYOSIDES: AGAR ET CARRAGHENANES

#### a. Agar et carraghénane lambda ( $\eta$ )

L'activité des enzymes #1 et #9 est testée sur agar, carraghénane iota, et carraghénane kappa (les enzymes sont induites indifféremment sur carraghénane iota ou kappa). L'activité des enzymes sur agar (DIFCO-BACTO) est testée par viscosimétrie à 40°C et par chromatographie sur plaque. Aucun changement de viscosité de la solution d'agar n'a pu être observé. Aucun oligoside n'apparaît sur la plaque de chromatographie. L'activité de ces enzymes a été également testée sur carraghénane lambda. Nous n'avons détecté aucune activité. Les enzymes #1 et #9 n'ont donc aucune action hydrolysante sur l'agar et le carraghénane  $\lambda$ .

#### b. Carraghénanes iota et kappa

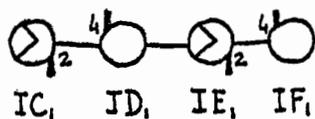
##### b.1 Enzyme #1

*L'enzyme #1 liquéfie très rapidement les échantillons de carraghénane iota.* Les produits d'hydrolyse peuvent être séparés sur plaque de chromatographie comme nous l'avons vu (figure 13).

La fraction contenant les oligosides de faible masse molaire (soluble dans l'éthanol après hydrolyse) a été analysée en spectroscopie de R.M.N. du carbone 13 (figure 30). La valeur des déplacements chimiques et celle du rapport des intégrales des signaux sont identiques à celles du tétrasulfate de néocarratétriose iota (figure 25).

La fraction de l'hydrolysate insoluble dans l'éthanol a également été analysée en spectroscopie de R.M.N. (figure 31, échantillon 712503). Quatre pics apparaissent dans la zone de résonance des carbones 1. Les pics à 103.1 p.p.m. ( $Kg_1$ ,  $Ig_1$ ), 95.7 p.p.m. ( $Ka_1$ ) et 92.6 p.p.m. ( $Ia_1$ ) indiquent la présence de carraghénanes kappa et iota en quantité à peu près égale. Le pic à 97.3 p.p.m. ( $\beta$ ) est très faible et met en évidence la faible concentration d'oligosides. Les molécules de kappa et iota sont donc essentiellement à l'état de polymère.

Figure 30 - Spectre R.M.N. de la fraction soluble dans l'éthanol, de l'hydrolysat #1 de carraghénane iota (E. spinosum)



pics	$\delta$ p.p.m.	intégrales
ID <sub>1</sub>	102.99	0.39
IF <sub>1<math>\beta</math></sub>	97.33	0.20
IF <sub>1<math>\alpha</math></sub>	92.98	0.54
IC <sub>1</sub> , IE <sub>1</sub>	92.68	0.38

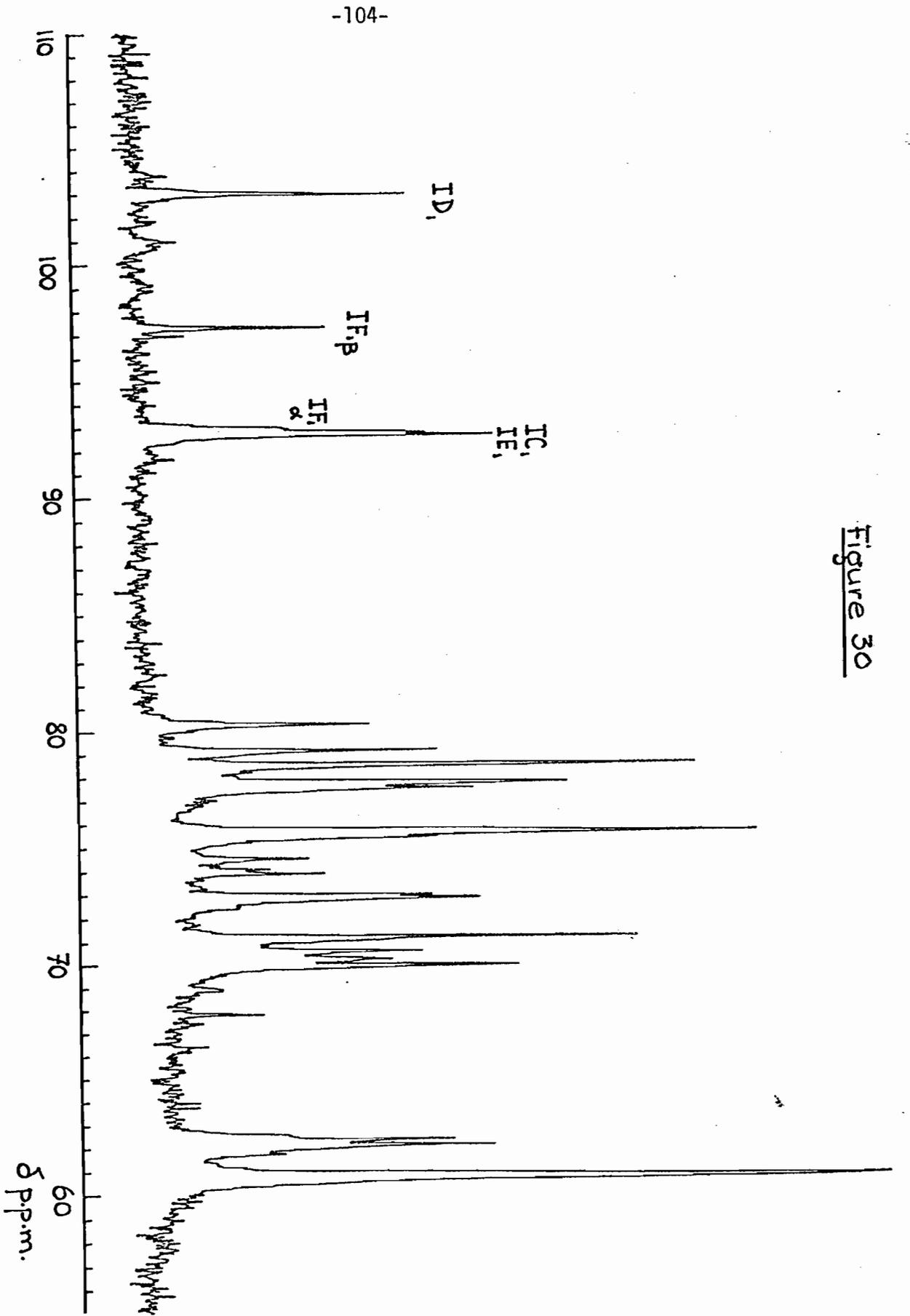
IC<sub>1</sub>, IE<sub>1</sub> : carbone n° des résidus sulfate-2 anhydro 3-6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl (Q<sub>2</sub>)

ID<sub>1</sub> : ————— sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranosyl (b)

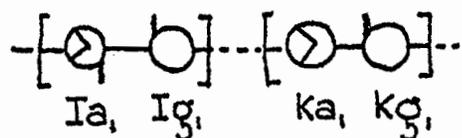
IF<sub>1 $\alpha$</sub>  et IF<sub>1 $\beta$</sub>  : ————— sulfate-4 -D galactopyranose (anomères  $\alpha$  et  $\beta$ ) (b)

$\delta$  : déplacements chimiques relatifs au TMS.

Figure 30



Figures 31 et 32 - Spectres R.M.N. de la fraction insoluble dans l'éthanol de l'hydrolysat #1 du polyside extrait d'Eucheuma spinosum - échantillons # 712503 et # 31210 - (carraghénanes iota : I, et kappa : k)



pics	$\delta$ p.p.m. #712503	$\delta$ p.p.m. #31210
Ig, Kg,	103.1	103.1
$\beta$	97.3	97.3
Ka,	95.7	95.7
Ia,	92.5	92.6

Ia, : carbonen°1 des résidus sulfate-2 anhydro 3,6  $\alpha$ -D.galactopyranosyl (⊗)

Ig, : ————— sulfate-4  $\beta$ -D.galactopyranosyl (iota) (⊙)

Ka, : ————— anhydro 3,6  $\alpha$ -D.galactopyranosyl (⊗)

Kg, : ————— sulfate-4  $\beta$ -D.galactopyranosyl (kappa) (⊙)

$\delta$  : déplacements chimiques relatifs au TMS

Figure 31 - échantillon # 712503 (E. spinosum)

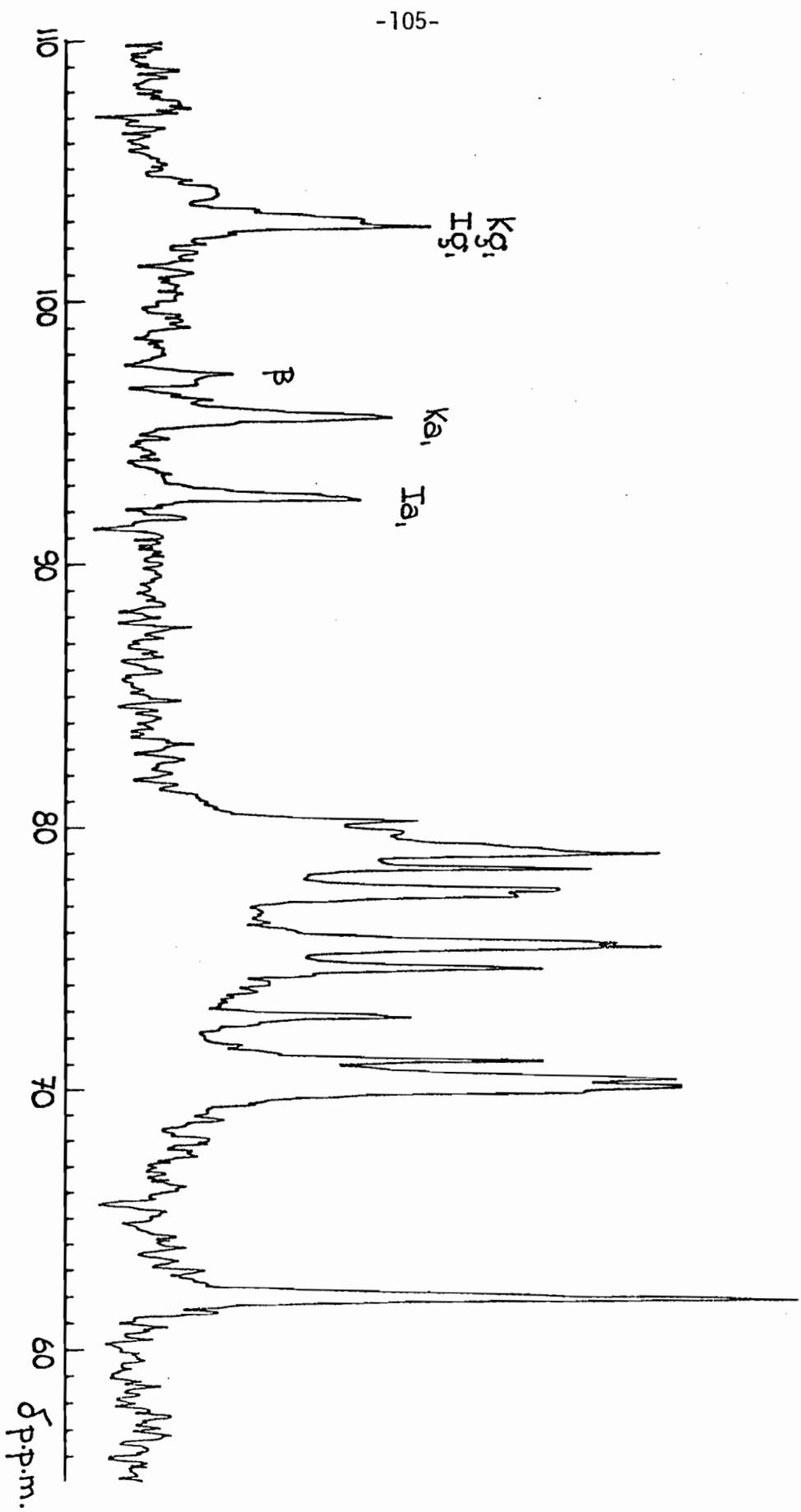
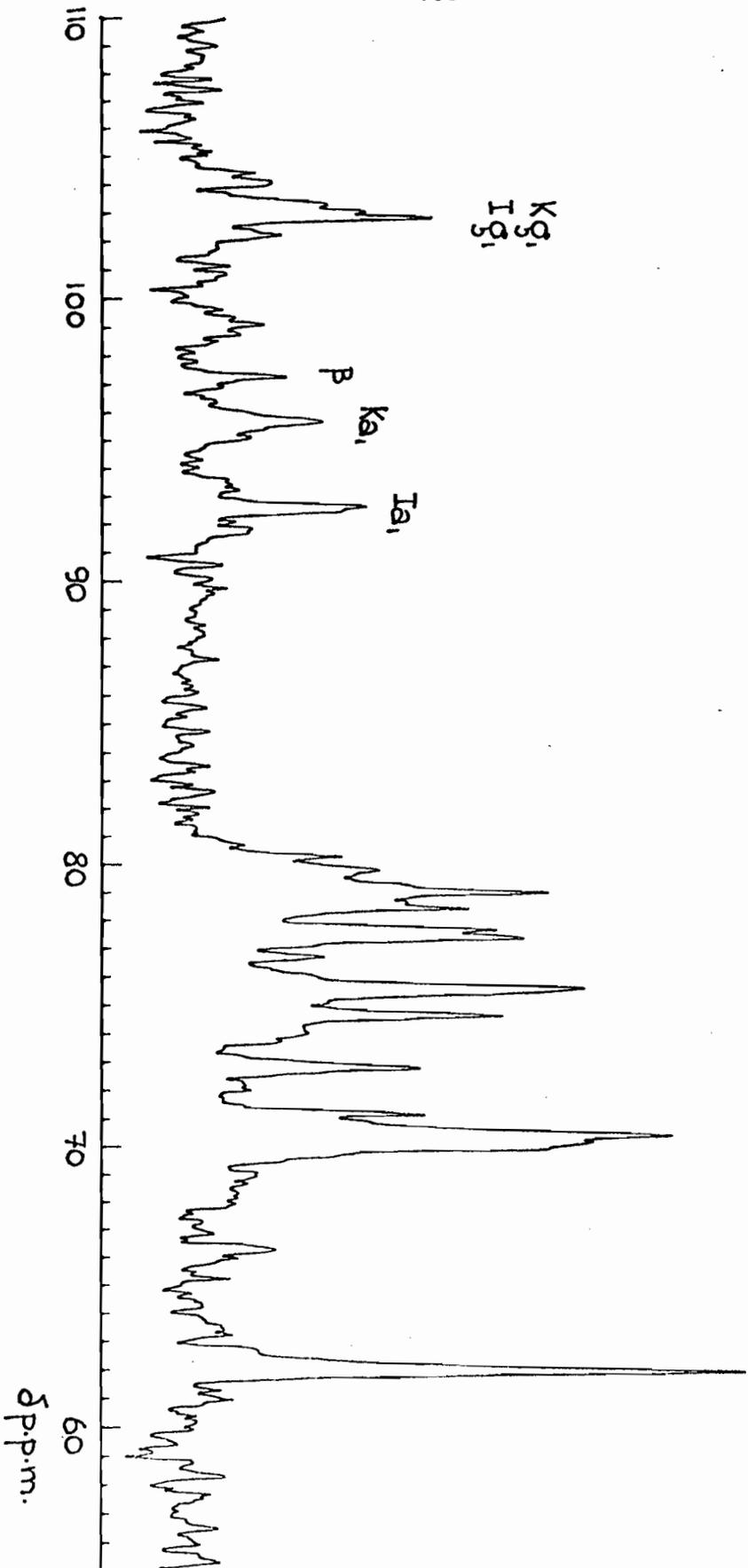


Figure 32 - échantillon # 31210 (E. spinosum)

-106-



Le spectre de l'échantillon #31210 (*E. spinosum*, figure 32) est semblable à celui que nous venons de décrire. L'intensité des pics est différente. Le pic à 95.7 p.p.m. ( $Ka_1$ ) correspondant au carraghénane kappa est moins intense mais confirme la présence de résidus kappa dans le polyoside.

*L'enzyme #1 dégrade très faiblement le carraghénane kappa.* En chromatographie sur plaque, aucun oligoside n'apparaît si l'hydrolysate est analysé avant précipitation à l'éthanol. Mais après précipitation de la fraction non dégradée (90%) et concentration de la fraction soluble, celle-ci, analysée en chromatographie sur plaque, présente la séquence d'oligosides  $K_1, K_2, I_3$  (figure 33). Pour mieux comprendre la nature de l'hydrolysate, cette fraction a été analysée par spectroscopie de R.M.N. (figure 34). Entre 110 et 90 p.p.m., sortent quatre principaux pics. La présence d'unités réductrices est prouvée par le pic ( $KF_{1\beta}, IF_{1\beta}$ ) à 97.36 p.p.m. (carbone 1 de l'anomère  $\beta$  du galactose réducteur). La présence d'oligosides de carraghénane kappa est prouvée par le pic ( $KC_1, KE_1$ ) à 95.51 p.p.m. (carbone 1 des résidus anhydrogalactose kappa). Le pic situé aux environs de 103 p.p.m. nous montre qu'il y a en solution des oligosides de degré de polymérisation supérieur à 2. Ce pic est dédoublé ( $KD_1, ID_1$ ), les oligosides sont donc de nature différente. Si l'on se réfère aux spectres des tétraholosides purs de carraghénanes kappa et iota (figures 24 et 25), on peut attribuer le premier pic,  $KD_1$  ( $\delta = 103.19$  p.p.m.), au carbone 1 du galactose non réducteur d'un oligoside de carraghénane kappa et le second,  $ID_1$  ( $\delta = 102.97$  p.p.m.) à celui d'un oligoside de carraghénane iota. La présence d'oligosides d'origine iota est confirmée par le pic à 92.60 p.p.m. ( $IC_1, IE_1$ ) représentant les résidus anhydro-galactose iota.

Le rapport de l'intégrale du pic  $KD_1$ , sur celle du pic  $KC_1, KE_1$  est égal à 0.76 suggérant que l'oligoside kappa est principalement le tétraholoside (rapport théorique: 0.5), avec probablement une faible quantité d'hexaholoside (rapport théorique: 1.6). Il n'est pas possible d'utiliser les intégrales des pics caractérisant l'oligoside iota; le dernier pic à 92.60 p.p.m. est confondu avec ceux représentant les anomères  $\alpha$ .

Figure 33 - Chromatogramme de l'hydrolysat  
#1 de l'extrait polyosidique de E.cottonii (kappa)

GAL : galactose

K<sub>1</sub> : sulfate de néocarrabiose kappa

K<sub>2</sub> : disulfate de néocarratétraose kappa

I<sub>3</sub> : tétrasulfate de néocarratétraose iota

HK : hydrolysat #1 de l'extrait polyosidique  
de Eucheuma cottonii (kappa)

- chromatographie sur plaque de cellulose MN300.

- solvant : Butanol / éthanol / eau (3/2/2.5)

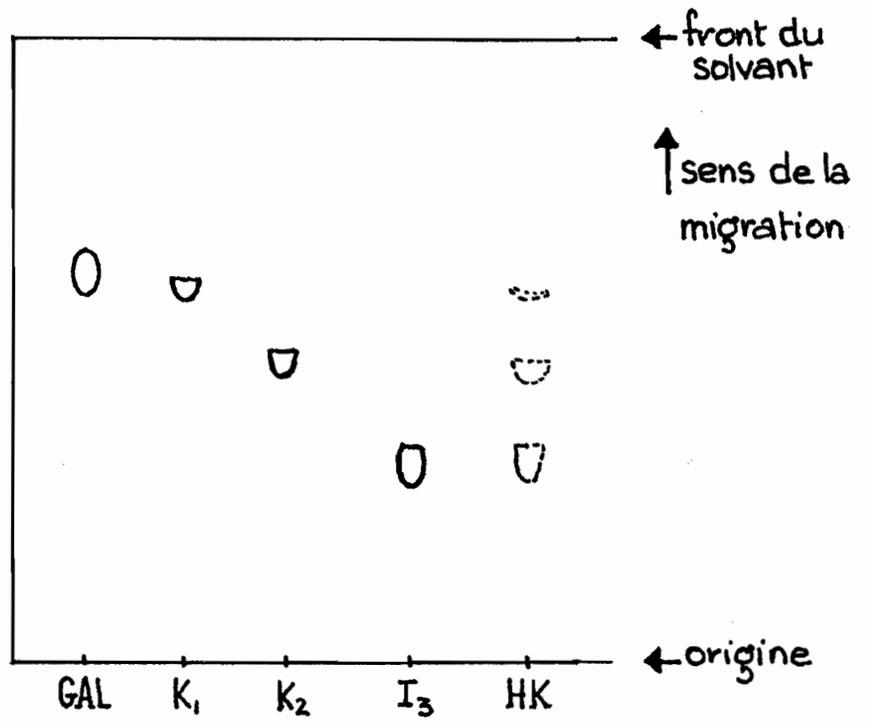
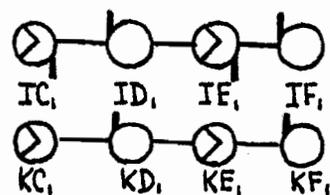


Figure 33

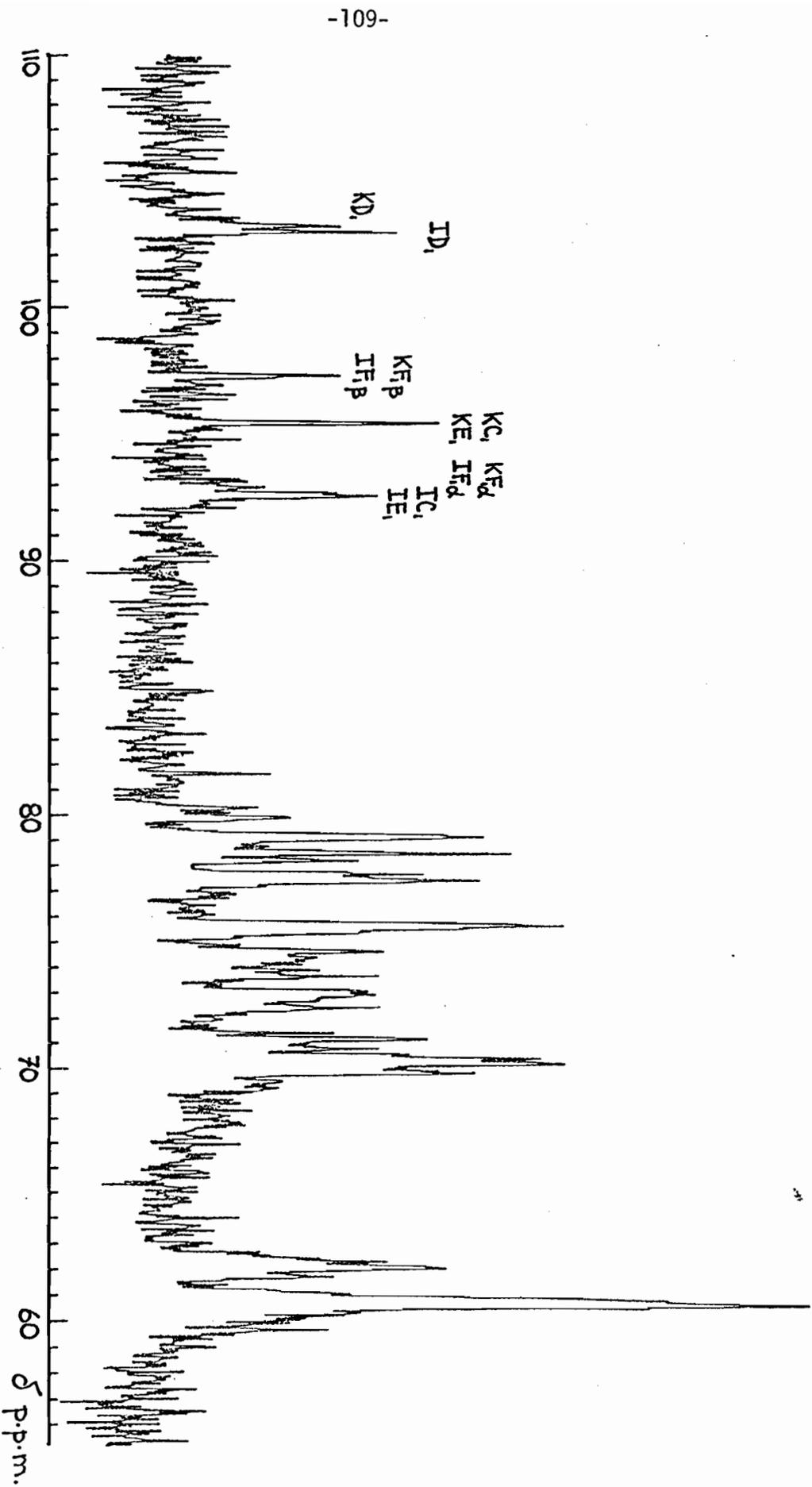
Figure 34 - Spectre R.M.N. de la fraction soluble dans l'éthanol de l'hydrolysât #1 du polyside extrait d' *Eucheuma cottonii*



pics	$\delta$ p.p.m.	intégrales
KD <sub>1</sub>	103.19	0.84
ID <sub>1</sub>	102.98	-
KF <sub>1\beta</sub> , IF <sub>1\beta</sub>	97.36	-
KC <sub>1</sub> , KE <sub>1</sub>	95.51	1.10
KF <sub>1\alpha</sub> , IF <sub>1\alpha</sub>	92.60	-
IC <sub>1</sub> , IE <sub>1</sub>		

- IC<sub>1</sub>, IE<sub>1</sub> : carbone n°1 des résidus sulfate-2 anhydro 3,6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl ( $\varnothing$ )  
 ID<sub>1</sub> : \_\_\_\_\_ sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranosyl (iota) (b)  
 IF<sub>1\alpha</sub>, IF<sub>1\beta</sub> : \_\_\_\_\_ sulfate-4 D-galactopyranose (anomères  $\alpha$  et  $\beta$ ) (iota)  
 KC<sub>1</sub>, KE<sub>1</sub> : \_\_\_\_\_ anhydro 3,6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl ( $\varnothing$ )  
 KD<sub>1</sub> : \_\_\_\_\_ sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranosyl (kappa) (b)  
 KF<sub>1\alpha</sub>, KF<sub>1\beta</sub> : \_\_\_\_\_ sulfate-4 D-galactopyranose (anomères  $\alpha$  et  $\beta$ ) (kappa)  
 $\delta$  : déplacements chimiques relatifs au TMS.

Figure 34



Cependant, par chromatographie sur plaque (figure 33), nous observons la présence d'une tache correspondant au tétraholoside iota ( $I_3$ ,  $R_{GAL} = 0.51 - 0.54$ ). Les résultats obtenus en spectroscopie de R.M.N. et en chromatographie sur couche mince ne permettent pas de prouver si le diholoside iota est présent ou non. Nous verrons dans la Discussion que sa présence est très peu probable.

La fraction soluble dans l'éthanol de l'hydrolysat de carraghénane kappa dégradé par l'enzyme #1, contient donc principalement les tétraholosides kappa et iota.

#### b.2 Enzyme #9

L'enzyme #9 a une très grande activité sur le carraghénane kappa. La fraction contenant les oligosides de faible masse molaire (80%) a été analysée en spectroscopie de R.M.N. (figure 35). Quatre pics apparaissent entre 90 et 110 p.p.m.:  $KD_1$ ,  $\delta = 103.21$  p.p.m.;  $KB_{1\beta}$ ,  $KF_{1\beta}$ ,  $\delta = 97.36$  p.p.m.;  $KA_1$ ,  $KC_1$ ,  $KE_1$ ,  $\delta = 95.53$  p.p.m.;  $KB_{1\alpha}$ ,  $KF_{1\alpha}$ ,  $\delta = 93.17$  p.p.m. Ces signaux sont caractéristiques d'oligosides de carraghénane kappa pur (cf. spectre des di et tétraholosides purifiés, figures 23 et 24). Nous rappelons qu'en chromatographie sur couche mince, nous observons principalement deux taches  $K_1$  et  $K_2$  correspondant aux di et tétraholosides kappa (figure 11); ces deux oligosides sont donc les principaux composants de l'hydrolysat.

Le rapport de l'intégrale du pic  $KD_1$  sur la somme de celles des quatre pics a pour valeur 0.174 suggérant que le mélange di et tétraholosides est équimoléculaire (rapport théorique: 0.167).

La fraction soluble dans l'éthanol de l'hydrolysat de carraghénane kappa dégradé par l'enzyme #9 contient donc en quantité égale du nécarrabiose kappa et du néocarratétrase kappa.

La fraction résistante de l'hydrolysat a également été analysée en spectroscopie de R.M.N. (figure 36).

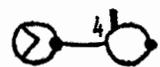
Cinq pics apparaissent entre 110 et 90 p.p.m. Le pic à 97.2 p.p.m. (K $\beta$ ) prouve la présence d'une quantité importante d'oligosides (carbone 1 de l'anomère  $\beta$  du galactose). L'extrémité réductrice de ces oligosides semble être principalement de nature kappa étant donné la présence du pic K $\alpha$  ( $\delta$  = 93.0 p.p.m.) caractéristique de l'anomère  $\alpha$  du galactose réducteur des oligosides kappa. Les pics I $g_1$ , K $g_1$  ( $\delta$  = 102.9 p.p.m.), K $a_1$  ( $\delta$  = 95.3 p.p.m.) et I $a_1$  ( $\delta$  = 92.4 p.p.m.) sont caractéristiques des polymères de carraghénanes kappa et iota. La fraction insoluble dans l'éthanol de l'hydrolysate #9 de carraghénane kappa semble donc contenir des oligosides de poids moléculaires élevés, de nature hybride kappa-iota. Le pourcentage de résidus iota présents dans cette fraction est d'environ 45%.

L'enzyme #9 dégrade les trois échantillons (cf. Annexe) d'Eucheuma spinosum (carraghénane iota). Environ 25% des hydrolysats restent dans la fraction soluble après précipitation à l'éthanol. Cette fraction présente, en chromatographie sur plaque, une séquence d'oligosides reportée figure 11. Sur le spectre R.M.N. (figure 37), six pics sortent entre 110 et 90 p.p.m. Les pics K $D_1$  ( $\delta$  = 103.19 p.p.m.), K $B_{1\beta}$ , K $F_{1\beta}$  ( $\delta$  = 97.36 p.p.m.), K $A_1$ , K $C_1$ , K $E_1$  ( $\delta$  = 95.1 p.p.m.) et K $B_{1\alpha}$ , K $F_{1\alpha}$  ( $\delta$  = 93.17 p.p.m.) prouvent que l'hydrolysate contient des oligosides d'origine kappa (cf. figure 36). Le rapport de l'intégrale du pic K $D_1$  sur la somme des intégrales des quatre pics est égal à 0.180. Cette valeur est très proche du rapport théorique déjà calculé (0.167) d'un mélange équimoléculaire de di et tétraholosides kappa.

Les deux autres pics I $g_1$  ( $\delta$  = 102.99 p.p.m.) et I $a_1$  ( $\delta$  = 92.72 p.p.m.) sont caractéristiques du carraghénane iota et correspondent probablement à un faible pourcentage de polymère partiellement dégradé (par l'hydrolyse des résidus kappa) qui n'aurait pas précipité après addition d'éthanol.

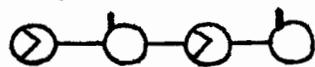
La fraction soluble dans l'éthanol de l'hydrolysate #9 de l'extrait polyosidique d'Eucheuma spinosum (échantillon #712503) est donc essentiellement constitué de néocarrabiose et néocarratétraose kappa en quantité égale, mélangés à une faible quantité de polymère iota.

Figure 35 - Spectre R.M.N. de la fraction soluble dans l'éthanol de l'hydrolysat #9 de carraghénane kappa (E.cottonii)



KA<sub>1</sub> KB<sub>1</sub>

sulfate de néocartriose kappa



KC<sub>1</sub> KD<sub>1</sub> KE<sub>1</sub> KF<sub>1</sub>

disulfate de néocarrotétraose kappa

pics	$\delta$ p.p.m.	intégrales
KD <sub>1</sub>	103.21	33.5
KB <sub>1\beta</sub> , KF <sub>1\beta</sub>	97.36	39.6
KA <sub>1</sub> , KE <sub>1</sub> KC <sub>1</sub> }	95.52	93.7
KB <sub>1\alpha</sub> , KF <sub>1\alpha</sub>	93.17	23.6

KA<sub>1</sub>, KC<sub>1</sub>, KE<sub>1</sub> : carbonen°1 des résidus anhydro 3-6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl (⊗)

KB<sub>1\alpha</sub>, KB<sub>1\beta</sub>, KF<sub>1\alpha</sub> et KF<sub>1\beta</sub> : \_\_\_\_\_ sulfate-4 D-galactopyranose (anomères  $\alpha$  et  $\beta$ ) (b)

KD<sub>1</sub> : \_\_\_\_\_ sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranosyl (b)

$\delta$  : déplacements chimiques relatifs au TMS.

Figure 35

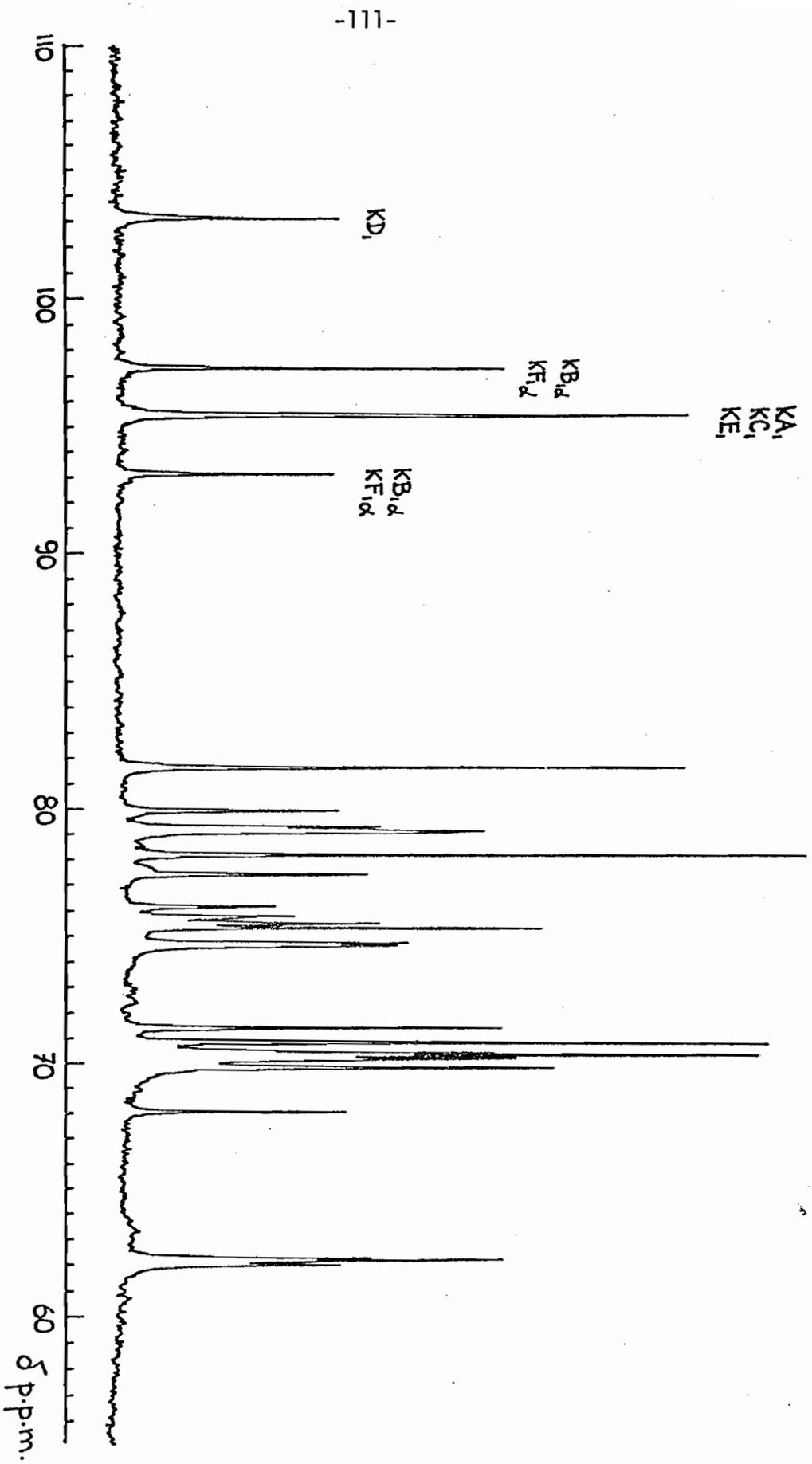
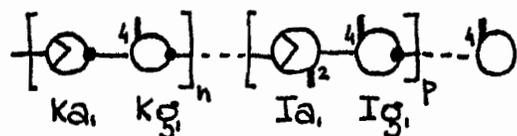


Figure 36 - Spectre R.M.N. de la fraction insoluble dans l'éthanol de l'hydrolysat #9 du polyoside extrait d'Euchemma cottonii



pics	$\delta$ p.p.m.	intégrales
$kg_1, Ig_1$	102.9	-
$k\beta$	97.2	-
$ka_1$	95.3	32
$k\alpha$	93.0	-
$Ia_1$	92.4	26

- $ka_1$  : atome de carbone n°1 des résidus anhydro 3.6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl ( $\alpha$ )  
 $kg_1$  : \_\_\_\_\_ sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranosyl (kappa) ( $\beta$ )  
 $Ia_1$  : \_\_\_\_\_ sulfate-2 anhydro 3.6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl ( $\alpha$ )  
 $Ig_1$  : \_\_\_\_\_ sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranosyl (iota) ( $\beta$ )  
 $k\alpha$  et  $k\beta$  : \_\_\_\_\_ sulfate-4 D-galactopyranose (kappa) (anomères  $\alpha$  et  $\beta$ )  
 $\delta$  : déplacements chimiques relatifs au TMS.

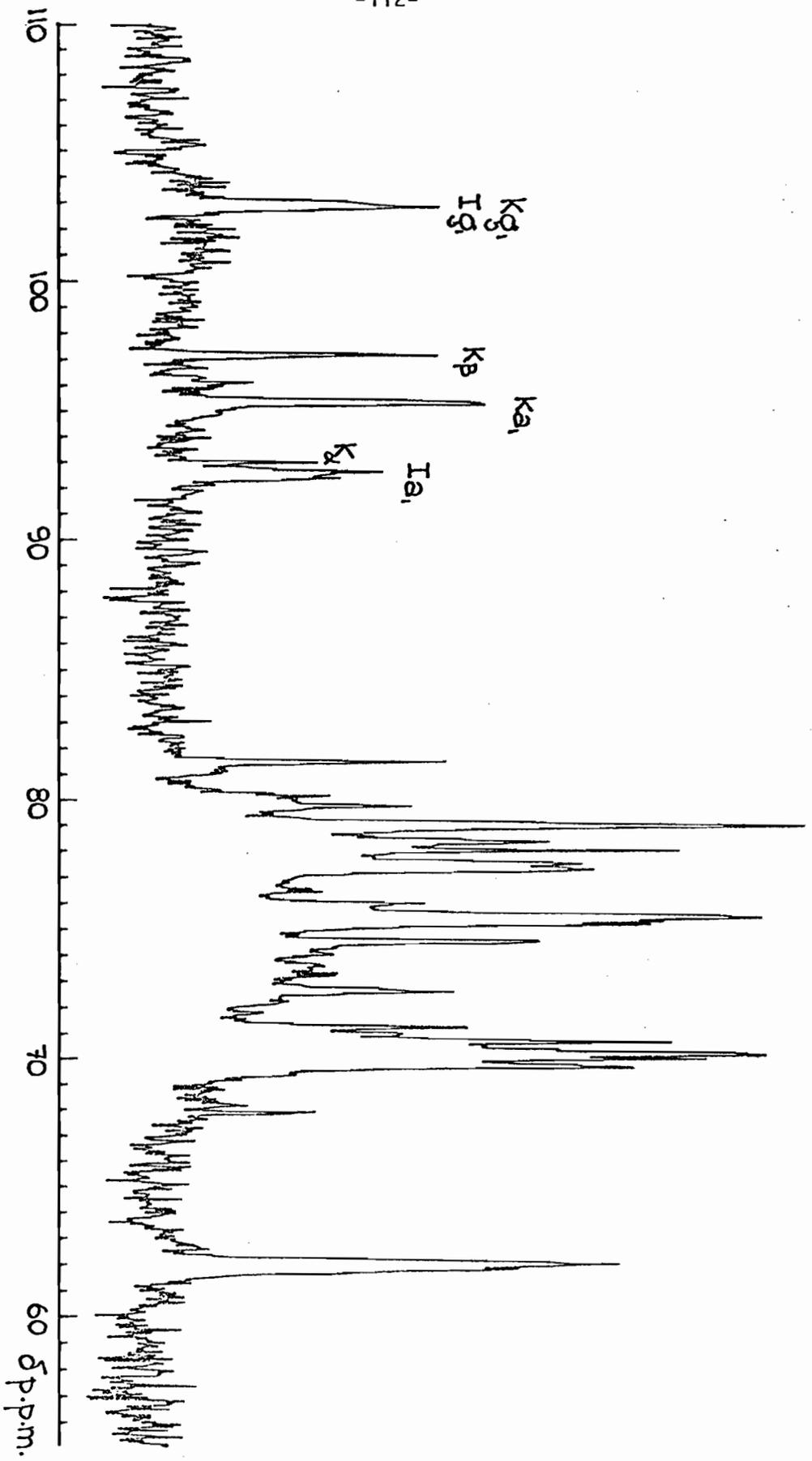
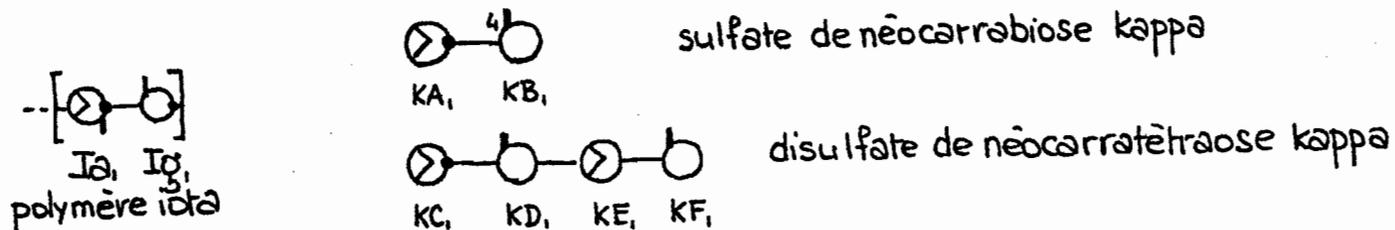


Figure 36

Figure 37 - Spectre R.M.N. de la fraction soluble dans l'éthanol de l'hydrolysât #9 du polyside extrait d'*Eucommia spinatum*



pics	$\delta$ p.p.m.	intégrales
KD <sub>i</sub>	103.21	0.9
Ig <sub>i</sub>	102.99	0.4
KB <sub><math>\beta</math></sub> , KF <sub><math>\beta</math></sub>	97.36	1.3
KA <sub>i</sub> , KC <sub>i</sub> , KE <sub>i</sub>	95.48	2.0
KB <sub><math>\alpha</math></sub> , KF <sub><math>\alpha</math></sub>	93.17	0.8
Ia <sub>i</sub>	92.72	0.6

- Ia<sub>i</sub> : atome de carbone n°1 des résidus sulfate-2 anhydro 3,6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl (2<sub>2</sub>)  
 Ig<sub>i</sub> : \_\_\_\_\_ sulfate-4 galactopyranosyl (iota) (4<sub>0</sub>)  
 KA<sub>i</sub>, KC<sub>i</sub>, KE<sub>i</sub> : \_\_\_\_\_ anhydro 3,6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl (2)  
 KB <sub>$\alpha$</sub> , KB <sub>$\beta$</sub> , KF <sub>$\alpha$</sub>  et KF <sub>$\beta$</sub>  : \_\_\_\_\_ sulfate-4 D-galactopyranose (anomères  $\alpha$  et  $\beta$ ) (b)  
 KD<sub>i</sub> : \_\_\_\_\_ sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranosyl (b)  
 $\delta$  : déplacements chimiques relatifs au TMS.

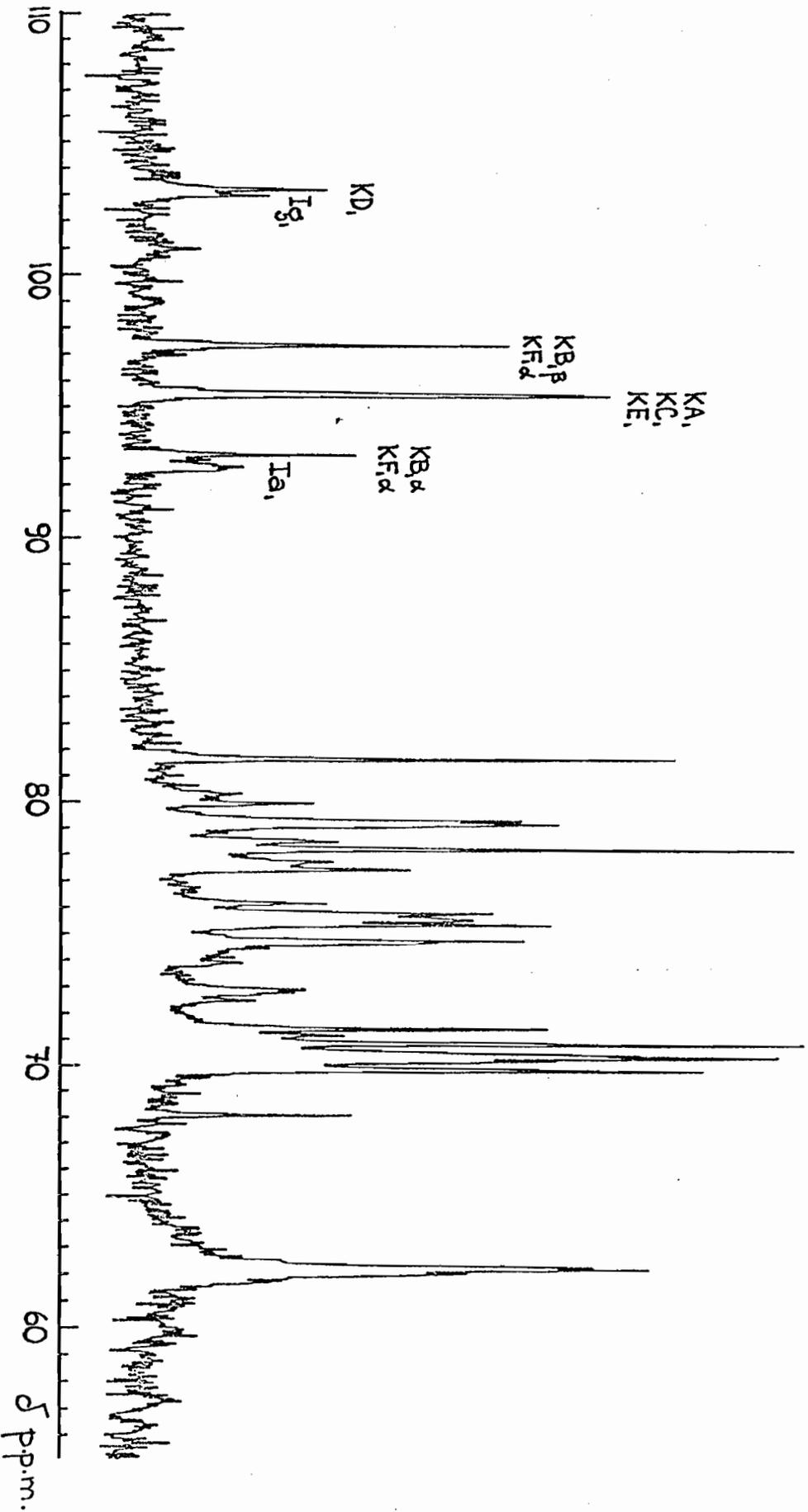


Figure 37

Nous avons également analysé en spectroscopie de R.M.N. la fraction résistante de l'extrait d'Eucheuma spinosum (échantillon #715203) après traitement à l'enzyme #9 (figure 38).

Deux pics apparaissent entre 110 et 90 p.p.m.,  $I_{a_1}$ ,  $\delta = 102.98$  p.p.m. et  $I_{g_1}$ ,  $\delta = 92.77$  p.p.m., caractéristique du carraghénane iota. L'absence de pic à 97.30 p.p.m. indique qu'il n'y a pas d'oligoside en présence.

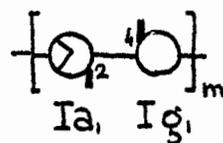
En comparant ce spectre à celui du même échantillon non dégradé (figure 21), nous observons la disparition du pic à 95.93 p.p.m. correspondant à la présence de carraghénane kappa. Ceci correspond parfaitement au résultat que nous venons d'exposer dans le paragraphe précédent: les résidus kappa présents dans l'extrait polyosidique ont été dégradés en di et tétraholosides.

Aucune dégradation du polymère de carraghénane iota par l'enzyme #9 n'a pu être détectée par spectroscopie de R.M.N. Nous avons cependant testé l'enzyme sur le carraghénane iota purifié par deux traitements à l'enzyme #9 (les détails expérimentaux sont décrits page 136). L'hydrolysat a ensuite été analysé par chromatographie sur plaque; le chromatogramme obtenu est présenté figure 39. L'intensité des taches est très faible, laissant supposer que l'enzyme #9 a peu d'affinité pour le carraghénane iota. On peut néanmoins discerner la présence d'un oligoside ( $I_2$ ) ayant un  $R_{GAL}$  semblable au tétraholoside kappa ( $R_{GAL} = 0.73 - 0.75$ ), suivi d'un oligoside ayant un  $R_{GAL}$  semblable au tétraholoside iota ( $I_3$ ). Un fait très important est à remarquer: l'oligoside  $I_1$  a complètement disparu, laissant supposer que l'oligoside  $I_2$  est le produit final de l'hydrolyse. Effectivement, nous verrons plus loin que  $I_2$  a été identifié comme étant le diholoside iota.

L'enzyme #9 hydrolyse donc très faiblement le carraghénane iota.

En conclusion, les deux enzymes #1 et #9 sont des carraghénases n'ayant aucune activité d'agarase ni de carraghénase lambda.

Figure 3B - Spectre R.M.N. de la fraction insoluble dans l'éthanol de l'hydrolysât #9 du polyside extrait d'Eucheuma spinosum



polymère iota

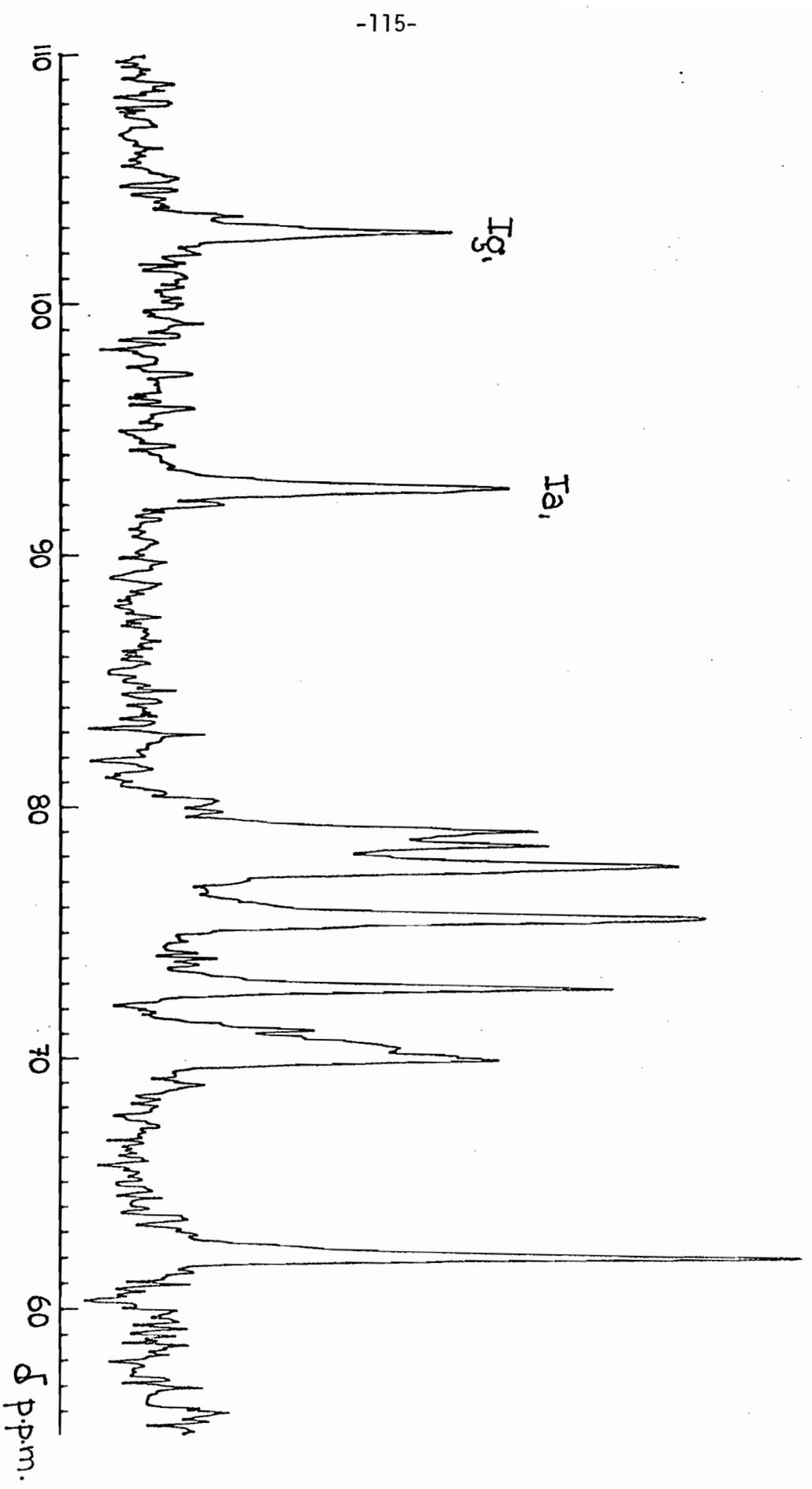
pics	$\delta$ p.p.m.
Ig <sub>1</sub>	102.9.
Ia <sub>1</sub>	92.7

Ig<sub>1</sub>: atome decarbone n°1 des résidus sulfate-4  $\beta$ -D-galactopyranosyl (4b)

Ia<sub>1</sub>: \_\_\_\_\_ sulfate-2 anhydro 3-6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl (2z)

$\delta$ : déplacements chimiques relatifs au TMS.

Figure 38



La préparation enzymatique #1 a une très grande activité hydrolysante sur le carraghénane iota et une faible sur le carraghénane kappa.

La préparation enzymatique #9 a une très grande activité hydrolysante sur le carraghénane kappa et probablement une très faible sur le carraghénane iota (extrait d'E. spinosum).

Il semble donc que l'enzyme #1 soit spécifique du carraghénane iota et nous l'appellerons carraghénase iota, et que l'enzyme #9 soit spécifique du carraghénane kappa et nous confirmons son nom de carraghénase kappa qui lui a déjà été attribué par WEIGL et coll. (1966).

#### VIII.2 ACTIVITE DES ENZYMES #2, 3, 4, 5, 6 ET 7 SUR LES CARRAGHENANES KAPPA ET IOTA, SPECIFICITE DES ENZYMES

Les enzymes (#2, 3, 4, 5, 6 et 7) utilisées dans cette étude ont été induites sur carraghénane iota.

Les 6 enzymes dégradent le carraghénane kappa, laissant environ 20 à 25% de fraction "résistante" (tableau 8). Les chromatogrammes de ces hydrolysats ont été présentés figure 11.

Les 6 enzymes dégradent les 3 échantillons d'Eucheuma spinosum (Annexe), laissant environ 70% de fraction "résistante". Elles dégradent en fait la fraction kappa contenue dans le polyside iota (les chromatogrammes sont identiques à ceux d'un hydrolysats de carraghénane kappa, figure 11).

Nous avons donc utilisé du carraghénane iota "purifié" par double traitement à l'enzyme #9 (procédé décrit page 136) afin de tester l'activité effective des enzymes sur le carraghénane iota. Les hydrolysats ont été analysés par chromatographie sur plaque. Les chromatogrammes obtenus sont présentés figure 39. La séquence des oligosides obtenus est la suivante:  $I_2$  ( $R_{GAL} = 0,73 - 0.75$ ),  $I_3$  ( $R_{GAL} = 0.51 - 0.54$ ) suivis d'une légère traînée jusqu'à l'origine. L'oligoside  $I_1$  ( $R_{GAL} = 0.97 - 1.0$ ) est pratiquement inexistant dans tous les hydrolysats. L'intensité des taches des hydrolysats #6 et #7 est beaucoup plus faible que celle correspondant aux

Figure 39 - Chromatogramme des hydrolysats de carraghénane iota "purifié", dégradé par les enzymes #1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 9

- GAL = galactose

- HK<sub>9</sub> = hydrolysat #9 de carraghénane kappa

- chromatographie sur plaque de cellulose.

MN 300.

- solvant = butanol / éthanol / eau (3/2/2.5)

- la préparation du carraghénane iota "purifié" est décrite page .

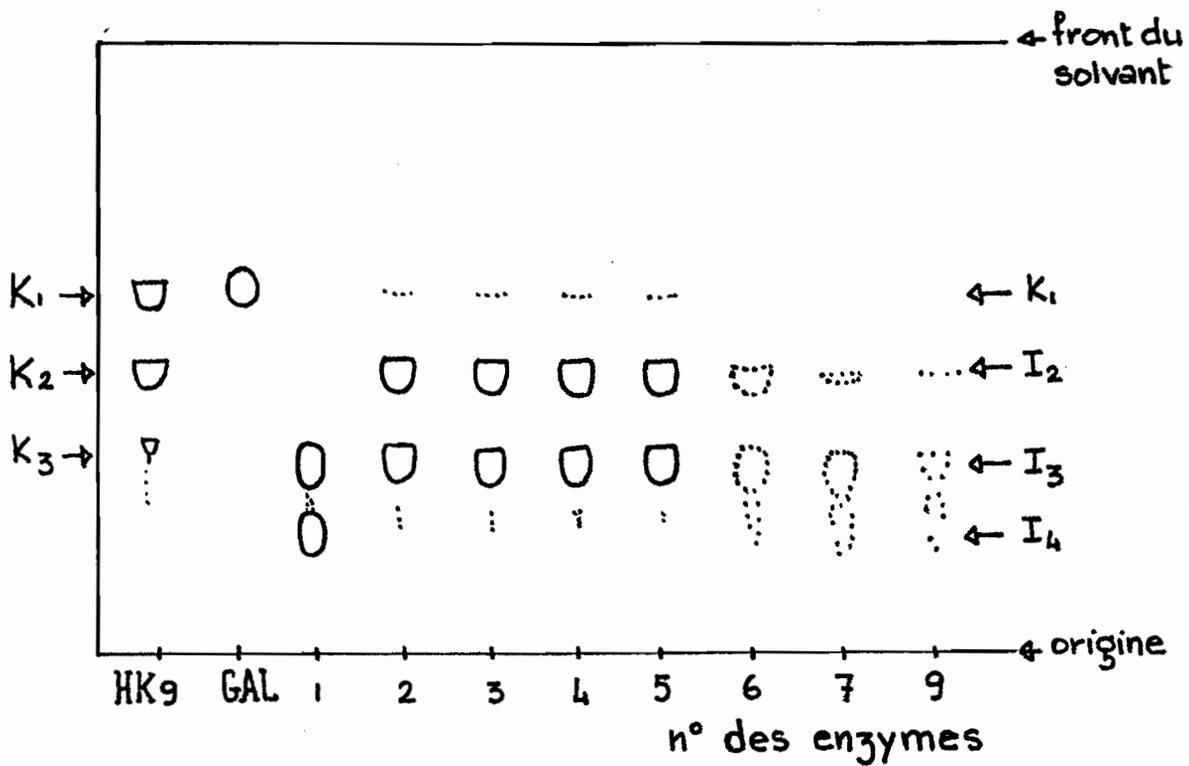


Figure 39

hydrolysats #2, 3, 4, 5, laissant supposer que les enzymes #6 et 7 ont une activité hydrolysante faible sur le carraghénane iota en comparaison des enzymes #2, 3, 4, 5.

En conclusion, les 6 préparations enzymatiques #2, 3, 4, 5, 6 et 7 dégradent le carraghénane kappa autant que l'enzyme #9 et peuvent donc être appelés carraghénase kappa.

Les préparations enzymatiques #2, 3, 4 et 5 semblent avoir aussi une activité sur le carraghénane iota "purifié" supérieure à celle des enzymes #6, 7 et 9 (figure 39) et peuvent, en plus, être appelées carraghénase iota bien que leur activité soit beaucoup plus faible que celle de l'enzyme #1.

IX: EFFET DES ENZYMES #1 ET #9 SUR LA DISTRIBUTION DES MASSES MOLAIRES DES HYDROLYSATS D'EUCHEUMA SPINOSUM, EUCHEUMA COTTONII, FURCELLARIA FASTIGIATA, AHNFELTIA CONCINNA, AHNFELTIOPSIS GIGARTINOIDES

Les extraits polysidiques des algues Eucheuma spinosum (échantillon #31210), Eucheuma cottonii, Furcellaria fastigiata, Ahnfeltia concinna, Ahnfeltiopsis gigartinoides ont été respectivement hydrolysés par les enzymes #1 (carraghénase iota) et #9 (carraghénase kappa). Les hydrolysats sont préparés dans les conditions standard décrites dans le paragraphe Matériel et Méthodes. Une différence cependant: après 48 heures d'hydrolyse, les extraits polysidiques subissent un deuxième traitement enzymatique identique au premier et l'hydrolyse est arrêtée, environ 96 heures après la première addition d'enzyme, par lyophilisation.

Les hydrolysats ainsi préparés sont chromatographiés sur colonne de Sepharose CL-4B, afin d'étudier l'influence des traitements enzymatiques sur la distribution des masses molaires. Les caractéristiques de la colonne de chromatographie et les conditions utilisées ont été décrites précédemment (Matériel et Méthodes). Avant de chromatographier les extraits polysidiques, nous avons déterminé les conditions optimales de fonctionnement de la colonne et l'avons calibrée.

IX-1 CALIBRATION DE LA COLONNE DE SEPHAROSE CL-4B ET OPTIMISATION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

Nous avons calibré la colonne à l'aide de glucose et de dextrans: DX 2000, DX 250, DX 70, DX 40, DX 10 (Pharmacia, Suède) dont les masses molaires moyennes respectives sont 2,000,000; 250,000; 70,000; 40,000; 11,000. Les oses contenus dans les fractions ont été dosés par la méthode au phénol-acide sulfurique décrite dans le paragraphe Matériel et Méthodes. La figure 40 nous montre les spectres obtenus.

Nous avons représenté la fonction corrélant leur masse molaire moyenne ( $\bar{M}_w$ ) et leur volume d'élution ( $V_e$ ) (figure 41)

$$\log (\bar{M}_w) = f\left(\frac{V_e}{V_0}\right),$$

$V_0$  étant le volume d'élution du dextran 2000. Cette fonction est repré-

Figure 40 - Calibration de la colonne Sepharose CL-4B

x—x Dextran 2000 (DX 2000)

◇—◇ DX 250

x—x DX 70

●—● DX 40

◇—◇ DX 10

○—○ glucose

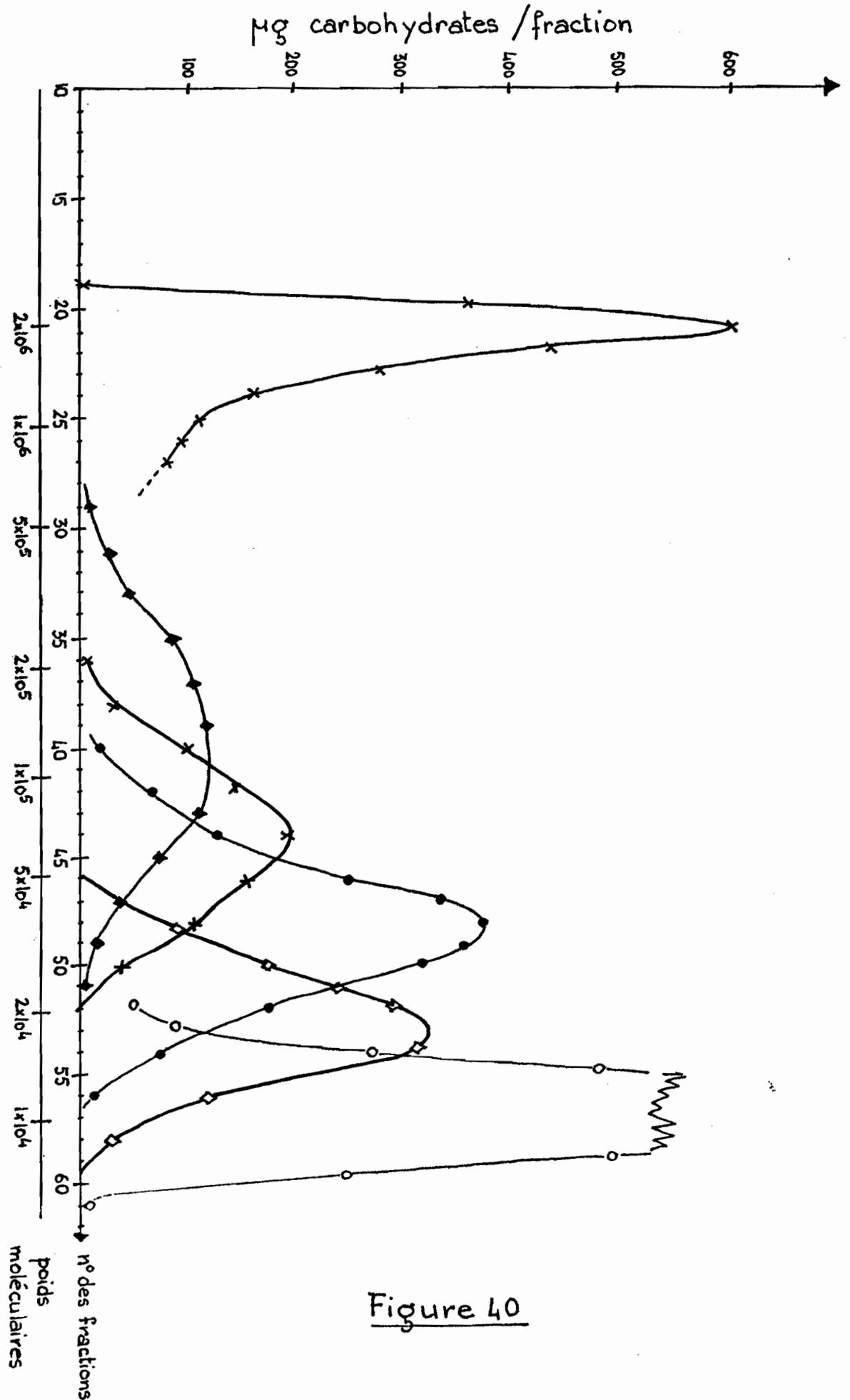


Figure 40

Figure 41 - Colonne Sepharose CL. 4B : corrélation  
entre  $\frac{V_e}{V_0}$  et  $\log M_w$ .

$V_e$  : volume d'éluion des dextrans

$V_0$  : volume d'éluion du dextran 2000

$M_w$  : poids moléculaire moyen des dextrans

longueur de la colonne : 33cm

diamètre : 1.6 cm

éluant : eau distillée

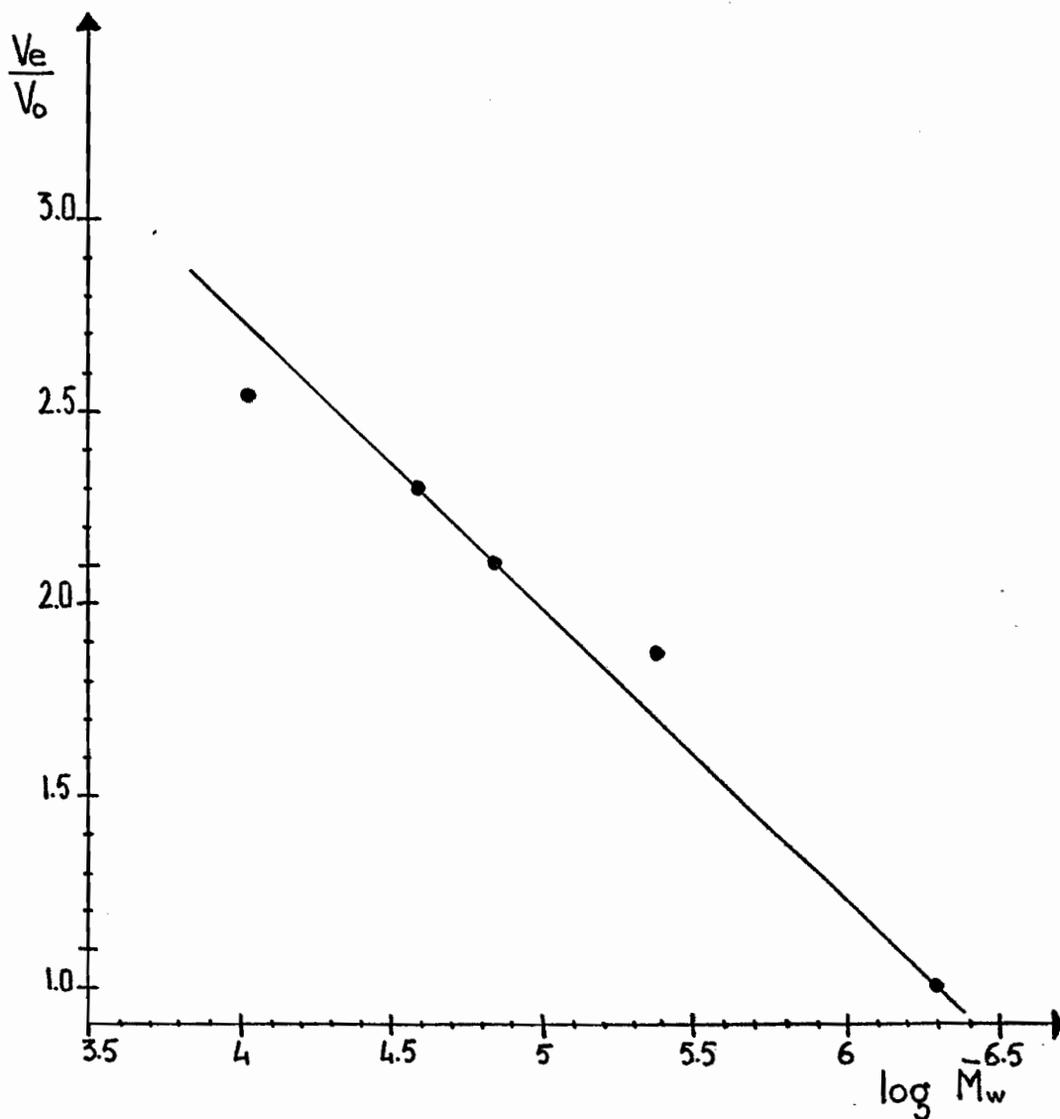


Figure 41

Figure 42 - Influence de la concentration de NaCl dans l'éluant sur le volume d'élution du néocarratétrase kappa.

- Dextran 2000 : x—x

- Néocarratétrase kappa :

●—●	eau distillée
◆—◆	NaCl 0.01M
○—○	NaCl 0.05M
x---x	NaCl 0.5 M

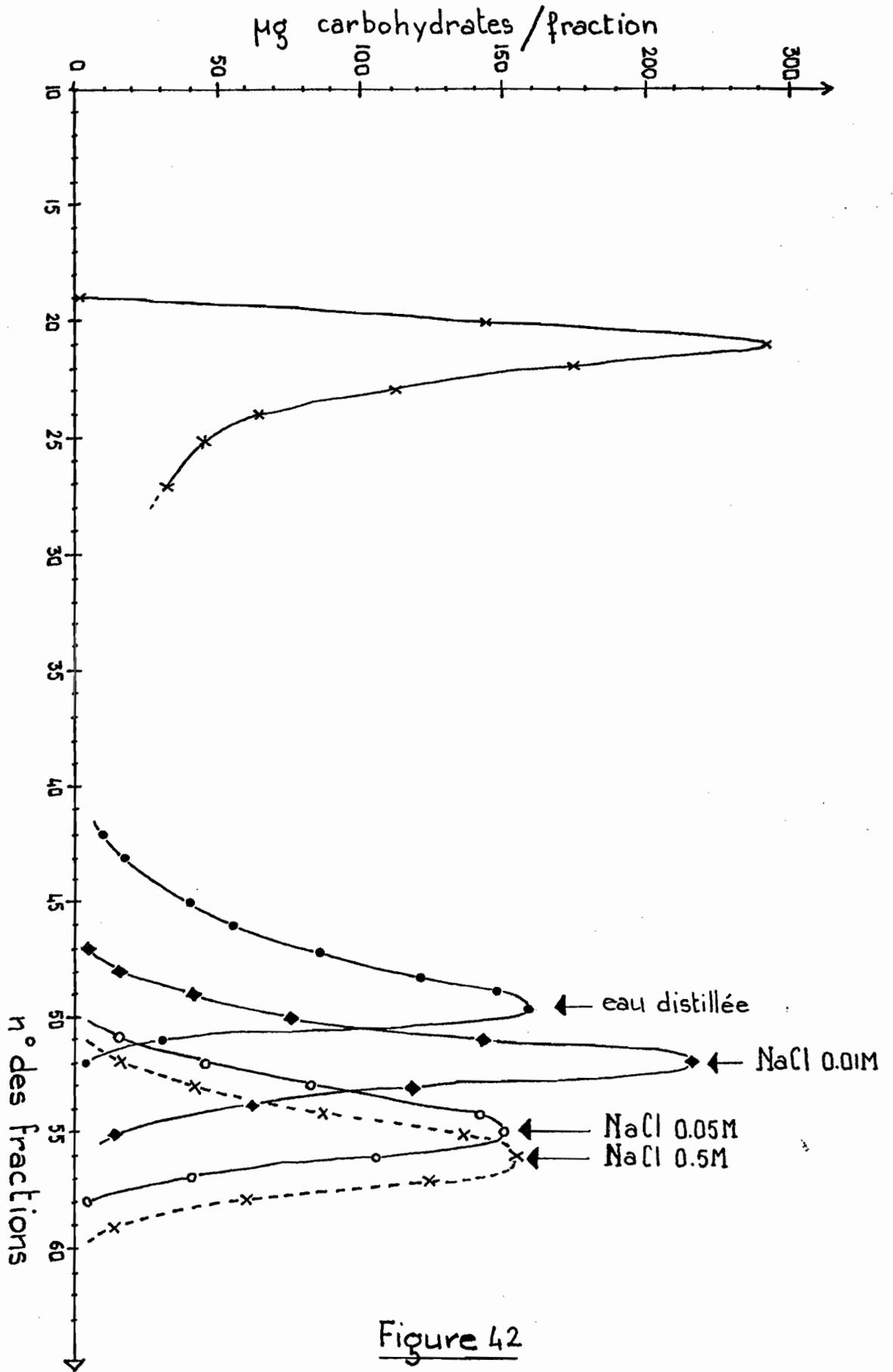


Figure 42

sentée par une droite et permet de corrélér le numéro des fractions dans lesquelles sortent les polyosides à la masse molaire respective de ces polyosides (sachant que chaque fraction contient 1.15 ml).

n° des fractions	$V_e$ (ml)	$V_e/V_0$	$M_w$
21	24	1.00	$2 \times 10^6$
25.	29.3	1.22	$10^6$
30	34	1.42	$5 \times 10^5$
36.	41.7	1.74	$2 \times 10^5$
41.	47.5	1.98	$10^5$
46	52.8	2.20	$5 \times 10^4$
52.	60	2.50	$2 \times 10^4$
57	65.7	2.74	$10^4$
61	70	2.92	$5 \times 10^3$

Nous avons utilisé de l'eau distillée pour éluer les dextrans et le glucose, mais les polyosides extraits d'algues étant fortement chargés (en raison de leurs radicaux sulfates), nous avons dû augmenter la force ionique de l'éluant afin d'éliminer les interactions ioniques entre les polyosides et le gel de Sepharose.

Il est évident que les masses molaires que nous attribuerons aux polyosides sulfatés, hydrolysés ou non, ne seront pas les masses molaires absolues, mais seront les masses molaires équivalant aux dextrans ayant le même volume d'élution.

Pour ce faire, nous avons utilisé une solution de chlorure de sodium, neutralisée à pH = 7.0 par addition de quelques gouttes d'une solution de soude 0.0025 N. Différentes concentrations de NaCl ont été testées et pour

chacune nous avons déterminé le volume d'élution du néocarratétrase kappa (~ 1 mg/ml) (figure 42). Plus la concentration de NaCl augmente, plus le volume d'élution du tétraose se rapproche de celui du glucose ( $V_e = 65$  ml, fractions 56-57), pour devenir identique lorsque la concentration de NaCl est 0.5 M. Nous avons donc utilisé cette molarité dans l'éluant pour chromatographier les polyosides portant des groupes sulfates.

## IX-2 CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SEPHAROSE CL-4B DES POLYOSIDES HYDROLYSES ET NON HYDROLYSES

Chaque extrait d'algue a été chromatographié avant hydrolyse, après traitement enzymatique à l'enzyme #9 (carraghénase kappa) et après traitement enzymatique à l'enzyme #1 (carraghénase iota). Les figures 43, 44, 45, 48, 49 représentent la quantité d'oses (dosés par la méthode au phénol-acide sulfurique) contenue dans chaque fraction en fonction de la masse molaire de ces oses.

### a. Eucheuma spinosum (carraghénane iota, échantillon #31210)

Le polyoside non hydrolysé n'a pu être chromatographié en présence de chlorure de sodium. Le sel provoque une telle gélification du carraghénane iota, qu'une solution de polyoside à 2% (concentration minimale que nous puissions utiliser) est trop épaisse à 50°C pour pénétrer dans le gel de Sepharose. Le carraghénane non hydrolysé a donc été élué à l'eau distillée. Les hydrolysats #1 et #9 de ce même polyoside ont pu être chromatographiés sans problème en présence de NaCl.

La figure 43 nous montre les différents spectres obtenus suivant les traitements enzymatiques. Non hydrolysé, le polyoside présente une distribution de masses molaires (M.M.) allant de  $2 \times 10^6$  à  $3 \times 10^4$  (fraction 50) avec un maximum de  $10^6$  (fraction 25). Les enzymes #1 et #9 affectent toutes les deux cette distribution.

Après traitement par l'enzyme #9 (carraghénase kappa), deux pics principaux apparaissent, l'un correspondant à une fraction non dégradée ou peu dégradée (M.M.  $\geq 2 \times 10^6$ , tube 22) et l'autre correspondant à une fraction contenant des osides de faibles masses molaires (M.M.  $\leq 10^4$ , tube 55).

Figure 43 - Influence des traitements enzymatiques  
sur la distribution des masses molaires du polyside  
extrait de Eucheuma spinosum

- x x polyside non dégradé
- o o polyside hydrolysé par l'enzyme #1 (carraghénase iota)
- • polyside hydrolysé par l'enzyme #9 (carraghénase kappa)

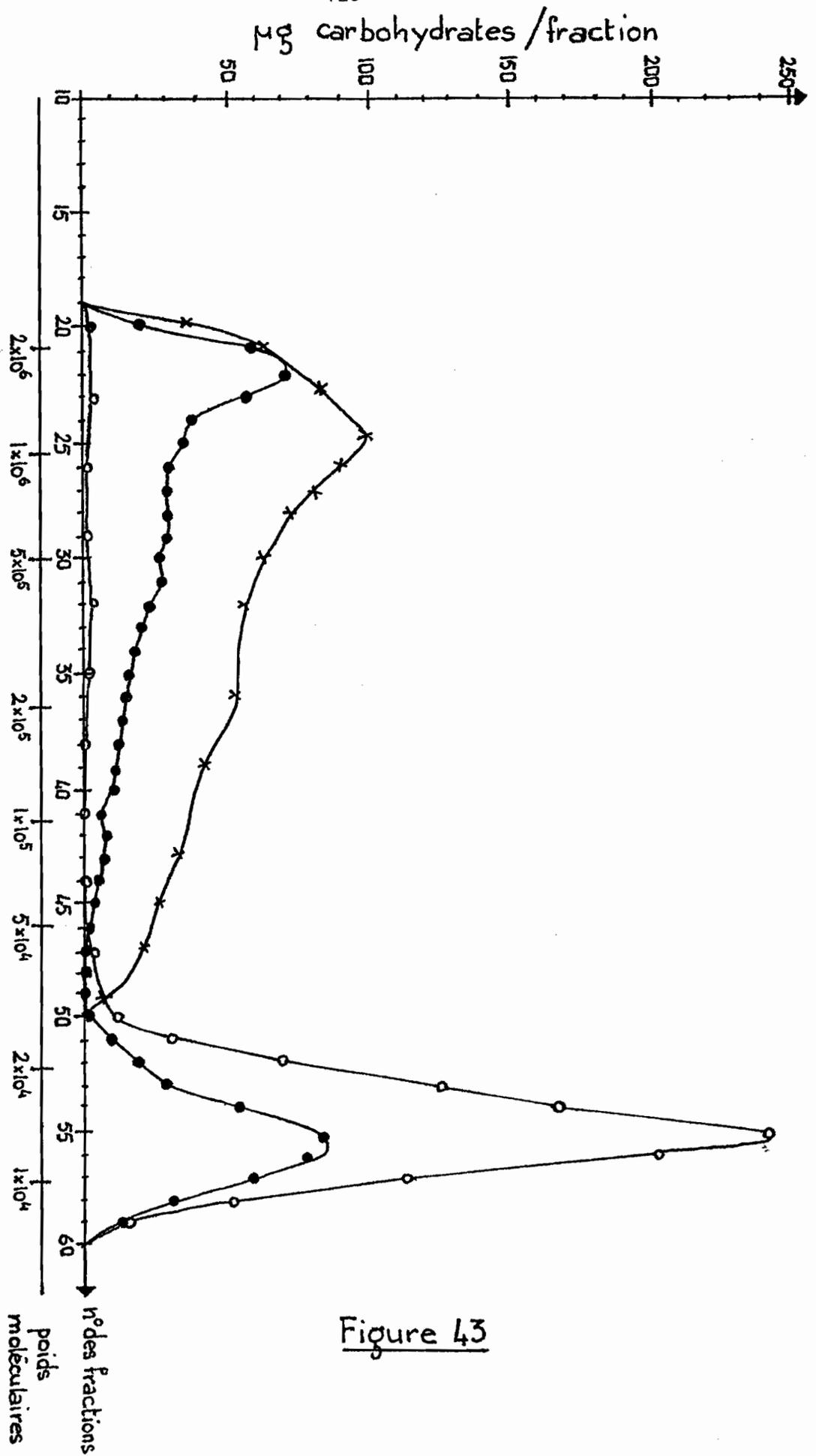


Figure 43

Nous avons vu lors de l'analyse par spectroscopie de R.M.N. que cette fraction contient principalement des oligosides de carraghénane kappa (figure 37) et que la fraction non dégradée est de nature iota (figure 38).

Le traitement par l'enzyme #1 (carraghénase iota) ne laisse aucune fraction ayant une masse molaire élevée; tout le polyside est dégradé en une fraction de masse molaire moyenne égale ou inférieure à  $1.5 \times 10^4$  (fraction 55). Nous avons vu que la partie soluble dans l'éthanol de cet hydrolysate (partie la plus dégradée) contenait principalement le tétraholoside de carraghénane iota (spectre R.M.N., figure 30) et la partie insoluble, de masse molaire plus élevée, contenait un polymère hybride carraghénane iota et kappa (figure 31).

b. Eucheuma cottonii (carraghénane kappa)

Le carraghénane non hydrolysé (figure 44) présente une distribution de masses molaires allant de  $2 \times 10^6$  à  $6 \times 10^4$  (fractions 19 à 45) avec un maximum à  $1.5 \times 10^6$  (fraction 23).

Le polyside hydrolysé par l'enzyme #9 (carraghénase kappa) est complètement dégradé en une fraction ayant une masse molaire moyenne  $\leq 1.5 \times 10^4$  (tube 55). Nous avons vu lors de l'analyse par spectroscopie R.M.N. (figures 35 et 36) que cet hydrolysate contenait un mélange équimoléculaire de di et tétraholosides de carraghénane kappa, et une fraction moins hydrolysée contenant du carraghénane iota.

Après traitement par l'enzyme #1, le spectre des masses s'étale tout au long de la colonne sans pic bien déterminé. On peut tout de même observer un léger maximum correspondant à une masse molaire de  $4 \times 10^5$  (tube 31), et un deuxième correspondant à M.M.  $\leq 1.5 \times 10^4$  (tube 55). Une remarque importante: nous avons traité cet hydrolysate une nouvelle fois à l'aide de l'enzyme #1 (en excès) et l'avons rechromatographié sur la colonne de Sepharose CL-4B; le spectre obtenu est identique à celui que nous venons de décrire.

Nous rappelons que le pourcentage de la fraction soluble dans

Figure 44 - Influence des traitements enzymatiques  
sur la distribution des masses molaires du polyoside  
extrait de *Eucheuma cottonii*

x-x polyoside non dégradé

o-o polyoside hydrolysé par l'enzyme #1 (carraghénase iota)

●-● polyoside hydrolysé par l'enzyme #9 (carraghénase kappa)

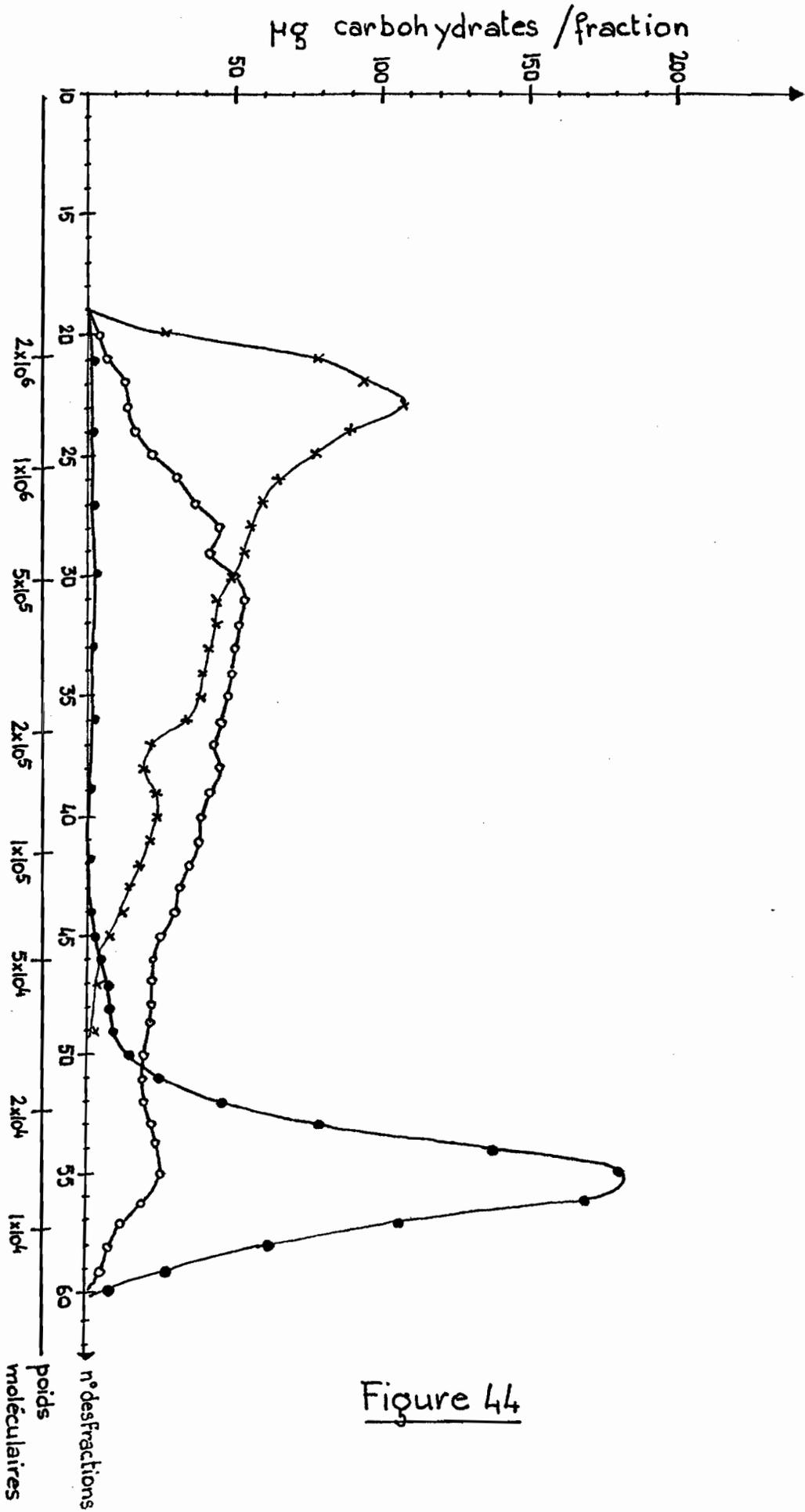


Figure 44

Figure 45 - Influence des traitements enzymatiques  
sur la distribution des masses molaires du polyoside  
extrait de *Furcellaria fastigiata*

- x-x polyoside non dégradé
- o-o polyoside hydrolysé par l'enzyme #1 (carraghénase iota)
- polyoside hydrolysé par l'enzyme #9 (carraghénase kappa)

µg carbohydrates / fraction

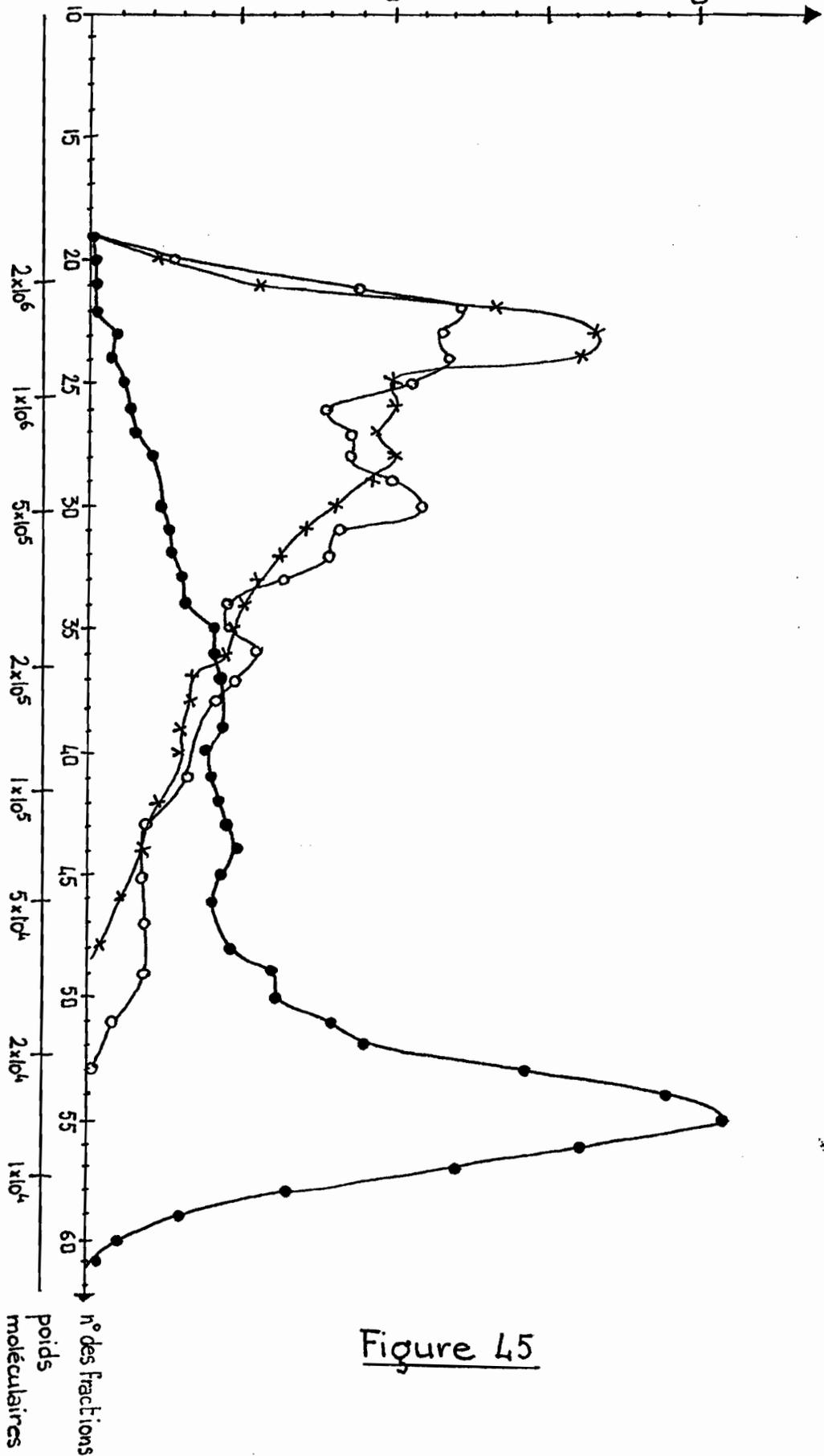


Figure 45

l'éthanol de cet hydrolysate est très faible (10%) et qu'il contient un mélange de tétraholosides kappa et iota (spectre R.M.N., figure 34).

c. Furcellaria fastigiata (cf. annexe)

L'extrait de cette algue est appelé furcellarane (cf. page 3). Ce polyoside est un carraghénane kappa partiellement désulfaté (cf. page 11).

Non hydrolysé (figure 45), ce furcellarane présente une distribution de M.M. allant de  $2 \times 10^6$  à  $3 \times 10^4$  (fractions 20 à 50) avec un pic maximum correspondant à une masse molaire égale ou supérieure à  $1.2 \times 10^6$  (fraction 24).

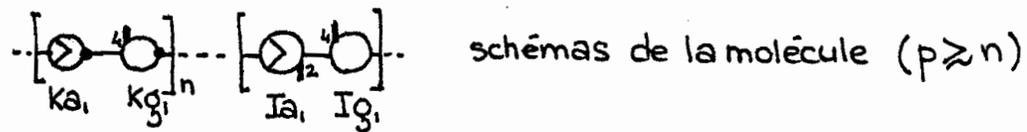
La distribution des masses molaires est peu affectée par l'enzyme #1 (carraghénase iota). Le pic précédent diminue en intensité et un nouveau pic apparaît (fraction 30), peu important par rapport à la quantité d'oses déjà contenue dans cette fraction avant hydrolyse.

L'enzyme #9 (carraghénase kappa) affecte beaucoup plus la distribution des masses molaires. Le spectre s'étale de  $2 \times 10^6$  à  $10^4$  (fractions 22 à 60) avec un pic important correspondant à une masse molaire  $\leq 1.5 \times 10^4$  (tube 55). Le chromatogramme sur plaque de cellulose de cet hydrolysate présente la distribution typique des oligosides kappa:  $K_1$  (diholoside),  $K_2$  (tétraholoside) et une traînée d'oligosides jusqu'à l'origine.

d. Ahnfeltia concinna

Le polyoside extrait de cette algue est un carraghénane hybride kappa-iota (cf. page 30). Nous avons analysé en spectroscopie de R.M.N. notre échantillon, avant de l'hydrolyser à l'aide des enzymes #1 et #9 (figure 46): cinq pics apparaissent entre 110 et 90 p.p.m. Les pics sortant à 103.10 p.p.m. ( $Ig_1$ ,  $Kg_1$ ), 95.95 p.p.m. ( $Ka_1$ ) et 92.69 p.p.m. ( $Ia_1$ ) sont caractéristiques des polymères de carraghénanes iota et kappa et confirment le caractère hybride de cet extrait d'algue. Les deux pics à 105.39 p.p.m. (Y) et 98.87 p.p.m. (X) n'ont pas été identifiés. Cependant nous avons une explication probable sur leur origine et en parlerons dans la Discussion.

Figure 46et47 - Spectres R.M.N. des extraits polysidiques des algues  
Ahhfeltia concinna et Ahnfeltiopsis gigartinoïdes



pics	$\delta$ p.p.m. A. concinna	$\delta$ p.p.m. A. gigartinoïdes
Y	105.39	105.37
Ig <sub>1</sub> , Kg <sub>1</sub>	103.10	102.99
X	98.89	98.81
KA <sub>1</sub>	95.95	96.00
IA <sub>1</sub>	92.69	92.62

- Ka<sub>1</sub> : atome de carbone n°1 des résidus anhydro 3.6  $\alpha$ -D. galactopyranosyl (Q)  
 Kg<sub>1</sub> : \_\_\_\_\_ sulfate-4  $\beta$ -D. galactopyranosyl (kappa) (b)  
 Ia<sub>1</sub> : \_\_\_\_\_ sulfate-2 anhydro 3.6  $\alpha$ -D. galactopyranosyl (Q)  
 Ig<sub>1</sub> : \_\_\_\_\_ sulfate-4  $\beta$ -D. galactopyranosyl (iota) (b)  
 X, Y : \_\_\_\_\_ de résidus inconnus  
 $\delta$  : déplacements chimiques relatifs au TMS

Figure 46 *Ahnfeltia concinna*

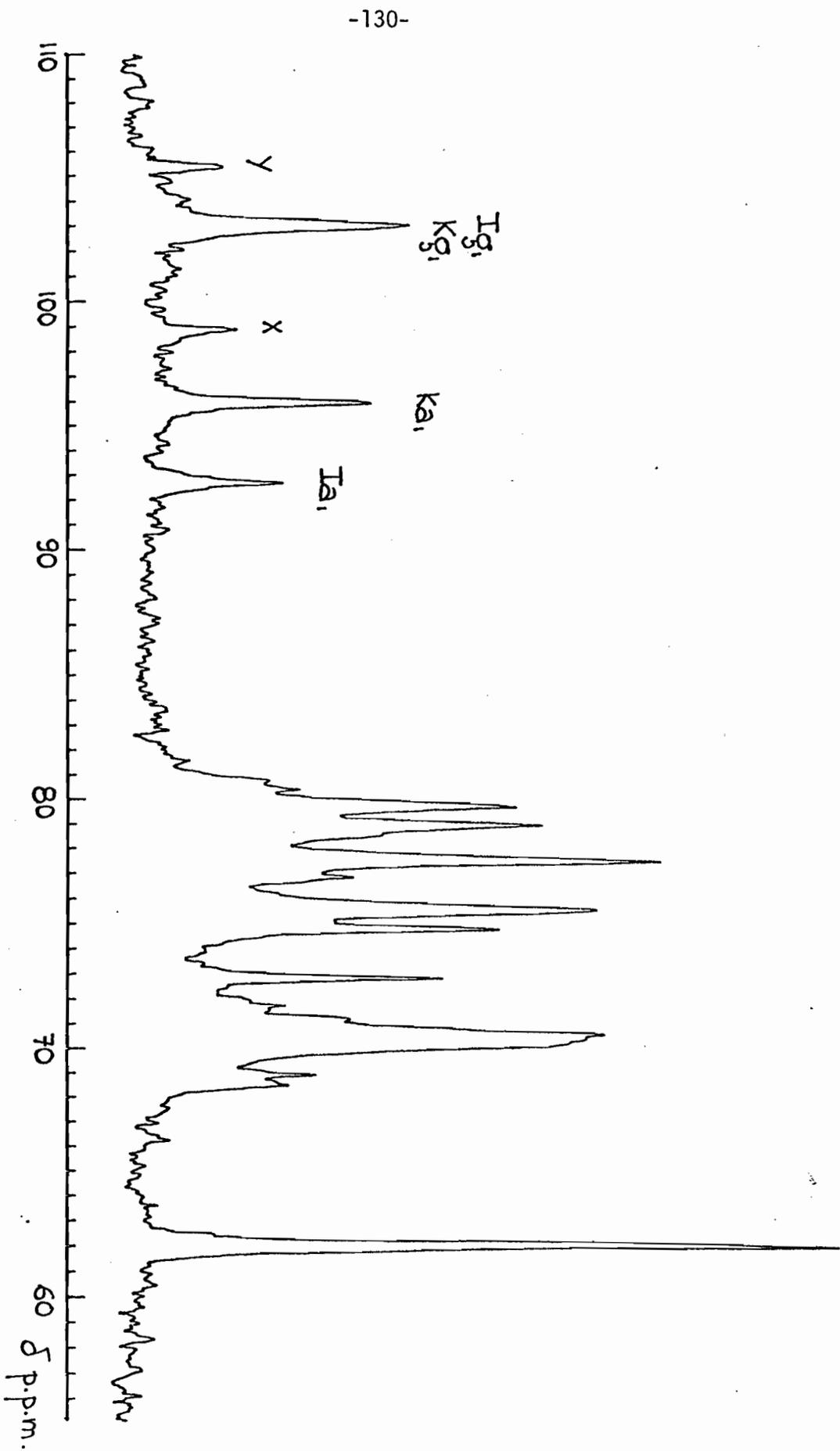
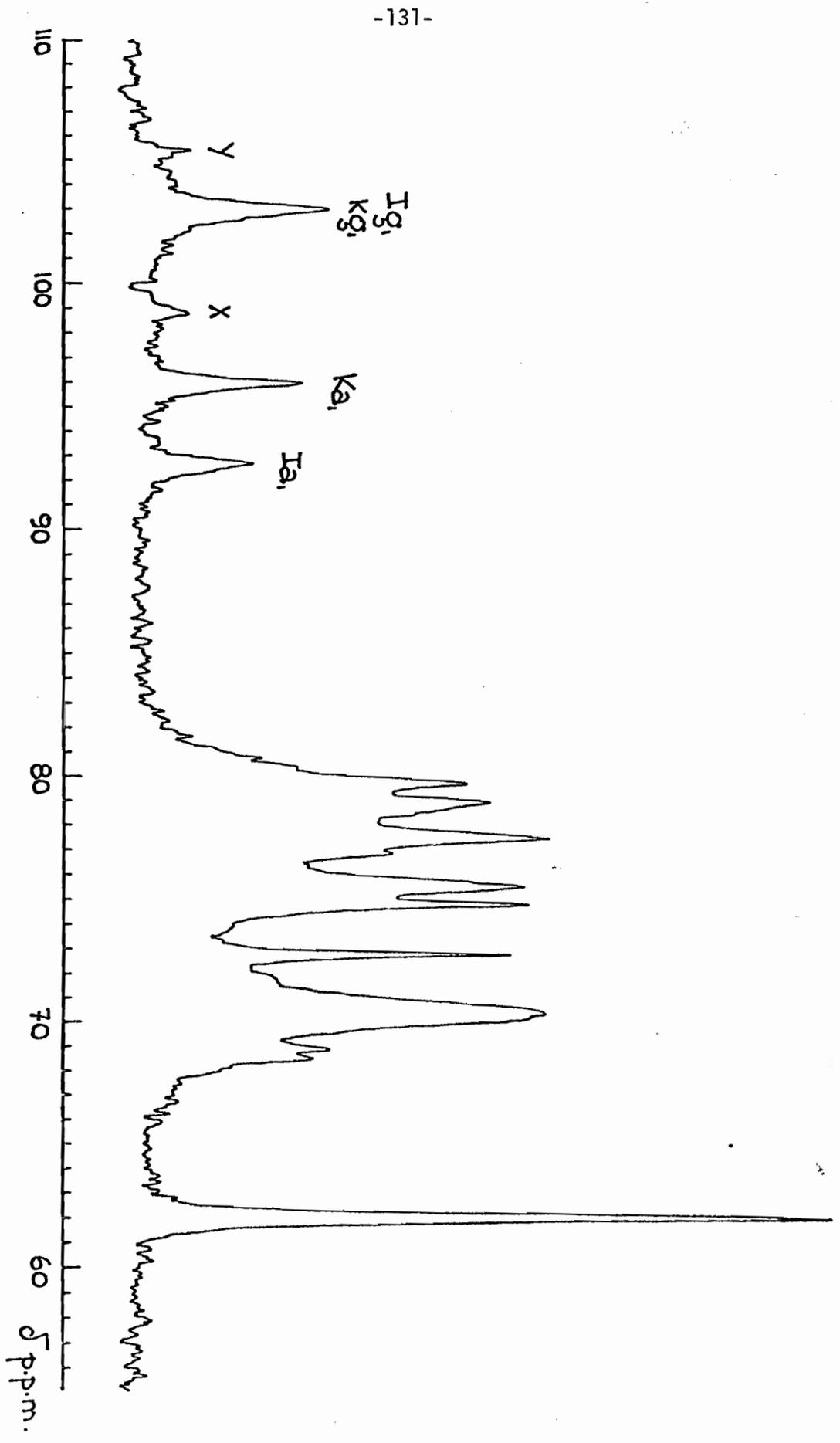


Figure 47 - Ahnfeltopsis gigartinoides



Les pourcentages de carraghénanes kappa, iota et de résidus inconnus ont été calculés d'après les intégrales correspondant à chaque pic et ont pour valeur respective: 50%, 32% et 18%.

La distribution des masses molaires du polyoside non dégradé (figure 48) est identique à celles des polyosides d'Eucheuma spinosum et d'Eucheuma cottonii, s'étalant de  $2 \times 10^6$  à  $2 \times 10^5$  (fractions 20 à 36), avec un pic maximum (fraction 22).

Les 2 enzymes #1 et #9 affectent la distribution des masses molaires. Dans les deux cas, le pic existant avant hydrolyse disparaît.

Après traitement par l'enzyme #1 (carraghénase iota), les masses molaires s'étalent de  $2.5 \times 10^5$  à  $10^4$  (fractions 35 à 57) en un pic arrondi, la moyenne se situant aux alentours de  $5 \times 10^4$  (fraction 46).

Le chromatogramme sur plaque de cellulose de cet hydrolysate présente la distribution typique d'un hydrolysate #1 de carraghénane iota (figure 13) soit les oligosides  $I_3$  (tétraholoside) et  $I_4$ .

Après traitement par l'enzyme #9 (carraghénase kappa), le pic se déplace vers des masses molaires plus faibles. Il est plus étroit et plus élevé, avec un épaulement (fraction 54). Le maximum correspond à une masse molaire de  $3 \times 10^4$  (fraction 50).

Le chromatogramme sur plaque de cellulose présente la distribution typique d'un hydrolysate #9 de carraghénane kappa (figure 13) avec une légère traînée entre le tétraholoside et l'origine.

Lorsque le polyoside subit un traitement simultané par les deux enzymes, la masse molaire moyenne de l'hydrolysate a une valeur encore inférieure à celle de la fraction précédente. Le pic correspondant à la masse molaire de  $3 \times 10^4$  disparaît et celui correspondant à l'épaulement reste.

e. Ahnfeltiopsis gigartinoides (description annexe)

Nous avons également analysé par spectroscopie de R.M.N. cet échantillon (figure 47). Le spectre est semblable à celui d'Ahnfeltia concinna. Les pourcentages kappa, iota et résidus non identifiés sont

Figure 48 - Influence des traitements enzymatiques  
sur la distribution des masses molaires du polyoside  
extrait d'*Ahnfeltia concinna*

- x—x polyoside non dégradé
- o—o polyoside hydrolysé par l'enzyme #1 (carraghénase iota)
- polyoside hydrolysé par l'enzyme #9 (carraghénase kappa)
- ◊—◊ polyoside hydrolysé par les 2 enzymes

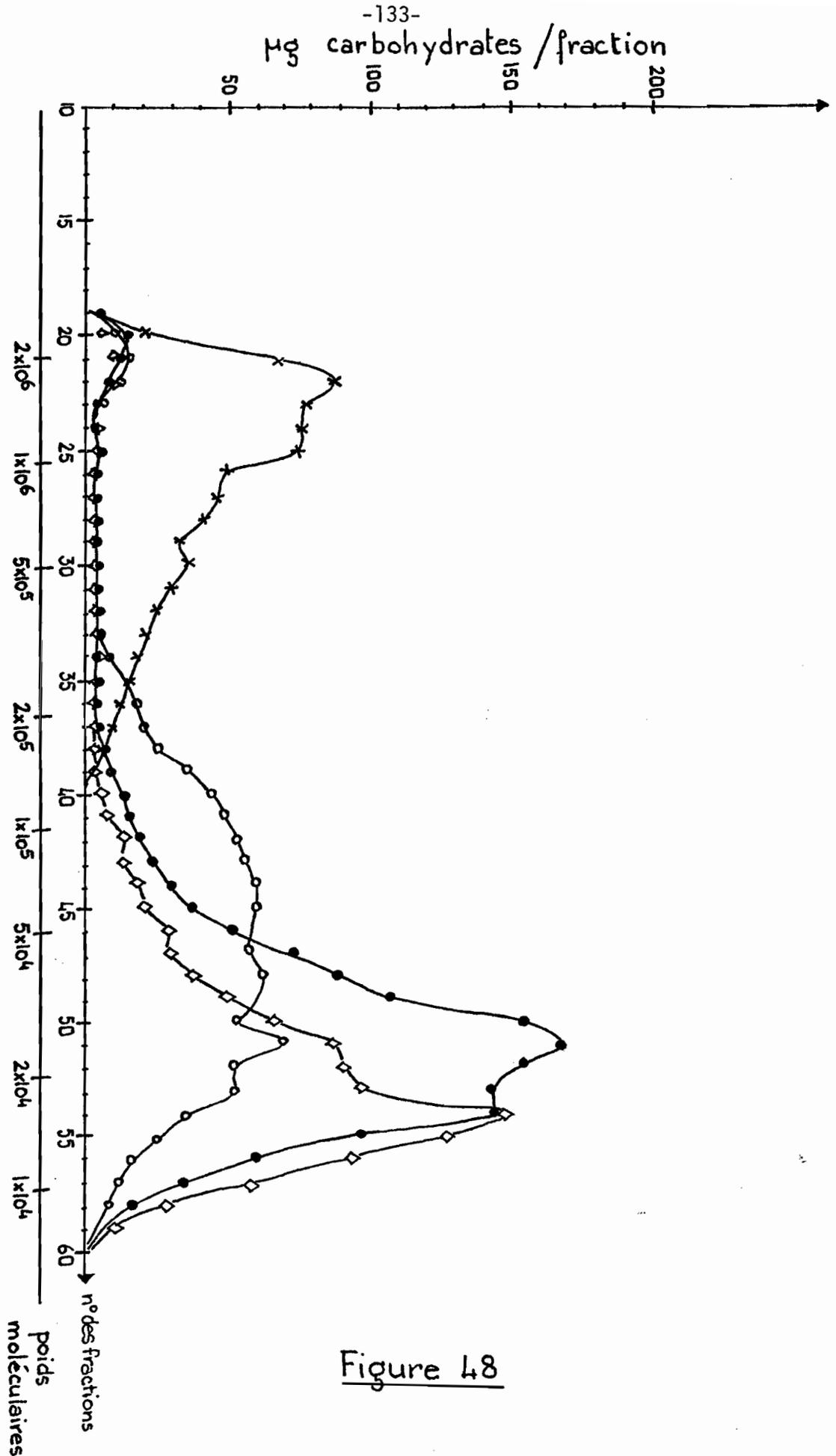


Figure 48

Figure 49. Influence des traitements enzymatiques  
sur la distribution des masses molaires du polyoside  
extrait d' Ahnfeltiopsis gigartinoides

- x-x polyoside non dégradé
- o-o polyoside hydrolysé par l'enzyme #1 (carraghénase iota)
- polyoside hydrolysé par l'enzyme #9 (carraghénase kappa)
- ◇-◇ polyoside hydrolysé par les 2 enzymes

µg carbohydrates / fraction

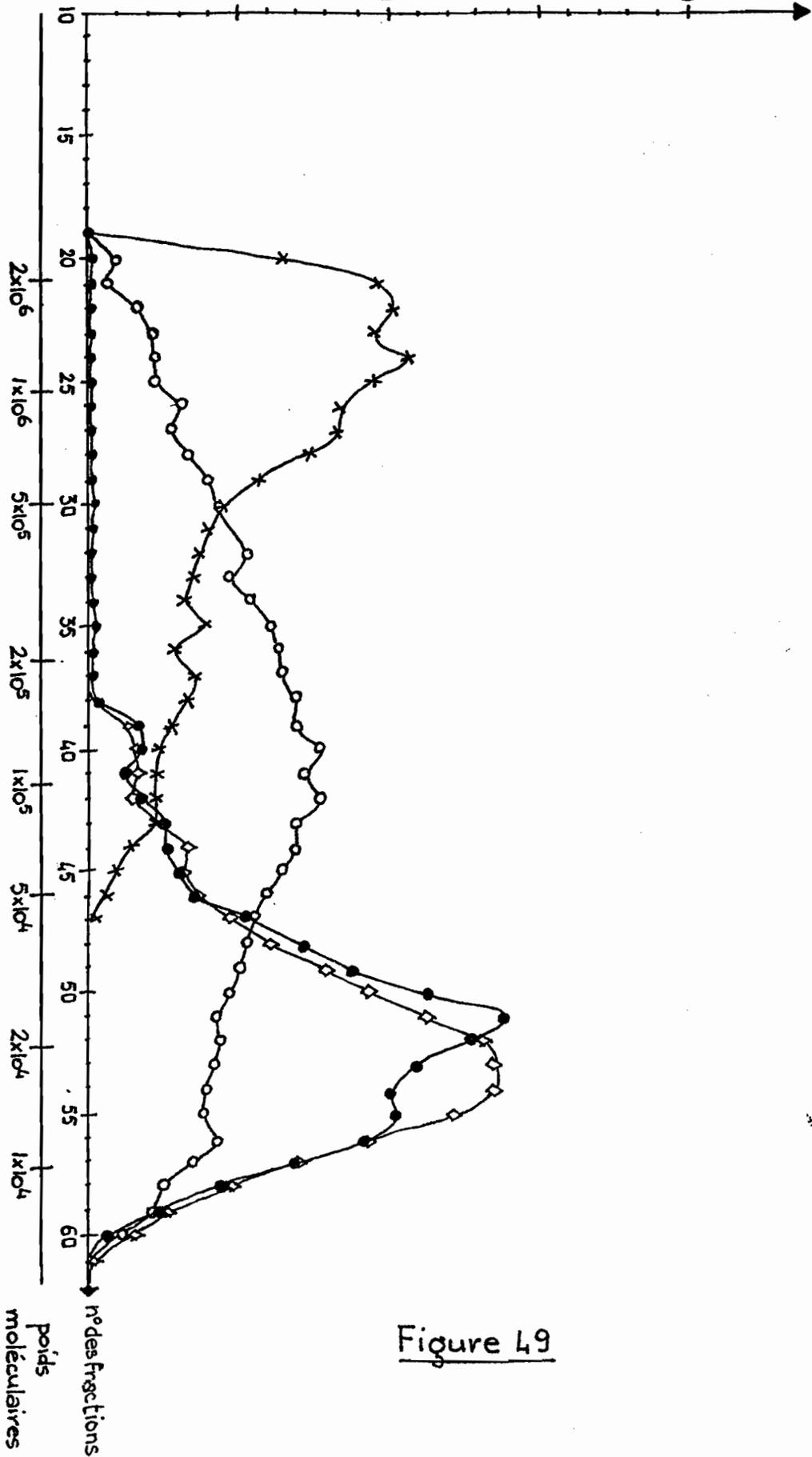


Figure 49

cependant légèrement différents (kappa 51%, iota 40%, non identifié 9%).

Chromatographié sur la colonne de Sepharose CL-4B (figure 49), le polyoside non hydrolysé présente le spectre classique des extraits non dégradés.

Après traitement par l'enzyme #1 (carraghénase iota), le spectre s'étale de façon symétrique tout au long de la colonne avec une valeur moyenne d'environ  $10^5$  (fraction 41).

En chromatographie sur couche mince, la distribution des oligosides est celle d'un hydrolysât #1 de carraghénane iota. L'intensité des taches est faible.

Après traitement par l'enzyme #9 (carraghénase kappa), les masses molaires se regroupent entre  $1.5 \times 10^5$  et  $10^4$  avec un pic maximal (P.M. =  $3 \times 10^4$ , fraction 51) et un épaulement (fraction 55).

Le traitement simultané par les deux enzymes déplace légèrement le pic vers une valeur moyenne M.M. =  $4 \times 10^4$  (fraction 53).

X: PRODUCTION, PURIFICATION DU DIHOLOSIDE DE CARRAGHENANE IOTA.  
CARACTERISATION PAR SPECTROSCOPIE DE R.M.N. DU  $^{13}\text{C}$

Les résultats des analyses précédentes sur l'activité des différentes préparations enzymatiques, et sur le caractère hybride des polyosides, nous a permis d'établir le protocole expérimental permettant de préparer le diholoside de carraghénane iota pur ( $\text{I}_2$ ).

Nous avons vu que la tache  $\text{I}_2$  obtenue après hydrolyse du polyoside d'Eucheuma spinosum par l'enzyme #5 était dédoublée (figure 15) et correspondait à un mélange de tétraholoside kappa et de diholoside iota (figure 26).

Si les résidus kappa contaminant le polyoside sont préalablement éliminés, l'enzyme #5 devrait alors produire le diholoside de carraghénane iota non contaminé par le tétraholoside de carraghénane kappa.

Le carraghénane iota "purifié" des résidus kappa est préparé par double hydrolyse à l'aide de l'enzyme #9. La nouvelle fraction non dégradée (carraghénane "purifié") est remise en solution et traitée par l'enzyme #5 en présence d'une faible concentration de NaCl (0.005 M). Tous les hydrolysats sont préparés dans les conditions standard décrites dans le paragraphe Matériel et Méthodes.

La fraction soluble dans l'éthanol de l'hydrolysats de carraghénane iota "purifié", traité par l'enzyme #5, est analysée par chromatographie sur plaque. Le chromatogramme a déjà été présenté plus haut (figure 39).

Ce nouvel hydrolysats est lyophilisé et chromatographié sur colonne de Sephadex G-25 fine, dans les mêmes conditions que celles décrites dans le paragraphe Matériel et Méthodes. Le contenu des fractions sortant de la colonne est chromatographié sur couche mince de cellulose (figure 50). Les fractions contenant  $\text{I}_2$  sont alors mélangées, la solution est concentrée et lyophilisée, pour être par la suite analysée par spectroscopie de R.M.N. du  $^{13}\text{C}$  (figure 51).

Figure 50 - Chromatogramme sur plaque  
des fractions collectées après passage sur colonne de  
Sephadex G-25 fine de l'hydrolysat #5 de carraghénane iota "purifié"

- GAL. = galactose

- H : hydrolysat #5 de carraghénane iota "purifié"

Conditions de la chromatographie sur plaque :  
plaque de cellulose MN 300

solvant : butanol / éthanol / eau : 3/2/2.5

Conditions de la chromatographie sur colonne :

volume des fractions = 2ml

diamètre de la colonne = 2.6cm

longueur du gel dans la colonne = 40cm

volume vide de la colonne = 76ml

éluant : eau distillée

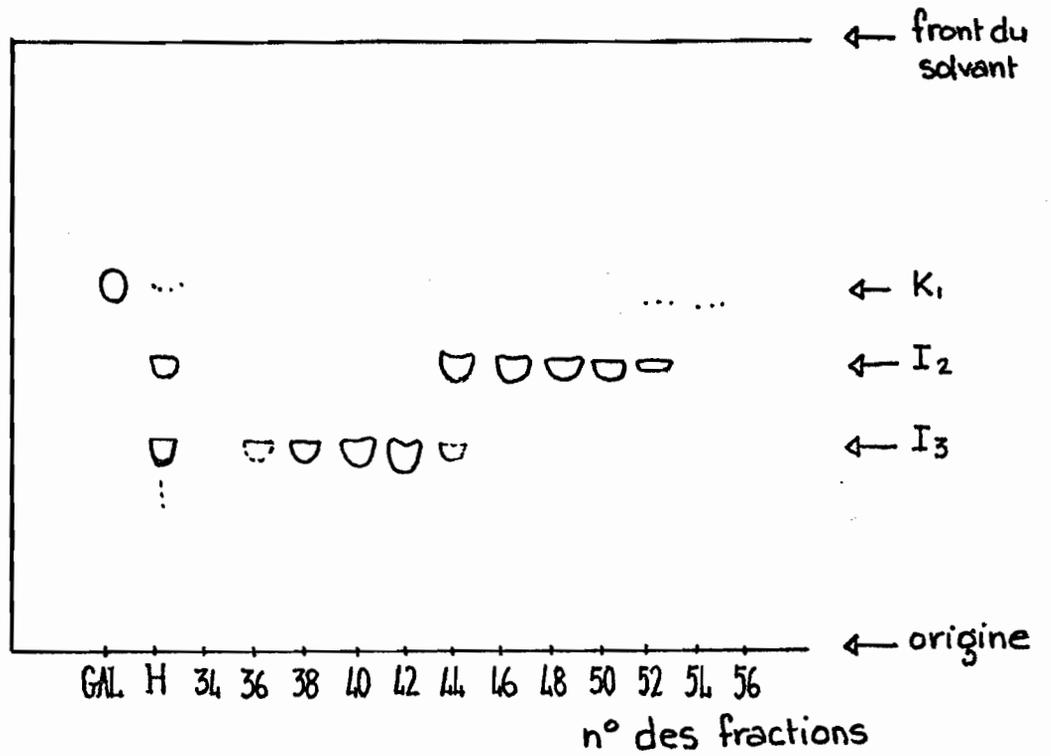
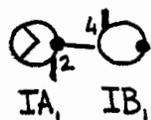


Figure 50

Figure 51 - Spectre R.M.N. de l'oligoside I<sub>2</sub> (disulfate de néocarrabiose iota)



pics	$\delta$ p.p.m.
IB <sub>1<math>\beta</math></sub>	97.34
IB <sub>1<math>\alpha</math></sub>	92.95
IA <sub>1</sub>	92.43

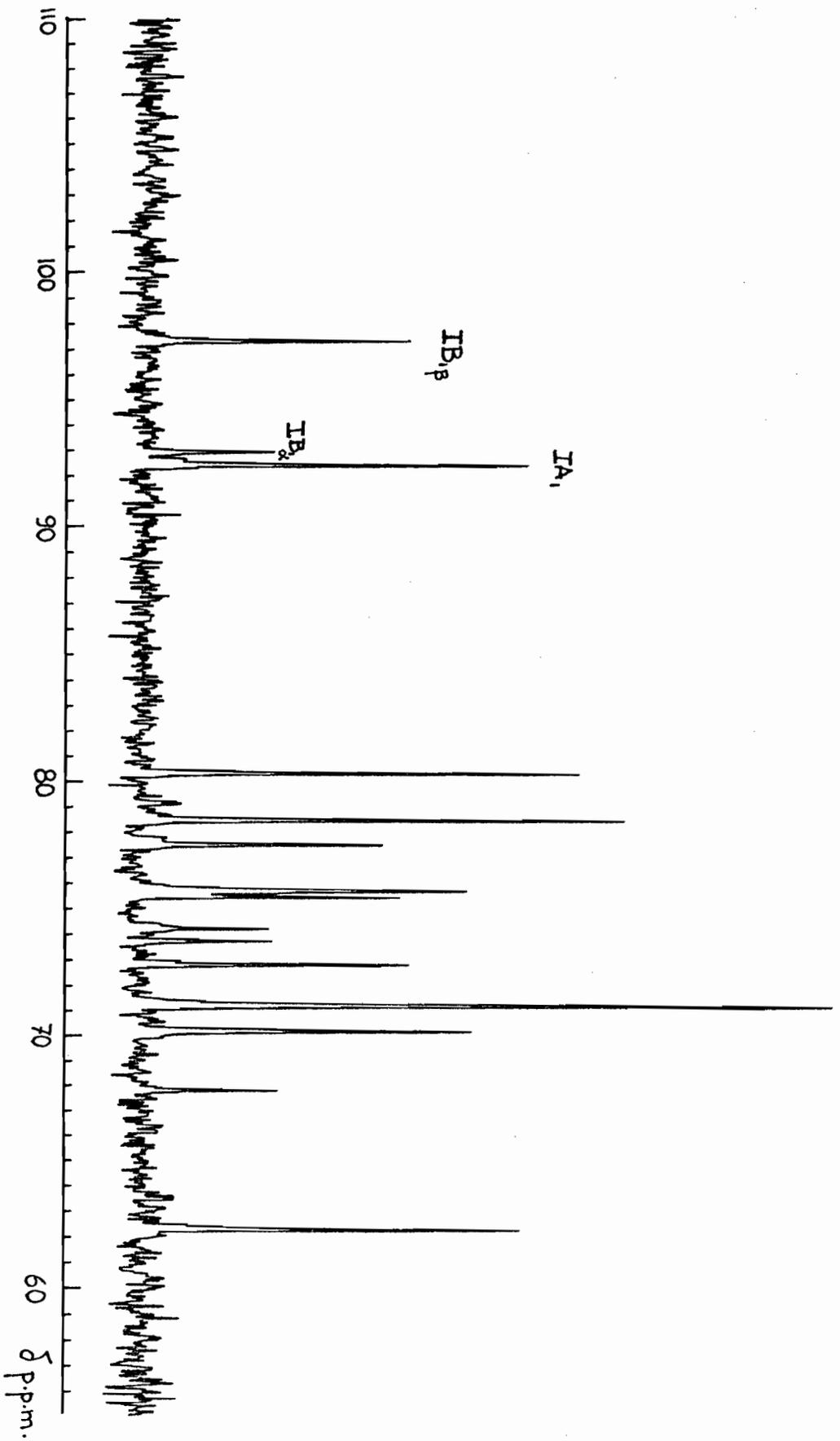
IA<sub>1</sub> : carbone n°1 des résidus sulfate-2 anhydro 3-6  $\alpha$ -D-galactopyranosyl (Q<sub>2</sub>)

IB<sub>1 $\alpha$</sub>  et IB<sub>1 $\beta$</sub>  : carbones n°1 des résidus sulfate-4 D-galactose (anomères  $\alpha$  et  $\beta$ ) (4b)

$\delta$  : déplacements chimiques relatifs au TMS.

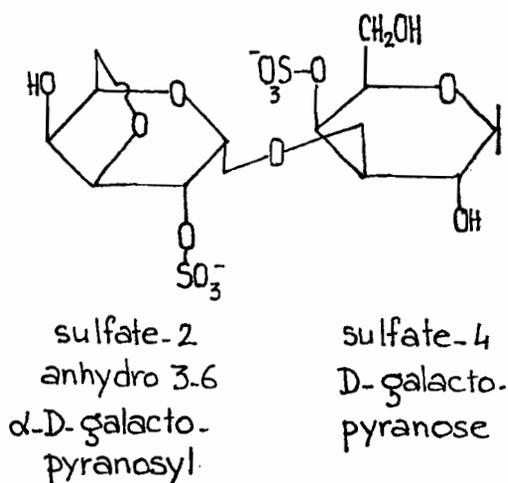
Figure 51

-138-



Sur le spectre apparaissent trois pics  $IB_{1\beta}$ ,  $IB_{1\alpha}$  et  $IA_1$ .  $IB_{1\beta}$  ( $\delta = 97.43$  p.p.m.) et  $IB_{1\alpha}$  ( $\delta = 92.95$  p.p.m.) représentent les anomères  $\alpha$  et  $\beta$  du galactose placé à l'extrémité réductrice de l'oligoside.  $IA_1$  ( $\delta = 92.43$  p.p.m.) est le signal correspondant au carbone 1 du sulfate-2-anhydro-3-6- $\alpha$ -D-galactosyl. L'absence de pic dans la région de 103 p.p.m. prouve qu'il n'y a aucun tétraholoside présent. La valeur du rapport de l'intégrale du pic  $IA_1$  sur la somme de celles des pics  $IB_{1\alpha}$  et  $IB_{1\beta}$  est égale à 0.98 prouvant que l'oligoside est un diholoside (valeur théorique = 1.00).

L'oligoside est donc le disulfate de néocarrabiose iota pur, ou sulfate-2-anhydro-3-6- $\alpha$ -D-galactopyranose (1  $\rightarrow$  3) sulfate-4-D-galactopyranose (O-O).



disulfate de néocarrabiose iota

## E/ - DISCUSSION

Les carraghénanes kappa et iota sont souvent présentés comme des entités ayant une structure pratiquement idéale. La structure régulière de ces polyosides est en fait toujours "contaminée" par la présence de résidus de natures différentes; un carraghénane kappa peut être contaminé par des résidus iota; un carraghénane iota peut contenir des résidus kappa. A ces structures "contaminantes" peuvent s'ajouter les carraghénanes mu et nu.

Jusqu'à maintenant seules deux carraghénases, kappa et lambda avaient été isolées pour analyser la structure des carraghénanes. Dans cette présente étude, une troisième carraghénase est isolée: une carraghénase iota que nous avons utilisée pour caractériser quelques polyosides extraits d'algues rouges. Nous avons également utilisé la spectroscopie de R.M.N. du  $^{13}\text{C}$  pour analyser ces polyosides et leurs hydrolysats obtenus après dégradation enzymatique.

Les carraghénases kappa et lambda ont été purifiées une ou plusieurs années après que leur spécificité ait été définie et testée sur différents extraits d'algues. Nous avons suivi la même ligne de pensée et bien qu'il soit plus sécuritaire et plus rationnel de travailler avec une enzyme purifiée, nous avons préféré étudier les propriétés de la carraghénase iota et leurs utilisations plutôt que d'orienter notre travail sur la purification d'une enzyme inconnue.

### I: DEGRADATION BACTERIENNE DES CARRAGHENANES

Les enzymes responsables de l'hydrolyse des extraits polyosidiques d'algues sont synthétisées par des bactéries dont le vrai rôle dans la nature n'est pas connu. Sont-elles pathogènes pour l'algue ou font-elles uniquement partie de la voie de décomposition normale de l'algue? Lorsque ces bactéries dégradent un polyoside extrait d'algue, il n'est pas évident qu'elles dégradent la structure dominante du polyoside; elles peuvent dégrader la structure "contaminante". C'est ainsi que nous avons isolé huit bactéries hydrolysant l'extrait d'Euclima spinosum; parmi elles, une seule hydrolyse la structure dominante de l'extrait (carraghénane iota),

Les autres dégradent préférentiellement la structure "contaminante" (carraghénane kappa). Parmi ces dernières, quelques-unes ont en plus la possibilité d'hydrolyser légèrement le carraghénane iota.

HUMM (1946) a décrit des bactéries qui liquéfiaient des extraits d'algues maintenant connus pour être des carraghénanes iota. Mais il faut être prudent dans l'interprétation de tels résultats; la liquéfaction du gel pouvait être liée à la présence de carraghénane kappa ou d'autres résidus dans le gel.

L'équipe de WILLIAMSON (communication personnelle) a isolé neuf bactéries ayant la possibilité d'hydrolyser le carraghénane kappa et n'a pu en isoler aucune spécifique du iota. Nous rappelons que nous-même, sur huit bactéries, sept dégradent principalement le carraghénane kappa et une seule a une activité marquée pour le iota. La propriété de dégrader le carraghénane kappa semble donc être plus répandue que celle d'hydrolyser le iota.

## II: PARAMETRES AFFECTANT LA PRODUCTION ET L'ACTIVITE DE LA CARRAGHENASE IOTA PAR LA SOUCHE #1

### II.1 EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA PRODUCTION DE CARRAGHENASE IOTA

Les bactéries ayant la propriété de dégrader les polysides extraits d'algues ont été isolées en général d'eaux tropicales ou tempérées; les températures de croissance utilisées pour faire pousser ces bactéries sur milieu de culture sont de l'ordre de 25°C. Nous avons étudié l'influence de la température sur la souche #1 responsable de la synthèse de la carraghénase iota. Le taux de croissance augmente avec la température, mais, fait surprenant, la production d'enzyme diminue. Il faut donc choisir un compromis afin d'avoir un temps de croissance assez court tout en gardant une bonne production d'enzyme. La température ainsi choisie est de 22°C.

### II.2 EFFET DE LA CONCENTRATION DE CARRAGHENANE IOTA DANS LE MILIEU DE CULTURE

Un autre paramètre influençant la production d'enzyme est la concentration de carraghénane iota dans le milieu de culture. La courbe de production d'enzyme en fonction de la concentration de substrat a l'allure d'une courbe de saturation normale. Lorsque la concentration de substrat est nulle, la production d'enzyme est nulle, ceci signifie que l'enzyme n'est pas constitutive mais est induite par la présence de carraghénane iota.

De même, la carraghénase kappa synthétisée par Pseudomonas carrageenovora est induite par le carraghénane kappa (JOHNSTON, 1973). Lorsque le milieu de culture contient du carraghénane lambda, Ps. carrageenovora est alors capable de synthétiser une carraghénase lambda: une souche peut synthétiser plusieurs enzymes si les substrats inducteurs sont présents. Il est ainsi fort possible que la double propriété des souches (#2, 3, 4, 5) d'hydrolyser les carraghénanes kappa et iota soit due au caractère hybride de l'extrait d'Eucheuma spinosum.

### II.3 ACTIVITE EN FONCTION DU pH

L'activité enzymatique de la carraghénase iota a été mesurée en fonction du pH; la courbe obtenue présente un épaulement et pourrait être la résultante de deux pics (figure 10). L'activité hydrolysante de la carraghénase iota peut être due à la présence de plusieurs enzymes. Pour détecter leur existence, toutes nos mesures d'activité faites par viscosimétrie devraient être doublées par le dosage de la production de sucres réducteurs. Une enzyme provoquant une forte réduction de la viscosité ne provoque pas obligatoirement la production d'une grande quantité de sucres réducteurs. Nous avons tenté de doser ces sucres par la méthode de SOMOGYI-NELSON (1952). Cette méthode avait été utilisée par YAPHE (1955), WEIGL (1966) et JOHNSTON (1973) pour mesurer l'activité des carraghénases kappa et lambda. Nous n'avons malheureusement pas obtenu de résultats cohérents dans le cas de notre enzyme. Nous proposons une autre méthode, celle de DYGERT et coll. (1965), suggérée par MC LEAN et WILLIAMSON (1979), qui semble plus précise, surtout à de faibles concentrations de sucres.

### II.4 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LES RENDEMENTS D'HYDROLYSE

Les rendements d'hydrolyse du carraghénane iota par la carraghénase iota #1 sont bien meilleurs lorsque la température d'hydrolyse est 40°C.

Ce phénomène n'est pas dû à une activation de l'enzyme par la température puisque tous les rendements ont été calculés en fin d'hydrolyse et sur des hydrolysats préparés en présence d'excès d'enzyme.

La température a un effet sur la structure tertiaire et quaternaire des molécules de carraghénanes (cf. page 14). A 40°C, le gel fond et le réseau tridimensionnel formé par les doubles hélices de carraghénane n'existe plus, les chaînes moléculaires sont libres; l'enzyme peut alors accéder plus facilement aux molécules et le rendement de l'hydrolyse augmente. Au-dessous de 40°C, le réseau tridimensionnel se forme et l'enzyme est probablement limitée par des phénomènes diffusionnels. Au-dessus de 40°C, le rendement de l'hydrolyse diminue; ce phénomène est dû à l'inactivation de l'enzyme par la température. Les hydrolyses, à l'aide des enzymes #5 et #9, ne semblent pas affectées par des problèmes d'accès au substrat. Au-dessus de 40°C, nous notons le même phénomène d'inactivation de l'enzyme par la température.

III: ACTIVITE ET SPECIFICITE DES ENZYMES SYNTHETISEES PAR LES SOUCHES #1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 9

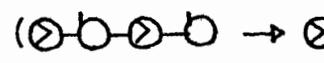
Au long de notre étude, nous avons comparé les résultats obtenus à l'aide des enzymes #1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 à ceux obtenus à l'aide de l'enzyme #9 sur laquelle quelques travaux avaient déjà paru. Cette enzyme #9 produite dans l'extrait extracellulaire de Pseudomonas carrageenovora a été caractérisée par YAPHE et BAXTER (1955) et WEIGL et YAPHE (1966-a-b): ils l'ont identifiée comme étant une carraghénase kappa.

Nous avons tenu à le confirmer par nos méthodes avant de l'utiliser comme référence.

III-1 LA CARRAGENASE KAPPA DE PSEUDOMONAS CARRAGEENOVORA (ENZYME #9)

a. Activité

WEIGL en 1966 (a-c) identifie par analyse chimique les produits d'hydrolyse du carraghénane kappa (extrait de Chondrus crispus) par les enzymes intra et extra-cellulaires de Pseudomonas carrageenovora. Il en déduit que l'enzyme extracellulaire purifiée, hydrolyse les liaisons  $\beta(1 \rightarrow 4)$  entre le sulfate-4-galactose et l'anhydro-3-6-galactose et que l'extrait cellulaire contient une désulfatase; le plus petit oligoside produit par l'enzyme extracellulaire est le sulfate de néocarrabiose kappa ( $\text{SO}_4\text{-O}$ ) qui est ensuite désulfaté par l'enzyme présente dans l'extrait cellulaire en néocarrabiose ( $\text{O}$ ). Il caractérise quatre oligosides de degré de polymérisation respectif, 2, 4, 6 et 8, comme produits résultant de l'hydrolyse du carraghénane kappa par l'enzyme extracellulaire. En chromatographie sur plaque de cellulose WHATMAN CC. 41, les valeurs de  $R_f$  de ces oligosides sont les suivantes: 0.60, 0.50, 0.35 et 0.22 (son système de solvant, Butanol /éthanol/eau, 1/1/1, est légèrement différent du nôtre, 3/2/2.5). Nous avons préféré reporter les valeurs de  $R_{GAL}$  des oligosides qui sont plus fiables. Le  $R_f$  peut varier en fonction de la température, de l'épaisseur des plaques, de la concentration des oligosides. Mais nous pouvons cependant reconnaître notre séquence d'oligosides kappa ( $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$ ,  $K_4$  (figure 11)). WEIGL a séparé les oligosides par chromatographie

sur colonne sèche de cellulose (solvant, butanol/éthanol/eau, 3/1/1) et obtient les quantités suivantes: 5 mg de diholoside (il estime en avoir perdu 40% lors d'une étape de la préparation et devrait donc en obtenir environ 8 mg), 2 mg de tétraholoside, 200 mg d'hexaholoside, 200 mg d'octaholoside. La quantité de diholoside serait donc quatre fois supérieure à celle de tétraholoside. Résultats surprenants si l'on se rappelle les nôtres: nous obtenons un mélange équimoléculaire de di et tétraholosides. WEIGL préparait son enzyme au bout de 66 heures de croissance dans 500 ml de milieu H<sub>1</sub>, alors que nous cultivons notre souche pendant 15 heures dans 200 ml du même milieu. Nous avons donc pensé que l'enzyme hydrolysant le tétra en diholoside () apparaissait plus tard pendant la phase stationnaire et avons utilisé une préparation enzymatique collectée après 60 heures de croissance, mais l'analyse de l'hydrolysat par spectroscopie de R.M.N. nous donne les mêmes résultats que ceux obtenus après 15 heures. Nous avons également pensé que l'enzyme hydrolysant le tétra en diholoside pouvait agir plus lentement; mais un hydrolysat de 72 heures contient les mêmes quantités de di et tétraholosides. La différence entre nos résultats et ceux de WEIGL peuvent venir du fait que nous avons travaillé avec une préparation enzymatique non purifiée.

Nous concluons que l'étape finale de l'hydrolyse du carraghénane kappa par notre préparation enzymatique #9 est l'hydrolyse de l'hexaholoside en di et tétraholosides. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer le procédé exact d'hydrolyse et déterminer si plusieurs enzymes entrent en jeu.

MC LEAN et coll. (1979) ont repris les travaux de WEIGL; ils viennent de purifier la carraghénase kappa par un procédé simple et publient les spectres de R.M.N. du <sup>13</sup>C des di et tétraholosides: ils interprètent les pics correspondant au galactose non réducteur et à l'anhydrogalactose, mais n'interprètent pas les pics correspondant aux anomères α et β, et ne calculent aucun rapport d'intégrales. L'allure de leurs spectres est cependant semblable à celle des nôtres (figures 23 et 24). (BHATTACHARJEE et coll. - 1977).

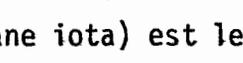
b. Spécificité

JOHNSTON, en 1973, utilise la carraghénase kappa extraite de Pseudomonas carrageenovora pour hydrolyser l'extrait polyosidique d'Eucheuma spinosum (carraghénane iota). Il prouve qu'une partie de la molécule est hydrolysée (apparition de sucres réducteurs) et en déduit la présence de résidus kappa dans la molécule. Nous nous sommes cependant posé la question à savoir si cette carraghénase kappa était strictement spécifique pour le carraghénane kappa ou avait quelque affinité pour le iota. L'analyse par spectroscopie de R.M.N. du  $^{13}\text{C}$  (figure 35) nous prouve que l'extrait d'E. spinosum (carraghénane iota) hydrolysé par l'enzyme #9 (carraghénase kappa de Pseudomonas carrageenovora) contient des oligosides de nature kappa. Aucun oligoside de nature iota n'apparaît dans cet hydrolysât; ceci laisse supposer que l'enzyme #9 ne dégrade pas le carraghénane iota (qui est la structure dominante de l'extrait) et met en évidence le caractère hybride du polyoside (dont nous reparlerons plus loin). Cependant lors de l'analyse par chromatographie sur couche mince de l'hydrolysât #9 de carraghénane iota "purifié", nous observons la présence de taches très faiblement colorées dont les  $R_{\text{GAL}}$  respectifs sont semblables à  $I_2$  et  $I_3$  (figure 39). Le réactif au naphtorésorcinol utilisé pour révéler les plaques est très sensible et révèle la présence de quelques  $\mu\text{g}$  d'oses contenant de l'anhydrogalactose. Cette activité sur le carraghénane iota peut donc être jugée négligeable: les carraghénanes kappa et iota ont des structures très proches, il est fort possible que la carraghénase kappa ait une très faible affinité pour le carraghénane iota.

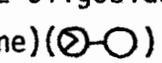
MC LEAN et WILLIAMSON (1979) attribuent à la carraghénase kappa de Pseudomonas carrageenovora, une activité de carraghénase iota, après avoir observé la diminution de viscosité d'une solution de polyoside extrait d'E. spinosum sur addition de la carraghénase. Nous venons de prouver que la diminution de viscosité de la solution est plutôt due à la présence de résidus kappa qu'à l'activité effective de la carraghénase sur le carraghénane iota.

### III-2 LA CARRAGHENASE IOTA SYNTHETISEE PAR LA SOUCHE #1

#### a. Activité

La carraghénase iota extracellulaire synthétisée par la souche #1 hydrolyse comme l'enzyme #9, les liaisons  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) de la chaîne de carraghénase iota; mais le produit final de l'hydrolyse par l'enzyme #1 (carraghénane iota) est le tétraholoside () (figure 30) et non un mélange de di et tétraholoside. La production de tétraholoside vient probablement de l'hydrolyse de l'octaholoside en deux molécules de tétra.

La souche #1 utilise le tétraholoside qui pénètre la paroi cellulaire pour être transformé par d'autres enzymes. DECAD et NIKAIDO (1976) ont étudié le rôle de tamis que joue la paroi cellulaire chez les bactéries Gram négatives (Salmonella typhimurium, Escherichia coli) et ont établi la limite d'exclusion des molécules à une masse molaire variant de 500 à 900 (à l'exception de Pseudomonas aeruginosa PA 01 pour lequel la limite se situe entre 3000 et 8000 - HANCOCK et NIKAIDO - 1978). La masse molaire du tétraholoside de carraghénane iota est 989; l'oligoside se situe donc dans la marge normale supérieure des substrats ayant la possibilité de pénétrer la paroi cellulaire.

L'extrait cellulaire dégrade le tétraholoside en une série d'oligosides que nous avons séparés sur plaque de chromatographie (figure 13) mais que nous n'avons pas identifiés. Il s'agit probablement de tétraholosides et diholosides partiellement désulfatés; le produit final (DS) a été identifié par comparaison avec le produit d'hydrolyse du sulfate de néocarrabiose kappa par la désulfatase intracellulaire de la souche #9 (Pseudomonas carrageenovora). L'oligoside DS a le même  $R_{GAL}$  que le néocarrabiose et son  $R_{GAL}$  n'est pas affecté lorsque du cétyle de pyridinium est ajouté au solvant (caractéristique des sucres neutres). L'oligoside est donc le néocarrabiose (diholoside désulfaté de carraghénane)().

Nous avons pensé que par analogie avec le système de Ps. atlantica (cf. page 22), l'étape finale de dégradation de la chaîne était l'hydrolyse de la liaison  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) du néocarrabiose avec production des deux

monomères: galactose et anhydro-galactose. Aucune enzyme ayant une telle propriété n'a pu être détectée sur simple lyse des cellules; nous leur avons donc fait subir des traitements au triton et chlorure de lithium. De nouveau, aucune enzyme ayant la possibilité d'hydrolyser le néocarrabiose ( $\text{O}-\text{O}$ ) n'a pu être isolée. Il est possible que l'enzyme ait été présente mais que les conditions requises par l'enzyme pour l'hydrolyse n'aient pas été réunies.

Le traitement au détergent ou au sel peut avoir détruit des liaisons nécessaires entre l'enzyme et des composants de l'enveloppe cellulaire; la valeur du pH requise par l'enzyme peut être différente de celle que nous avons utilisée (pH = 7, 7.5).

L'extrait cellulaire de la souche #1 contient donc une ou des désulfatases et une ou des oligosidases, le produit final de l'hydrolysat du tétrasulfate de néocarratétriose ( $\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O}$ ) par ces enzymes est le néocarrabiose ( $\text{O}-\text{O}$ ).

#### b. Spécificité

Nous avons étudié la spécificité de la carraghénase iota en analysant les spectres R.M.N. des polyosides d'E. spinosum et d'E. cottonii hydrolysés par l'enzyme. La fraction de l'extrait d'E. spinosum (carraghénane iota) dégradée par la carraghénase iota (enzyme #1) contient le tétraholoside iota pratiquement pur (figure 30); aucun oligoside de nature kappa n'a pu être détecté. L'enzyme semble donc être spécifique pour le carraghénane iota et si elle dégrade très faiblement le carraghénane kappa présent dans le substrat (extrait d'E. spinosum), la quantité d'oligosides kappa formés est trop faible pour être détectée.

La fraction résistante du même hydrolysat contient un mélange d'oligosides hybrides kappa et iota de masse molaire élevée (figures 31 et 32). La présence de résidus kappa semble donc inhiber l'hydrolyse complète en oligosides de faibles masses molaires.

Mais si l'extrait d'E. cottonii (carraghénane kappa) est traité à l'aide de l'enzyme #1 (carraghénase iota), il est possible d'identifier

par spectroscopie de R.M.N. du  $^{13}\text{C}$ , dans la fraction hydrolysée (10%), non seulement un ou des oligosides iota (prouvant le caractère hybride de la molécule) mais aussi le tétraholoside de carraghénane kappa (figure 34).

La présence d'un oligoside kappa suggère que la carraghénase iota a une faible activité de carraghénase kappa. Il est possible que la libération d'une extrémité réductrice soit favorisée par la proximité de résidus iota. Le degré de polymérisation du ou des oligosides iota présents dans la fraction de l'extrait d'E. cottonii hydrolysée par la carraghénase iota n'a pu être identifié par spectroscopie de R.M.N. Il est fort probable qu'un seul oligoside soit présent et qu'il soit le tétraholoside puisque l'enzyme #1 ne peut dégrader plus loin le carraghénane et que le tétraholoside est le produit caractéristique final de l'hydrolyse du carraghénane iota par l'enzyme #1.

Nous avons vérifié si cette activité de carraghénase kappa que nous avons détectée dans la préparation enzymatique #1, pouvait nuire à l'interprétation de certains résultats: la distribution des masses molaires d'E. cottonii, après avoir été déterminée une première fois (figure 44), a été déterminée une seconde fois, après un nouveau traitement à l'aide de la carraghénase iota. Aucun changement n'a été noté.

L'activité de carraghénase kappa de la préparation enzymatique #1 semble donc trop faible pour affecter la distribution des masses molaires de carraghénane kappa, et l'hydrolyse partielle des chaînes d'E. cottonii semble être principalement due à la présence de résidus iota.

Cette activité de carraghénase kappa peut être due à une double activité de la carraghénase iota ou à une autre enzyme présente en faible quantité. L'oligoside kappa présent dans l'hydrolysate d'E. cottonii par l'enzyme #1 est un tétraholoside. Cette observation serait en faveur de l'hypothèse d'une seule et même enzyme. Cette enzyme serait une carraghénase iota ayant une faible activité pour le carraghénane kappa. Ceci est envisageable étant donné que les structures de base des deux carraghénanes sont identiques, ils ne diffèrent que par l'absence d'un groupe sulfate sur tous les seconds résidus, chez le carraghénane kappa.

### III-3 LES ENZYMES #2, 3, 4, 5, 6 ET 7

Les préparations enzymatiques #2, 3, 4, 5, 6 et 7 ont toutes une activité de carraghénase kappa. Elles dégradent le polyoside d'E. cottonii (carraghénane kappa) en laissant environ le même pourcentage de fraction résistante (20% - tableau 8) que la carraghénase kappa de Ps. carrageenovora. Les hydrolysats des cinq premières enzymes (#2, 3, 4, 5 et 6) contiennent les di et tétraholosides (figure 11) comme l'hydrolysat #9, alors que l'hydrolysat #7 ne contient pas de diholoside, mais contient les tétra et hectaholosides (figures 11 et 28).

Les enzymes #2, 3, 4 et 5 ont en plus de leur activité de carraghénase kappa, une activité de carraghénase iota qui est plus faible mais non négligeable. De nouveau la question se pose: la double activité des préparations est-elle due à une ou deux enzymes? Les souches synthétisant ces enzymes sont cultivées sur extrait polyosidique d'E. spinosum (carraghénane iota). La double activité des préparations pourrait être induite par le caractère hybride iota-kappa du substrat. Avant de passer aux travaux de purification de ces enzymes, il faudrait penser à les induire sur un carraghénane préalablement "purifié" des résidus hybrides, par traitement enzymatique.

Nous avons également mis en évidence chez toutes les souches (#2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8) la présence d'une désulfatase intracellulaire (produit final d'hydrolyse: le néocarrabiose). La désulfatation des oligosides par les bactéries dégradant les carraghénanes semble être une étape essentielle dans leur métabolisme.

#### IV: PURIFICATION ET ANALYSE PAR SPECTROSCOPIE DE R.M.N. DU $^{13}\text{C}$ DES OLIGOSIDES

Les oligosides ont été séparés et purifiés sur colonne de gel SEPHADEX, par élution à l'eau distillée. L'efficacité de la séparation peut être améliorée en augmentant la force ionique de l'éluant (par addition de NaCl). Nous avons préféré sacrifier ce point, afin de pouvoir analyser nos produits par chromatographie sur couche mince (la présence de NaCl empêche toute lecture de chromatogramme sur plaque).

Les oligosides purifiés ont été analysés par spectroscopie de R.M.N. du  $^{13}\text{C}$ . Alors que l'identification par analyse chimique est longue et fastidieuse, et nécessite plusieurs expériences, un seul spectre R.M.N. nous fournit tous les renseignements sur l'oligoside. La valeur des déplacements chimiques permet de connaître la nature des oligosides, kappa ou iota; la nature de la liaison hydrolysée est identifiée par la présence des signaux correspondant aux anomères  $\alpha$  et  $\beta$ ; le degré de polymérisation peut être calculé par intégration des surfaces des pics.

La spectroscopie de R.M.N. du carbone 13 s'est révélée d'une grande utilité non seulement dans l'analyse des oligosides mais aussi dans l'étude de la nature hybride des polysides.

## V: NATURE HYBRIDE DES POLYOSIDES

L'utilisation d'enzymes spécifiques sur des extraits polyosidiques d'algues, suivie de l'analyse par spectroscopie de R.M.N. des fractions résistantes, permet de mettre en évidence le caractère hybride des molécules. La détermination de la distribution des masses molaires apporte des renseignements sur la répartition des résidus hybrides dans la chaîne.

Nous avons utilisé la propriété des polyosides de précipiter par addition d'éthanol pour séparer les fractions dites résistantes des fractions appelées "hydrolysées" ou dégradées. Cette méthode de fractionnement est peu précise; si la grosse majorité des oses aux masses molaires élevées précipitent, il peut arriver qu'il en reste des traces dans la fraction soluble.

Si la préparation de polyosides sulfatés ne contient pas suffisamment de sels, les polymères ne précipitent pas. Le pourcentage de fraction précipitée dépend également du nombre de volumes d'éthanol utilisés. Le fait d'appeler la fraction précipitée, fraction résistante, n'a aucune signification quant à sa masse molaire; les chaînes moléculaires peuvent être partiellement hydrolysées. La fraction résistante peut donc contenir des oses allant des polymères non dégradés aux oligosides de masse molaire élevée.

Nous avons établi que pour les préparations d'E. spinosum et E. cottonii, l'addition de 2 volumes d'éthanol nous donnait une séparation satisfaisante et significative. Mais il n'est pas impossible qu'il faille utiliser une autre concentration d'éthanol pour d'autres préparations de polyosides ou qu'il faille y ajouter du sel (NaCl).

### V-1 POLYOSIDE EXTRAIT D'EUCHEUMA SPINOSUM

L'analyse par spectroscopie de R.M.N. (figures 21 et 22) du polyoside non dégradé extrait d'E. spinosum (carraghénane iota) laisse prévoir la présence de résidus kappa (échantillon #712503 - 20% de kappa). Après avoir hydrolysé la structure dominante iota par traitement à l'aide de la

carraghénase iota (enzyme #1), la fraction kappa apparaît nettement dans la fraction résistante (spectre R.M.N. - figures 31 et 32). Dans cet hydrolysate, il ne reste aucune molécule de masse molaire élevée (figure 43), la fraction résistante contient des petits morceaux de polysides hybrides (figures 31 et 32), les résidus de nature kappa sont donc situés sur les chaînes de carraghénane iota. Toutes les chaînes de carraghénane iota ne semblent pas contenir de résidus kappa puisque lorsque le polyside est traité par la carraghénase kappa, une fraction importante de l'hydrolysate n'est pas affectée par l'hydrolyse (figure 43).

Le polyside extrait d'E. spinosum nous avait été présenté par REES et son équipe (ANDERSON et coll. - 1973) comme un carraghénane iota contaminé par un faible pourcentage de résidus nu. Après traitement au borohydrure, les proportions de galactose/anhydrogalactose/groupes sulfates sont les suivantes 1/1.03/2.03 prouvant que tous les résidus nu ont été transformés en iota. Aucun résidu kappa n'est détecté.

Nous venons de prouver que le polyside extrait d'E. spinosum contient principalement du carraghénane iota et peut contenir un pourcentage non négligeable de carraghénane kappa. Une partie des chaînes serait du carraghénane iota pur et l'autre contiendrait des résidus kappa.

La présence d'un faible pourcentage de carraghénane kappa dans l'extrait polyosidique d'E. spinosum explique la raison pour laquelle les colonies de Ps. carrageenovora sont capables de dégrader très faiblement le gel d'E. spinosum lorsque la culture est inoculée sur milieu H<sub>1</sub> solidifié par le polyside (figures 3 et 3').

Nous pensions sélectionner des bactéries dégradant spécifiquement le carraghénane iota en isolant des cultures qui liquéfiaient l'extrait d'E. spinosum (cultures #2, 3, 4, 5, 6, 7). Les résultats nous ont montré que nous nous étions trompés et que ces bactéries ne dégradent pas préférentiellement le carraghénane iota présent en grande quantité, mais le carraghénane kappa "contaminant".

## V-2 POLYOSIDE EXTRAIT D'EUCHEUMA COTTONII

Le spectre R.M.N. de l'extrait non dégradé d'E. cottonii ne laisse pas prévoir la présence de résidus iota dans la molécule (figure 20). La "contamination" est trop faible. Après traitement par la carraghénase kappa, la structure dominante est éliminée et la structure cachée (iota) est démasquée (figure 36).

La quantité de carraghénane iota présent dans la fraction résistante (20%) d'E. cottonii après traitement par la carraghénase kappa est de 45% ce qui correspond à 9% du polyoside total. Ce pourcentage est supérieur à la quantité d'oligoside iota libéré (environ 5%) dans le milieu après hydrolyse du même polyoside par la carraghénase iota. La différence peut être expliquée de la manière suivante: des liaisons entre les résidus iota peuvent être hydrolysées dans les chaînes sans qu'il y ait production d'oligosides; cette hypothèse est appuyée par le fait que le spectre de distribution des masses molaires du polyoside après hydrolyse par la carraghénase kappa est très large (figure 44): l'hydrolysate est principalement constitué de morceaux de polyosides partiellement dégradés, les liaisons qui les reliaient étaient principalement des liaisons entre des résidus iota et le nombre de résidus iota présents dans ces sections n'était pas suffisant pour qu'il y ait libération d'oligosides.

La présence de résidus iota a déjà été prouvée dans le carraghénane kappa de Chondrus crispus (PAINTER, 1966 - ANDERSON et coll., 1968-a). Le polyoside d'E. cottonii a déjà été étudié par ANDERSON et coll. (1973) et bien qu'ils n'aient pas mis en évidence l'existence de résidus iota dans les chaînes, la présence de ces résidus a été posée comme une éventualité.

Dans la présente étude, nous prouvons que l'extrait polyoside d'E. cottonii est un carraghénane kappa "contaminé" par environ 9% de carraghénane iota.

## V-3 POLYOSIDE EXTRAIT DE FURCELLARIA FASTIAGATA

Cet extrait d'algue est un carraghénane kappa partiellement désulfaté (---⊙---⊙---⊙---), donc un hybride (BHATTACHARJEE et coll. - 1978). Nous nous sommes posés la même question que pour les hybrides kappa-iota

quant à la répartition des résidus dans le polyoside. Les résultats obtenus (figure 45) prouvent que les résidus neutres et sulfatés ne sont pas situés sur des chaînes séparées mais sont imbriqués dans des chaînes identiques. La carraghénase iota (enzyme #1) a un effet très léger sur la distribution des masses molaires du polyoside (figure 45). Mais ce résultat seul ne nous permet pas d'affirmer la présence de résidus iota dans la molécule. D'une part nous devons nous rappeler que la préparation enzymatique a une très faible activité de carraghénase kappa (bien qu'elle ne semble pas être assez importante pour affecter sensiblement la distribution des masses molaires d'un hydrolysât d'E. cottonii (page 126), elle peut être responsable de ce léger changement). D'autre part, si les résidus iota existaient, il faudrait analyser attentivement les spectres R.M.N. des fractions hydrolysées et résistantes des hydrolysats.

La présence de résidus iota est probable puisque PAINTER (1966) a mis en évidence dans 3 différents échantillons de furcellarane, l'existence de sulfate-2-anhydro-3-6-D-galactose.

#### V-4 POLYOSIDES EXTRAITS D'AHNFELTIA CONCINNA ET AHNFELTIOPSIS GIGARTINOIDES

##### a. Hybrides kappa-iota

Les extraits polyosidiques d'Ahnfeltia concinna et Ahnfeltiopsis gigartinoïdes sont dégradés par les carraghénases kappa et iota. Comme les polyosides précédents, les résidus kappa et iota sont situés sur les mêmes chaînes moléculaires. Dans les deux cas, les produits hydrolysés des polyosides dégradés par la carraghénase kappa ont une masse molaire moyenne inférieure à ceux obtenus par hydrolyse à l'aide de la carraghénase iota (figures 48 et 49). Ceci suggère que la quantité de carraghénane kappa est supérieure dans les deux extraits à la quantité de carraghénane iota. Ce résultat est confirmé par l'analyse par spectroscopie de R.M.N. du carbone 13 (figures 46 et 47) (A. concinna, kappa: 50%, iota: 32%; A. gigartinoïdes, kappa: 51%, iota: 40%).

Le spectre des masses molaires de l'extrait d'A. gigartinoïdes hydrolysé par la carraghénase iota (figure 49) est plus large que celui obtenu dans le cas du polyoside d'A. concinna (figure 48); et la moyenne des masses molaires est plus faible dans l'hydrolysât de ce dernier.

Ce résultat peut paraître surprenant étant donné que, d'après les résultats obtenus par spectroscopie de R.M.N., le pourcentage de carraghénane iota est inférieur chez Ahnfeltia concinna. Il peut cependant être expliqué par la manière dont les résidus sont répartis dans la molécule: chez A. concinna, les résidus iota seraient répartis de façon plus répétitive que chez A. gigartinoïdes, les molécules produites auraient donc une taille plus homogène.

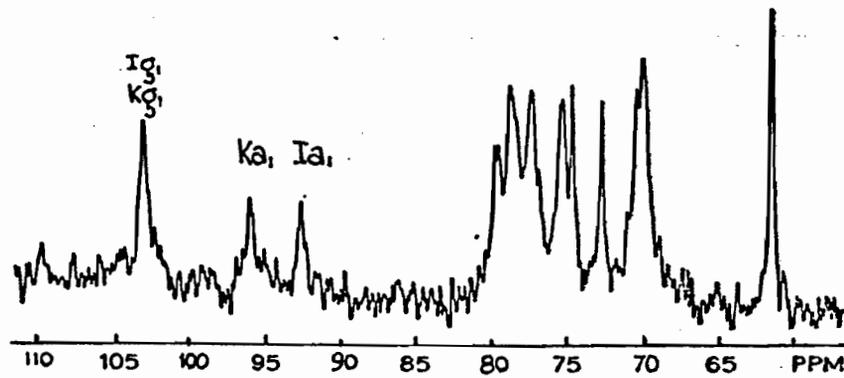
b. Présence éventuelle de carraghénane nu.

Un autre résultat intéressant est l'obtention de deux pics inconnus X et Y sur le spectre de R.M.N. des deux extraits (figures 46 et 47). BHATTACHARJEE et coll. (1979) ont déjà analysé par spectroscopie de R.M.N. l'extrait polysidique d'Ahnfeltia concinna après traitement alcalin. Le spectre obtenu est présenté figure 52 (spectre A) et comparé au spectre que nous avons déjà présenté figure 46 (spectre B).

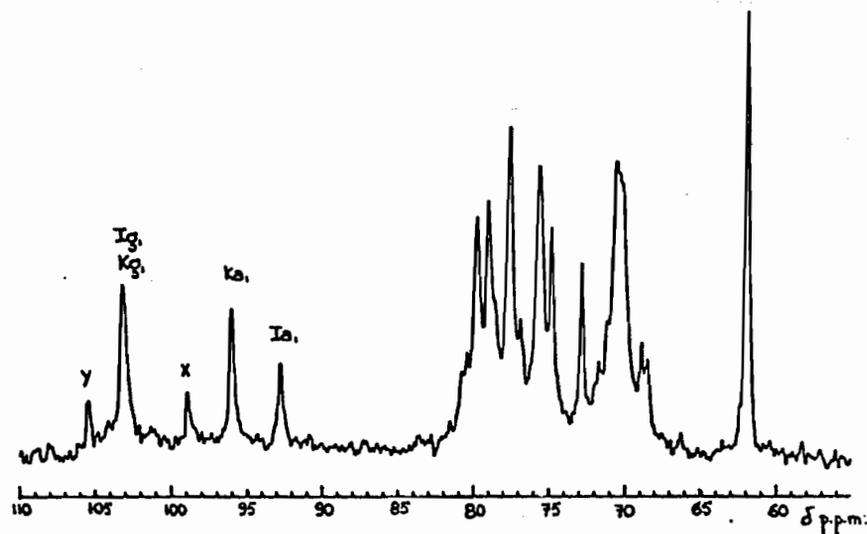
Sur le spectre A seuls trois pics apparaissent, caractéristiques d'un polymère hybride de carraghénane iota et kappa. Les carraghénanes iota et kappa sont présents en quantité égale (50%-50%). L'échantillon utilisé par BHATTACHARJEE est le même que celui que nous avons utilisé pour nos analyses (#26576, préparé par le Dr SANTOS, Université d'Hawaï). La seule différence est le traitement alcalin qu'il a fait subir au polyside. Pour interpréter de façon certaine ces résultats obtenus par des personnes différentes, il faudrait analyser parallèlement les extraits traités et non traités (projet à l'étude). Nous allons cependant nous permettre une interprétation qui pourrait éventuellement être révisée après l'obtention de résultats supplémentaires.

Nous rappelons qu'un traitement alcalin sur un carraghénane convertit tous les résidus précurseurs sulfatés sur le carbone #6 en anhydro-3-6-galactose, avec élimination du groupe sulfate.

Les pourcentages de carraghénane kappa et iota que nous obtenons dans le polyside d'A. concinna (kappa: 50%, iota: 32%, inconnu: 18%) et ceux de BHATTACHARJEE (kappa: 50%, iota: 50%) laissent supposer que les résidus inconnus ont été transformés en carraghénane iota par le traitement alcalin et seraient donc du carraghénane nu ( $\nu$ ) précurseur du carraghénane iota (page 6).



(A)



(B)

Spectres de R.M.N. du  $^{13}\text{C}$  de l'extrait polysidique d'*A. concinna*

- Ⓐ *Ahnfeltia concinna* après traitement alcalin.  
d'après BHATTACHARJEE et coll. (1979)
- Ⓑ *Ahnfeltia concinna* avant traitement alcalin  
(figure 46)

$I_g, K_g$  : atome de carbone n°1 des résidus sulfate-4  $\beta$ -D.galactopyranosyl de carraghénanes iota et kappa ( $\delta = 103.2$  p.p.m.)

$K_a$  : atome de carbone n°1 des résidus anhydro 3-6- $\alpha$ -D galactopyranosyl (kappa) ( $\delta = 96.2$  p.p.m.)

$I_a$  : atome de carbone n°1 des résidus sulfate-2 anhydro 3-6  $\alpha$ -D.galactopyranosyl ( $\delta = 92.9$  p.p.m.)

X et Y : atome de carbone n°1 de résidus inconnus

Figure 52

Le fait que nous ne trouvions pas de carraghénane mu ( $\mu$ ) précurseur du carraghénane kappa est très intéressant; c'est un atout supplémentaire pour la théorie qu'est en train d'établir MC CANDLESS (DI NINNO et MC CANDLESS - 1979) sur la biosynthèse des carraghénanes. Elle pense que le précurseur commun des carraghénanes kappa et iota est le carraghénane nu qui se transformerait en iota, puis le iota en kappa. Une école différente existe, celle de CRAIGIE et WONG (1979) qui pensent que le carraghénane mu ( $\mu$ ) est le tronc commun et peut se transformer soit en kappa, soit en nu ( $\nu$ ) qui lui-même se transformerait en iota.

Les résidus de nature inconnue supposés de nature nu sont non seulement présents chez A. concinna, mais aussi chez Ahnfeltiopsis gigartinoïdes. Les pourcentages sont légèrement différents (résidus inconnus, A. concinna: 18%; A. gigartinoïdes: 9%) et varient aux dépens du pourcentage de carraghénane iota (A. concinna: 32%; A. gigartinoïdes: 40%). Le pourcentage de carraghénane kappa est constant (A. concinna: 50%; A. gigartinoïdes: 51%).

Nous rappelons que la dénomination Ahnfeltiopsis est très récente et vient d'être proposée par le Dr SILVA (Dr Mc CANDLESS, communication personnelle) pour caractériser les algues carraghénophytes du genre Ahnfeltia. Si le terme Ahnfeltiopsis est accepté, Ahnfeltia concinna devrait s'appeler Ahnfeltiopsis concinna.

F/ - CONCLUSION

L'utilisation d'enzymes s'était avérée utile pour déterminer la structure dominante d'un extrait d'algue (YAPHE, 1957-1959). Nous venons de prouver qu'elle peut être aussi très utile pour dévoiler les structures cachées de ces polyosides. La découverte et la caractérisation d'une nouvelle enzyme, la carraghénase iota, augmente les possibilités de ces méthodes.

Nous avons analysé cinq extraits d'algues rouges appartenant à trois familles différentes: Furcellariaceae (F. fastigiata), Solieriaceae (E. cottonii, E. spinosum) et Phylloporaceae (A. concinna et A. gigartinoïdes). Les cinq polyosides sont des hybrides de carraghénanes dont le degré et la nature de l'hybridisation varient.

L'utilisation de la carraghénase iota couplée à celle de la carraghénase kappa nous a permis de mettre en évidence un spectre d'hybrides partant du carraghénane iota dominant, contenant un faible pourcentage de kappa (E. spinosum), allant jusqu'au carraghénane kappa dominant, contenant un faible pourcentage de iota (E. cottonii) en passant par des carraghénanes contenant des pourcentages de kappa et iota pratiquement égaux (A. concinna, A. gigartinoïdes). Dans tous les polyosides, les résidus de nature différente sont imbriqués dans les mêmes chaînes moléculaires.

Lorsque ces polyosides sont utilisés comme substrat pour alimenter les bactéries ayant la propriété de les dégrader, il faut être prudent quant aux enzymes qu'ils peuvent induire chez les bactéries. Ces enzymes peuvent être une carraghénase kappa, une carraghénase iota ou un mélange des deux.

Les carraghénanes sont synthétisés dans l'algue par des processus qui sont à éclaircir. Comment expliquer la différence de pourcentage de kappa et de iota chez E. cottonii et E. spinosum? Les enzymes responsables de la synthèse du kappa et du iota (sulfotransférases ou sulfhydrolases) sont présentes dans les deux cas. Pourquoi l'activité d'une enzyme dominerait sur celle de l'autre?

Parmi les cinq extraits que nous avons analysés, trois d'entre eux sont communément employés industriellement: E. cottonii (carraghénane kappa), E. spinosum (carraghénane iota) et F. fastigiata (furcellarane). La découverte du caractère hybride prononcé des Ahnfeltia est récente et leurs propriétés physiques probablement différentes de celles d'un mélange de carraghénane kappa et de carraghénane iota, intéresseront peut-être un jour les industries.

G/ - ANNEXE

I: MILIEU DE CULTURE H<sub>1</sub>

Solution A

- NaCl	25.0 g
- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 g
- MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	5.0 g
- KCl	1.0 g
- CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	0.2 g
- casamino-acides	2.5 g
- eau distillée	q.s.p. 1000 ml

Solution B

- Solution de FeSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O à 0.3%.

Autoclaver les solutions A et B séparément à 120°C pendant 15 mn.  
Les solutions stérilisées peuvent être conservées à température ambiante pendant quelques jours.

Préparation du milieu: à 1000 ml de solution A, ajouter 10 ml de solution B et la quantité désirée de polyoside (milieu solide: 1.2%).

II: SOLUTION SALINE DE MAC LEOD

- NaCl	0.03 M
- MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0.05 M
- KCl	0.01 M
- Trizma base	0.05 M
- eau distillée	

Ajuster le pH de la solution à pH = 7.2 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 5 N.

III: REACTIF AU NAPHTORESORSINOL (YAPHE - 1957)

Solution 1

Ethanol	375 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentré	100 ml

Solution 2

Naphtoresorsinol	0.1 g
Ethanol	50 ml

La solution 1 est conservée à température ambiante et la solution 2 à 4°C. Le réactif est préparé juste avant son utilisation en mélangeant 1 volume de solution 2 à 2 volumes de solution 1.

IV: PRECIPITATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

**Per Cent Saturation  
Final Concentration of Ammonium Sulfate**

	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	56	84	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	610	662	713	767
10		28	67	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	540	592	640	694
15			28	57	88	107	120	153	185	220	256	294	333	373	415	459	506	556	605	657
20				29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	471	520	569	619
25					30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	436	485	533	583
30						19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	401	449	496	546
33							12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	378	426	472	522
35								31	63	94	129	164	200	238	278	319	364	411	457	506
40									31	63	97	132	168	205	245	285	328	375	420	469
45										32	65	99	134	171	210	250	293	339	383	431
50											33	66	101	137	176	214	256	302	345	392
55												33	67	103	141	179	220	264	307	353
60													34	69	105	143	183	227	269	314
65														34	70	107	147	190	232	275
70															35	72	111	153	194	237
75																36	74	115	155	198
80																	38	77	117	157
85																		39	77	118
90																			38	77
95																				39

**AMMONIUM SULFATE TABLE**

This table indicates the correct amount of solid ammonium sulfate (at 25°C) to be added to one liter of solution to produce a desired change in the percent saturation of ammonium sulfate. Saturated ammonium sulfate at 25°C is 4.1M and requires 767 grams of salt per liter. "Percent saturation" in this table is percent of 4.1M. The listed values were calculated from tables of percent salt, specific gravity and grams per liter at various concentrations.

V: ECHANTILLONS DE CARRAGHENANES ET AUTRES POLYOSIDES UTILISES

V-1 Carraghénane iota

- Eucheuma spinosum - échantillon #31210 (1975)  
origine: Hawaï  
préparé par le Dr Santos (Université d'Hawaï, U.S.A.)  
extraction alcaline
- Eucheuma spinosum - échantillon #582407 (1977)  
fourni par Marine Colloids Inc. (Springfield, N.J., U.S.A.)
- Eucheuma spinosum - échantillon #712503 (1978)  
fourni par Marine Colloids Inc.

V-2 Carraghénane kappa

- Eucheuma cottonii - échantillon #482407 (1977)  
fourni par Marine Colloids Inc.

V-3 Autres carraghénanes

- Ahnfeltia concinna - échantillon #26576 (1975)  
origine: Hawaï  
préparé par le Dr Santos  
extraction alcaline
- Ahnfeltiopsis gigartinoides (1979)  
origine: Puerto Escondido, Baie de Californie (Mexique)  
préparé par le Dr Mc Candless (Université McMaster, Ontario, Canada)

- Furcellaria fastigiata - échantillon AP 641 (1977)

furcellaran préparé par LITEX Gelagar (Danemark)

- Chondrus crispus (1970)

carraghénane lambda préparé par Dr YAPHE par fractionnement au chlorure de potassium

V-4 Agar

- Bacto-Agar

laboratoires DIFCO, Michigan, U.S.A.

- Ahnfeltia plicata

origine: Iles-de-la-Madeleine, Canada

préparé par A. Smith (Département biologie, Université Mc Gill)

VI: CULTURES BACTERIENNES #1 ET #9. TRAVAIL  
PRELIMINAIRE DE CLASSIFICATION

Etant donné les propriétés intéressantes des souches #1 et #9, nous avons tenté un début de classification.

Nous ne reporterons ici que les résultats préliminaires. Bien qu'ils soient incomplets, nous avons pensé qu'il serait intéressant de les exposer.

Nous avons effectué les tests oxidase, catalase, fermentation du glucose et coloration de Gram sur les deux souches. Les deux bactéries ont été également photographiées au microscope électronique. Malheureusement, le pourcentage G + C n'a été déterminé que sur la souche #9 par le Dr Holder Franklin (Université de Windsor, Ontario, Canada) que nous remercions vivement. La souche #1 devrait être analysée dans l'avenir.

VI-1 COLORATION DE GRAM, TESTS OXIDASE, CATALASE ET FERMENTATION DU GLUCOSE

Tous ces tests ont été effectués suivant les méthodes répertoriées par COWAN et STEEL (1965). (Le test oxidase est celui de KOVACS - 1956). Nous avons testé deux milieux pour le test de fermentation du glucose, celui décrit par HUGH et LEIFSON (1953) dans lequel nous avons ajouté 25 g/l de chlorure de sodium et celui décrit par LEIFSON (1963) pour les bactéries d'origine océanique.

Les deux cultures bactériennes #1 et #9 donnent une coloration de Gram négative et sont oxidase et catalase positives.

Un problème subsiste pour déterminer si les souches fermentent le glucose ou non. Les souches témoins que nous avons utilisées sont Pseudomonas aeruginosa (fermentation négative, oxidation positive), Escherichia Coli (fermentation positive) et Pseudomonas atlantica - nouveau nom: Alteromonas atlantica - (fermentation négative, oxidation positive) (LEE et coll. - 1977).

Les deux premières souches (Ps. aeruginosa et E. coli) ne sont pas d'origine océanique; nous avons donc utilisé les mêmes milieux de culture sans chlorure de sodium.

Ces deux contrôles nous ont donné les résultats attendus, alors qu'Alteromonas atlantica a montré une réaction très légèrement positive: la bactérie pousse faiblement en milieu anaérobie.

Les souches #1 et #9 ont donné le même résultat que celui obtenu avec Alteromonas atlantica.

Certaines personnes travaillant avec des bactéries d'origine océanique ont admis que ce test était difficile à réaliser: la faible croissance des bactéries peut être due, non à la fermentation du glucose mais à l'utilisation d'autres composés présents dans le milieu. L'étude est donc à poursuivre.

#### VI-2 PRESENCE DE FLAGELLES: OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

Les figures 53 et 54 sont les photographies des bactéries #1 et #9 agrandies au microscope électronique. Elles ont été prises par M. GOMERSALL (Université Mc Gill). Les bactéries sont fixées au glutaraldéhyde.

Nous observons que les deux cultures #1 et #9 ont un flagelle polaire.

#### VI-3 DETERMINATION DU POURCENTAGE G + C (GUANINE-CYTOSINE) DE LA CULTURE #9

Le pourcentage G + C de la culture #9 a été déterminé par la méthode de mise au point par le Dr Holder Franklin et son équipe (CASHION et coll. - 1977). La valeur du taux G + C obtenue est de 48.5% (valeur moyenne de deux expériences: 47.1% et 49.9%).

Figures 53 et 54 - Observation au microscope  
électronique des cultures bactériennes #1 et #9.  
Agrandissement : x 15,000.



Figure 53 - culture #1



Figure 54 - culture #9

En conclusion, cette valeur du pourcentage G + C (48.5%) laisse penser que la souche #9 qui avait été appelée Pseudomonas carrageenovora par le Dr Yaphe et son équipe (WEIGL et coll. - 1966) serait plutôt un Alteromonas (G + C = 43.2% à 48%) qu'un Pseudomonas (G + C = 57.8% à 64.7%). Nous ne pouvons nous prononcer sur l'identité probable de la culture #1, étant donné que le pourcentage G + C n'a pas été déterminé.

H/ - BIBLIOGRAPHIE

- Anderson, N.S., Campbell, J.W., Harding, M.M., Rees, D.A. and Samuel, J.M.B.. 1969. "X-Ray diffraction studies of polysaccharide sulfates. Double helix models for K and i-carrageenans". J. Mol. Biol., 45: 85-89.
- Anderson, N.S., Dolan, T.C.S., Penman, A., Rees, D.A., Mueller, G.P., Stancioff, D.J. and Stanley, N.F. 1968-a. "Carrageenans. Part IV. Variations in the structure and gel properties of K-carrageenan, and the characterization of sulphate esters by infra-red spectroscopy". J. Chem. Soc. (C), 602-606.
- Anderson, N.S., Dolan, T.C.S. and REES, D.A. 1968-b. "Carrageenans. Part III. Oxydative hydrolysis of methylated K-carrageenan and evidence for a masked repeating structure". J. Chem. Soc. (C), 596-601.
- Anderson, N.S., Dolan, T.C.S. and Rees, D.A. 1973. "Carrageenans. Part VII. Polysaccharides from *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottonii*. The covalent structure of iota-carrageenan". J. Chem. Soc., Perkin 1, 2173-2176.
- Anderson, N.S. and REES, D.A. 1966. "The repeating structure of some polysaccharide sulfates from red seaweeds". Proc. 5<sup>th</sup> Int. Seaweed Symp. Ed. by E.G. Young and J.L. McLachlan. Pergamon Press. London. 243-249.
- Araki, C. and Arai, K. 1957. "Studies on the chemical constitution of agar-agar-XX-Isolation of a tetrasaccharide by enzymatic hydrolysis of agar-agar". Bull. Chem. Soc. Japan, 29: 287-293.
- Arnott, S. Scott, W.E., Rees, D.A. and McNab, C.G.A. 1974. "i-carrageenan: Molecular structure and packing of polysaccharide double helices in oriented fibres of divalent cation salts". J. Mol. Biol. 90: 253-267.
- Atkins, E.D.T. and Parker, K.D. 1969. "The helical structure of a  $\beta$ -D-1-3-xylan". J. Polymer Sci., Polymer Symposia, Part C, 28: 69-81.
- Baumann, P., Baumann, L. and Mandel, M. 1971. "Taxonomy of marine bacteria: the genus *Beneckea*". J. Bacteriol, 107: 268-294.
- Baumann, L., Baumann, P., Mandel, M. and Allen, R.D. 1972. "Taxonomy of aerobic marine Eubacteria". J. Bacteriol, 110: 402-429.
- Bergey's manual of determinative bacteriology, 8<sup>th</sup> edition. 1974. Ed. by R.E. Buchanan and N.E. Gibbons. The Williams and Wilkins Company. Baltimore.
- Bhattacharjee, S.S., Bellion, C. and Yaphe, W. 1977. "Enzymic studies on kappa and iota carrageenans". Abstract Am. Chem. Soc. Meeting, Chicago, Illinois.
- Bhattacharjee, S.S. and Yaphe, W. 1979. "Enzymic and N.M.R. Spectroscopic analysis of agar type polysaccharides". Marine algae in pharmaceutical sciences. Ed. by H.A. Hoppe, T. Levring, Y. Tanaka. Walter de Gruyter and Co., Berlin - New York.

- Bhattacharjee, S.S., Yaphe, W. and Hamer, G.K. 1978. Preliminary Communication. "<sup>13</sup>C N.M.R. spectroscopic analysis of agar, K-carrageenan and i-carrageenan". Carbohydr. Res., 60: C1-C3.
- Bhattacharjee, S.S., Yaphe, W. and Hamer, G.K. 1979. "Study of agar and carrageenan by <sup>13</sup>C Nuclear magnetic resonance spectroscopy". Proc. 9<sup>th</sup> Int. Seaweed Symp. Ed. by A. Jensen and J.R. Stein. Pub. by Science Press. 379-385.
- Black, W.A.P., Blackmore, W.R., Colquhoun, J.A. and Dewar, E.T. 1965. "The evaluation of some red marine algae as a source of carrageenan and of its K and λ components". J. Sci. Fd. Agric., 16: 573-585.
- Bold, H.C. and Wynne, M.J. 1978. "Introduction to the algae - Structure and reproduction". Prentice-hall biological sciences series. Ed. by W.D. McElroy and C.P. Swanson, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J. 07632.
- Brisou, J. 1955. "Microbiologie du milieu marin". Collection de l'institut Pasteur. Editions Médicales. Flammarion. Paris.
- Bryce, T.A., McKinnon, A.A., Morris, E.R., Rees, D.A. and Thom, D. 1974. "Chain conformations in the sol-gel transitions for polysaccharide systems, and their characterization by spectroscopic methods". Faraday Discussions of the Chem. Soc., 57: 221-229.
- Cashion, P., Holder-Franklin, M.A., McCully, J. and Franklin, M. 1977. "A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA". Anal. Biochem., 81: 461-466.
- Cerezo, A.S. 1967. "The carrageenan system of *Gigartina skottsbergii* S. et G. - Part I - Studies on a fraction of K-carrageenan". J. Chem. Soc. (C), 992-997.
- Corpe, W.A. and Winters, H. 1972. "Hydrolytic enzymes of some periphytic marine bacteria". Can. J. Microbiol., 18: 1483-1489.
- Cowan, S.T. and Steel, K.J. 1965. "Manual for the identification of medical bacteria". Cambridge University Press.
- Craigie, J.S. and Wong, K.F. 1979. "Carrageenan biosynthesis". Proc. Int. 9<sup>th</sup>. Seaweed Symp., 369-377.
- Dawes, C.J., Stanley, N.F. and Stancioff, D.J. 1977. "Seasonal and reproductive aspects of plant chemistry and i-carrageenan from Floridian *Eucheuma* (Rhodophyta-Gigartinales). Bot. Mar., XX: 137-147.
- Day, D.F. and Yaphe, W. 1975. "Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of neoagarobiose hydrolase and p. nitrophenyl-α-galactoside hydrolase". Can. J. Microbiol., 21: 1512-1518.
- Dea, I.C.M., McKinnon, A.A. and Rees, D.A. 1972. "Tertiary and quaternary structure in aqueous polysaccharide systems which model cell wall cohesion: Reversible changes in conformation and association of agarose, carrageenan and galactomannans". J. Mol. Biol., 68: 153-172.

- Dea, I.C.M. and Morrison, A. 1975. "Chemistry and interactions of seed galactomannans". *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 31: 241-312.
- Decad, G.M. and Nikaido, H. 1976. "Outer membrane of Gram negative bacteria. XII. Molecular sieving function of cellwall". *J. Bact.*, 128: 325-336.
- Dininno, V.L. and McCandless, E.L. 1979. "Immunochemistry of kappa-type carrageenans from certain red algae". *Carbohydr. Res.*, 72: 157-163.
- Doġan, T.C.S. and Rees, D.A. 1965. "The carrageenans. Part II: the positions of the glycosidic linkages and sulphate esters in  $\lambda$ -carrageenan". *J. Chem. Soc.*, pt 3, 3534-3539.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- Dygert, S. Li, L.H., Florida, D. and Thoma, J.A. 1965. "Determination of reducing sugar with improved precision". *Anal. Biochem.*, 13: 367-374.
- Gordon, E.M. and McCandless, E.L. 1973. "Ultrastructure and histochemistry of Chondrus crispus stackhouse". *Proc. Nova Scot. Inst. Sci.*, 27 supp.: 111-119.
- 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". *Phyc.*, 14: 275-281.
- Gran, H.H. 1902. "Studien über Meeresbakterien-II-über die Hydrolyse des Agar-Agars durch ein neues Enzym, die Gelase". *Bergens Museums Aarborg*, 2: 1-16.
- Groleau, D. and Yaphe, W. 1977. "Enzymatic hydrolysis of agar purification and characterization of a  $\beta$ -neogaratetraose hydrolase from Pseudomonas atlantica". *Can. J. Microbiol.*, 23: 672-679.
- Hamer, G.K., Bhattacharjee, S.S. and Yaphe, W. 1977. "Analysis of the enzymic hydrolysis products of agarose by  $^{13}\text{C}$  N.M.R. spectroscopy". *Carbohydr. Res.*, 54: C7-C10.
- Hancock, R.E.W. and Nikaido, H. 1978. "Outer membranes of Gram negative bacteria. XIX. Isolation from Pseudomonas aeruginosa PA01 and use in re-constitution and definition of the permeability barrier". *J. Bact.*, 136: 381-390.
- Hartmann, R., Bock-Hennig, S.B. and Scharz, U. 1974. "Murein hydrolases in the envelopes of Escherichia coli". *Eur. J. Biochem.*, 41: 203-208.
- Hirase, S. and Watanabe, K. 1972. "The structure of K-carrageenan from Gigartina stellata". *Bull. Chem. Soc. Japan*, 45: 1839-1843.

- 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.
- Hugh, R. and Leifson, E. 1953. "The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria". *J. Bact.*, 66: 24.
- Humm, H.J. 1946. "Marine agar digesting bacteria of the South Atlantic coast". *Duke Univ. Mar. Sta. Bull.*, 3: 43-45.
- Ingram, L.O. 1973. "Occurrence of cell lytic enzymes in blue-green bacteria". *J. Bacteriol.*, 116: 832-835.
- Ishimatsu, K., Kibesaki, Y. and Maitani, S. 1954. "Agar liquefying bacteria. XIV. Properties of reducing sugars formed from agar by agarase". *Science and Industry (Japan)*, 28: 100-103.
- Johnston, K.H. 1973. "Studies on the activity of carrageenases from Pseudomonas carrageenovora". Ph. D. Thesis. McMaster University. Hamilton. Ontario.
- Johnston, K.H. and McCandless, E.L. 1973. "Enzymic hydrolysis of the potassium chloride soluble fraction of carrageenan: properties of " $\lambda$ -carrageenases" from Pseudomonas carrageenovora". *Can. J. Microbiol.*, 19: 779-788.
- Kovács, N. 1956. "Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction". *Nature, Lond.*, 178: 703.
- Lawson, C.J. and Rees, D.A. 1970. "An enzyme for the metabolic control of polysaccharide conformation and function". *Nat.*, 227: 392-393.
- Lawson, C.J., Rees, D.A., Stancioff, D.J. and Stanley, N.F. 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 isiforme, Eucheuma uncinatum, Aghardhiella tenera, Pachymenia hymantophora, and Gloiopeltis Cervicornis". *J. Chem. Soc., Perkin 1*, 2177-2182.
- Lee, J.V., Gibson, D.M. and Shewan, J.M. 1977. "A numerical taxonomy study of some Pseudomonas like marine bacteria". *J. Gen. Microbiol.*, 98: 439-451.
- Leifson, E. 1963. "Determination of carbohydrate metabolism of marine bacteria". *J. Bacteriol.*, 85: 1183-1184.
- Leifson and Mandel, M. 1969. "Motile marine bacteria. II. DNA base composition". *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 19: 127-137.
- McCandless, E.L. 1978. "The importance of cell wall constituents in algal taxonomy". *Systematic Association Special Volume no 10. "Modern approaches to the taxonomy of red and brown algae"*. Ed. by D.E.G. Irvine and J.H. Price. Acad. Press. 63-85.

- 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.
- McKinnon, A.A., Rees, D.A. and Williamson, F.B. 1969. "Coil to double helix transition for a polysaccharide". *J. Chem. Soc., (D), Chem. commun.*, 701-702.
- McLean, M.W. and Williamson, F.B. 1979. "K-carrageenase from Pseudomonas carrageenovora". *Eur. J. Biochem.*, 93: 553-558.
- Neish, A.C., Shacklock, P.F., Fox, C.H. and Simpson, F.J. 1977. "The cultivation of Chondrus crispus. Factors affecting growth under greenhouse conditions". *Can. J. Bot.*, 55: 2263-2271.
- O'Neil, A.N. 1955. "3-6-Anhydro galactose as a constituent of K-carrageenan". *J. Am. Chem. Soc.*, 77: 2837-2839, 6324-6326.
- Painter, T.J. 1960. "The polysaccharides of Furcellaria fastigiata-1-Isolation and partial mercaptolysis of a gel fraction". *Can. J. Chem.*, 38: 112-118.
- Painter, T.J. 1966. "The location of the sulphate half-ester groups in Furcellaran and K-carrageenan". *Proc. 5<sup>th</sup> Intl. Seaweed Symp.* Ed. by E.G. Young and J.L. McLachlan. Pergamon Press. London. 305-315.
- Pataki, G. 1968. "Techniques of thin layer chromatography in amino acid and peptide chemistry". Revised ed. Ann Arbor Science publishers Inc. Michigan. p. 49.
- Penman, A. and Rees, D. 1973-a. "Carrageenans. Part IX. Methylation analysis of galactan sulphates from Furcellaria fastigiata, Gigartina canaliculata, Gigartina chamissoi, Gigartina atropurpurea, Ahnfeltia durvillaei, Gymnogongrus furcellatus, Eucheuma isiforme, Eucheuma uncinatum, Aghardhiella tenera, Pachymenia hymantophora, and Gloiopeltis cervicornis. Structure of  $\epsilon$ -carrageenan". *J. Chem. Soc., Perkin 1*, 2182-2187.
- Penman, A. and Rees, D.A. 1973-b. "Carrageenans. Part X. Synthesis of 3-6-di-O-methyl-D-galactose, a new sugar from the methylarion analysis of polysaccharides related to  $\xi$  carrageenan". *J. Chem. Soc., Perkin 1*, 2188-2191.
- Penman, A. and Rees, D.A. 1973-c. "Carrageenans. Part XI. Mild oxidative hydrolysis of K and i-carrageenans and the characterisation of oligosaccharide sulphates". *J. Chem. Soc., Perkin 1*, 2191-2196.
- Pernas, A.J., Smidrød, O., Larsen, B. and Haug, A. 1967. "Chemical heterogeneity of carrageenans as shown by fractional precipitation with potassium chloride". *Acta Chem. Scand.*, 21: 98-110.
- Pfister, R.M. and Burkholder, P.R. 1965. "Numerical taxonomy of some bacteria isolated from antartic and tropical sea-waters". *J. Bacteriol.*, 90: 863-872.
- Rees, D.A. 1962. "Some properties of the cell wall mucilage of marine algae". *Brit. Phycol. Bull.*, 2: 180-181.

- Rees, D.A. 1969. "Polysaccharide gels and networks. Carrageenans and other natural sulphates". *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 24: 267.
- Rees, D.A. and Conway, E. 1962. "The structure and biosynthesis of porphyran: a comparison of some samples". *Biochem. J.*, 84: 411-416.
- 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., Part C*, no 28, 261-276.
- Santos, G.A. and Doty, M.S. 1975. "I.R. Studies on carrageenan of Ahnfeltia concinna, a marine red alga". *J. Pharm. Sci.*, 64: 1704-1706.
- Shashkov, A.S., Usov, A.I. and Yarotskii, S.V. 1978. "Polysaccharides of algae. XXIV. The application of  $^{13}\text{C}$  N.M.R. spectroscopy to the analysis of the structures of polysaccharides of the agar groups". *Bioorg. Khim.*, 4: 74-81.
- Smith, D.B. and Cook, W.H. 1953. "Fractionation of carrageenin". *Arch. Biochem. Biophys.*, 45: 232-233.
- Somogyi, M. 1952. "Notes on sugar determination". *J. Biol. Chem.* 195: 19-23.
- Stancioff, D.J. 1965. "Selective extraction of hydrocolloid fractions from sea plants". *U.S.P.* 3: 176,003.
- Stancioff, D.J. and Stanley, N.F. 1969. "Infrared and chemical studies on algal polysaccharides". *Proc. 6<sup>th</sup> Intl. Seaweed Symposium, Santiago de Compostela*. Ed. by R. Margalef. 595-609.
- Stoloff, L. and Silva, P. 1957. "An attempt to determine possible taxonomic significance of the properties of water extractable polysaccharides in red algae". *Econ. Botany*, 11: 327-330.
- Usov, A.I., Yarotskii, S.V., Shashkov, A.S. and Tishenko, V.P. 1978-a. "Polysaccharides of algae. XXII. Polysaccharide composition of Rhodymenia stenogona PEREST, and the application of  $^{13}\text{C}$  N.M.R. spectroscopy to the determination of xylan structures". *Bioorg. Khim.*, 4: 57-65.
- Usov, A.I., Yarotskii, S.V. and Esteves, M.L. 1978-b. "Polysaccharides of algae. XXIII. Polysaccharides of the red alga Banqia fuscopurpurea". *Bioorg. Khim.* 4: 66-73.
- Weigl, J., Turvey, J.R. and Yaphe, W. 1966-a. "The enzymic hydrolysis of kappa-carrageenan with K-carrageenase from Pseudomonas carrageenovora". *Proc. 5<sup>th</sup> Intl. Seaweed Symp.* Ed. by E.G. Young and J.L. McLachlan. Pergamon Press, 329-332.
- Weigl, J. and Yaphe, W. 1966-b. "The enzymic hydrolysis of carrageenan by Pseudomonas carrageenovora: purification of a K-carrageenase". *Can. J. Microbiol.*, 12: 939-947.

- Weigl, J. and Yaphe, W. 1966-c. "Glycosulfatase of Pseudomonas carrageenovora: desulfatation of disaccharide from K-carrageenan". Can. J. Microbiol., 12: 874, 876.
- Yaphe, W. 1957. "The use of agarase from Pseudomonas atlantica in the identification of agar in marine algae (Rhodophyceae)". Can. J. Microbiol., 3: 987-993.
- Yaphe, W. 1959. "The determination of K-carrageenin as a factor in the classification of the Rhodophyceae". Can. J. Botany, 37: 751-757.
- Yaphe, W. 1966. "The purification and properties of an agarase from a marine bacterium Pseudomonas atlantica". Proc. 5<sup>th</sup> Intl. Seaweed Symp. Ed. by. E.G. Young and J.L. McLachlan. Pergamon Press, 333.
- Yaphe, W. and Baxter, B. 1955. "The enzymic hydrolysis of carrageenin". Appl. Microbiol., 3: 380-383.
- Yarotskii, S.V., Shashkov, A.S. and Usov, A.I. 1977. "Analysis of <sup>13</sup>C N.M.R. spectra of some red seaweed galactans". Soviet J. Bioorg. Chem., 3: 1135-1137.
- Young, K., Hong, K.C., Duckworth, M. and Yaphe, W. 1972. "Enzymic hydrolysis of agar and properties of bacterial agarases". Proc. 7<sup>th</sup> Intl. Seaweed Symp., 469-472.