

UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA MATIÈRE, DE L'INFORMATION ET DU VIVANT

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Chimie

**Etude structurale des polysaccharides pariétaux de
l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales)**

Présentée par

Sandrine GARON-LARDIERE

Soutenue le 24 février 2004

Devant le jury composé de

M. FERRIERES Vincent, Docteur, ENS Chimie Rennes	Rapporteur
M. POTIN Philippe, Chargé de Recherches, CNRS Roscoff	Rapporteur
Mme MOREAU Nicole, Professeur, ENS Chimie Paris	Examineur
M. DESLANDES Eric, Professeur, Université de Brest	Examineur
M. CORBEL Bernard, Professeur, Université de Brest	Examineur
M. GUEZENNEC Jean, Docteur, IFREMER BREST	Directeur de thèse
M. CARLSON RUSS W., Professeur, CCRC (Athens, Georgia, USA)	Invité
M. JY MOIGNE, SA ALGUES et MER, Ouessant	Invité

Remerciements

Cette étude a été réalisée au laboratoire de Biotechnologie et Molécules marines de l'IFREMER de Brest, en collaboration avec la Société Anonyme Algues et Mer (Ouessant) qui a assuré en partenariat avec l'ANRT (Association Nationale de la Recherche Technique) le financement de mon allocation de recherche.

Je tiens à remercier M. J. Y. Moigne, directeur de la Société Algues et Mer, de m'avoir offert la possibilité d'effectuer cette thèse qui m'a permis de développer une expérience enrichissante.

Je souhaite également remercier M. J. Guézennec, responsable du laboratoire de Biotechnologie et Molécules marines, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour son encadrement et pour l'opportunité offerte de partir six mois aux Etats-Unis dans un laboratoire de grande renommée.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Claire Boisset pour son inestimable soutien scientifique et moral. Je la remercie également pour la relecture de ce mémoire, ses judicieux conseils et son amitié.

Mes remerciements s'adressent également à Mmes Corinne Siquin et Jacqueline Ratiskol pour leur support technique, leur très grande disponibilité et leur gentillesse.

I wish to express my sincere thanks to Dr. Peter Albersheim and all the members of the Complex Carbohydrate Research Center (Athens, Georgia) for their reception and their kindness, and especially to Dr. Russ W. Carlson for his great availability, his expertise and his continuous supports during six months.

I also wish to thank for the reading and the correction of the english part of this Ph 'D report Mrs Carol Mancuso Nichols (Universirty of Tasmania). I would also like to thank her for the lovely moments shared together.

Je remercie également les Docteurs Sylvia Collic-Jouault et Christine Delbarre-Ladrat pour la relecture de la synthèse bibliographique ainsi que leurs précieux conseils.

J'adresse également mes remerciements au Dr. Roger Pichon et Mme Nelly Kervarec du laboratoire de RMN de l'Université de Bretagne Occidentale de Brest pour leur accueil chaleureux, leur grande patience ainsi que leur gentillesse et leur bonne humeur.

Je ne saurais oublier tous les membres de l'équipe BMM, en particulier Gérard Raguénés pour son soutien complice, Annie Chauchot, Anthony Courtois, Benoît Quéguineur et Xavier Moppert pour leur présence amicale, leur enthousiasme permanent et leur gentillesse.

Je n'oublie pas Caroline et la longue amitié sans faille qui nous unit, Frédéric pour son soutien, ainsi que Delphine et Sylvain pour leur amitié profonde et sincère.

Enfin, je remercie ma famille pour leur soutien et leur affection tout au long de ces années, et en particulier ma Grand-Mère et Yannic pour leurs encouragements permanents et leur présence dans ma vie.

ABSTRACT

Asparagopsis armata is a red seaweed of great commercial value. It is cultivated mainly on Ouessant island as a raw material for the industrial production of a cellular extract, which demonstrate antibacterial and antifungal activities. The structure of the water-soluble cell-wall polysaccharides from this seaweed was realized with the aim of developing the by-product of manufacture of this extract, rich in cellular walls. Structural elucidation was achieved by the combination of two strategies.

First, a study was performed on the crude polysaccharides extract of this seaweed. It required the development of specific analytical techniques and showed that these polysaccharides were mainly composed of galactose, belonging mainly to the D-series, as well as of xylose and sulfate ester substituents. The methylation analysis applied to these polysaccharides revealed a linear backbone built up of alternating 3-linked- β -D-galactopyranosyl and 4-linked- α -D/L-galactopyranosyl residues. This step also showed that various hydroxyl groups might also carry substituents such as sulfate ester or sugar side-chains. Because of the complicated structural feature of these polysaccharides, numerous uncertainties were pointed out and could not be resolved. Therefore, purification analyses were applied to these crude polysaccharides extract.

Depolymerization of the polysaccharide using a radical process produced a low molecular weight fraction, where the sulphur content and the main structural features were the same as the native polysaccharide. This step did not allow the resolution of the ambiguities raised previously. The second method of purification, based on the heterogeneous sulfate substitution pattern on these polysaccharides previously separated by their molecular weight, allowed us to define the structure. First, the exact sulfate substitution pattern was determined by a specific methylation analysis. Then, NMR spectroscopy was used to show the presence of 4-linked residues belonging to the both D- and L-series. This demonstrated that these polysaccharides are complex hybrid galactans containing both an agar and a carrageenan-like structure. In addition, presence of substituents, which are pyruvate groups or methyl groups was also proven through this technique. The branched structure of these polysaccharides was also confirmed by the presence of side-chains sugar, such as xylose or galactose, which carry sulfate ester groups.

In this study, cell-wall polysaccharides from the red seaweed *Asparagopsis armata* were identified as complex DL-galactan hybrids with mixed carrageenan (belonging on one hand to the xi- and pi-family, and on the other hand to the gamma- and psi-family sulfated in an heterogeneous way), and agar backbone structure. The potential applications for the native and the low molecular weight fraction were also estimated in the pharmaceutical and cosmetic fields.

Key-words : *Asparagopsis armata*, red seaweeds, polysaccharides, structure, D/L-galactan hybrids, depolymerization, methylation, NMR spectroscopy.

SOMMAIRE

ABRÉVIATIONS.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	2
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I - LES ALGUES ET LEURS POLYSACCHARIDES PARIÉTAUX.....	4
1 - Généralités sur les algues.....	4
1.1 - Classification des algues.....	4
1.1.1 -Les algues vertes (Chlorophycées).....	5
1.1.2 -Les algues brunes (Phéophycées).....	5
1.1.3 -Les algues rouges (Rhodophycées).....	5
1.2 - Reproduction des algues.....	6
1.3 - Les différents types de polysaccharides des algues.....	6
1.4 - Rôle économique des algues.....	7
2 - Les polysaccharides pariétaux des algues.....	8
2.1 - La paroi des algues.....	8
2.2 - Les polysaccharides.....	9
2.2.1 - Généralités sur les polysaccharides.....	9
2.2.2 — Composition chimique et structure des polysaccharides d'algues.....	10
2.2.3 - Classification de ces polysaccharides d'algues.....	11
2.3 - Les polysaccharides squelettiques, ou fibrillaires.....	13
2.4 - Les polysaccharides matriciels.....	14
2.4.1 — Composition chimique et structure.....	14
2.4.1.1 - Les polysaccharides matriciels d'algues vertes : les Chlorophycées..	15
2.4.1.2 - Les polysaccharides matriciels d'algues brunes : les Phéophycées...	15
2.4.1.3 - Les polysaccharides matriciels d'algues rouges : les Rhodophycées..	17
2.4.1.3.1-Biosynthèse.....	18
2.4.1.3.2 - Les différents polysaccharides matriciels d'algue rouge.....	20

II - Applications des polysaccharides pariétaux des algues.....	31
1 - Applications des polysaccharides matriciels d'algues vertes	32
2 - Applications des polysaccharides matriciels d'algues brunes.....	32
2.1 - Fucanes.....	32
2.2 - Alginates.....	32
3 - Applications des polysaccharides matriciels d'algues rouges.....	33
3.1 - Propriétés texturantes des polysaccharides matriciels d'algues rouges.....	34
3.1.1 -Introduction.....	34
3.1.2 - Cas des carraghénanes.....	35
3.1.2.1 - Propriétés rhéologiques.....	36
3.1.2.2-Propriétés spécifiques de certains carraghénanes.....	38
3.1.2.3 - Applications en industrie agro-alimentaire.....	40
3.1.2.4 - Applications en industrie pharmaceutique.....	41
3.1.2.5 - Applications en industrie cosmétique.....	41
3.1.2.6 - Autres applications.....	42
3.1.3 - Cas des agars.....	43
3.1.3.1- Propriétés rhéologiques.....	43
3.1.3.2 - Applications en industrie agro-alimentaire.....	44
3.1.3.3 - Applications en industrie pharmaceutique.....	44
3.1.3.4 - Applications en bactériologie.....	45
3.1.3.5 - Autres applications.....	45
3.2 - Applications thérapeutiques en tant que principes actifs.....	45
3.2.1 - Les carraghénanes.....	46
3.2.2 -Les agars.....	47
3.3 - Autres applications.....	47
 III- CAS PARTICULIER DE L'ALGUE ROUGE ASPARAGOPSIS ARMA TA_____	48
1 -Taxonomie.....	48
2-Biologie.....	49
2.1-Ecologie.....	49
2.2 - Cycle de reproduction.....	49
2.3 - Cytologie.....	50
3 - Applications d'<i>Asparagopsis armata</i>.....	51

3.1 - Les ioduques.....	51
3.2- Les polysaccharides pariétaux d' <i>Asparagopsis armata</i>	52
CHAPITRE 1 : ETUDE STRUCTURALE DES POLYSACCHARIDES NATIFS.	54
I-INTRODUCTION.....	54
II - MATERIEL ET METHODES.....	56
1 - Obtention des polysaccharides.....	56
1.1- Culture de l'algue <i>Asparagopsis armata</i>	56
1.2 - Extraction des polysaccharides.....	56
1.2.1 - Extraction préliminaire.....	56
1.2.2 -Extraction des polysaccharides.....	57
1.2.3 -Purification des polysaccharides.....	58
2- Analyse chimique des polysaccharides. Dosages et identification des résidus glycosidiques.....	59
2.1 - Composition totale.....	59
2.1.1 - Dosage des acides uroniques.....	59
2.1.2 -Dosage des oses neutres.....	60
2.1.3 -Dosage des protéines.....	62
2.1.4 - Dosage des sulfates par turbidimétrie.....	63
2.1.5 - Dosage des 3,6-anhydrogalactoses.....	64
2.1.6 —Dosage des groupements pyruvate.....	65
2.2 - Identification et dosage des résidus glycosidiques.....	67
2.2.1 -Analyse des résidus glycosidiques sous forme de dérivés triméthylsilylés. 67	
2.2.2 - Analyses des oses neutres sous forme d'acétates d'alditols_____69	
2.2.3 - Détermination de la configuration absolue des résidus glycosidiques.71	
2.2.4 — Dosage enzymatique du D-galactose.....73	
2.2.5 - Détermination du taux de galactose lié en 4, sulfaté en 6.....74	
3- Détermination de la nature des liaisons glycosidiques.....	77
3.1 - Méthylation des polysaccharides.....77	
3.2- Détermination de la position des groupements sulfate.....84	
4-Détermination de la séquence glycosidique.....	86
4.1 - Dégradation de Smith.....86	

4.2 - Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire.....	88
4.2.1 - Analyse par RMN.....	88
4.2.2 - Préparation de l'échantillon.....	89
4.2.3 - Appareillage et séquence.....	89
5 - Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier.....	90
6 - Détermination de la masse molaire moyenne du polysaccharide natif.....	90
III - RESULTATS ET DISCUSSION.....	91
1 - Production de polysaccharides.....	91
2 - Caractérisation chimique des polysaccharides.....	92
2.1 - Composition globale.....	92
2.2 - Identification et dosage des monosaccharides.....	93
2.2.1 - Analyse par chromatographie en phase gazeuse.....	93
2.2.2 — Détermination de la configuration absolue des résidus glycosidiques...	96
2.2.3 - Détermination du taux de galactose lié en 4, sulfaté en 6.....	97
3- Détermination de la nature des liaisons glycosidiques.....	100
3.1- Méthylation des polysaccharides.....	100
4-Détermination de la séquence osidique.....	106
4.1 - Dégradation de Smith.....	106
4.2 -Résonance Magnétique Nucléaire.....	107
5 - Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier.....	108
6 - Comparaison avec les travaux réalisés par Haslin <i>et al</i> (2000).....	110
IV - Conclusion.....	112
Chapitre 2 - Partie 1 : Obtention de polysaccharides de faibles masses molaires par dépolymérisation radicalaire.....	115
I - INTRODUCTION.....	115
II - MATERIEL ET METHODES.....	116
1 - Obtention d'oligosaccharides de faibles masses par dépolymérisation radicalaire.....	116

1.1 - Formation des oligosaccharides.....	116
1.2 - Estimation de la masse molaire des oligosaccharides formés par HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography).....	118
1.3 - Profil des fractions oligosaccharidiques obtenues.....	119
2-Désulfatation des oligosaccharides.....	120
2.1-Solvolyse.....	120
2.2- Nouvelle méthode de désulfatation des oligosaccharides.....	121
3 - Purification des oligosaccharides désulfatés.....	122
3.1- Chromatographie échangeuse d'ions.....	122
3.2- Chromatographie de filtration sur gel.....	123
4-Perméthylation.....	124
5 - Résonance Magnétique Nucléaire.....	125
5.1- Choix des échantillons à analyser.....	125
5.2- Préparation de l'échantillon.....	126
5.3 - Appareillage et séquence.....	126
6 - Détermination des masses réelles des fractions dépolymérisées.....	126
6.1 - MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption - Time Of Flight).....	126
6.1.1 -Principe.....	127
6.1.2-Protocole.....	127
6.2 - Electrospray.....	127
6.2.1 -Principe.....	127
6.2.2-Protocole.....	128
6.3-HPSEC.....	128
III - RESULTATS ET DISCUSSION.....	130
1 - Obtention d'oligosaccharides de faibles masses par dépolymérisation radicalaire.....	131
1.1 - Formation des oligosaccharides.....	131
1.2- Pureté des oligosaccharides obtenus.....	133
1.3- Composition chimique des oligosaccharides DR 4 obtenus.....	133
1.3.1— Composition globale des oligosaccharides DR 4.....	134
1.3.2 — Dosage des monosaccharides présents dans les oligosaccharides DR 4...	135
2- Désulfatation des oligosaccharides.....	136
2.1-Solvolyse.....	136

2.2- Désulfatation des oligosaccharides selon Miller et Blunt (Miller & Blunt, 1998).....	137
3- Purification des oligosaccharides DR 4 désulfatés.....	138
3.1- Oligosaccharides DR 4 désulfatés par solvolyse.....	139
3.1.1 - <i>Chromatographie échangeuse d'ions DEAE</i>	139
3.1.2- <i>Chromatographie de filtration sur gel</i>	139
3.2 - Oligosaccharides DR 4 désulfatés selon Miller et Blunt (Miller & Blunt, 1998).....	140
3.2.1 - <i>Chromatographie échangeuse d'ions DEAE</i>	140
3.2.2 - <i>Chromatographie de filtration sur gel</i>	141
4 - Perméthylation.....	141
4.1- Oligosaccharides DR 4 désulfatés par solvolyse.....	142
4.2- Oligosaccharides DR 4 désulfatés selon Miller et Blunt (Miller & Blunt, 1998)	143
5- Résonance Magnétique Nucléaire.....	144
5.1- Choix de l'échantillon.....	144
5.2- Analyse par RMN de la fraction oligosaccharidique DR 4 désulfatée par solvolyse.....	145
5.2.1 - <i>Configuration anomérique des liaisons glycosidiques</i>	146
5.2.2- <i>Enchaînement des résidus glycosidiques</i>	148
6- Détermination des masses réelles des fractions dépolymérisées.....	150
6.1-Maldi-TOF.....	150
6.2- Electrospray.....	150
6.3-HPSEC.....	151
IV - CONCLUSION.....	152
 CHAPITRE 2 - PARTIE 2 : PURIFICATION DES POLYSACCHARIDES NATIFS PAR CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'ANIONS.....	
154	
I - INTRODUCTION.....	154
II - MATERIEL ET METHODES.....	155
1 - Obtention de fractions purifiées par chromatographie préparative d'échange d'ions DEAE à partir des polysaccharides bruts d'<i>Asparagopsis armata</i>.....	155
1.1- Séparation préliminaire en masse.....	155

1.2 - Séparation des fractions isolées par chromatographie échangeuse d'ions	156
1.3-Détermination de la masse des fractions sélectionnées	156
14— Détermination du taux de sulfate des différentes fractions	158
2-Perméthylation des différentes fractions sélectionnées.....	159
2.1- Désulfatation des fractions	160
2.2- Perméthylation des fractions sélectionnées	160
3- Résonance Magnétique Nucléaire.....	167
3.1- Choix des échantillons	167
3.2- Préparation des échantillons	167
3.3 - Appareillage et séquence	167
 III - RESULTATS ET DISCUSSION.....	 168
1 - Obtention de fractions purifiées par chromatographie préparative d'échange d'ions DEAE à partir des polysaccharides bruts d'<i>Asparagopsis armata</i>.....	168
1.1- Séparation préliminaire en masse	168
1.2 - Séparation des fractions isolées par chromatographie échangeuse d'ions	168
1.2.1- <i>Chromatographie préparative d'échange d'ions.....</i>	<i>168</i>
1.2.2- <i>F > 100.....</i>	<i>169</i>
1.2.3- <i>F 10-100.....</i>	<i>170</i>
1.3- Détermination de la masse des fractions sélectionnées	171
1.3.1- <i>F > 100.....</i>	<i>171</i>
1.3.2 - <i>Fractions comprises entre 10 et 100KDa.....</i>	<i>171</i>
2 - Perméthylation des différentes fractions retenues.....	172
2.1 - F > 100.....	173
2.2- F 10-100.....	181
3 - Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) des différentes fractions.....	186
3.1 - F > 100.....	187
3.1.1 - <i>Configuration des liaisons glycosidiques.....</i>	<i>187</i>
3.1.2 - <i>Attribution des signaux.....</i>	<i>188</i>
3.1.3 - <i>Enchaînement des résidus osidiques.....</i>	<i>190</i>
3.2- F 10-100.....	197
3.2.1 - <i>Configuration des liaisons glycosidiques.....</i>	<i>197</i>
3.2.2 - <i>Attribution des signaux.....</i>	<i>198</i>
3.2.3 — <i>Enchaînement des résidus osidiques.....</i>	<i>199</i>

IV - CONCLUSION.....	201
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	205
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	211

Abréviations

% p/p :	Pourcentage poids/poids
% p/v :	Pourcentage poids/volume
Gal	Galactose
Glc	Glucose
Xyl	Xylose
Dp:	Degré de polymérisation
CG:	Chromatographie en phase gazeuse
CG/SM :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse
PMMA:	Acétates d'alditols partiellement méthylés (Partially methylated alditol acetate)
RMN:	Résonance Magnétique Nucléaire
COSY:	Correlation Observed Spectroscopy
TOCSY :	Total Observed Correlation Spectroscopy
HMQC:	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC:	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC:	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
NOESY :	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
ROESY :	Roasting-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
FTIR:	Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier
HPSEC :	Chromatographie d'exclusion stérique haute performance (High Performance Size Exclusion Chromatography)
Mw :	Masse molaire moyenne en poids
Mn:	Masse molaire moyenne en nombre
Mp:	Masse molaire au pic
Ip:	Indice de polydispersité = Mw/Mn
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption - Time Of Flight
ESI:	ElectroSpray Ionization

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La Société Algues et Mer cultive au large de l'île d'Ouessant l'algue rouge *Asparagopsis armata* dans le but d'en commercialiser un extrait cellulaire, l'« Ysaline », aux propriétés antibactériennes et antifongiques.

La réalisation de cet extrait engendre un co-produit de fabrication, important en biomasse, et constitué notamment des parois cellulaires de cette algue.

Les algues rouges, ou Rhodophycées, sont connues et exploitées pour leurs composés polysaccharidiques, principaux constituants matriciels de leur paroi cellulaire, dont les propriétés texturantes leur confèrent des applications industrielles importantes et multiples. Les applications de ces polysaccharides pariétaux, qui sont principalement des agars et des carraghénanes, étaient traditionnellement limités à l'industrie agro-alimentaire. Elles se sont étendues depuis quelques années aux domaines de la cosmétologie, de la pharmacologie et plus généralement, des biotechnologies.

Des études réalisées il y a une vingtaine d'années sur les polysaccharides pariétaux matriciels d'*Asparagopsis armata* avaient démontré que ces derniers, galactanes sulfatés hydrosolubles, présentaient des propriétés anticoagulantes ainsi qu'une activité significative sur la stimulation lymphocytaire. Des études plus récentes ont également démontré pour ces derniers des activités antivirales prometteuses contre le virus de *VHerpès* ou encore le VIH. De telles études laissent donc entrevoir de réelles potentialités pour ces polysaccharides à l'état natif ou sous forme modifiée.

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre la Société Anonyme Algues et Mer (Ouessant), et le laboratoire de Biotechnologie et Molécules Marines de l'IFREMER (Institut Français pour la Recherche et l'Exploitation de la MER) de Brest. Elle a pour objectif la valorisation des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata*, et en particulier, leur caractérisation structurale dans le but d'établir une relation entre la structure et les fonctions potentielles de ces polysaccharides.

Ce travail est basé sur une synthèse bibliographique regroupant les connaissances sur les polysaccharides pariétaux des algues et leurs applications, ainsi qu'une présentation de l'algue rouge *Asparagopsis armata*.

L'étude présentée dans ce mémoire se divise en deux parties. Tout d'abord, nous avons cherché à caractériser la structure des polysaccharides natifs de l'algue *Asparagopsis armata*, ce qui a nécessité la mise en place de techniques analytiques spécifiques. Puis, les informations structurales obtenues pour ces polysaccharides bruts soulevant de nombreuses incertitudes et révélant le caractère hétérogène et complexe de ces derniers, une purification ayant pour objectif l'obtention de fractions plus simples à étudier a été réalisée.

Deux types de purifications ont été envisagés. La première a consisté en la dépolymérisation des polysaccharides natifs. Les oligosaccharides de faibles masses molaires obtenus ont alors été soumis, après purification, à une caractérisation structurale. Enfin, la seconde voie de purification exploitée a été basée sur une hétérogénéité de structure révélée au cours des analyses préliminaires, à savoir une répartition irrégulière des groupements sulfate le long de la chaîne principale. Elle a donc consisté à séparer les chaînes polysaccharidiques en fonction du nombre et de la distribution des groupements sulfate qu'elles comportent avant de chercher à élucider leur structure.

Les résultats de ces différentes approches ont été rassemblés pour proposer un modèle de structures pour les polysaccharides pariétaux d'*Asparagopsis armata*. L'évaluation des applications potentielles des polysaccharides de cette algue dans divers domaines est également abordée.

Synthèse bibliographique

I - LES ALGUES ET LEURS POLYSACCHARIDES PARIÉTAUX

1 - Généralités sur les algues

Les algues sont des organismes photosynthétiques que l'on trouve dans les milieux aquatiques d'eau douce ou marin, ainsi que dans de nombreux milieux terrestres. Elles comprennent 20 000 à 30 000 espèces dans le monde, soit 18% du règne végétal.

1.1 - Classification des algues

Leur appareil végétatif ou thalle est extrêmement variable, aussi bien en forme qu'en dimension. Il peut ainsi être formé d'une seule cellule allant de quelques dizaines de microns à une dizaine de centimètres ; il peut au contraire comporter de très nombreuses cellules et atteindre plusieurs dizaines de mètres de longueur. Les algues se distinguent donc des autres végétaux par leur thalle, appareil végétatif uni- ou pluricellulaire, dépourvu de racines, de tiges et de feuilles.

Les cellules des algues possèdent les mêmes éléments de structure que celles des plantes supérieures. Elles ont une paroi cellulaire partiellement cellulosique, des petits noyaux et des plastes pigmentés ou chromatophores (comportant de la chlorophylle souvent masquée par des pigments surnuméraires qui donnent aux thalles des couleurs rouge, brune, verte ou bleue).

C'est ainsi qu'un des critères de classification des algues est leur pigmentation, qui permet de définir plusieurs grands groupes : les algues rouges (6 000 espèces), les algues brunes (2 000 espèces), les algues vertes (1 200 espèces) et les algues bleues (2 000 espèces). Ces dernières sont des organismes unicellulaires dépourvus de noyau différencié : il s'agit de procaryotes, également nommées cyanobactéries. Toutes les autres algues, uni- ou pluricellulaires, ont des

cellules dont le noyau est différencié (noyau individualisé entouré d'une membrane). Ce sont des eucaryotes.

1.1.1 - Les algues vertes (Chlorophycées)

Elles sont de formes très variées, uni- ou pluricellulaires. Leurs plastes sont colorés en vert par les chlorophylles a et b, auxquelles sont associés des carotènes et des xanthophylles. La photosynthèse permet la formation d'amidon, comme pour les plantes supérieures. La plupart des algues vertes vivent en eau douce ou en milieux marins, mais certaines espèces peuvent également se développer sur terre.

Elles jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux, favorisant ainsi la vie animale.

1.1.2 - Les algues brunes (Phéophycées)

La couleur brune de ces algues résulte de la dominance du pigment xanthophylle, la fucoxanthine, qui masque les autres pigments (chlorophylle a et c, ainsi que le bêta-carotène). Toutes possèdent une structure pluricellulaire, mais leurs dimensions varient depuis les éléments microscopiques jusqu'aux très grands spécimens.

La grande majorité des algues brunes sont marines.

1.1.3 - Les algues rouges (Rhodophycées)

Les rhodophytes ou algues rouges forment un groupe très diversifié. Ces algues doivent leur couleur à la présence de plastes roses dans lesquels un pigment rouge, la phycoérythrine, est associé à plusieurs autres pigments dont les chlorophylles.

La plupart de ces algues rouges sont pluricellulaires et marines, mais il existe quelques formes unicellulaires et quelques unes vivent également en eau douce.

Les algues rouges sont divisées en deux groupes : celui des Bangiophycées (qualifiées de primitives) et celui des Floridéophycées (plus complexes). Elles se distinguent généralement par leur cycle de reproduction particulièrement complexe.

1.2 - Reproduction des algues

Dans de très nombreux cas, la reproduction des algues s'effectue par multiplication végétative. Il s'agit d'une multiplication asexuée qui consiste soit en la division d'une cellule isolée (cas des algues bleues), soit en une fragmentation de thalle aboutissant à la formation de plusieurs organismes identiques. Elle est souvent réalisée par la formation de cellules spécialisées : les spores.

Les algues eucaryotes réalisent en plus une reproduction sexuée au cours de laquelle l'union de deux cellules reproductrices, ou gamètes, produit un œuf, ou zygote.

La reproduction des algues se déroule ainsi selon une alternance de phases de reproduction asexuée assurée par les thalles (sporophytes), et de phases de reproduction sexuée, assurée par des thalles producteurs de gamètes (gamétophytes).

Aux cycles d'alternance de génération plus ou moins variés caractérisant leur reproduction, se superpose également une alternance de phases (de n à $2n$ chromosomes).

1.3 - Les différents types de polysaccharides des algues

Les polysaccharides algaux forment une vaste famille au sein de laquelle on distingue :

- **Les polysaccharides de réserve (stockés à l'intérieur de la cellule)**

Chez les algues brunes, il s'agit de la laminarine (polymère du 1,3- β -glucopyranose), chez les algues rouges, de l'amidon floridéen (polymère du 1,4- α -glucose), et chez les algues vertes, du glucane (polymère du 1,4- β -glucose).

- **Les polysaccharides de faible poids moléculaire**

Solubles dans le milieu, ils passent au travers de la membrane pour réguler la pression osmotique.

Chez les algues rouges, on distingue plusieurs espèces dont deux isomères : le floridoside et l'isofloridoside participant à la régulation osmotique.

Chez les algues brunes, plusieurs espèces sont également présentes. Est également présent un type particulier de saccharide sous forme de polyols, le D-mannitol, qui représente jusqu'à 25% du poids sec de l'algue.

Enfin, les algues vertes comportent des traces de monosaccharides tels que le fructose ou le saccharose.

- **Les polysaccharides de structure**, c'est à dire ceux de la paroi.

Appelés polysaccharides pariétaux, ils comprennent :

- une phase **squelettique**, uniquement de structure et constituée de polysaccharides insolubles (cellulose, mannanes, xylanes)
- une phase **matricielle** contenant des polysaccharides de structure plus hydrosolubles noyés dans la matrice (ou zone amorphe), dans laquelle ont lieu les échanges cationiques. La nature des polysaccharides matriciels est spécifique à chaque type d'algue, et sera développée plus tard.

1.4 - Rôle économique des algues

On estime que sur notre planète, l'activité photosynthétique est à plus de 90% le fait des algues marines, constituant ainsi notre principale source d'oxygène.

De nombreuses populations des régions côtières utilisent quotidiennement les algues marines pour leur alimentation. La propriété physiologique des algues qui consiste à concentrer dans leurs cellules des oligo-éléments contenus dans l'eau est désormais utilisée à des fins diététiques ou en thalassothérapie.

Mais l'exploitation industrielle des algues est essentiellement liée à l'extraction de leurs phycocolloïdes, polysaccharides constituant la paroi des cellules, aux propriétés texturantes. On distingue ainsi les agars et les carraghénanes, extraits des algues rouges, des alginates, extraits des algues brunes.

Les principales applications de ces phycocolloïdes sont dans le domaine de l'agro-alimentaire, mais également dans des domaines variés tels que celui de la cosmétologie ou encore de l'industrie des peintures.

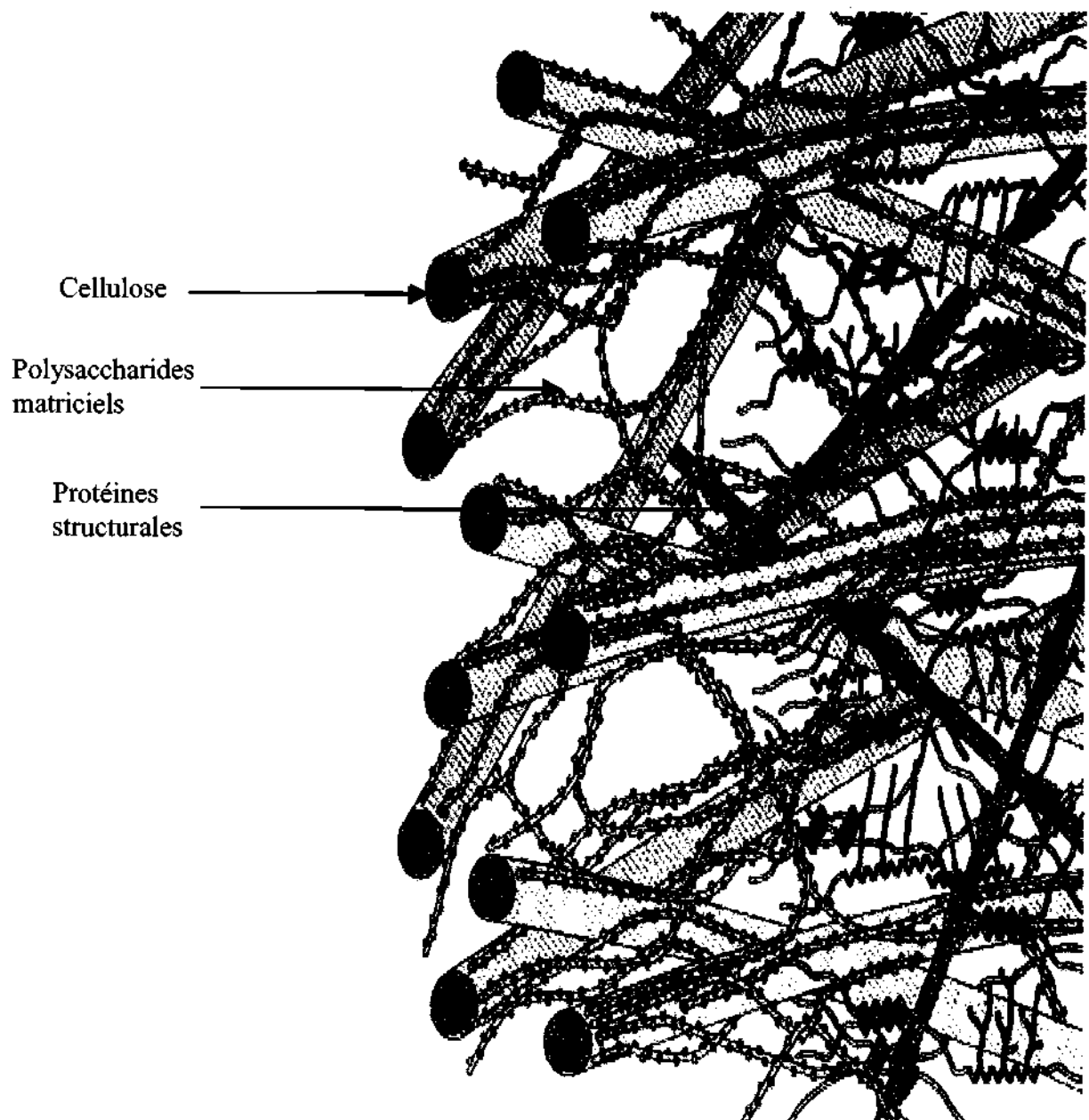


Figure 1 : Représentation de la paroi primaire des végétaux supérieurs (Angiosperme)
(Carpita & Mc Cann, 2000)

2 - Les polysaccharides pariétaux des algues

2.1 - La paroi des algues

La paroi cellulaire des algues possède une architecture semblable à celle des végétaux terrestres. Elle est constituée de deux phases : une phase cristalline, qui correspond à un squelette de microfibrilles, enveloppée d'une phase amorphe, appelée également matrice prédominante.

Elle se distingue cependant de celle des plantes par l'importance de la matrice sur le squelette, et par l'abondance des polysaccharides anioniques sur les polysaccharides neutres (Kloareg & Quatrano, 1988). Par exemple, les Rhodophycées (algues rouges) ont une phase amorphe importante, qui est en fait un réseau de polysaccharides sulfatés. Ainsi, on trouve généralement des galactanes (polymères de galactose), qui permettent entre autre de résister à l'immersion.

En ce qui concerne la phase cristalline des algues, essentiellement fibrillaire et neutre, elle est composée de molécules telles que la cellulose, les xylanes et les mannanes, avec, selon les espèces d'algues, un polymère dominant.

Contrairement à la phase cristalline, la composition de la phase amorphe est caractéristique de la nature de l'algue étudiée.

Enfin, ces parois cellulaires comportent également des protéines. Celles-ci sont peu abondantes chez les algues rouges, contrairement aux végétaux supérieurs (jusqu'à 10% du poids sec de la paroi), et aux algues vertes (Cassab, 1998). Les rôles de ces protéines sont généralement limités à des rôles de transport des ions, d'adhésion cellulaire ou encore de détoxification. La protection physique du thalle de l'algue ainsi que les propriétés antifouling peuvent également être imputées à ces protéines (Craigie, 1990).

La paroi cellulaire des algues possède donc un rôle spécifique, aussi bien structural que protecteur (Kloareg & Quatrano, 1988). En effet, ses composés interviennent dans la morphologie des thalles, notamment grâce à la flexibilité de leurs propriétés colloïdales. Ils participent en outre aux échanges ioniques de l'algue avec son milieu, ce qui permet notamment d'abaisser la pression osmotique de l'eau de mer, et de réguler ainsi les pressions de turgescence dans les membranes cellulaires. Ils occupent également d'autres fonctions

Origine des polysaccharides	Polysaccharides
Végétale	Amidon Cellulose Pectines Gommes
Algale	Alginates Agars Carraghénanes Fucanes
Animale	Héparine Chondroïtine
Microbienne	Dextranes Xanthanes

Tableau 1 : Origine des principaux polysaccharides d'intérêt

comme la défense face aux attaques pathogènes ou aux blessures, ou encore la protection de l'espèce (limitation de la dessiccation due à leur forte hygroscopie).

Il existe une similitude entre le réseau macromoléculaire des algues et celui des végétaux supérieurs. Une représentation de la paroi primaire des végétaux supérieurs, assimilée aux trois réseaux macromoléculaires interagissant entre eux (réseau de polysaccharides fibrillaires, amorphes et réseau de protéines), est illustrée sur la figure 1 (Carpita & McCann, 2000).

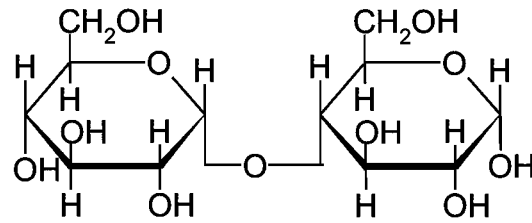
Les polysaccharides chargés de ces parois, encore appelés phycocolloïdes de par leur origine, possèdent des propriétés intéressantes puisqu'ils forment avec l'eau des systèmes colloïdaux capables de donner des gelées fermes à la température ambiante, avec les applications industrielles que cela implique, notamment en agro-alimentaire. Ils sont principalement extraits à partir de deux types d'algues. Les agars et les carraghénanes proviennent des algues rouges, alors que les alginates et les fucanes sont issus des algues brunes.

Les algues rouges (Rhodophycées) représentent donc une source économique de polysaccharides importante qui, de par leur taille et leur complexité ne peuvent être synthétisés de manière artificielle. Ils sont donc extraits directement à partir des parois cellulaires des algues.

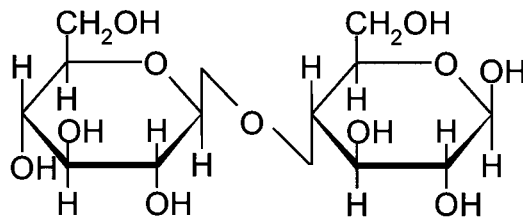
2.2 - Les polysaccharides

2.2.1 - Généralités sur les polysaccharides

Il existe dans la nature de nombreuses variétés de polysaccharides répertoriées, auxquelles l'intérêt porté est proportionnel aux propriétés ou applications potentielles. Ces polysaccharides peuvent être d'origine végétale, c'est le cas de l'amidon, de la cellulose, des pectines ou des gommes. Ils peuvent également être issus des algues comme les alginates, les carraghénanes, l'agar ou les fucanes, ou encore être d'origine animale (héparine, chondroïtine), ou microbienne (dextranes, xanthanes) (tableau 1).



Maltose (liaison de configuration α)



Cellobiose (liaison de configuration β)

Figure 2 : Différents types de liaisons rencontrées chez les polysaccharides

Quelle que soit leur origine, ils se caractérisent tous par des propriétés biologiques et rhéologiques spécifiques, à l'origine de leurs applications diverses.

Les polysaccharides forment un groupe hétérogène de polymères de compositions multiples et variées, et de longueurs différentes. Ils sont construits à partir de résidus monosaccharidiques liés entre eux par des liaisons dites glycosidiques. Les liaisons ainsi formées peuvent avoir la configuration α ou β (Robyt, 1998) (figure 2).

2.2.2 – Composition chimique et structure des polysaccharides d'algues

Chez les algues, il existe une grande variété d'unités saccharidiques, qu'elles soient neutres, acides ou aminées, mais seul un nombre restreint d'entre elles sera rencontré couramment dans les polysaccharides d'algue. C'est le cas par exemple de certains hexoses tels que le galactose (sous sa forme D ou L), le D-glucose, le D-mannose, ou encore de certains acides uroniques tels que l'acide mannuronique, l'acide glucuronique ou l'acide guluronique (figure 3).

Ces monosaccharides sont généralement présents au sein de la chaîne polysaccharidique sous forme de pyranose, ou cycle à 6 chaînons. Notons qu'un dérivé du galactose, le 3,6-anhydrogalactose, est également couramment rencontré dans les polysaccharides d'algues rouges. Parmi les 6-déoxy-hexoses les plus fréquemment rencontrés, peuvent être présents sous leur forme L le fucose, ou encore le rhamnose. Enfin, il faut souligner la présence de certains pentoses tels que le D-xylose ou encore le L-arabinose également présents sous leur forme pyranosique.

Ces monosaccharides adoptent généralement la conformation de chaise qui leur est la plus favorable d'un point de vue énergétique, notée 4C_1 ou 1C_4 en fonction de la position des carbones 1 et 4 par rapport au plan moyen du cycle (Lahaye, 2001a) (figure 4).

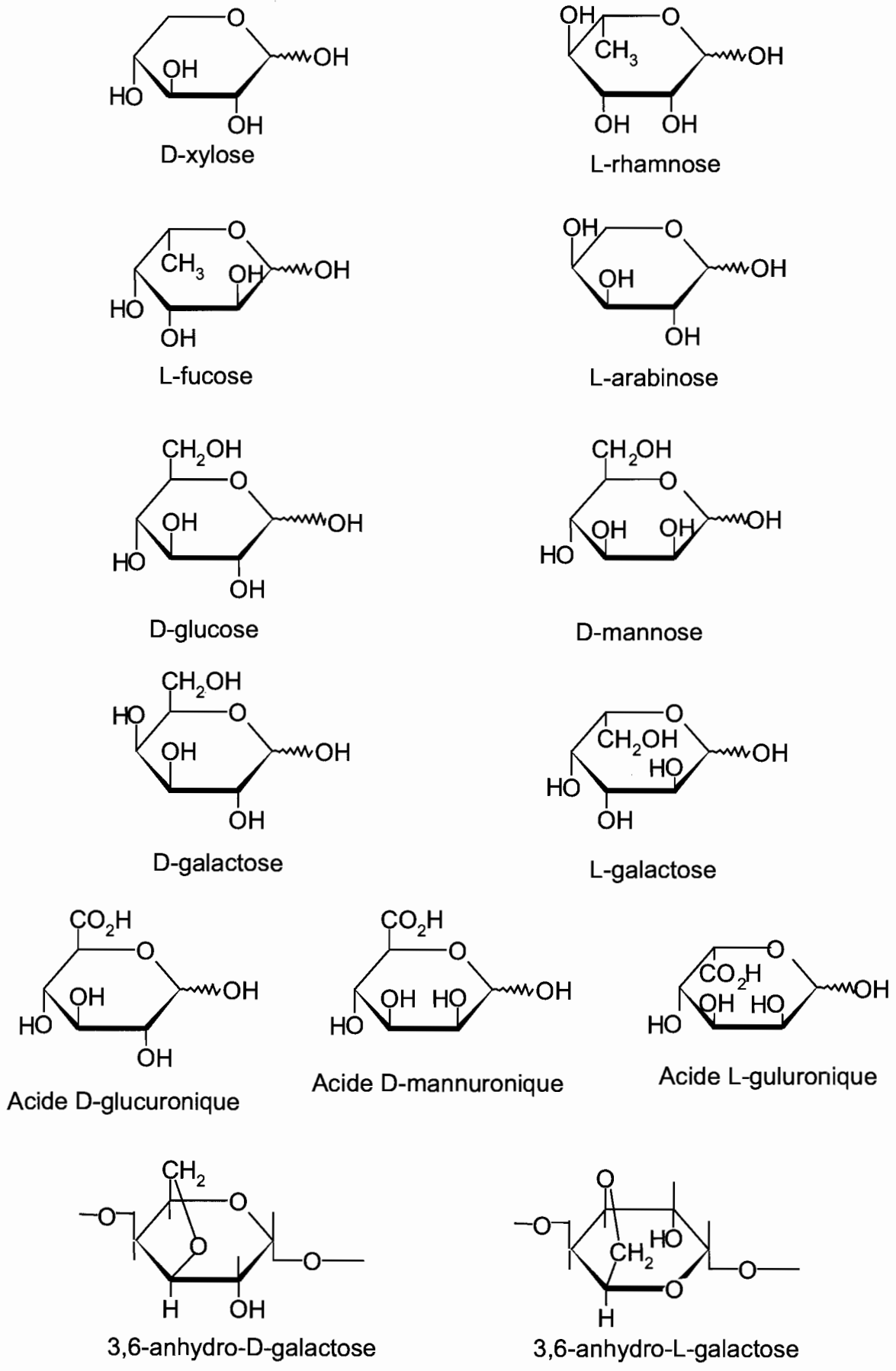


Figure 3 : Oses présents dans les polysaccharides d'algues

La chaîne polysaccharidique formée peut être linéaire ou ramifiée, les ramifications possibles étant d'autres unités monosaccharidiques, seules ou en chaînes, ou des composés non-osidiques appelés substituants et liés de manière covalente à la chaîne principale. Ces substituants peuvent être d'origine organique ou inorganique.

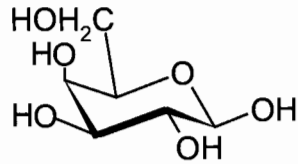
Dans les deux cas, la majorité des liaisons s'effectue par le biais des fonctions hydroxyle des monosaccharides. Ainsi, pour les polysaccharides d'algues, les substituants d'origine organique les plus fréquemment rencontrés sont généralement soit des groupements O-méthyl associés par une liaison de type éther au résidu glycosidique, soit de l'acide pyruvique impliquant la présence de deux groupements hydroxyle sur le monosaccharide (généralement en 4 et 6) pour former une liaison acétalique.

En ce qui concerne les substituants inorganiques, seuls les groupements sulfate sont généralement rencontrés en abondance dans les polysaccharides d'origine algale. Il sont liés à la chaîne polysaccharidique par le biais d'une liaison ester, et contribuent fortement aux propriétés spécifiques de ces polysaccharides (accroissement de la solubilité dans l'eau, activités biologiques) (tableau 2).

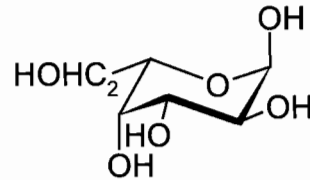
2.2.3 – Classification de ces polysaccharides d'algues

Les polysaccharides peuvent être divisés en deux classes : les homopolysaccharides, et les hétéropolysaccharides (Robyt, 1998).

Les homopolysaccharides ne comportent qu'un seul type de monosaccharides, et peuvent être classés en deux catégories en fonction du type d'enchaînement qui lie les résidus entre eux. Dans le cas de liaisons glycosidiques toutes identiques entre elles, nous sommes en présence d'un polysaccharide constitué d'un seul type de monosaccharides liés entre eux par un seul type de liaison : le polysaccharide en question est donc linéaire. C'est le cas notamment de la cellulose (enchaînement de β -(1-4)-D-glucose), que l'on trouve fréquemment dans les parois cellulaires des algues comme élément de structure, ou encore des mannanes (enchaînement de β -(1-3)-D-mannose). Mais la majorité des homopolysaccharides possède généralement au moins deux types de liaisons glycosidiques, donnant ainsi lieu à des polysaccharides plus complexes, pouvant être ramifiés (Sutherland, 1990). L'amidon floridéen, polysaccharide de réserve de nombreuses algues rouges en constitue un exemple



β -D-galactopyranose 4C_1



α -L-galactopyranose 1C_4

Figure 4 : Différentes conformations adoptées par les monosaccharides

Origine du substituant	Nature du substituant	Structure	Nature de la liaison
Organique	O-Methyl	-OCH ₃	Ether
	Pyruvyl	-O[C(CH ₃)CO ₂ H]O-	Acétals
Inorganique	Sulfate hémiester	-OSO ₃ ⁻	Ester

Tableau 2 : Principaux substituants rencontrés chez les algues

courant. Il s'agit d'un α -glucane branché, constitué d'une chaîne principale linéaire de α -(1-4)-D-glucose, substitué régulièrement en position 6 par un α -D-glucose (Craigie, 1990).

Les xylanes, que l'on trouve également de manière courante dans les algues rouges en proportions plus ou moins importantes, sont formés sur la base d'un enchaînement linéaire de β -D-xylopyranose, liés en (1-3) et en (1-4). Les proportions variables entre ces deux types de liaisons, directement fonction de l'espèce d'algue, sont à l'origine de leur différence de solubilité (Usov, 1992).

En ce qui concerne les hétéropolysaccharides, la même diversité au sujet des liaisons glycosidiques existe, mais elle est en plus appliquée à des unités monosaccharidiques de nature différente (entre deux et dix par polysaccharide en général). De plus, outre la diversité des monosaccharides et des liaisons qui les unissent, il faut également prendre en compte les éventuelles ramifications présentes, ce qui multiplie les probabilités de structures de polysaccharides, ainsi que les propriétés physico-chimiques et biologiques qui en découlent.

Il est cependant possible de dégager de cette grande variété de structures possibles des tendances, notamment de par le fait que la plupart des hétéropolysaccharides comportent généralement des unités répétitives. Ainsi, ils peuvent être constitués de blocs de copolymères, comme dans le cas par exemple des alginates d'algues brunes (blocs de β -(1-4)-acide D-mannuronique et de α -(1-4)-acide L-guluronique), ou bien être formés de deux types de monosaccharides alternant régulièrement le long de la chaîne principale. Ce dernier exemple peut être illustré par les galactanes extraits des algues rouges. Parmi ceux-ci, on trouve les carraghénanes, formés par la répétition régulière du motif diosidique 3- β -D-galactopyranose et 4- α -D-galactopyranose, ce dernier pouvant exister sous la forme de 3,6-anhydrogalactose, ou les agars, dont le motif diosidique est le 3- β -D-galactopyranose et le 4- α -L-3,6-anhydrogalactopyranose (Lahaye, 2001a).

Il arrive également de rencontrer des polysaccharides dont la chaîne est constituée de monosaccharides identiques, interrompue ponctuellement par des résidus de nature différente, voire ramifiée par ces individus. C'est le cas de certains fucoïdanes d'algues brunes (Duarte *et al.*, 2001), dont la chaîne principale constituée de α -(1,2)-L-fucose peut contenir parfois des résidus mannose ou galactose.

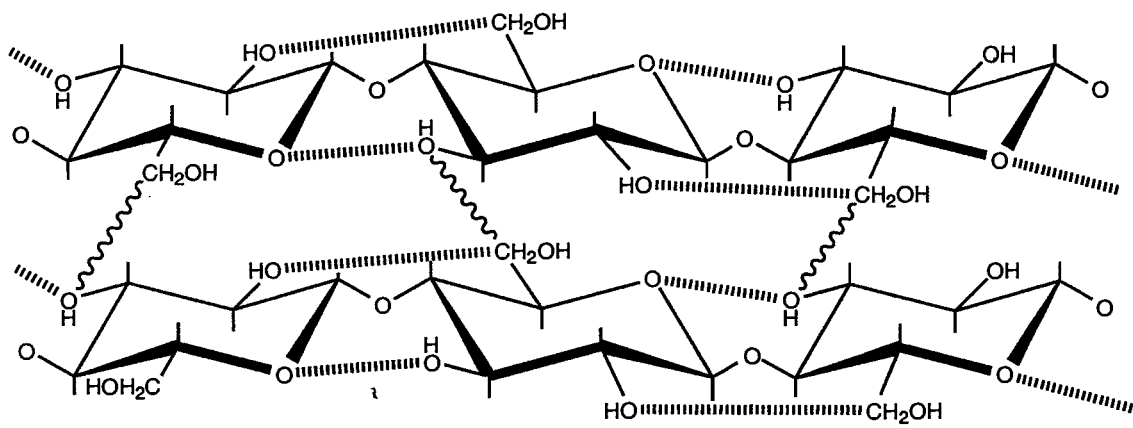


Figure 5 : Microfibrilles de cellulose (Franz, 1990)

2.3 – Les polysaccharides squelettiques, ou fibrillaires

Chez la plupart des algues marines pluricellulaires, les polymères squelettiques sont des polysaccharides neutres, linéaires dont le plus courant est la cellulose.

Des xylanes et des mannanes sont également rencontrés, en fonction des espèces et/ou des étapes du cycle de développement (Kloareg & Quatrano, 1988).

Ces polysaccharides, minoritaires, représentent environ 5 à 15% du poids sec de l'algue.

La cellulose

De manière générale, la cellulose ne représente que 1 à 9% de la masse sèche des parois cellulaires d'algues rouges (Ross, 1953), alors que dans les parois des plantes supérieures, elle peut atteindre jusqu'à 30% de la masse sèche (Preston, 1974).

Elle est également fortement présente dans les parois des algues vertes (jusqu'à 70% en poids sec), contrairement aux algues brunes où sa proportion ne dépasse jamais les 20% en poids sec de l'algue (Kloareg & Quatrano, 1988).

La cellulose est un polymère constitué d'unités β -(1,4)-D-glucose, comportant généralement un enchaînement linéaire de 8 000 à 12 000 unités de D-glucose, de conformation 4C_1 (figure 5) (Franz & Blaschek, 1990).

Les chaînes individuelles de cellulose sont associées en microfibrilles par le biais de liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires. La microfibrille est l'élément structural de base (Chanzy, 1990), et est composée de 30 à 200 chaînes de cellulose.

Ces microfibrilles s'associent à leur tour pour générer une structure ordonnée pseudocristalline : les fibrilles.

La cellulose d'algues marines comporte généralement d'autres unités saccharidiques que le glucose, telles que le xylose, ou le mannose par exemple.

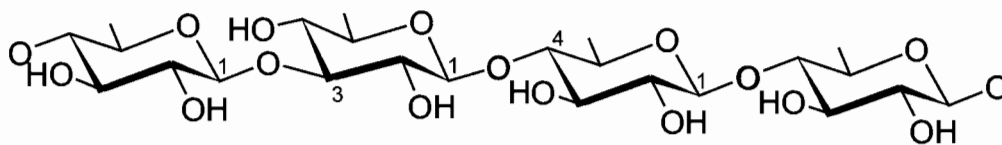


Figure 6 : Structure des xylanes mixtes rencontrés chez Némaiales et les Palmariales
(Usov, 1992)

Les xylanes

Les xylanes squelettiques des parois cellulaires sont des polymères linéaires d'unités β -(1,3)-D-xylose, ou β -(1,4)-D-xylose (Craigie, 1990). Les β -(1,3) xylanes forment des microfibrilles qui résultent d'un arrangement en triple hélice, stabilisées par des liaisons hydrogène intra- ou intermoléculaires (Atkins & Parker, 1969).

Il est intéressant de noter que les β -(1,3) xylanes ne sont présents que dans les algues dont la paroi cellulaire ne contient pas de cellulose. C'est le cas de certaines Bangiales (Iriki *et al.*, 1960), ou de la phase gamétophytique de *Porphyratenera* (alors que sa phase sporophytique ne contient pas ce type de xylanes, mais de la cellulose et du xylose terminal substitué en 4).

Quant aux β -(1,4) xylanes fibrillaires, arrangés en double hélice, on les trouve sous forme pure chez certaines Rhodophycées dont *Palmaria palmata* (Craigie, 1990), mais ils sont surtout présents chez les algues vertes.

Enfin, il est à noter que les deux types de xylanes (β -(1,3) et β -(1,4)) sont par ailleurs présents chez certaines espèces issues de l'ordre des Palmariales ou des Nemaliales (Usov, 1992) (figure 6).

Les mannanes

Les mannanes sont des polymères linéaires formés d'unités β -(1,4)-D-mannose dont les chaînes s'associent entre elles de la même manière que les molécules de cellulose pour former des microfibrilles, elles-mêmes associées en fibrilles (Kloareg & Quatrano, 1988).

On les retrouve principalement dans la phase gamétophytique de *Bangia atropurpurea* (Bangiophycée) (Gretz *et al.*, 1982), où ils remplacent la cellulose et y sont présents à raison de 31%, par opposition à la phase sporophytique de cette espèce (*Conchocelis*) dont les parois contiennent de la cellulose et peu de mannanes (seulement 1 à 4%) (Craigie, 1990).

2.4 – Les polysaccharides matriciels

2.4.1 – Composition chimique et structure

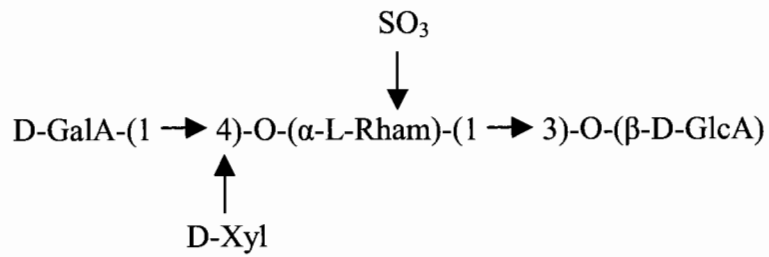


Figure 7 : Glucuronoxylorhamnanes sulfatés

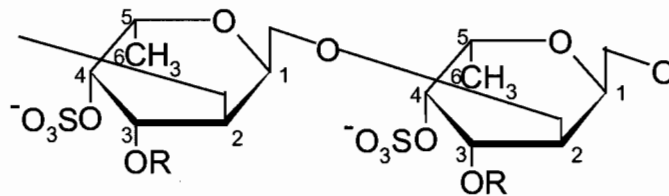


Figure 8 : Structure primaire des chaînes de fucose α -(1,2) des fucanes d'algues brunes

2.4.1.1 – Les polysaccharides matriciels d’algues vertes : les Chlorophycées

Les polysaccharides matriciels des algues vertes marines ont été considérés comme des hétéropolysaccharides ramifiés sulfatés (Percival, 1979). Ils ont été divisés en trois principaux groupes :

Les *xyloarabinogalactanes sulfatés* comportant environ 17% de sulfate et présents dans les algues de l’ordre des Cladophorales et des Codiales. Il n’y a pas vraiment d’unité répétitive, mais plutôt des portions comportant des blocs de (1,4)-L-arabinose, séparés par des unités D-galactose.

Toutes les unités D-xylose et une partie des unités D-galactose sont en position terminale.

Les *glucuronoxylorhamnanes sulfatés* extraits des Ulvales par exemple et comportant 22% de groupements sulfates, et 16 à 22% d’acide uronique selon les espèces (figure 7).

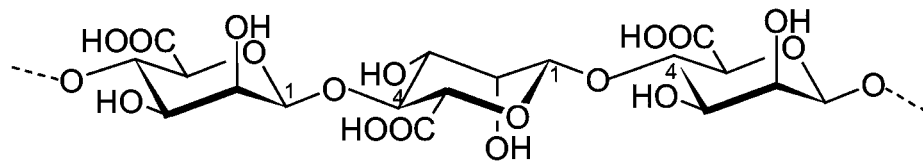
Les *glucuronoxylorhamnogalactanes sulfatés* et les *rhamnogalactogalacturonanes* (Ulvales), peu différents des acides pectiques des végétaux supérieurs, mis à part la présence de sulfate (Lahaye, 2001).

2.4.1.2 – Les polysaccharides matriciels d’algues brunes : les Phéophycées

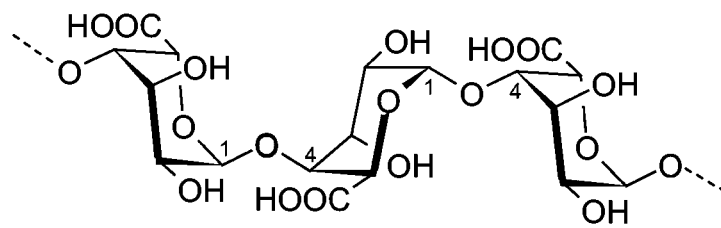
Trois principaux types de polysaccharides matriciels sont issus des algues brunes : les fucanes, les ascophylanes et les alginates.

Les fucanes

Les fucanes, ou fucoïdanes, constituent une famille hétérogène de polymères à base d’unités L-fucose liées en α -(1,2) et sulfatés en 4 (figure 8), dont la composition varie depuis les molécules riches en fucose vers des molécules plus pauvres en cet ose comportant de grandes proportions de galactose, de xylose ou encore d’acide uronique (Percival, 1979).



Chaîne polymannuronique



Chaîne polyguluronique

Figure 9 : Structure de l'acide alginique

Il arrive d'ailleurs fréquemment que certaines algues brunes comportent un mélange de fucanes de compositions différentes en leur sein. C'est le cas notamment des fucanes d'*Ascophyllum nodosum* (Chevolot *et al.*, 2001).

Les ascophyllanes

La chaîne principale des ascophyllanes est constituée principalement d'acides uroniques : acide D-glucuronique, acides mannuronique et guluronique, portant des ramifications de type xylose ou fucose (Percival, 1979).

Les alginates

Les alginates représentent le mucilage matriciel majeur des algues brunes (entre 10 et 45% du poids sec du thalle) (Kloareg & Quatrano, 1988). Ils sont dans un premier temps transformés sous forme d'acide alginique pour être extraits de ces dernières, puis stabilisés à l'aide d'un contre-ion approprié tel que le calcium par exemple (Lahaye, 2001a).

Présents au sein de l'algue sous forme d'alginates, c'est sous la forme d'acide alginique qu'il sont extraits, caractérisés et employés.

L'acide alginique est un polymère linéaire constitué de deux unités monosaccharidiques : l'acide β -D-mannuronique et son épimère en C₅ l'acide α -L-guluronique, liés entre eux par des liaisons glycosidiques de type (1,4) (figure 9).

La molécule d'acide alginique comporte des fractions riches en acides mannuroniques (appelées blocs M), des zones uniquement formées par des acides guluroniques (blocs G), et une fraction où les deux unités d'acides uroniques sont liées alternativement entre elles (blocs MG ou GM). Chaque bloc pouvant contenir 20 à 30 unités.

La structure primaire de l'acide alginique dépend donc à la fois du rapport M/G, mais aussi des proportions relatives des trois types de blocs dans la chaîne. Ce rapport M/G varie généralement de 0,25 à 2,25 selon l'espèce, l'âge des tissus et leur nature, ainsi que la saison et le lieu de récolte (Kloareg & Quatrano, 1988).

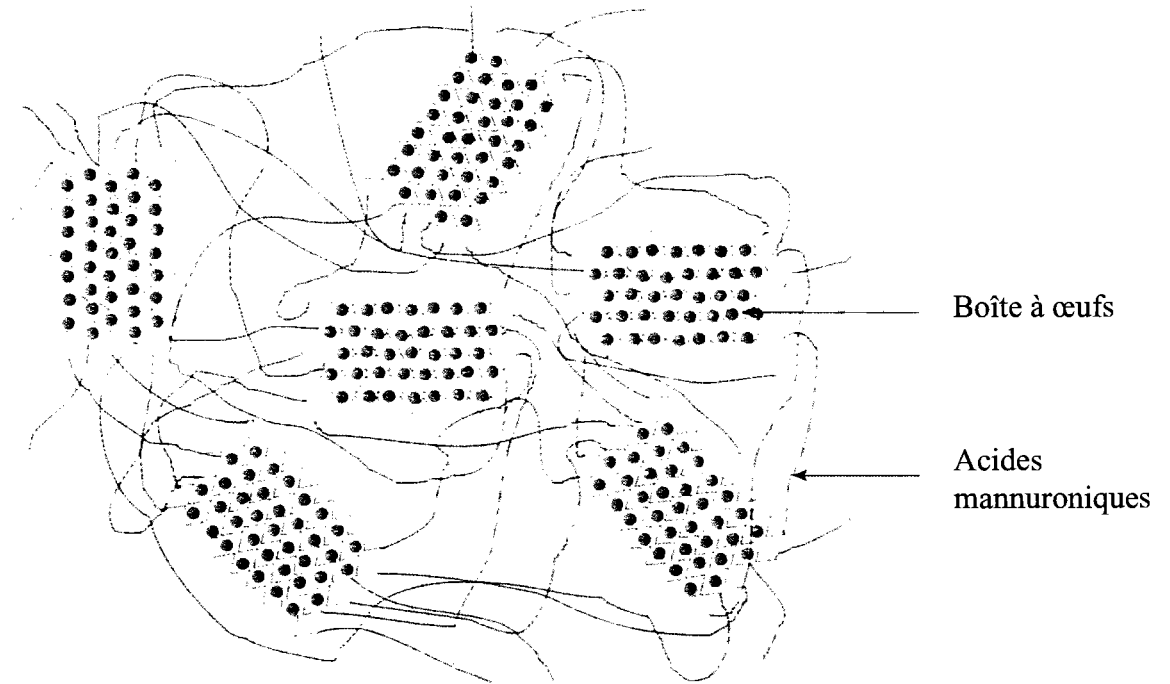


Figure 10 : Schéma de l'assemblage « boîte à œufs » de l'acide alginique (Grant *et al.*, 1973)

L'acide alginique possède la propriété de former en présence d'ions bivalents ou trivalents des gels très fermes dont les applications sont multiples.

Cette particularité est due aux blocs G de l'acide alginique : les fractions d'acides guluroniques de plusieurs molécules s'associent entre elles par le biais des ions calcium pour conduire à un assemblage géométrique régulier appelé « boîte à œufs » (figure 10). Ce sont ces groupements qui permettent donc de former à froid des gels durs, irréversibles et stables jusqu'à 400°C (Grant *et al.*, 1973). Ce type d'arrangement ne pouvant se produire avec les blocs M pour des raisons d'orientation spatiale des acides mannuroniques, la rigidité du gel est donc principalement fonction de la proportion et de la longueur du bloc G.

En réalité, texture et rigidité du gel sont également modulées en jouant entre autre sur la concentration en ions du milieu.

2.4.1.3 - Les polysaccharides matriciels d'algues rouges : les Rhodophycées

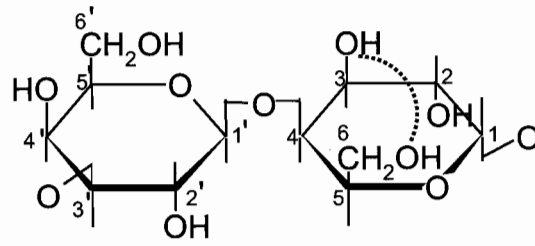
Les algues rouges sont une source industrielle connue de galactanes sulfatés pariétaux aux propriétés gélifiantes et texturantes (Usov, 1992).

Les agarocolloïdes et les carraghénanes sont les principaux polysaccharides matriciels. Tous deux sont construits sur la base d'un enchaînement linéaire d'unités 3- β -D-galactopyranose et 4- α -galactopyranose alternant régulièrement. L'unité β -galactose appartient toujours à la série D, alors que l'unité α -galactose est de configuration D chez les carraghénanes, et sous la forme L chez les agarocolloïdes.

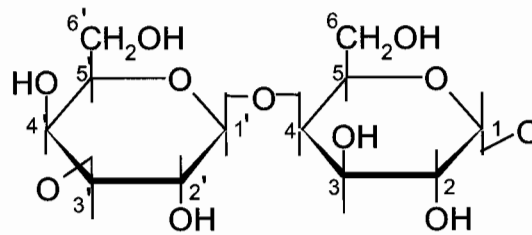
De plus, une part plus ou moins importante des résidus α -galactose peut exister sous la forme de 3,6-anhydrogalactose (figure 11).

Enfin, un certain nombre de groupements hydroxyle de ces galactopyranose peut être sulfaté, méthylé, pyruvaté ou encore substitué par un monosaccharide, générant des unités répétitives dites « masquées » (Anderson & Rees, 1965).

De manière générale, les carraghénanes contiennent toujours plus de groupements sulfate que les agars (Usov, 1998), mais moins de substituants méthyles (Craigie, 1990), et les masses moléculaires de ces deux types de polysaccharides sont généralement importantes (supérieures à 1 000 KDa) (Kloareg & Quatrano, 1988).



(1) [... 3] (D-galactose) β (1-4) (L-galactose) α (1....]_n



(2) [... 3] (D-galactose) β (1-4) (D-galactose) α (1....]_n

Figure 11 : Motifs osidiques de base des agarocolloïdes (1) et des carraghénanes (2)

2.4.1.3.1 - Biosynthèse

La biosynthèse des polysaccharides matriciels d'algues rouges est un processus complexe et relativement mal connu. Elle repose sur la formation de liaisons glycosidiques qui nécessite l'utilisation d'un précurseur activé, un ose nucléotide, comme substrat de la glycosyl synthase. La biosynthèse comporte ainsi des étapes initiales qui consistent en l'activation des oses, mais également des étapes terminales, ou post-polymérisation, qui sont une suite de réactions chimiques (méthylation, sulfatation, ...) qui modifient la structure du squelette carboné, à l'origine de propriétés fonctionnelles très spécifiques, et d'une grande complexité des structures engendrées.

2.4.1.3.1.1 – Localisation

Les sites de polymérisation des polysaccharides non cellulosiques sont localisés dans l'appareil de Golgi. Les modifications post-polymérisation s'opèrent généralement dans les dictyosomes puis les polysaccharides finis sont véhiculés dans les vésicules golgiennes à travers le cytoplasme et finalement excrétés et incorporés dans la matrice extracellulaire.

2.4.1.3.1.2 – Synthèse de précurseurs, et mécanisme de polymérisation

La photosynthèse conduit chez les algues rouges à l'obtention d'hexoses phosphates, le glucose-1-phosphate et le mannose-1-phosphate (Raven *et al.*, 1990). Ces hexoses phosphates doivent ensuite être activés en nucléotides diphosphate-osés (NDP-osés) par des pyrophosphorylases. L'activité de l'UDP-glucose- (uridine diphosphoglucose) et de la GDP-mannose- (guanosine diphosphomannose) pyrophosphorylase a été mise en évidence chez plusieurs espèces d'algues rouges (Goulard *et al.*, 1999; Manley & Burns, 1991).

Les carraghénanes et les agars étant des galactanes, leur synthèse nécessite la conversion des glucoses et mannoses activés en galactoses activés. Ce type de réaction est catalysé par des épimérasés, l'UDP-glucose-4-épimérase (Goulard *et al.*, 1999; Manley & Burns, 1991;

Prosselkov *et al.*, 1996) et la GDP-mannose-3,5-épimérase (Barber, 1971) conduisant respectivement à l'UDP-D-galactose et au GDP-L-galactose.

Il est supposé que la synthèse des polysaccharides pariétaux chez les algues suit les principes généraux de la polymérisation des oses chez les plantes supérieures. Ainsi, le mécanisme fait intervenir des glycosyltransférases qui transfèrent le résidu glycosyl d'un NDP-ose vers une chaîne polysaccharidique en extension selon la voie décrite par Leloir (Leloir, 1964; Leloir, 1971). En raison de l'alternance des liaisons α -1,3 et β -1,4 chez les carraghénanes et les agars, il est probable que pour ces deux familles de galactanes interviennent au moins deux types de glycosyltransférases : une première enzyme synthétisant un disaccharide de répétition en formant une liaison glycosidique α -1,3 et une seconde associant les disaccharides entre eux, en catalysant la formation d'une liaison β -1,4, ou réciproquement.

Cependant, aucune activité galactosyltransférase n'a été caractérisée, et des travaux démontrant récemment la présence de structures de type agar chez plusieurs algues productrices de carraghénanes suggèrent l'existence de voies communes de biosynthèse entre les deux grands groupes de galactanes sulfatés d'algues rouges.

2.4.1.3.1.3 – Mécanisme de sulfatation et de formation du pont 3,6-anhydre

La chaîne polymérisée β -1,4- α -1,3-galactane synthétisée dans l'appareil de Golgi est ensuite sulfatée spécifiquement dans les dictyosomes pour aboutir aux différentes structures de galactanes. L'ion sulfaté SO_4^{2-} étant peu réactif, les mécanismes de sulfatation nécessitent une activation de ce sulfate. Pour ce faire, il y a formation d'APS (adénosine-5'-phosphosulfate) par l'ATP- (adénosine triphosphate) sulfurylase. Cet APS est ensuite converti en PAPS (adénosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate) sous l'action d'une APS-kinase. Le PAPS ainsi formé est alors utilisé par des sulfotransférases spécifiques pour former les esters de sulfate des différents galactanes sulfatés. Ce mécanisme est d'ailleurs confirmé par la publication de Kano *et al.* (Kano *et al.*, 1990). La sulfatation du squelette carboné des galactanes en divers points du motif de base de la molécule est à l'origine de la variété des structures existantes (Craigie & Wong, 1978).

De même, il est raisonnable de penser que l'addition de substituants tels que les groupements méthyles ou pyruvates sur le squelette carboné nécessite la présence de transférases

spécifiques chez ces algues rouges, bien que les mécanismes impliqués dans ces substitutions n'aient pas été élucidés à ce jour.

La formation des résidus 3,6-anhydro-D/L-galactose est spécifique aux carraghénanes et aux agars, à l'origine de leurs propriétés physico-chimiques (*cf.* paragraphe 3-1 p.34) puisque la présence d'une forte teneur en 3,6-anhydrogalactose conditionne les propriétés gélifiantes de ces galactanes sulfates.

En 1961, Rees (Rees, 1961b) isolait une enzyme de l'algue rouge *Porphyra umbilicalis* capable d'agir sur le porphyrane (agar sulfaté), entraînant l'élimination de l'ester sulfate du carbone 6 de l'unité L-galactose lié en 4 avec formation concomitante d'un pont 3,6-anhydre. Ces enzymes, appelées sulfoéliminases ou sulfohydrolases ont été identifiées depuis dans d'autres algues rouges (Lawson & Rees, 1970; Zinoun *et al.*, 1997).

La biosynthèse des polysaccharides matriciels d'algues rouges encore mal définie fait intervenir des processus complexes à l'origine de la complexité structurale éventuelle des galactanes engendrés, notamment au niveau de leur substitution.

2.4.1.3.2 – Les différents polysaccharides matriciels d'algues rouges

2.4.1.3.2.1 – Les agarocolloïdes

Les agarocolloïdes sont divisés en deux groupes : les agars, gélifiants, et les agaroides, peu ou pas gélifiants (Craigie, 1990).

La principale différence entre ces deux groupes réside dans le fait que chez les agars, l'unité 4- α -galactopyranose est sous la forme dérivée 3,6-anhydrogalactose, et que le pourcentage de groupements sulfate y est plus faible (de l'ordre de 2%) que chez les agaroides (20% environ). Le fait que sur ces derniers, les groupements sulfate soient principalement placés en position 6 permet d'assimiler ces unités 4- α -galactopyranose-6-sulfate à des précurseurs des agars, la transformation pouvant être biogénétique (Usov, 1998), réalisée à partir d'enzymes spécifiques ou par traitement chimique (Rees, 1961a; Rees, 1961b).

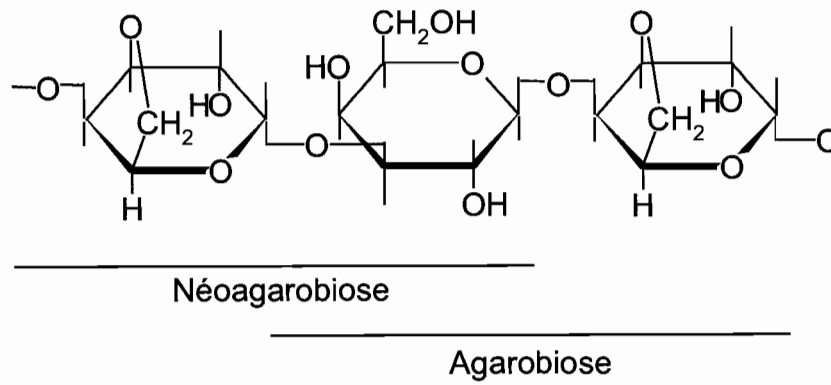


Figure 12 : Motif disaccharidique de répétition chez les agars

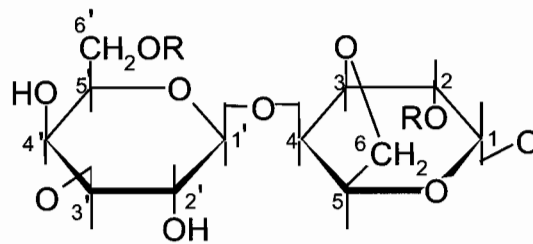
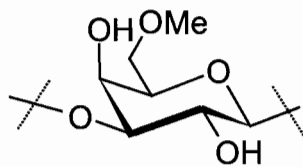
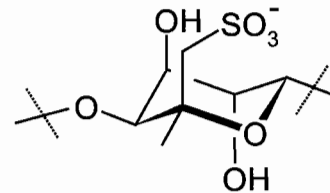


Figure 13 : Structure des furananes



3- β -D-galactopyranose 6-OMe



4- α -L-galactopyranose 6-SO₃⁻

Figure 14 : Structure des unités osidiques des porphyranes

Les agars

Les agars sont extraits en milieu alcalin, à chaud (120°C environ), et proviennent principalement d'algues rouges de l'ordre des Géladiales (*Gelidium*, *Pterocladia*), ou des Gigartinales (*Gracilaria*) (Pérez, 1997). Leur structure est définie comme étant l'enchaînement d'un motif disaccharidique, l'agarobiose ou le néoagarobiose (Akari, 1966), constitué d'une unité β -D-galactopyranose liée en (1,3), alternant avec une unité α -L-3,6-anhydrogalactopyranose liée en (1,4) (figure 12).

Mais la structure réelle des agars tels qu'on les trouve dans les algues rouges diffère de cette structure idéale d'agarobiose en raison du fait qu'un nombre plus ou moins important de groupements hydroxyle soit substitué par des esters sulfates (principalement en 6), des groupements méthoxyles ou pyruvates, ou encore certains résidus osidiques (Furieux & Stevenson, 1990; Knutsen *et al.*, 1994).

Les agaroides

Ils sont proches de cette structure idéale d'agarobiose, mais ils comportent néanmoins beaucoup moins d'unités 3,6-anhydrogalactose, remplacées par des unités 4- α -L-galactopyranose simples, et le taux de groupements sulfate y est plus important (jusqu'à 20%). Ces derniers sont d'ailleurs généralement placés entre autre sur le carbone 6 des unités 4- α -L-galactopyranose.

Parmi ces agaroides, deux exemples peuvent être cités :

- celui des **funoranes** (figure 13), dont les proportions en D-galactose et L-3,6-anhydrogalactose sont identiques à celles des agars, mais dont les hydroxyles placés sur les carbones 6 du 3- β -D-galactopyranose et 2 du 4- α -L-galactopyranose sont substitués soit par un groupement sulfate, soit par un groupement méthyle.

Le funorane extrait du genre *Gloiopeltis* (Hirase & Watanabe, 1972a) est employé comme adhésif par exemple.

- celui des **porphyranes**, extraits par exemple de *Porphyra umbilicalis*, pour lesquels les unités 3- β -D-galactopyranose sont méthylées ou sulfatées en 6, et dont une unité 4- α -L-3,6-anhydrogalactose sur deux est remplacée par une unité 4- α -L-galactopyranose-6-sulfate (Usov, 1992) (figure 14).

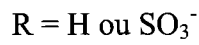
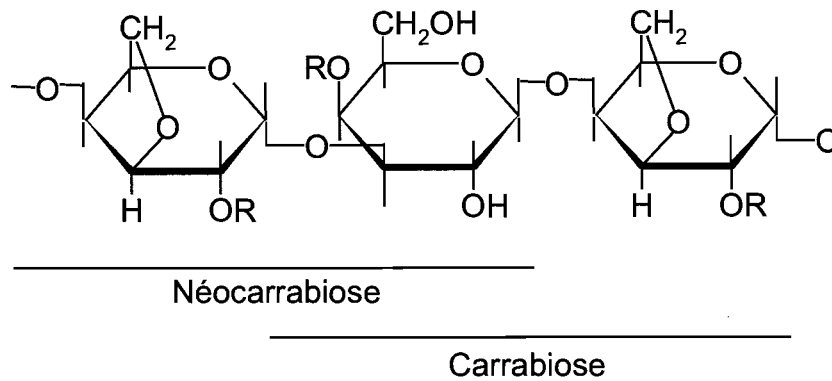
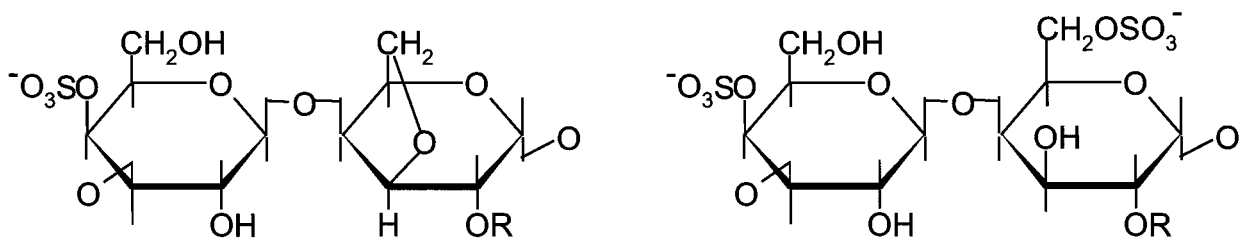


Figure 15 : Motif disaccharidique de répétition dans les carraghénanes



$R = H$ κ -carraghénane

$R = H$ μ -carraghénane

$R = SO_3^-$ ι -carraghénane

$R = SO_3^-$ ν -carraghénane

Kappa, iota-carraghénanes

Mu, nu-carraghénanes

Figure 16 : Famille des Kappa-carraghénanes

Ce sont ces dernières unités qui, par le biais de réactions enzymatiques ou chimiques (traitement alcalin), peuvent générer à nouveau des unités 3,6-anhydrogalactose, et sont ainsi nommées précurseurs biologiques (Rees, 1961a;1961b).

2.4.1.3.2.2 – Les carraghénanes

Comme dans le cas des agars, la structure des carraghénanes est définie comme étant l'enchaînement d'un motif disaccharidique, le carrabiose ou néocarrabiose (Akari, 1966), constitué d'une unité β -D-galactopyranose liée en (1,3), alternant avec une unité α -D-3,6-anhydrogalactopyranose liée en (1,4) (figure 15).

Cependant, et contrairement aux agars, les carraghénanes sont généralement très fortement sulfatés (de 20 à 38%) (Kloareg & Quatrano, 1988), et ne comportent que des oses sous la configuration D. Ils peuvent également comporter des substituants de nature diverse (groupements méthyle, pyruvate, ou encore osidiques : xylose, glucose...).

Le nombre de groupements sulfate ainsi que leur position, de même que la présence ou l'absence de ponts 3,6-anhydro sur les résidus α -D-galactopyranosyles sont à l'origine des 42 structures disaccharidiques théoriques existantes, parmi lesquelles seules 15 ont été identifiées chez les carraghénanes d'algues, assignées par des lettres grecques (Lahaye, 2001a).

Cette nomenclature a pour origine les noms qui avaient été donnés aux carraghénanes extraits de l'algue *Chondrus crispus*, les premiers à être employés de manière courante (Pérez, 1997). En effet, par ajout de chlorure de potassium à un extrait de *Chondrus crispus*, deux types de carraghénanes ont mis été en évidence dès 1953 (Smith & Cook, 1953) : les kappa-carraghénanes, insolubles dans le KCl, et les lambda-carraghénanes, solubles dans le KCl et qui comportent une faible concentration de 3,6-anhydrogalactose.

Plus tard, un troisième type de carraghénanes a été défini. Il s'agit du iota-carraghénane, capable de générer des gels avec des ions calcium.

Actuellement, les carraghénanes sont répartis en quatre familles. Cette répartition est basée sur le nombre et la position des groupements sulfate (C-2, C-4 ou C-6), et sur la présence ou non d'unités 3,6-anhydrogalactose sur le résidu lié en 4.

Famille des Kappa-carraghénanes

Au sein de cette famille, l'unité liée en β -(1,3) est toujours sulfatée en C-4. Seule l'unité 4- α -D-galactopyranose varie. Elle est la moins riche en groupements sulfate, avec un seul groupe par diholoside (Cosson *et al.*, 1995).

Cette famille comporte les kappa (κ), iota (ι), mu (μ), et nu (ν) -carraghénanes, illustrés sur la figure 16.

Chez les μ et ν -carraghénanes, l'unité 4- α -D-galactose est sulfatée en C-6, tandis que chez les κ et ι -carraghénanes, elle porte un pont 3,6-anhydro.

Les travaux de O'Neil (1955a; 1955b) ont mis en évidence le fait que le κ -carraghénane était composé de D-galactose, de 3,6-anhydrogalactose et d'esters sulfates dans un rapport molaire de 6/5/7.

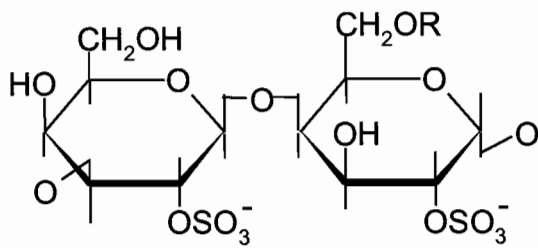
Un diholoside constitué uniquement de 3- β -D-galactopyranosyl-4-sulfate et de 4- α -D-3,6-anhydrogalactopyranose a d'ailleurs été isolé par Weigl et Yaphe (1966) à l'aide d'une κ -carraghénase.

Anderson et ses collaborateurs (1968) ont découvert, chez *Chondrus crispus*, un polysaccharide dont l'unité α apparaissait sous la forme d' α -D-galactose-6-sulfate nommé μ -carraghénane.

Avec deux groupements sulfate par diholoside, le ι -carraghénane est plus sulfaté que le κ -carraghénane (Rees, 1969). Il se présente comme un enchaînement de 3- β -D-galactopyranosyl-4-sulfate lié à un motif 4- α -D-3,6-anhydrogalactopyranosyl-2-sulfate. Celui extrait d'*Euclima spinosum* (= *Euclima denticulatum*), est considéré comme le plus proche de la structure ι -carraghénane idéale (Anderson *et al.*, 1973).

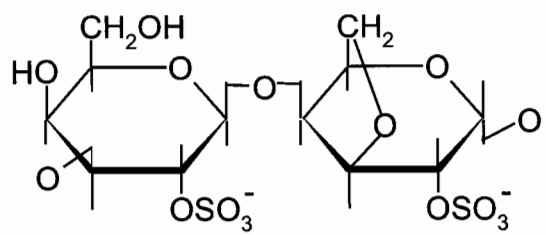
Le ν -carraghénane est extrait en 1969 d'*Euclima uncinatum* (Stancioff & Stanley, 1969). Il comporte un 4- α -D-galactose-2,6-disulfate (10%). Un hybride ν/ν -carraghénane a d'ailleurs été extrait plus tard de cette même espèce (Lawson *et al.*, 1973).

Bixler (1996) a également mis en évidence et recensé la présence d'hybrides κ/ι -carraghénanes chez les Gigartinales. En particulier, c'est le stade gamétophytique de l'algue qui produit des hybrides κ/ι -carraghénanes consistant en une chaîne mixte contenant à la fois du κ et du ι -carraghénane (Van de Velde *et al.*, 2001).



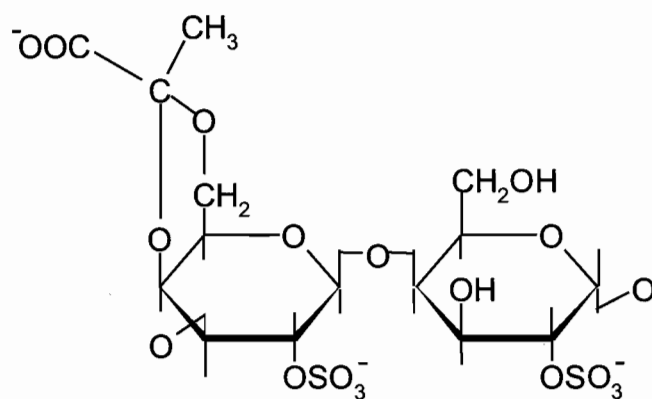
R = H ξ -carraghénane

R = SO₃⁻ λ -carraghénane



Théta-carraghénanes

Xi, lambda-carraghénanes



Pi-carraghénanes

Figure 17 : Famille des Lambda-carraghénanes

A noter, un dérivé du ι-carraghénane où l'unité 4-α-D-3,6-anhydrogalactose est remplacée par un 4-α-D-galactose-2-sulfate et nommé omicron-carraghénane (Craigie, 1990) a été isolé de certaines Phylloporacées ou Solieriées.

Famille des Lambda-carraghénanes

Le lambda (λ)-carraghénane, soluble dans le KCl lors de la séparation des carraghénanes de *Chondrus crispus*, est une espèce très sulfatée où les résidus 3-β-D-galactopyranose sont toujours sulfatés en C-2.

Avec trois groupements sulfate par unité disaccharidique, il ne comporte pas de 3,6-anhydrogalactose, mais un 4-α-D-galactopyranose-2,6-disulfate à la place (Rees, 1969).

Cette famille des λ-carraghénanes contient les xi (ξ), théta (θ) et pi (π) -carraghénanes, où seule l'unité 4-α-D-galactopyranose varie (figure 17).

Ces carraghénanes sont généralement produits par les sporophytes des Phylloporacées, des Petrocelidacées et des Gigartinacées (Stortz & Cerezo, 2000). Le carraghénane pi se caractérise par la présence du groupement pyruvate lié en 4 et 6 de l'unité 3-β-D-galactopyranose (Hirase & Watanabe, 1972b). Il a également été extrait de *Petrocelis middendorffii* (Gigartinales) (Dininno *et al.*, 1979).

Un λ-carraghénane parfait a été extrait en 1994 de *Gigartina decipiens* (Falshaw & Furneaux, 1994), dont 15% des résidus liés en 3 possèdent un groupement sulfate en position 6.

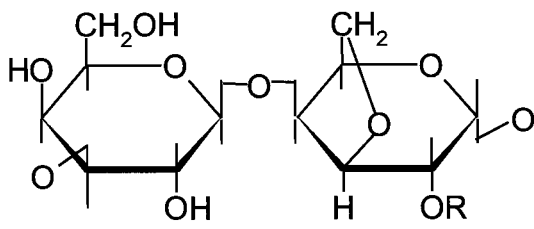
Enfin, Penman et Rees (1973) ont extrait de *Gigartina atropurpurea* un carraghénane dont l'unité 4-α ne comportait pas de sulfate en C-6, et qu'ils ont nommé ξ-carraghénane.

Famille des Bêta-carraghénanes

Elle est composée de carraghénanes dans lesquels les résidus 3-β-D-galactopyranose ne sont pas sulfatés.

Elle regroupe les bêta (β), gamma (γ), alpha (α) et delta (δ) -carraghénanes dont l'unité 4-α-D-galactopyranose est différente d'un carraghénane à l'autre (figure 18).

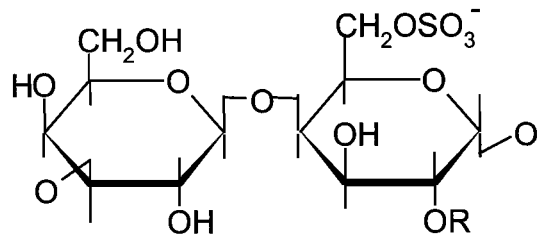
En fait, le β-carraghénane d'*Euclima gelatinae* et d'*Euclima speciosum* correspond à un κ-carraghénane non sulfaté (Greer & Yaphe, 1984). Sa structure diholosique



R = H β -carraghénane

R = SO₃⁻ α -carraghénane

Bêta, alpha-carraghénanes

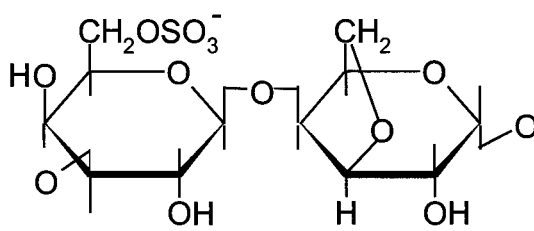


R = H γ -carraghénane

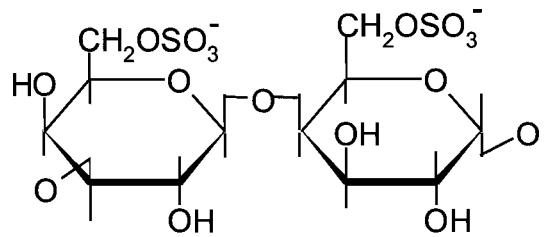
R = SO₃⁻ δ -carraghénane

Gamma, delta-carraghénanes

Figure 18 : Famille des Bêta-carraghénanes



Oméga-carraghénanes



Psi-carraghénanes

Figure 19 : Famille des Oméga-carraghénanes

est donc constituée de 3-β-D-galactopyranose lié en (1,4) à une unité α-D-3,6-anhydrogalactopyranose. C'est l'algue *Tylopus obtusatus* (Dicranemataceae) qui contiendrait la plus forte teneur en β-carraghénane, avec la production d'un hybride β/κ-carraghénane (β prédominant) représentant 50% de la masse sèche du thalle.

L'α-carraghénane et son supposé précurseur biologique, le δ-carraghénane, ont été isolés de *Catanelia nipae* (Gigartinales) en 1986 (Zablackis & Santos, 1986).

Quant au γ-carraghénane, il a été décelé entre autre chez *Furcellaria lumbricalis* (Knutsen & Grasdalen, 1987).

Famille des Oméga-carraghénanes

Au sein de cette famille, l'unité 3-β-D-galactopyranose est sulfatée en 6 (Mollion *et al.*, 1986). Outre l'oméga (ω)-carraghénane, cette famille comporte le psi (ψ)-carraghénane, précurseur biologique de l'ω-carraghénane. Le carraghénane extrait de *Rissoella verruculosa* (Gigartinales, Rissoellaceae) a été identifié par ces auteurs comme étant un ω-carraghénane.

Plus récemment, Miller a établi la structure de carraghénanes extraits du stade tétrasporophytique de *Stenogramme interrupta*, et l'a identifié comme étant du ψ-carraghénane, précurseur de l'ω-carraghénane (Miller, 2001) (figure 19).

Les carraghénanes sont des polysaccharides extraits de diverses espèces de Rhodophycées appartenant principalement à l'ordre des Gigartinales, et en particulier aux genres *Gigartina*, *Hypnea*, *Furcellaria*, *Polyidea* (McCandless, 1978), ou encore *Chondrus*, *Iridea* ou *Eucheuma* (Cosson *et al.*, 1995).

Les différents types de carraghénanes décrits ci-dessus sont des modèles idéalisés, et n'existent pas à l'état pur dans la nature, mais sous forme d'hybrides. En effet, généralement plus d'un type d'unité répétitive carrabiose est trouvé dans les polysaccharides d'algues rouges (Lahaye, 2001b).

De manière générale, chaque carraghénane pourra donc être assimilé à un hybride, comportant une séquence régulière principale d'un même motif diholosique interrompue par des segments d'un autre type de carraghénane (Bellion *et al.*, 1982). Ces segments peuvent être proches spatialement, ou distribués aléatoirement le long de la chaîne, et il est parfois

Famille	Lettre grecque	3-β-galactose	4-α-galactose
Kappa	κ	G4S	DA
	ι	G4S	DA2S
	μ	G4S	D6S
	ν	G4S	D2S,6S
Lambda	λ	G2S	D2S,6S
	ξ	G2S	DAS
	θ	G2S	DA2S
	π	GP,2S	D2S
Bêta	β	G	DA
	γ	G	D6S
	α	G	DA2S
	δ	G	D2S,6S
Oméga	ω	G6S	DA
	ψ	G6S	D6S

G : 3-β-D-galactopyranosyl ; **D** : 4-α-D-galactopyranosyl ; **DA** : 3,6-anhydro-α-D-galactopyranosyl ; **S** : ester sulfate ; **P** : 4',6'-O-(1-carboxyéthylidène)

Tableau 3 : Nomenclature des carraghénanes selon Knutsen *et al.* (1994)

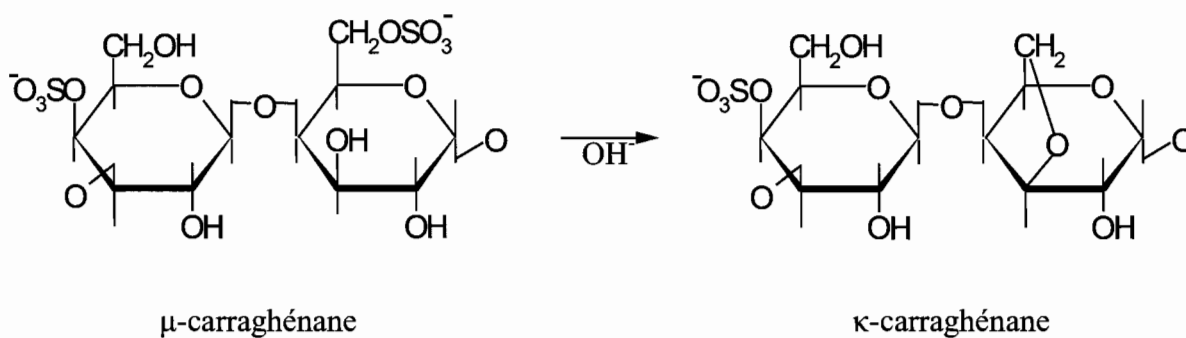


Figure 20 : Transformation du μ -carraghénane en κ -carraghénane par voie alcaline ou enzymatique

difficile d'estimer s'il s'agit d'une seule molécule hybride ou de deux carraghénanes distincts (Craigie, 1990).

Afin de faciliter la description de ces polysaccharides, Knutsen et ses collaborateurs (Knutsen *et al.*, 1994) ont proposé une nouvelle nomenclature basée uniquement sur la structure chimique de ces carraghénanes. Cette dernière emploie des abréviations logiques qui décrivent les différentes unités répétitives.

Ainsi, dans cette notation, les lettres D et L se réfèrent au 4- α -D et 4- α -L-galactose. DA et LA à leur dérivé 3,6-anhydro correspondant, et G au 3- β -D-galactose. Les substituants potentiels n'ont pas été exclus de cette nomenclature. Ainsi, la lettre S représente les esters sulfates, le M, les groupements méthyle, et le P, les pyruvates. La position de ces substituants est bien-sûr précisée.

Dans cette nouvelle nomenclature, le terme « carraghénane » (G-D) est associé à une structure composée d'unités 3- β -D-galactopyranose liées à des unités 4- α -D-galactopyranose, et le terme « carraghénose » désigne un polysaccharide dont l'unité 4- α est sous la forme de 3,6-anhydro-D-galactose (G-DA) (Usov, 1998). Bien entendu, cette nomenclature s'applique également aux agaroïdes.

Cependant, et bien qu'elle soit très pratique pour nommer sans ambiguïté les polysaccharides d'algues rouges comparée à l'emploi des lettres grecques, ces dernières continuent à être utilisées de manière courante, en général par habitude (tableau 3).

Comme pour les agaroïdes, les carraghénanes peuvent contenir des précurseurs biologiques des unités 4- α -D-3,6-anhydrogalactose, initialement sous la forme 4- α -D-galactopyranose-6-sulfate ou 2,6-disulfate. De manière similaire, la désulfatation de ces précurseurs accompagnée de la formation d'unités 3,6-anhydrogalactose peut être réalisée soit par traitement chimique alcalin (Anderson & Rees, 1966), soit par l'emploi d'enzymes spécifiques.

Ainsi, une telle enzyme isolée des thalles frais de *Mastocarpus stellatus* (anciennement *Gigartina stellata*) a permis de transformer le μ -carraghénane en κ -carraghénane (Lawson & Rees, 1970), ce qui a permis de considérer ce premier comme précurseur de la fraction κ . (figure 20)

Les précurseurs biosynthétiques présumés des différents carraghénanes sont résumés dans le tableau n° 4 (Falshaw *et al.*, 2001).

Famille	Carraghénanes	Précurseurs biosynthétiques
κ	κ	μ
	ι	ν
λ	θ	λ
	π	ξ
β	β	γ
	α	δ
ω	ω	ψ

Tableau n° 4 : Précurseurs biosynthétiques des différents carraghénanes.

Il est également intéressant de noter que de manière générale, la nature des carraghénanes produits par une algue est fonction des différentes générations du cycle biologique de celle-ci (*cf.* paragraphe III-2-2.2).

C'est le cas par exemple des polysaccharides sulfatés des algues rouges de l'ordre des Gigartinales, qui ont été longuement étudiés. Ainsi, les espèces appartenant à cet ordre peuvent contenir plusieurs types de carraghénanes, et au sein d'une même espèce, des variabilités structurales liées à l'alternance des générations (*cf.* paragraphe III-2-2.2) ont été mises en évidence, notamment au niveau des teneurs en groupements sulfate et des 3,6-anhydrogalactoses.

McCandless *et al.* (1982; 1983) ont étudié les carraghénanes des Phylloporacées et des Gigartinacées, et ont démontré que les polysaccharides pariétaux générés par les gamétophytes étaient une forme hybride de ι/κ ou κ/ι selon l'espèce, alors que les carraghénanes issus des tétrasporophytes étaient plutôt de la forme λ (λ , ξ et π).

Cette tendance a été confirmée depuis pour certains genres de Gigartinacées telles que *Chondrus*, *Gigartina*, *Iridea* ou *Rhodoglossum* pour lesquels les gamétophytes produisent des

κ ou ι -carraghénanes, alors que leurs tétrasporophytes contiennent des carraghénanes du type λ ou ξ (Chen *et al.*, 1973; Matsuhira & Urzua, 1992; Matulewicz *et al.*, 1989; 1990; McCandless & Craigie, 1974; McCandless *et al.*, 1973; 1975; 1983; Pickmere *et al.*, 1973).

Plus récemment, Falshaw *et al.* (2001) l'ont également démontré pour des algues rouges chiliennes, *Sarcothalia crispata* et *Gigartina skottsbergii*. Il en est de même pour *Gigartina atropurpurea* (Falshaw *et al.*, 2003a), où l'extrait issu de la phase gamétophytique comporte un hybride de κ et de ι -carraghénanes (ainsi que de μ et de ν , leurs précurseurs biologiques en fonction des conditions d'extraction employées), alors que la phase tétrasporophytique contient un carraghénane complexe de type λ (comportant également du θ -carraghénane).

C'est également le cas de *Gigartina decipiens* (Falshaw & Furneaux, 1994), où la phase tétrasporophytique contient un carraghénane de type λ .

Concernant les tétrasporophytes de *Gigartina clavifera* et de *Gigartina alveata*, ils génèrent majoritairement des ξ -carraghénanes (Falshaw & Furneaux, 1995). Les tétrasporophytes de *Gigartina lanceata* contiennent des carraghénanes très proches de la structure idéale des λ , alors que pour *Gigartina chapmanii*, ils sont plutôt proches des ξ -carraghénanes (Falshaw & Furneaux, 1998).

Quant aux carraghénanes issus de la phase gamétophytique de *Gigartina pistillata*, il s'agit d'un mélange hétérogène de κ et de ι -carraghénanes, avec de faibles taux de ν -carraghénanes, alors que les tétrasporophytes comportent un galactane sulfaté complexe à base de λ -, ξ -, et π -carrabioses.

Cependant, chez les *Eucheuma* (Solieriacées), les thalles cystocarpiques et tétraphytiques produisent le même type de carraghénane pour une espèce donnée (Dawes *et al.*, 1977; Doty & Santos, 1978), et les gamétophytes et les sporophytes d'*Hypnea musciformis* (Hypneacées) contiennent tous les deux un κ -carraghénane (Hosford & McCandless, 1975).

Il existe également des exceptions au sein des Gigartinacées. C'est ainsi le cas de *Chondrus canaliculatus* où les carraghénanes issus des phases carposporophytiques et tétrasporophytiques ne possèdent aucune différence de structure.

Enfin, il est également possible de trouver des différences au sein d'une même génération. Ainsi, chez *Mastocarpus stellata* le disque basal du thalle cultivé comporte du λ -carraghénane, alors que les frondes contiennent des hybrides κ/ι -carraghénanes. C'est également le cas de l'extrait du carposporophyte de *Chondrus crispus* qui contient au moins trois types différents de carraghénanes, ι , κ , et μ (Craigie, 1990).

Chez les agarophytes, la ploïdie n'a que peu d'effet sur la nature et les propriétés des agars synthétisés (Craigie, 1990).

2.4.1.3.2.3 – Polysaccharides hybrides

Il s'agit de polysaccharides de structures intermédiaires entre les agars et les carraghénanes.

Pour ceux dont la structure ressemble en majorité aux agars, cela se traduit par une sulfatation plus importante, avec une diminution du taux de L-3,6-anhydrogalactoses. Outre le fait qu'une partie plus ou moins importante d'unités 4- α -galactose puisse se retrouver sous la configuration D, on peut également trouver des substitutions de la chaîne principale par des xyloses par exemple.

Les galactanes de *Porphyra columbina*, de *Bangia atropurpurea*, de *Ceramium rubrum* ou de *Osmundea pinnatifida* illustrent bien ce type de polysaccharides (De Reviers, 2002).

En ce qui concerne les polysaccharides hybrides à majorité carraghénanes, ils se caractérisent par la présence plus ou moins importante de L-galactose.

C'est le cas des aéodanes définis par Parolis (Parolis, 1978), extraits de certaines espèces de Grateloupiacées. Ces galactanes sont dépourvus d'anhydrogalactose, et la proportion des liaisons β -(1,3) et α -(1,4) est variable. Les groupements sulfate sont placés uniquement sur l'unité liée en 3, et ils contiennent de faibles quantités de groupements méthyle ou encore de L-galactose.

Le terme de carragar (Myslabodski, 1990) a été attribué à ce genre de polysaccharides hybrides, et démontre bien les limites de la nomenclature des carraghénanes basée sur l'emploi des lettres grecques pour décrire ce genre de galactanes.

De tels polysaccharides ont été isolés chez *Gigartina skottsbergii*, dont le squelette est constitué majoritairement d'unités carrabioses comportant du L-galactose (Ciancia *et al.*, 1993; 1997), ou encore chez la Cryptonémiale *Grateloupia divaricata* et *Grateloupia elliptica* (Usov & Barbakadze, 1978).

Chez la Rhodyméniale *Lomentaria catenata* (Takano *et al.*, 1994), chez la Cryptonémiale *Gloiopeltis furcata* (Takano *et al.*, 1998), ou encore chez les Gigartinales *Anatheca dentata* (Nunn *et al.*, 1971), de telles structures ont également été mises en évidence. C'est également le cas de la Cérámiale *Rhodomela larix* (Takano *et al.*, 1999).

L'existence de molécules complexes a également été mise en évidence chez l'algue rouge *Kappaphycus alvarezii* (Estevez *et al.*, 2000).

Enfin, la présence de tels carragars au sein de la fraction pariétale du gamétophyte *Asparagopsis armata* (Rhodophycées) a été mise en évidence en 2000 (Haslin *et al.*, 2000), sans pouvoir toutefois trancher entre une molécule hybride contenant ces deux types de polysaccharides, ou bien un mélange de deux polysaccharides distincts.

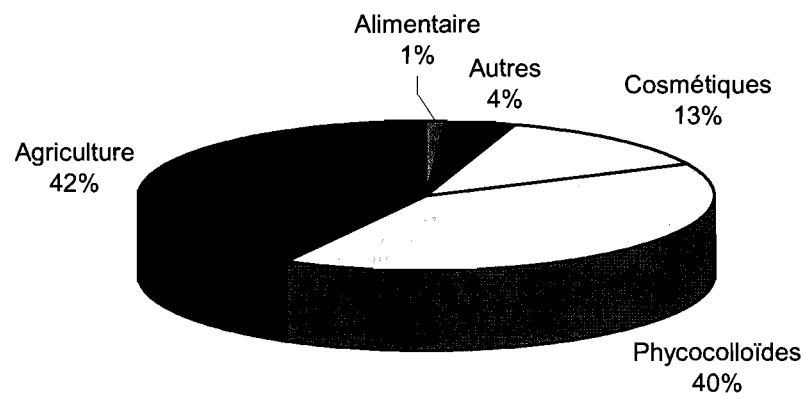


Figure 21 : Répartition de l'utilisation des algues en 2001 (Source : SODEPAR)

II – APPLICATIONS DES POLYSACCHARIDES PARIETAUX DES ALGUES

Les algues, et notamment les algues rouges, sont utilisées depuis la nuit des temps de par le monde pour des applications alimentaires, médicales, et plus récemment, biotechnologiques.

Un bilan a été réalisé en 1999 (Zemke-White & Ohno, 1999) concernant la production et l'utilisation des algues à travers le monde pour les années 1994-1995. Ils ont établi que sur 221 espèces d'algues utilisées, 145 l'étaient pour l'alimentation, 101 pour la production de phycocolloïdes, et que parmi ces 221 espèces d'algues employées, 32 étaient des Chlorophycées (algues vertes), 125 des Rhodophycées (algues rouges) et 64 des Phéophycées (algues brunes).

L'origine de ces algues est double : soit elles sont issues de la production naturelle mondiale (2 millions de tonnes de poids sec), soit elles proviennent de culture, dont le tonnage représente 1 million de tonnes de poids sec. La Chine étant dans les deux cas de figure le leader mondial. Il est intéressant de noter que depuis 1984 la production mondiale d'algues s'est accrue de 119%, mettant ainsi en évidence la croissance continue de l'utilisation des algues.

Certaines de ces algues sont directement employées pour l'alimentation humaine, surtout dans les pays du sud-est asiatique (Chine ou Japon) où l'on trouve le Nori par exemple, fabriqué à partir de différentes espèces d'algues rouges du genre *Porphyra*. Ce dernier présente d'ailleurs un grand intérêt nutritionnel puisqu'il contient 35% de son poids sec en protéines, ainsi que de nombreuses vitamines.

En ce qui concerne les applications industrielles, elles se font généralement autour du caractère texturant (propriétés gélifiantes et épaississantes) des phycocolloïdes extraits de ces algues. En particulier, les agars et les carraghénanes extraits des algues rouges sont très couramment utilisés dans les industries agro-alimentaires et cosmétiques.

En 2001, la SODEPAR (Agence de développement économique de l'archipel de Saint-Pierre et Miquelon) estimait que l'utilisation des algues dans le monde se répartissait en 5 activités où l'industrie des colloïdes représentait 40% de la récolte consommée et 50% du chiffre d'affaires de la filière (figure 21).

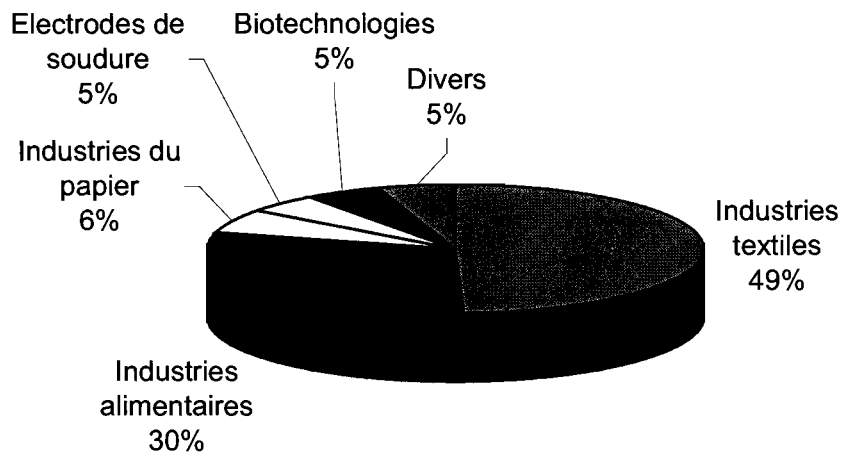


Figure 22 : Principales applications industrielles de l'acide alginique et de ses sels

Les polysaccharides matriciels des algues marines sont étudiés depuis une trentaine d'années, l'intérêt qu'ils suscitent étant lié à leurs propriétés aussi bien texturantes que gélifiantes, et donc à leurs applications industrielles potentielles. De plus, les nouvelles applications biotechnologiques (biomédicales, cosmétiques...) associées à ces phycocolloïdes depuis vingt ans environ, ont exacerbé l'intérêt qui leur était porté, les faisant passer du rôle d'agent texturant à celui de principe actif à part entière.

Contrairement aux polysaccharides squelettiques, les polysaccharides matriciels sont spécifiques au type d'algue étudiée (verte, brune ou rouge).

1 – Applications des polysaccharides matriciels d'algues vertes

Le principal intérêt industriel de ces mucilages d'algues vertes réside dans leur propriétés anticoagulantes (Deacon-Smith *et al.*, 1985; Maeda *et al.*, 1991), les gels que forment les polysaccharides d'Ulves, par exemple, en présence de cations divalents étant des gels souples, donc sans grand intérêt industriel.

2 – Applications des polysaccharides matriciels d'algues brunes

2.1 – Fucanes

Les fucanes sont surtout exploités dans un intérêt biomédical potentiel pour leurs activités antithrombiques (Mauray *et al.*, 1995), antivirales (Baba *et al.*, 1990; Ponce *et al.*, 2003), ou encore anticoagulantes (Nardella *et al.*, 1996; Ponce *et al.*, 2003; Roger *et al.*, 2002)

2.2 – Alginates

Ces gels ont des applications industrielles diverses (figure 22), et sont trouvés dans les produits sous les codes E 400 pour l'acide alginique, E 401 pour l'alginate de sodium, E 402 pour l'alginate de potassium, E 403 pour l'alginate d'ammonium, et E 404 pour l'alginate de calcium.

Ils sont utilisés aussi bien à des fins agro-alimentaires pour leur pouvoir épaississant (comme épaississant des sauces par exemple), qu'à des fins plus techniques. Ainsi, dans l'industrie textile par exemple, les alginates sont employés couramment dans l'impression des tissus. On les retrouve également dans la fabrication des couches culottes où l'acide alginique, grâce à sa propriété d'absorber 200 à 300 fois son poids en eau, est utilisé. Mais des applications pharmaceutiques ont également été trouvées pour les alginates, soit en tant qu'excipient dans les comprimés, facilitant ainsi la dispersion du médicament en contact avec l'eau, soit en tant que principe actif comme pansement gastrique par exemple (Gaviscon).

3 – Applications des polysaccharides matriciels d'algues rouges

Ces polysaccharides algaux ont connu leurs premières applications importantes dans l'industrie agro-alimentaire, en raison de leur pouvoir texturant.

Depuis, leur champ d'application s'est élargi, n'étant plus bâti uniquement sur leurs propriétés physiques, mais également sur leurs potentialités en tant que principe actif.

Cependant, les algues rouges sont surtout connues pour leur importance économique en tant que source d'agars et de carraghénanes, polysaccharides sulfatés utilisés en agro-alimentaire et en biochimie.

Ces polysaccharides sont d'ailleurs principalement exploités pour leurs propriétés physiques comme agent gélifiant, épaississant, stabilisant, ou encore comme rétenteur d'eau. L'agar sert par exemple de base de milieu de culture en microbiologie, entre dans la composition des pâtes à empreintes dentaires en dentisterie, possède également des propriétés laxatives et est couramment employé en tant qu'additif alimentaire (E 406).

Quant aux carraghénanes, notamment ceux extraits de certaines Gigartinales (*Chondrus crispus*, *Gigartina stellata*), ils sont employés comme épaississants (E 407) en pâtisserie par exemple, dans les pâtes dentifrices, ou encore dans l'industrie pharmaceutique comme pansements gastriques dans le traitement des ulcères. On les retrouve également en cosmétique, en tant qu'adouçissants dans les shampooings ou encore comme hydratants dans les produits de beauté.



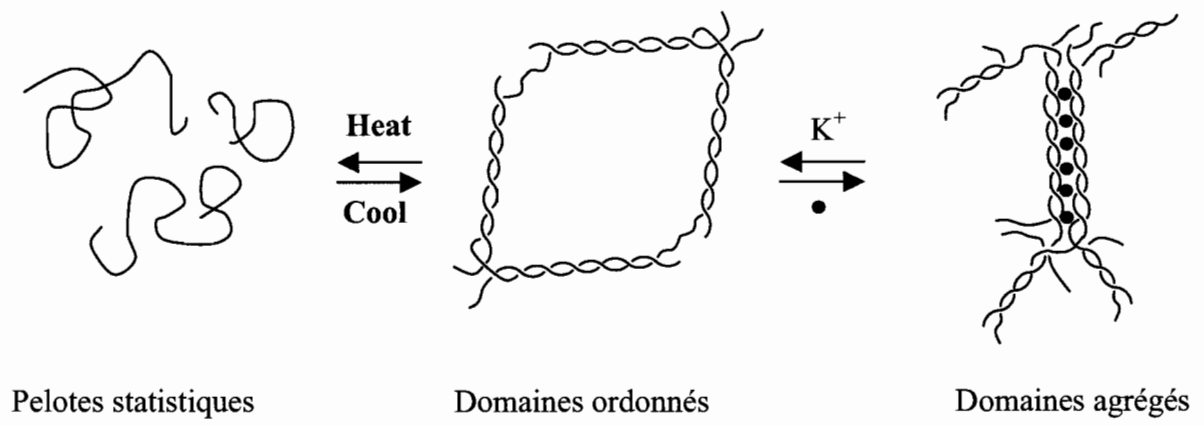


Figure 23 : Modèle de formation des gels selon Morris *et al.* (1980)

Mais l'intérêt de ces polysaccharides sulfatés ne se limite pas aux applications texturantes seules, et la recherche d'une diversification vers des applications à orientation biomédicale est en cours depuis une vingtaine d'année environ.

Parmi celles-ci, des activités anticoagulantes ou antithrombiques ont été démontrées pour de nombreux polysaccharides sulfatés d'algues rouges. Nombre de publications en atteste, et parmi les plus récentes peut être citée celle de Melo *et al.* (2002).

Des activités antivirales ont également été reportées pour les polysaccharides d'algues rouges (Filali-Mouhim & Hours, 1995; Witvrouw & De Clercq, 1997), notamment contre le virus de l'Herpès (Carlucci *et al.*, 1997; 1999; Damonte *et al.*, 1996; Pujol *et al.*, 1996) ou le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Yamada *et al.*, 1997)

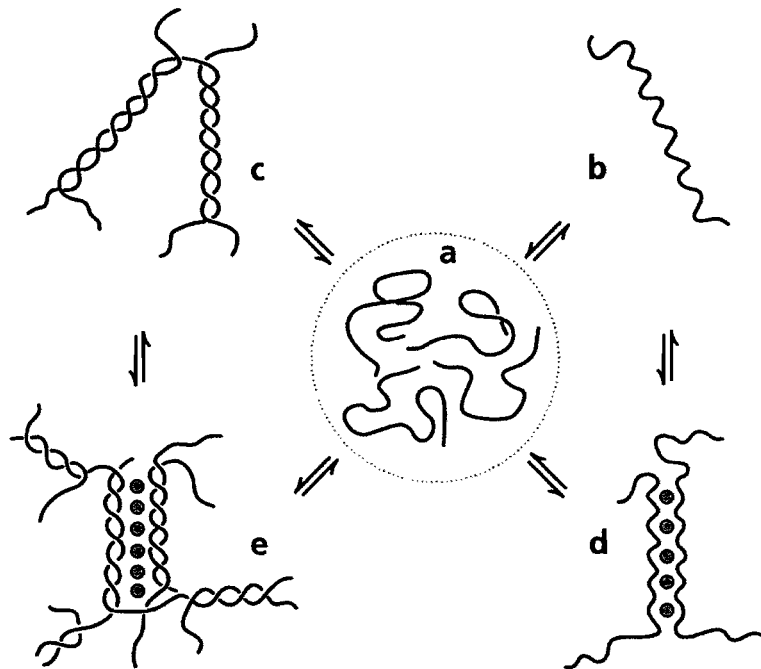
3.1 – Propriétés texturantes des polysaccharides matriciels d'algues rouges

3.1.1 – Introduction

L'intérêt industriel de ces polysaccharides réside dans leur aptitude à modifier à faible concentration les caractéristiques rhéologiques des milieux dans lesquels ils sont dissous. Ce sont essentiellement des agents gélifiant, épaississant, stabilisant. Ces phénomènes sont intimement liés à la composition chimique des polysaccharides, à leur conformation, leur charge et à la nature des ions en présence.

Le mécanisme de gélification est sensible à la température et à la présence d'électrolytes. Ainsi, en solution dans de l'eau chaude, les chaînes macromoléculaires de polysaccharides se répartissent sous forme de pelotes statistiques. A température ambiante, les deux chaînes de polysaccharides s'associent progressivement, de manière réversible, en double hélice, stabilisée par des liaisons intermoléculaires de faible énergie (liaisons hydrogène).

La gélification peut être facilitée par des ions spécifiques (K^+ , Rb^+ , Cs^+ , NH_4^+ ou Ca^{2+}) qui facilitent l'agrégation des doubles hélices entre elles afin de former un réseau tridimensionnel (Figure 23) (Morris *et al.*, 1980; Rees *et al.*, 1982).



- a. Chaînes isolées
- b. Simples hélices formées lors refroidissement
- c. Doubles hélices
- d. Association simples hélices par l'intermédiaire de cations
- e. Association doubles hélices par l'intermédiaire de cations

Figure 24 : Modèle de gélification thermoréversible des différents carraghénanes

Cependant, face à certaines incohérences liées au premier modèle, notamment le fait qu'aucune augmentation de poids moléculaire n'accompagne la formation du gel (Smidsrod *et al.*, 1980), un deuxième modèle impliquant l'association de simples hélices par l'intermédiaire de cations (Paoletti *et al.*, 1984; Smidsrod & Grasdalen, 1984a; 1984b) a été établi.

Quoiqu'il en soit, et indépendamment du modèle pris en compte, ces deux modèles se rejoignent pour résumer le phénomène de gélification (figure 24) :

Pelote statistique → Simple / Double hélice → Agrégats

L'aptitude des polysaccharides à former des gels dépend bien sûr de leur conformation, mais aussi de leur capacité à former des liaisons inter- ou intramoléculaires. Les associations qui en résultent sont affectées par la présence de charges négatives telles que celles apportées par les groupements carboxyliques ou les groupements sulfate, ou encore par la présence de substituants tels que les groupements méthyle, pyruvate, ou les chaînes osidiques.

Les premiers, porteurs de charges négatives, génèrent des répulsions électrostatiques et ont ainsi tendance à favoriser la solubilisation des polysaccharides dans l'eau, alors que les seconds, outre l'encombrement stérique apporté, remplacent des groupements hydroxyle impliqués dans les liaisons intra- ou intermoléculaires, à l'origine de conséquences analogues (Lahaye, 2001b). C'est ainsi qu'une composition irrégulière, des ramifications par des chaînes osidiques ou encore des substitutions sont à l'origine d'une augmentation de la solubilité des polysaccharides.

3.1.2 – Cas des carraghénanes

Les carraghénanes occupent le troisième rang mondial des hydrocolloïdes dans l'industrie alimentaire, après la gélatine et l'amidon. La production mondiale des algues dans le but de fournir des carraghénanes est de l'ordre de 140 millions de kg en poids sec, générant environ 26 millions de kg de carraghénanes pour une valeur de 310 millions d'USD en 2000. Le marché des carraghénanes est en pleine expansion, avec une croissance annuelle de l'ordre de 3% depuis ces dernières années (Van de Velde & De Ruiter, 2002). Plus du tiers des carraghénanes est utilisé en Europe (36%), l'Amérique du Nord en consomme 26%,

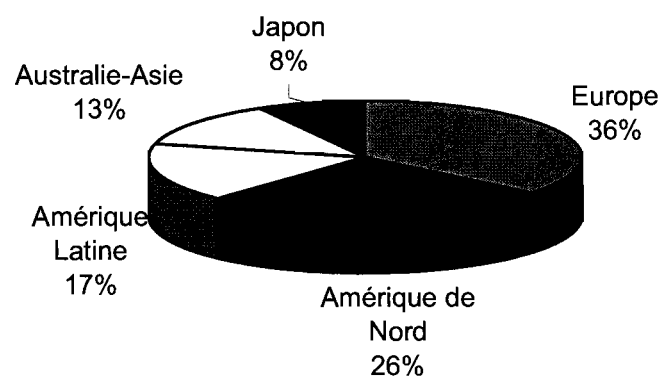


Figure 25 : Consommation de carraghénanes dans le monde en 1993 (Pérez, 1997)

l'Amérique du Sud, 17%, et l'Asie, notamment le Japon, plus de 20% (Pérez, 1997) (figure 25).

3.1.2.1 – Propriétés rhéologiques

La présence de groupements sulfate et de ponts 3,6-anhydro sur les résidus galactose est à l'origine des propriétés physico-chimiques des carraghénanes, de leur aptitude à former des hélices, et donc de leurs propriétés rhéologiques et de leurs applications.

En 1969, Rees (Rees, 1969) a démontré que l'association en double hélice à l'origine du phénomène de gélification était possible grâce à la présence dans les chaînes de 3,6-anhydrogalactoses. En effet, la présence d'un pont entre les carbones 3 et 6 génère un changement de conformation des unités qui impose alors au squelette moléculaire une rotation autour de son axe, une torsion, qui donne à la séquence une disposition en hélice.

Seuls les κ et ι -carraghénanes sont capables de former des gels, puisque les autres carraghénanes ne possèdent pas la conformation 1C_4 nécessaire, résultant de la présence de ponts 3,6-anhydro. Ces deux carraghénanes existent principalement sous deux formes. A haute température, ils sont présents sous forme de pelote statistique, alors que, par refroidissement, ils adoptent une conformation plus structurée de double hélice. La température de transition entre les deux états est appelée **point de gel** : la densité d'hélices est suffisante pour qu'il y ait interpénétration et apparition d'un réseau continu. Cette température est un paramètre important pour les propriétés fonctionnelles des carraghénanes et dépend de facteurs intrinsèques de la molécule (polydispersité, distribution des groupements sulfate, etc...), comme de facteur extrinsèque (nature et concentration des sels, pH, ...).

Le κ -carraghénane, en raison de sa structure riche en 3,6-anhydrogalactoses, génère des gels rigides, cassants, qui exsudent l'eau : c'est le phénomène de **synérèse**.

Ce phénomène n'est pas retrouvé au sein des gels de ι -carraghénane, ces derniers étant beaucoup plus élastiques. Cette élasticité est due à la présence de nombreux esters sulfates situés sur la face extérieure de la double hélice, empêchant ainsi par répulsion électrostatique une agrégation trop étroite des chaînes polysaccharidiques.

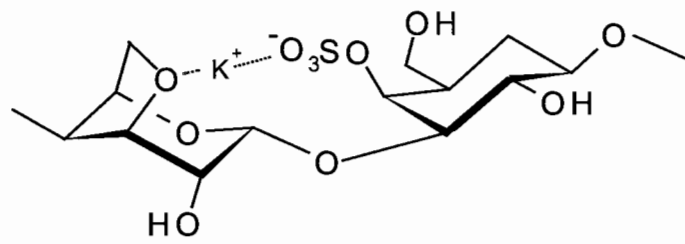


Figure 26 : Interactions moléculaires de l'ion potassium au sein du kappa-carraghénane

Les gels de κ et ι -carraghénanes sont **thermoréversibles**, c'est à dire qu'à une température supérieure au point de gélification l'agitation thermique domine sur l'arrangement en double hélice, et le polysaccharide existe en solution sous la conformation de pelote statistique.

La « dureté » des deux types de gel est contrôlée par la concentration en cations (Van de Velde & De Ruiter, 2002). Ainsi, le ι -carraghénane forme des gels en présence d'ions calcium, et la dureté du gel est corrélée à la concentration en cet ion.

La gélification du κ -carraghénane est facilitée surtout par des cations monovalents (K^+ , Rb^+ , Cs^+ , NH_4^+), qui favorisent l'agrégation des doubles hélices entre elles pour former des domaines d'agrégats. Ces cations jouent le rôle de « lien » intramoléculaire, formant des interactions électrostatiques entre les esters sulfates et les atomes d'oxygène des ponts 3,6-anhydro (Figure 26) (Tako & Nakamura, 1986).

Cette aptitude des doubles hélices à former des réseaux tridimensionnels d'agrégats cristallins chez les κ -carraghénanes permettrait d'expliquer le phénomène d'**hystérèse** rencontré chez ses gels. Ce phénomène d'hystérèse thermique se traduit par une température de fusion du gel qui est toujours supérieure à la température de gélification, et aurait pour origine le fait que les jonctions entre les doubles hélices au sein des agrégats soient cinétiquement stables et résistent aux variations de températures (Lahaye, 2001b). Ce phénomène décroît avec la présence de substituants, et dans le cas des gels de ι -carraghénane, où il n'y a pas ou peu d'hystérèse, cela confirme la tendance très faible des hélices à former des agrégats, générant ainsi des gels souples et élastiques (Van de Velde & De Ruiter, 2002). Les gels de κ -carraghénane présentent une hystérèse de 15 à 27°C, alors que celle des gels de ι -carraghénane est de l'ordre de 2 à 5°C.

La double hélice du ι -carraghénane est une hélice droite dont le pas est de 2,6 nm. Trois diholosides constituent le motif de répétition, et six liaisons hydrogène par tour d'hélice stabilisent l'édifice. Ces liaisons hydrogène sont situées entre les groupements hydroxyle portés par le carbone 6 d'une chaîne, et ceux portés par le carbone 2 de l'autre chaîne. Les deux groupements sulfate de chaque disaccharide sont orientés à l'extérieur de l'hélice.

Quant au κ -carraghénane, un arrangement similaire en double hélice de pas 2,5 nm est noté, avec un décalage d'un demi pas d'hélice entre les deux chaînes (Lahaye, 2001b), et seulement trois liaisons hydrogène entre les résidus intermoléculaires.

La propagation de la double hélice le long des chaînes de carraghénanes peut être interrompue par la présence de coudes structuraux, appelés « kinks » par Rees (Rees, 1969), dus à l'existence de sulfates en position 6 ou en position 2,6 sur le résidu α -D-galactose. Ces kinks sont alors à l'origine d'une forte diminution de la rigidité du gel, au profit d'une augmentation de leur élasticité, puisque les chaînes s'associent en double hélice avec plusieurs d'entre elles pour assurer la continuité du réseau.

Un cas extrême réside chez les μ et ν -carraghénanes, où la rupture régulière des chaînes empêche l'établissement de liaisons stables entre elles, puisque les zones régulières sont trop courtes. Cependant, le traitement alcalin à chaud conduisant à la désulfatation partielle du carbone 6 des unités μ et ν -carraghénanes, accompagnée d'une cyclisation des carbones 3 et 6 pour former du 3,6-anhydrogalactose, permet d'éliminer un grand nombre de coudes structuraux, et les chaînes régulières ainsi générées peuvent s'associer pour former des gels plus ou moins rigides.

La conformation des λ -carraghénanes ne leur permet pas de former des gels, puisqu'ils ne possèdent pas d'unités 3,6-anhydrogalactose et que la présence de groupements sulfate sur les carbones 2 et 6 des unités α -D-galactose empêche la formation de structures hélicoïdales, et donc à fortiori le rapprochement des chaînes entre elles pour former des réseaux. Solubles à froid, ils génèrent donc des solutions visqueuses et sont utilisées principalement comme stabilisant, et non comme gélifiant.

Les ξ -carraghénanes ou encore les π -carraghénanes sont également considérés comme des polymères visqueux.

3.1.2.2 - Propriétés spécifiques de certains carraghénanes

Interaction avec les protéines

Dans l'industrie laitière, les carraghénanes sont utilisés pour leurs interactions spécifiques avec les protéines du lait, et en particulier la fraction caséine- κ . C'est ainsi qu'il faut cinq fois moins de carraghénanes pour gélifier la même quantité de lait que d'eau (Van de Velde & De Ruiter, 2002).

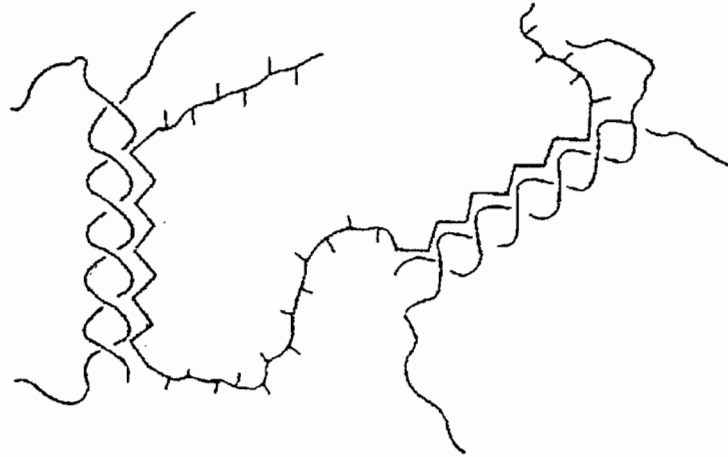


Figure 27 : Interactions entre les doubles hélices de carraghénanes et les galactomannanes

Les carraghénanes se lient aux protéines par le biais de liaisons établies entre les ions sulfates du polymère, et les groupes NH_3^+ de la protéine, si cette dernière est à un pH inférieur à son point isoélectrique. Si le pH devient supérieur au point isoélectrique, la protéine devient négative, entraînant une répulsion entre celle-ci et les carraghénanes (Pérez, 1997).

Dans le cas du lait, où le pH (6,7) est supérieur au pH isoélectrique de la caséine (4,4), la synergie entre carraghénanes et caséine est médiée par la présence d'ions calcium, permettant la formation d'une liaison complexe associant carraghénanes-calcium-caséine, et ce, quel que soit le pH.

Les gels ainsi formés ont une force qui dépend de la concentration en ion calcium présents dans le milieu, et sont présents dans la plupart des dérivés lactés sous le code E 407.

Interaction avec les lipides

En fonction de leur concentration, les lipides du lait ont des actions opposées sur la formation du gel. En faible quantité, ils exercent un pouvoir dispersant vis à vis des molécules de carraghénanes, diminuant de ce fait la force du gel, et ce, même en présence d'ions calcium.

Par contre, lorsque les matières grasses sont abondantes, une liaison entre carraghénanes et lipides se crée, par l'intermédiaire des fonctions acides de ces derniers, permettant la gélification (Pérez, 1997).

Interaction avec les gommes

Les κ -carraghénanes montrent une certaine synergie pour les galactomannanes de la gomme de guar ou de caroube. Ces galactomannanes comportent des zones linéaires de β -(1,4)-mannanes, et des zones ramifiées par des résidus galactose branchés en position C-6.

Les interactions entre carraghénanes et galactomannanes se feraient par l'intermédiaire des zones linéaires de ces derniers, et de la double hélice des premiers (Dea & Morrison, 1975; Harding *et al.*, 1995) (figure 27).

L'ajout de galactomannanes aux gels de κ -carraghénanes assouplirait ces derniers, les substituants portés par les chaînes de galactomannanes générant des connexions entre les différentes hélices (Rees, 1972).

Certains amidons ont des affinités avec les ι-carraghénanes. Cependant, aucun mécanisme n'a à ce jour été établi (Van de Velde & De Ruiter, 2002).

3.1.2.3 – Applications en industrie agro-alimentaire

Les principales sources de carraghénanes industriels sont *Kappaphycus cottonii* pour le κ-carraghénane et *Eucheuma denticulatum* pour le ι-carraghénane. Quant au λ-carraghénane, il est obtenu à partir des sporophytes de *Chondrus crispus*, ou de *Gigartina (pistillata* ou *radula)*.

Les carraghénanes sont identifiés sous le code E 407 parmi les additifs alimentaires autorisés par la CEE. Ils ne possèdent aucune propriété nutritionnelle, ils ne sont donc employés qu'à des fins texturantes, allant de l'épaississement à la gélification des solutions auxquelles ils sont incorporés.

En ce qui concerne les produits lactés, les carraghénanes sont incorporés à de nombreux produits tels que les laits aromatisés ou chocolatés, les crèmes épaissies, les glaces industrielles, les flans ou encore les yaourts. Ils jouent alors principalement soit un rôle de stabilisant, permettant le maintien en suspension de fruits ou le maintien d'une émulsion, soit un rôle de gélifiant/épaississant dans le cas des gels à base de lait (flans, crème...) (Therkelsen, 1993).

Les carraghénanes peuvent être également impliqués dans la formation de gels aqueux, avec comme principales applications les nappages de desserts, les garnitures des tartes, les préparations dites « instantanées » froides ou chaudes, ou encore certaines sauces (Rudolph, 1998). Ils sont également présents pour la confection d'aliments à teneur réduite en calories comme les poissons, les potages, les saucisses, etc... où ils remplacent les lipides. On les retrouve aussi dans les gelées ou les confitures basses calories. Parfois, ils composent même majoritairement certains produits diététiques tels que les préparations diététiques hypocaloriques destinées aux régimes amaigrissants (80% de carraghénanes non assimilables par l'homme, et 20% de vitamines) (Pérez, 1997).

Emploi	Fonctions	Type de carraghénanes	Concentration (%)
Desserts gélifiés	Gélation	$\kappa + \iota$	0,6-0,9
Gels basses calories	Gélation	$\kappa + \iota$	0,5-1,0
Flans lactés	Texturation/Goût	$\kappa, \kappa + \iota$	0,2-0,3
Petit déjeuner instantané	Texturation/Suspension	λ	0,1-0,2
Chocolat lait	Suspension/Goût	κ, λ	0,01-0,03
Lait artificiel	Emulsifiant	ι, λ	0,05
Crèmes glacées	Contrôle de la fonte	$\kappa + \text{galactomannane}$	0,01-0,03
Sauces	Texturation	κ	0,2-0,5
Garniture tartes	Glaçage/Gélation	κ	0,7-1,0
Sirops	Suspension/Texturation	κ, λ	0,3-0,5
Bière/Vin clarification	Complexation des protéines	κ	?
Aliments pour animaux	Stabilisation des lipides	$\kappa + \text{galactomannane}$	0,5-1,0

Tableau 5 : Principales applications alimentaires des carraghénanes (Van de Velde, 2001)

Les carraghénanes sont encore couramment employés dans le domaine des viandes et des volailles. Pour le jambon, par exemple, ils sont utilisés dans le but d'obtenir une meilleure texture, une teneur en lipides plus faible, tout en conservant une bonne tenue des tranches. Chez les volailles, ils permettent après pénétration dans les aliments, d'améliorer à la cuisson le goût et le caractère tendre de la chair (Therkelsen, 1993).

De manière générale, ce sont les κ -carraghénanes qui sont couramment rencontrés dans ces types de préparation. Le fait que la texture de leur gel puisse être modulée par ajout de farine de graines de guars (ce qui permet de générer des gels plus souples à l'aspect brillant), permet de diversifier leurs applications. Quant aux ι -carraghénanes, ils sont présents dans de nombreux desserts, leurs gels de structure légère étant stables dans le temps et aux variations de températures (Rudolph, 1998).

Les principales applications alimentaires des carraghénanes, ainsi que leur nature et leur fonction sont résumées dans le tableau n° 5 .

3.1.2.4 – Applications en industrie pharmaceutique

Les carraghénanes sont employés de manière courante comme excipient dans les médicaments. Par exemple, les ι -carraghénanes à raison de 0,1% à 0,5% sont utilisés pour stabiliser les émulsions et les suspensions d'huiles minérales, ou encore les préparations dont le principe actif est insoluble.

Les complexes susceptibles de se former entre certains carraghénanes et certaines molécules actives peuvent être utilisés dans le but d'un relargage contrôlé et progressif du médicament. Enfin, les carraghénanes peuvent être utilisés simplement comme agent d'enrobage des compositions pharmaceutiques (Van de Velde & De Ruiter, 2002).

3.1.2.5 – Applications en industrie cosmétique

Les carraghénanes peuvent être inclus dans la formulation de gels désodorisants. Une solution aqueuse contenant une forte teneur en parfum est gélifiée à l'aide d'un κ -carraghénane, en mélange avec d'autres gommes et des sels de potassium (jusqu'à 2,5% p/p).

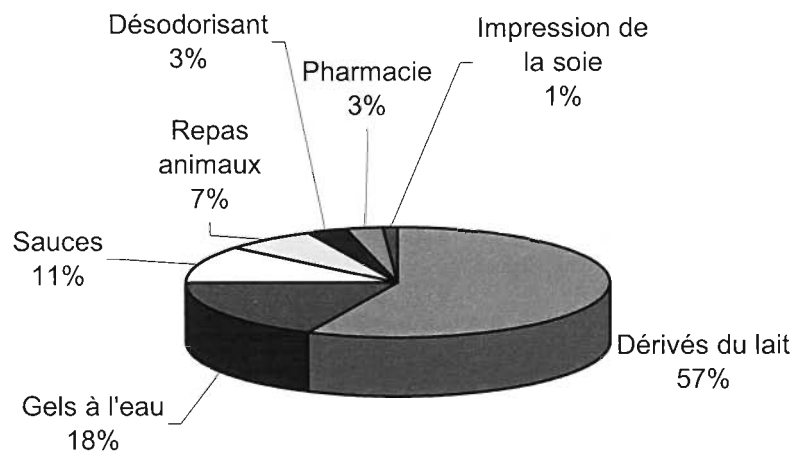


Figure 28 : Principales utilisations des carraghénanes

Progressivement, ce gel exsude l'eau qu'il contient, celle-ci se vaporise alors dans l'atmosphère avec le parfum qu'elle renferme (Pérez, 1997).

Une des principales applications non alimentaire des carraghénanes est son emploi en tant qu'épaississant dans les pâtes dentifrices, les shampooings, ou encore les lotions et les crèmes (Van de Velde & De Ruiter, 2002).

Ainsi, dans les dentifrices, des ι -carraghénanes (0,8 à 1,2% p/p) sont rajoutés afin de préserver l'homogénéité des différents ingrédients, et permettent une bonne conservation dans le temps de la pâte, et ce, à des conditions de température et d'humidité variables.

Dans les lotions, les crèmes pour les mains, ce sont des λ -carraghénanes (0,1 à 1,0% p/p) qui sont utilisés afin d'exacerber la pénétration du produit.

Enfin, les carraghénanes sont utilisés dans les shampooings afin de les épaissir et de les stabiliser. Ils auraient également des propriétés hydratantes.

3.1.2.6 – Autres applications

Les carraghénanes peuvent être utilisés à des fins techniques, dans l'industrie des peintures ou des encres par exemple. Employés comme agents stabilisants et épaississants à raison de 0,15 à 0,25% p/p, les κ ou ι -carraghénanes permettent d'éviter la sédimentation des pigments (Van de Velde & De Ruiter, 2002).

Les ι -carraghénanes (0,25 à 0,8% p/p) sont également présents dans les pesticides ou les abrasifs, permettant une suspension stable des substances insolubles.

Les κ -carraghénanes sont quant à eux utilisés dans les clarifications de breuvages tels que la bière, ou peuvent encore avoir des utilisations en biotechnologie, où ils sont employés pour immobiliser des cellules ou des enzymes dans les cultures *in vitro*.

Quant aux λ -carraghénanes, ils peuvent être utilisés comme support chiral des séparations par électrophorèse capillaire. Ainsi, récemment, les dérivés du tryptophane ont pu être séparés avec succès en leurs deux énantiomères (Beck *et al.*, 2000).

Les principales applications des carraghénanes sont résumées au sein de la figure 28.

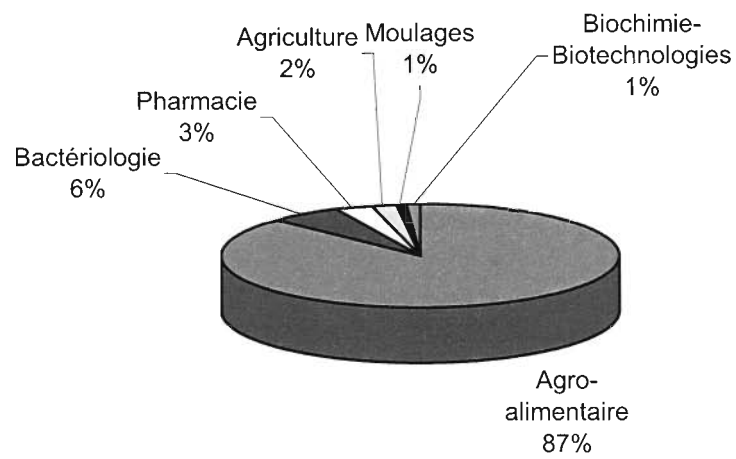


Figure 29 : Principales utilisations des agars

3.1.3 - Cas des agars

Nous avons vu que les agarocolloïdes comportaient deux types de familles : les agars, riches en unités 3,6-anhydrogalactose et au pourcentage en groupements sulfate faible (ils sont gélifiants), et les agaroides, riches en esters sulfates, très solubles dans l'eau. Ces derniers ne possédant pas de propriétés gélifiantes, ils ne seront pas traités ici.

3.1.3.1 - Propriétés rhéologiques

Les agars forment des gels thermoréversibles dont le mécanisme de formation est proche de celui des carraghénanes. En solution à haute température, ils seraient sous forme de simples hélices allongées (Foord & Atkins, 1989; Guenet *et al.*, 1993). Ces simples hélices s'associeraient ensuite en double hélice gauche de pas 1,9 nm lors de la gélification, leur structure n'étant constituée que d'unités de conformation 4C_1 (Lahaye, 2001b).

Les dimensions réduites de la cavité interne font que cette dernière est uniquement occupée par des molécules d'eau qui stabilisent la structure en double hélice par le biais de liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyle portés par les carbones 2 de l'unité galactose, et ceux portés par les carbones 5 des unités 3,6-anhydrogalactose positionnés vers l'intérieur de l'édifice. Les gels d'agars générés sont alors solides puisqu'il n'y a pas de répulsion des charges.

Comme les gels de κ -carraghénanes, les gels d'agars présentent un phénomène d'hystérèse, leur température de gélification étant de l'ordre de 40-50°C, et celle de fusion aux alentours de 80-90°C. Cette hystérèse thermique est ici aussi révélatrice d'une certaine stabilité du réseau tridimensionnel.

Seuls les agars aux propriétés gélifiantes et donc aux applications pertinentes seront traités ici.

Ils génèrent des gels translucides, sans goût ni odeur, mais qui rehaussent le goût originel et fixent l'arôme. Cela leur confère donc de nombreuses applications dans le domaine de l'agro-alimentaire (88% de l'utilisation des agars).

Les autres applications des agars sont diverses, et vont de la bactériologie à l'agriculture (Figure 29). Les agars à but alimentaire sont extraits de *Gracillaria*, *Gelidium*, *Pterocladia* et

Gelidiella, alors que seuls *Gelidium* et *Pterocladia* sont utilisés pour la fabrication d'agars de qualité pharmacologique ou bactériologique.

3.1.3.2 - Applications en industrie agro-alimentaire

Identifiés sous le code E 406, 88% de l'utilisation des agars est consacrée à ce domaine de l'alimentaire, en raison de leur neutralité sur le plan organoleptique (inodore, inodore, sans saveur), et grâce à leur grande stabilité thermique (permettant notamment de les utiliser dans les préparations à stériliser à chaud).

Incorporés à des doses inférieures à 1%, ils peuvent jouer un rôle de gélifiant ou encore de stabilisant permettant de contrôler la viscosité des milieux dans lesquels ils sont dissous.

Les agars sont souvent associés à d'autres substances (sucre, amidon, gomme de guar, carraghénanes...), qui leur permettent de moduler la viscosité ou la texture des gels en vue d'applications spécifiques.

De plus, la faible digestibilité des agars (de l'ordre de 10%), permet de ne pas modifier l'apport calorique des aliments qui les contiennent, ou très faiblement (0,6 kcal/g environ).

Leurs applications alimentaires sont proches de celles des carraghénanes, elles concernent principalement les secteurs suivant :

- Produits laitiers : yaourts, glaces, flans...
- Pâtisserie : glaçage et nappages (ils évitent les craquelures et donne une meilleure brillance), fourrage, gelées
- Confiserie : caramels, gommés... (ils évitent la déshydratation des préparations)
- Produits carnés : substitution de la matière grasse, viandes en gelée
- Produits à tartiner : confitures (en substitution à la pectine pour réduire le taux de sucre)

3.1.3.3 - Applications en industrie pharmaceutique

La principale utilisation des agars dans ce domaine reste en tant qu'excipients des préparations pharmaceutiques : soit en tant que gélifiants (pommades, suppositoires...), soit

en tant que stabilisants des solutions médicamenteuses. Dans le passé, ils ont largement été employés comme laxatifs.

Ils entrent également dans la composition des pâtes à empreintes dentaires en dentisterie, ou encore en criminologie.

3.1.3.4 - Applications en bactériologie

Les agars forment le substrat de base dans la confection des milieux de culture solides. L'Institut Pasteur commercialise d'ailleurs des milieux prêts à l'emploi. En fonction de l'application, ils sont préparés soit à partir d'agars extraits de *Gelidium*, soit d'agars extraits de *Gracilaria*, dont les gels sont plus souples (Pérez, 1997).

Les agars peuvent également être utilisés pour l'immobilisation ou l'encapsulation de substances spécifiques, ces dernières pouvant alors diffuser à travers le gel (Rudolph, 1998).

3.1.3.5 – Autres applications

En cosmétologie, les agars servent d'excipient dans les dentifrices, ou encore de gélifiant dans les crèmes. Contrairement aux carraghénanes pouvant posséder des propriétés qui leur sont propres (hydratantes ou adoucissantes), les agars jouent plus un rôle de texturant dans les compositions cosmétiques.

En agriculture, les agars ont notamment un rôle de protection des semences en les enrobant. Enfin, mélangés à de la gélatine, ils permettent la fabrication de films ultra-sensibles, aux applications diverses (Pérez, 1997).

3.2 – Applications thérapeutiques en tant que principes actifs

Il est nécessaire de préciser que si le potentiel biomédical de ces molécules semble extrêmement prometteur, les applications thérapeutiques en tant que principes actifs relèvent encore du domaine de la recherche.

De plus, si les polysaccharides possèdent de nombreuses applications sous leur forme native de haut poids moléculaire, ils en ont peu en tant que molécules actives. En effet, il est nécessaire de les dépolymériser afin de perdre leurs propriétés rhéologiques, et en particulier leur viscosité, dans le but de pouvoir les utiliser sous forme d'oligosaccharides diffusibles au sein de l'organisme et des tissus.

3.2.1 - Les carraghénanes

Les carraghénanes peuvent également avoir des activités qui leur sont propres. Ainsi, dans le traitement des ulcères gastriques, ce sont les propriétés antipeptidiques et filmogènes des carraghénanes qui sont exploitées. Dans un premier temps, l'activité de la pepsine (enzyme gastrique qui digère les protéines) est fortement diminuée par complexation avec les carraghénanes, ce qui permet d'éviter l'amplification de la lésion. Les carraghénanes interviennent alors dans un deuxième temps pour panser la plaie (Pérez, 1997).

Ils présentent également des activités antivirales, notamment contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou celui de l'*Herpès*.

Ils sont reconnus pour prévenir voire inhiber le développement des infections virales sexuellement transmissibles (Carlucci *et al.*, 1997; Neushul, 1990; Schaeffer & Krylov, 2000; Yamada *et al.*, 1997). Ils apparaissent donc comme un éventuel remède dans le traitement du VIH (Phillips *et al.*, 1994), avec un mode d'action situé au niveau de la transcriptase inverse du virus (Nakashima *et al.*, 1987), ainsi qu'une faible toxicité.

Ils présentent également une action contre le virus de l'*Herpès*, en inhibant sa réplication (Caceres *et al.*, 2000; Carlucci *et al.*, 1997; 1999; Neushul, 1990).

Certains carraghénanes réduiraient également le pouvoir infectant du virus de l'hépatite A grâce à la présence de leurs esters sulfates (Girond *et al.*, 1991).

De même, leur structure interne (squelette carboné et groupements sulfate) leur permettrait de se lier à certains domaines de certains facteurs de croissance (en particulier ceux impliqués dans la prolifération des tumeurs), leur conférant ainsi des potentialités anticancéreuses (Hoffman, 1993; Hoffman & Paper, 1995).

Enfin, certains carraghénanes ont démontré des activités anticoagulantes ou antithrombiques (Caceres *et al.*, 2000; Carlucci *et al.*, 1997; Farias *et al.*, 2000).

Bien entendu, la position des groupements sulfate, la nature des liaisons ainsi que la conformation de la molécule jouent un rôle dans l'activité des carraghénanes (Shanmugan & Mody, 2000).

3.2.2 – Les agars

En ce qui concerne les activités thérapeutiques des agars, il s'agit surtout de propriétés antivirales, ces dernières restant très limitées par rapport à celles des carraghénanes. Cependant, il a été démontré que certaines espèces de *Laurencia* inhibent la réplication du virus de l'*Herpès*, mais restent sans effet sur le VIH (Hayashi *et al.*, 1996).

3.3 – Autres applications

Applications en biotechnologie des agars

Les agars peuvent être utilisés à des fins de séparation et de purification de composés, dans des techniques telles que l'électrophorèse, l'immunologie ou l'immobilisation des systèmes biologiques.

Dans le cas de l'électrophorèse, la séparation d'espèces chargées telles que les protéines par exemple, se fait en fonction de leur charge et de leur masse, à l'origine d'une vitesse de migration sur le gel différente, permettant ainsi la séparation des espèces.

Mais les agars peuvent également servir de matériel de base dans la réalisation de billes de chromatographie.

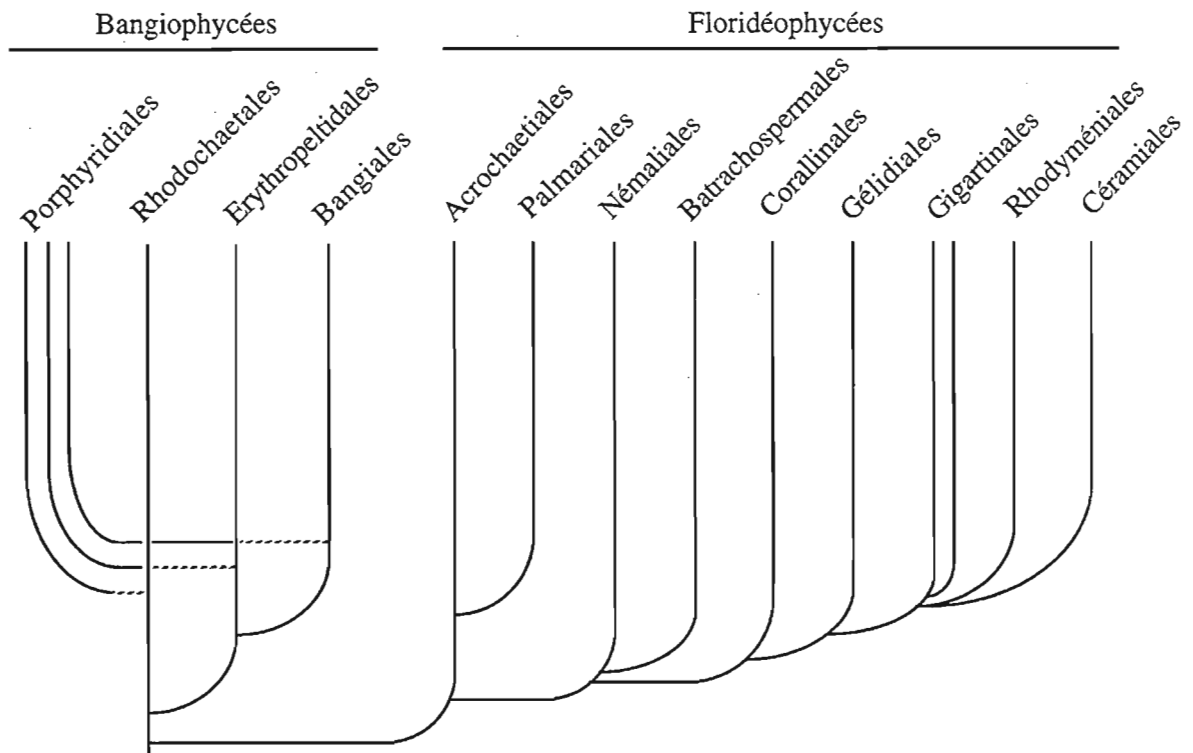


Figure 30 : Arbre phylogénétique des algues rouges (Van den Hoek *et al.*, 1995)

III– CAS PARTICULIER DE L’ALGUE ROUGE *ASPARAGOPSIS ARMATA*

Les algues sont des végétaux photosynthétiques répandus dans tous les milieux aquatiques, dont l’appareil végétatif simple (car ne comportant ni racines, ni tiges, ni appareil vasculaire feuillé) est appelé thalle. Ce thalle peut être unicellulaire ou pluricellulaire.

Au sein du règne végétal, les algues représentent les plus anciens organismes vivants, existant vraisemblablement depuis plus de trois milliards d’années (Painter, 1982). Elles ne peuvent cependant être assimilées à un ensemble homogène, et sont ainsi distribuées en quatre classes principales, basées notamment sur leur pigmentation.

Les Cyanophycées (ou algues bleues) seraient apparues les premières il y a environ 3,7 milliards d’années, suivies des Rhodophycées (algues rouges, 1,7 milliard d’années), des Chlorophycées (algues vertes, 1,3 milliard d’années) et des Phéophycées (algues brunes, 1,1 milliard d’année) (Pérez, 1997).

L’algue sur laquelle nos recherches ont porté, *Asparagopsis armata*, appartient à la classe des algues rouges.

1 - Taxonomie

Les algues rouges, ou Rhodophycées, sont très diversifiées et regroupent entre 5000 et 6000 espèces réparties dans environ 680 genres. Elles comprennent deux sous-divisions, les Bangiophycées, et les Floridéophycées dont l’organisation végétative (Van den Hoek *et al.*, 1995) est différente, les premières pouvant être qualifiées de « primitives ». (figure 30)

Asparagopsis armata Harvey (Harvey, 1855), est une algue rouge marine pluricellulaire, dont la taxonomie complète est la suivante :

Division : Rhodophyta
 Classe : Rhodophyceae
 Sous-classe : Florideophyceae
 Ordre : Bonnemaisoniales
 Famille : Bonnemaisoniaceae
 Genre : *Asparagopsis*
 Espèce : *Asparagopsis armata*



Figure 31 : Photos de l'algue rouge *Asparagopsis armata*

Semblable aux autres algues rouges, sa couleur est due à la présence de deux pigments présents dans les chloroplastes : la phycoyanine (bleu) et la phycoérythrine (rouge), qui masquent la couleur verte de la chlorophylle, et dont la proportion relative est à l'origine de la teinte caractéristique des thalles.

Son cycle de reproduction est complexe, semblable en cela à la plupart des algues rouges.

2 – Biologie

2.1 - Ecologie

Asparagopsis armata (figure 31) est une espèce originaire d'Australie, où elle a été découverte en 1855 par Harvey (Harvey, 1855).

Egalement présente en Nouvelle-Zélande et en Tasmanie, elle s'est naturalisée sur les côtes européennes par le biais du Canal de Suez depuis les années 1920.

C'est ainsi que son aire de répartition s'est étendue des côtes algériennes où elle fut décrite dès 1923 aux côtes françaises méditerranéennes (Hamel, 1927) et atlantiques (Sauvageau, 1925), jusque dans les îles britanniques (De Valéra, 1942).

Sa présence est constatée sur l'île d'Ouessant dès 1936 par Chemin (Feldmann & Feldmann, 1942).

2.2 – Cycle de reproduction

La reproduction des algues est à la fois sexuée et asexuée. La reproduction sexuée fait appel à des cellules spécialisées, les gamètes, qui fusionnent pour donner naissance à un œuf appelé zygote. La reproduction asexuée, quant à elle, s'effectue à l'aide de spores, cellules qui ne fusionnent pas mais donnent directement naissance à un autre individu.

Dans la majorité des cas, la descendance d'un individu comporte une succession de générations alternativement gamétophytiques (thalles producteurs de gamètes) et sporophytiques (thalles producteurs de sporophytes), morphologiquement semblables (cycle isomorphe) ou non (cycle hétéromorphe).

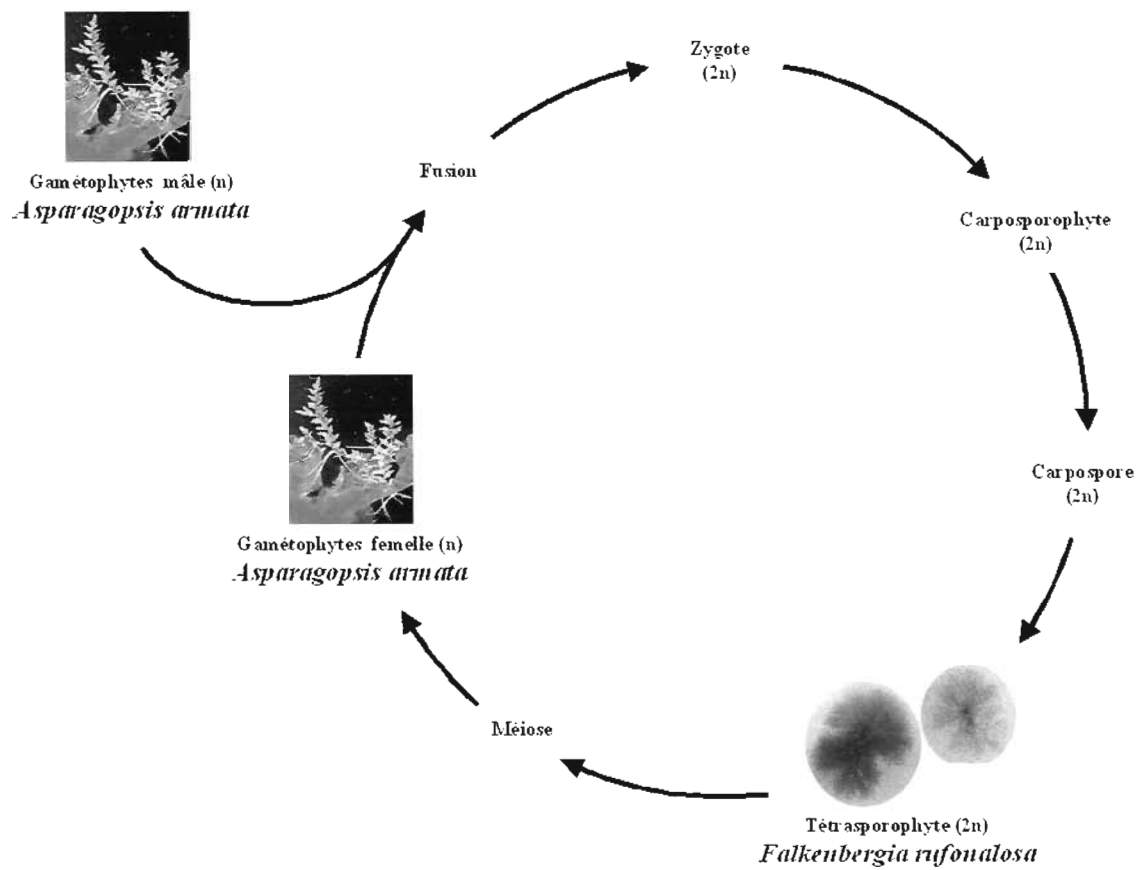


Figure 32 : Cycle de reproduction d'*Asparagopsis armata*

La plupart des algues rouges sont réputées pour posséder un cycle de développement particulièrement complexe.

Dans le cas d'*Asparagopsis*, la reproduction se fait suivant un cycle **trigénétiq**ue (alternance de trois générations) :

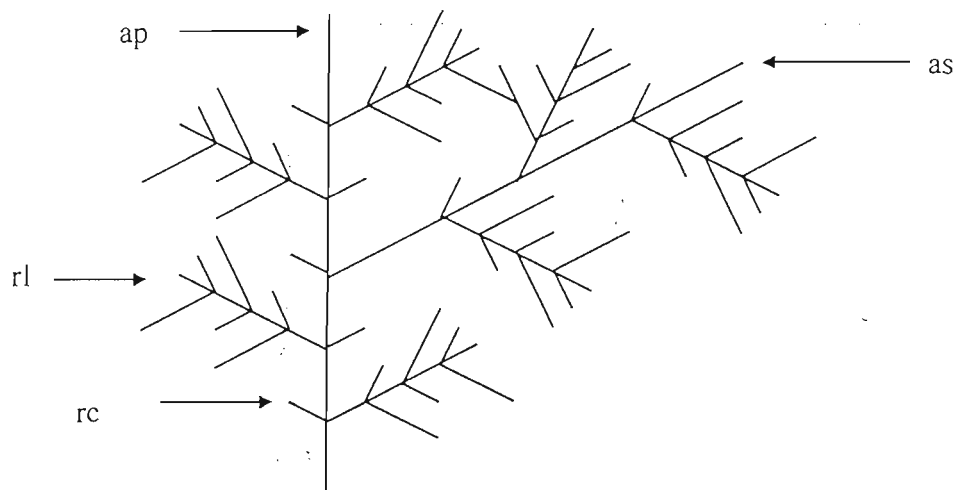
La première génération est sexuée, et se présente sous forme de gamétophytes à n chromosomes (haploïdes). Le gamète femelle demeure hébergé par le gamétophyte et l'œuf issu de la fécondation engendre, sur le gamétophyte porteur, une génération parasite à développement réduit : le carposporophyte (deuxième génération, asexuée) (Cabioc'h *et al.*, 1992). Ce carposporophyte à $2n$ chromosomes formera des carpospores qui germeront pour donner la troisième génération, ou tétrasporophyte, diploïde, et qui fournit des spores (tétraspores) dont le développement générera à nouveau des gamétophytes.

Dans notre cas, le cycle est trigénétique **hétéromorp**he, le tétrasporophyte étant très différent des gamétophytes (figure 32). L'algue *Asparagopsis armata* représente la phase gamétophyte d'*Asparagopsis*, alors que *Falkenbergia rufonala* est la génération tétrasporophytique de cette algue. Ces deux générations sont dissemblables morphologiquement, ce qui est à l'origine de leur appellation différente, puisque pendant longtemps elles ont été prises pour des espèces distinctes.

Enfin, il existe un autre type de propagation de l'espèce *Asparagopsis*. Il s'agit de la multiplication végétative qui consiste à générer, à partir d'une partie du thalle qui se détache et se fixe ailleurs, un nouvel individu.

2.3 – Cytologie

Asparagopsis armata, phase gamétophytique d'*Asparagopsis*, est une espèce annuelle. Cette algue photophile se développe au niveau de l'infralittoral supérieur, entre la surface et dix mètres de profondeur, dans des zones modérément battues (mode abrité) (Cabioc'h *et al.*, 1992). Elle est le plus souvent épiphyte d'autres algues, et colonise facilement les substrats artificiels.



rc : rameaux courts
rl : rameaux longs
as : axes secondaires
ap : axe principal

Figure 33 : Ramification du thalle chez *Asparagopsis armata* (Bonin & Hawkes, 1987)

Son thalle se présente sous forme de touffes roses au contour pyramidal, de 15 à 30 cm de long. Il est ramifié et est constitué par une alternance de rameaux longs à croissance indéfinie, de rameaux courts, encore appelés brachyblastes, et de rameaux épineux, en forme de « harpon », par l'intermédiaire desquels les frondes d'*Asparagopsis armata* s'accrochent aux algues environnantes. Ces deux derniers rameaux ont une croissance limitée (figure 33).

Les rameaux longs naissent à partir d'une cellule initiale terminale (apicale) qui génère une file de cellules axiales très allongées constituant le filament axial. La structure du thalle uniaxiale est donc formée par un tube creux, constitué par ce filament axial (fa) et limité par un cortex cellulaire dense (c) (Feldmann & Feldmann, 1939).

La ramification des rameaux longs est générée par le cloisonnement oblique des cellules axiales, donnant naissance à deux cellules périaxiales opposées. Chacune va alors générer un filament axial latéral (fal) qui va se développer soit en rameaux courts pour l'un, soit en un nouveau rameau long à croissance indéterminée ou axe secondaire pour l'autre, ce dernier ressemblant à l'axe principal (Bonin & Hawkes, 1987; Feldmann & Feldmann, 1939; Womersley, 1996) (figure 34).

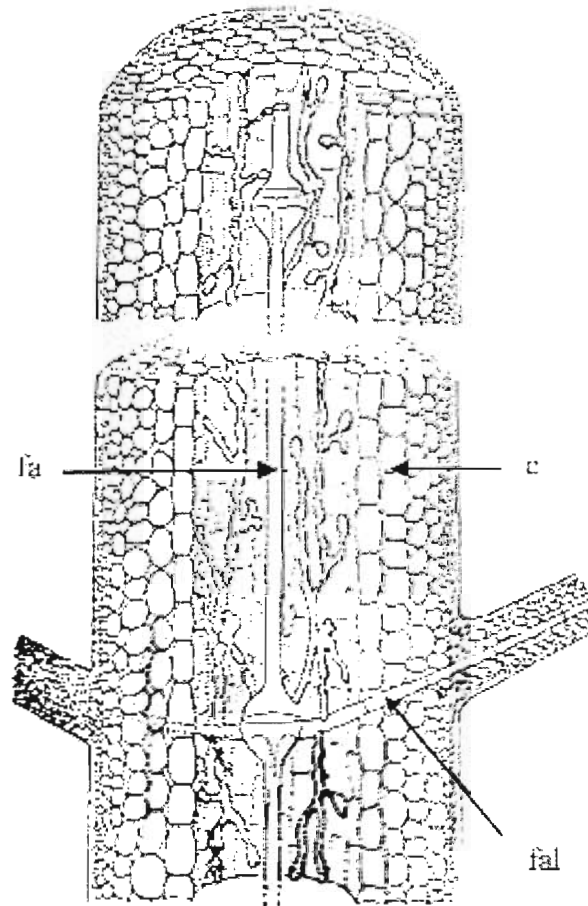
Les rameaux courts (brachyblastes), quant à eux, ont une structure plus simple (Feldmann & Feldmann, 1942). Ils sont formés d'une seule file de cellules qui se divisent ensuite par des cloisons parallèles à l'axe du rameau pour donner naissance à une cellule centrale étroite (axe du brachyblaste) et à trois cellules plus larges entourant le filament axial et constituant les cellules péricentrales. Ces dernières ne sont pas disposées toutes les trois au même niveau, mais alternent régulièrement.

Enfin, les rameaux épineux sont généralement disposés par paire à la base des axes secondaires, et sont produits par des cellules axiales successives. Leur structure est identique à celle des rameaux longs, mais ils sont assimilés à des rameaux à croissance définie.

3 – Applications d'*Asparagopsis armata*

3.1 – Les iodures

Une particularité structurale du gamétophyte d'*Asparagopsis* est liée à la présence de cellules particulières, appelées cellules sécrétrices ou iodures, et décrites par Sauvageau dès



fa : filament axial
fal : filament axial latéral
c : cortex dense

Figure 34 : Structure d'un axe adulte d'*Asparagopsis armata* (Feldmann & Feldmann, 1945)

1925 (Sauvageau, 1925). Ces petites cellules sécrétrices (Figure 35), enchâssées dans la grande cellule péricentrale des brachyblastes (Feldmann & Feldmann, 1942) renferment des composés organiques halogénés volatiles non seulement iodés (d'où leur nom de ioduques), mais aussi chlorés et bromés (Bruneau *et al.*, 1978; Codomier *et al.*, 1977; 1983; Combaut *et al.*, 1978; McConnell & Fenical, 1977), à l'origine des propriétés antibactériennes et antifongiques de l'algue (Biard *et al.*, 1980). Notons que la composition chimique des ioduques est liée très étroitement aux conditions climatiques, aux phases du cycle biologique de l'algue, à l'éclairement, etc...(Bruneau, 1977).

Un extrait conservant les propriétés spécifiques de l'algue a été développé par la Société Algues et Mer, et est commercialisé soit à des fins de protection des formules cosmétiques, limitant ainsi l'emploi de conservateurs chimiques, soit en tant que produit actif dans les formulations cosmétiques, grâce à son action sur certaines souches bactériennes ou certaines levures (Moigne, 1996).

3.2 – Les polysaccharides pariétaux d'*Asparagopsis armata*

Les polysaccharides pariétaux d'*Asparagopsis armata* n'ont jamais été étudiés à des fins alimentaires. En effet, la faible abondance naturelle de cette algue comparée aux autres algues rouges sources de carraghénanes (Eucheuma, Gigartinales), ou d'agars (Gelidiales, Gigartinales ou Cérariales), associée à la découverte d'activités biologiques pour ces derniers dès les années 80 ont orienté très tôt les recherches vers des applications biomédicales.

Ainsi, des propriétés anticoagulantes ont été mises en évidence pour ces polysaccharides au début des années 80 (Carporiccio *et al.*, 1983; 1984), et une activité significative sur la stimulation lymphocytaire a également été démontrée par Braun *et al.* pendant cette même période (Braun *et al.*, 1983).

Une étude plus récente a également démontré des activités antivirales prometteuses contre le virus de l'Herpès ou encore le VIH (Haslin *et al.*, 2001).

Pendant longtemps la recherche pharmaceutique a été orientée par la synthèse chimique, mais l'accent mis sur les produits d'origine végétale constitue une opportunité pour les algues, et notamment pour *Asparagopsis armata*.

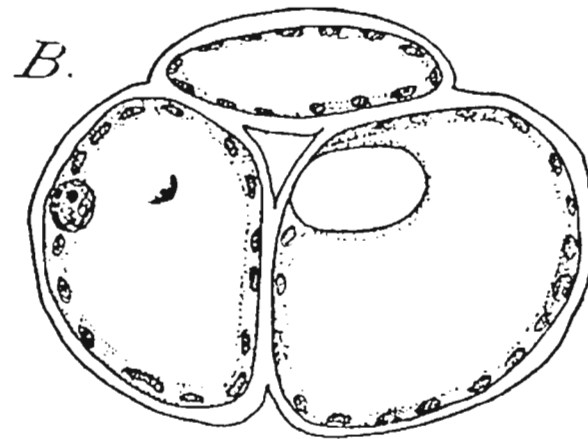


Figure 35 : Coupe transversale d'un brachyblaste d'*Asparagopsis armata* (Feldmann & Feldmann, 1942)

CHAPITRE 1 : ETUDE STRUCTURALE DES POLYSACCHARIDES NATIFS

I – INTRODUCTION

L'étude de la structure des polysaccharides de l'algue *Asparagopsis armata* doit être réalisée sur du matériel le plus pur possible, ce qui nécessite des étapes de purifications préalables.

La caractérisation chimique de ces polysaccharides consiste principalement en la détermination de leur structure primaire.

Cette approche structurale repose dans un premier temps sur l'évaluation de leur composition globale par le biais de dosages colorimétriques. Ainsi, les proportions d'oses neutres, d'acides uroniques mais aussi de groupements sulfate ou de protéines seront estimées à travers cette méthode.

Une caractérisation plus précise des résidus glycosidiques ainsi que de leurs substituants est alors réalisée, basée sur l'emploi de techniques chromatographiques en phase gazeuse ou spectroscopiques (Infra-Rouge et Résonance Magnétique Nucléaire). La nature des unités saccharidiques (glucose, galactose...) ainsi que leurs proportions relatives, et l'identification des positions impliquées dans les liaisons glycosidiques sont ainsi évaluées au cours de dosages par chromatographie en phase gazeuse couplée ou non à de la spectrométrie de masse.

La configuration des résidus (D ou L), ainsi que la nature et les sites de liaisons d'éventuels substituants, ou encore la masse moyenne du polymère sont autant d'éléments essentiels à la connaissance de sa structure.

Enfin, la séquence des résidus osidiques au sein de la chaîne polysaccharidique, déterminée principalement par RMN, est nécessaire dans le but de connaître la nature de l'unité répétitive du polysaccharide, à l'origine des propriétés spécifiques de ces derniers.

Les techniques analytiques employées, utilisées dans tous les chapitres de la thèse sont décrites dans cette partie.

Les matériels et méthodes spécifiques de chaque chapitre sont décrits dans les chapitres correspondants.

II – MATERIEL ET METHODES

1 - Obtention des polysaccharides

1.1 – Culture de l'algue *Asparagopsis armata*

L'*Asparagopsis armata* ne se trouvant pas en quantité suffisante à l'état naturel, il a été nécessaire d'élaborer une technique de culture afin de disposer de quantités importantes, tout en assurant l'obtention d'une algue de qualité homogène.

Un procédé de culture breveté (Exsymol *et al.*, 1995) mis au point par la société Algues et Mer, consiste en une technique de micro bouturage en pleine mer, permettant la multiplication végétative de l'espèce.

En effet, la mise en culture des rameaux à harpons de l'algue permet l'obtention de frondes toute l'année. Cette multiplication végétative permet ainsi de générer relativement rapidement des individus de taille correcte (Codomier *et al.*, 1977).

De plus, la proximité du site d'extraction par rapport au site de culture en pleine mer situé au large de l'île d'Ouessant, permet une conservation optimale de la qualité de la matière première.

1.2 – Extraction des polysaccharides

1.2.1 - Extraction préliminaire

La culture de l'*Asparagopsis armata* est effectuée dans le but de réaliser des extraits aqueux à partir de cette algue, extraits qui conservent les activités antibactériennes et antifongiques de l'algue, et commercialisés sous le nom d' « Ysaline » par la société Algues et Mer.

Ces extraits sont obtenus par congélation lente de la matière fraîche, ce qui permet à l'eau libre contenue dans les cellules de cristalliser sous forme de cristaux volumineux,

entraînant ainsi un début d'éclatement de ces cellules. La libération du contenu des cellules est achevée par un broyage fin de la matière première (Cutter Hellijoly, capacité 120 L, vitesse rotation bol : 800 tours/min, vitesse rotation lames : 1500 tours/min), suivi d'une macération dans de l'eau filtrée (0,45 μm) à température ambiante pendant 8 à 10 jours, après acidification du milieu (pH = 3,5) par ajout d'acide citrique.

L'ensemble subit alors une filtration préliminaire par passage sur un tamiseur vibrant (Sweco séparateur, modèle LS30S6G, grille de 100 μm), avant d'éliminer les particules résiduelles par passage sur un filtre-pressé (VELO S.p.A., F. FECCIA, Italie, 40*40, 1988), comportant 40 plateaux verticaux (surface filtrante : 12,8 m^2). Le débit de 900 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ est assuré par une pompe à piston (Lafert, 80S4). Les terres filtrantes employées pour ce type de séparation sont des minerais de perlite (Clarcel, Flo/M). La taille des particules à éliminer nécessite la formation préliminaire d'une précouche constituée par ce même type de terres filtrantes.

L'extrait récupéré est alors clarifié par microfiltration tangentielle (seuil de clarification : 1,4 μm), au Laboratoire de Recherches de Technologie Laitière, à l'INRA de Rennes. Le perméat ainsi récupéré est nommé « Ysaline ».

Le co-produit de fabrication de cette gamme « Ysaline », à savoir le broyat d'algue issu du passage sur le tamiseur vibrant, est récupéré et de nouveau extrait de manière à obtenir les polysaccharides.

1.2.2 - Extraction des polysaccharides

500 kg de ce broyat d'algues sont mélangés à une quantité équivalente d'eau filtrée (0,45 μm), exempte de bactéries (stérilisateur UV sous pression de type Protec L-MS 86 inox).

Le tout est placé dans une cuve à double enveloppe chauffante de 1430 L comportant une double hélice (vitesse de rotation : 80 tours/min), et chauffé à 70°C pendant 6 heures après neutralisation du milieu par de la soude (NaOH, 0,3 M).

Comme dans le cas de l' « Ysaline », l'ensemble subit en fin de réaction une première filtration par passage sur le tamiseur vibrant (grille de 100 μm), avant d'éliminer les particules

résiduelles par passage sur le filtre-presse. Là encore, la finesse des particules à éliminer nécessite la formation préliminaire d'une précouche.

Le filtrat ainsi obtenu est alors concentré par passage sur un module d'ultrafiltration (DDS RO, Danemark, Membranes de type GR 6 en polysulfone, surface de 9 m², seuil de clarification : 10 000 Da), et recirculation du rétentat.

Après une étape de diafiltration permettant d'éliminer les molécules résiduelles du rétentat inférieures à 10 000 Da, le volume final du rétentat concentré correspond environ au dixième du volume initial introduit. C'est à partir de ce rétentat concentré que seront extraits les polysaccharides.

Pour ce faire, on y ajoute au préalable du chlorure de sodium à raison de 0,8% p/p afin d'augmenter la force ionique du milieu et de faciliter la précipitation des polysaccharides.

Après dissolution, 2 volumes d'éthanol (90% vol.) par volume d'extrait sont ajoutés sous agitation, entraînant la précipitation des polysaccharides.

Ces derniers sont récupérés par centrifugation (5000 G, 10 min), repris dans de l'alcool (éthanol 90%), à nouveau centrifugés et séchés pendant 2 heures à 60°C.

S'ensuit une étape de broyage suivie d'un passage sur le tamiseur vibrant (grille 100 µm), à l'issue de laquelle une poudre marron clair contenant des polysaccharides de granulométrie homogène est obtenue.

Le rendement d'extraction est alors calculé comme étant le rapport de la masse de polysaccharides séchés sur la masse d'algue sèche introduite au départ (sachant que notre broyat de départ ne comporte que 10% d'extrait sec).

1.2.3 - Purification des polysaccharides

Les polysaccharides ainsi obtenus sont repris dans de l'eau milli-Q, puis dialysés 2 jours contre de l'eau milli-Q (membrane de dialyse Spectra/Por 1, seuil de coupure : 6-8,000 Da).

La solution est alors centrifugée pendant 2 heures à 20 000 G (Jouan, KR 22 *i*), et le surnageant lyophilisé.

2 – Analyse chimique des polysaccharides. Dosage et identification des résidus glycosidiques

2.1 – Composition totale

Les teneurs en oses neutres, acides uroniques, protéines et sulfates sont déterminés par des dosages colorimétriques. Le taux de sulfates est également déterminé par analyse élémentaire au service de microanalyse du CNRS de Gif sur Yvette.

Les mesures d'absorbance ont toutes été réalisées sur un spectrophotomètre UVIKON 930 (KONTRON Instruments), dont la gamme de longueur d'onde est comprise entre 190 et 900 nm, et présentant une gamme linéaire de mesure jusqu'à 2,3 uDO.

2.1.1 – Dosages des acides uroniques (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991)

Principe :

La quantité d'acides uroniques est déterminée par le dosage colorimétrique mis au point par Blumenkrantz et Asboe-Hansen (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973) modifié par Filisetti-Cozzi et Carpita (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991). Ce dosage emploie le meta-hydroxydiphényl (MHDP). L'ajout de sulfamate de potassium permet de limiter les interférences dues aux monosaccharides neutres.

Les solutions développent une coloration rose lue à 525 nm.

Réactifs :

- Acide D-galacturonique
- H₂O milli-Q
- Solution de sulfamate de potassium 4 M à pH 1,6, réalisée en dissolvant 7,76 g d'acide sulfamique dans 10 mL d'eau distillée, et en ajustant le pH à l'aide de KOH 10 M, avant de compléter la solution à 20 mL

- Solution de tétraborate de sodium 75 mM dans l'acide sulfurique concentré (réalisée la veille, et agitée une nuit à température ambiante)
- Solution de meta-hydroxydiphényl (MHDP) à 0,15 % dans NaOH à 0,5 % (conservée à 4°C)

Protocole :

100 et 200 μL de la solution de polysaccharides à doser (contenant respectivement 100 et 200 μg de polysaccharides) sont introduits dans des tubes en verre. Le volume est complété à 400 μL à l'aide d'eau milli-Q.

40 μL de la solution de sulfamate de potassium, ainsi que 2,4 mL de la solution sulfurique de tétraborate de sodium sont ajoutés. Les tubes sont agités au vortex, puis placés au bain-marie à 100°C pendant 20 minutes.

Les tubes sont alors refroidis dans de la glace, et 80 μL de la solution de MHDP sont ajoutés. Après agitation, les tubes sont laissés au repos à température ambiante pendant 10 minutes, et l'absorbance de chaque solution est lue à 525 nm.

L'étalonnage est effectué en prélevant 25 à 200 μL d'une solution d'acide D-galacturonique (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), que l'on complète à 400 μL avec de l'eau milli-Q, et traités dans les mêmes conditions.

2.1.2 – Dosage des oses neutres (Rimington, 1931)

Principe :

La quantité d'oses neutres est déterminée par le dosage colorimétrique mis au point par Tillmans et Philippi (Tillmans & Philippi, 1929) modifié par Rimington (Rimington, 1931). Ce dosage emploie l'orcinol sulfurique comme réactif.

L'utilisation d'acide sulfurique concentré génère une hydrolyse des liaisons osidiques, ainsi qu'une déshydratation des monosaccharides en dérivés furfural, substances chromogènes, dont la présence est observée à 510 nm.

Réactifs :

- D-galactose
- H₂O milli-Q
- Solution d'orcinol sulfurique préparée à partir de 1,5 g d'orcinol (3,5-dihydroxytoluène) dissous dans 100 mL d'acide sulfurique H₂SO₄ concentré (96%). (conservée à 2°C)
- Solution d'acide sulfurique à 60%

Protocole :

100 et 200 µL de la solution de polysaccharides à doser (contenant respectivement 100 et 200 µg de polysaccharide) sont introduits dans des tubes en verre. Le volume est complété si nécessaire à 200 µL à l'aide d'eau milli-Q.

400 µL de la solution d'orcinol sulfurique, ainsi que 3 mL d'acide sulfurique à 60 % sont ajoutés. Les tubes sont agités au vortex, puis placés au bain-marie à 80°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, ils sont placés à l'obscurité pendant 45 minutes, puis l'absorbance de chaque solution est lue à 510 nm (développement d'une couleur orangée).

L'étalonnage est effectué en prélevant 20 à 200 µL d'une solution de D-galactose (1 mg.mL⁻¹), que l'on complète si nécessaire à 200 µL, et traités dans les mêmes conditions.

La présence d'acides uroniques en quantité non négligeable peut interférer avec ce dosage, il est alors nécessaire d'introduire un terme de correction.

Il s'agit d'une formule correctrice (Montreuil & Spik, 1963), où les pourcentages en masses des oses neutres (m_N) et des acides uroniques (m_A) sont déterminés par la résolution d'un système de deux équations à deux inconnues :

$$\alpha = m_N X (a/200) + m_A X (b/200)$$

$$\beta = m_N X (d/200) + m_A X (c/50)$$

où : α est l'absorbance des solutions à doser par la méthode de l'orcinol sulfurique

β est l'absorbance des solutions à doser par la méthode au MHD

a est l'absorbance de 200 µg de la solution standard de D-galactose par l'orcinol sulfurique

b est l'absorbance de 200 µg de la solution standard d'acide D-galacturonique par l'orcinol sulfurique

c est l'absorbance de 50 µg de la solution standard d'acide D-galacturonique par MHDP

d est l'absorbance de 200 µg de la solution standard de D-galactose par MHDP.

2.1.3 – Dosage des protéines (Smith *et al.*, 1985)

Principe :

En milieu alcalin, les protéines réduisent le cuivre (II) en cuivre (I) qui peut alors former un complexe avec l'acide bicinchoninique (BCA) de couleur pourpre, dont l'absorbance à 562 nm est directement proportionnelle à la concentration en protéines.

Le dosage est effectué à l'aide d'un Kit de dosage (Bicinchoninic acid protein assay kit, Sigma).

Réactifs :

- Solution d'acide bicinchoninique (BCA) (acide bicinchoninique, carbonate de sodium, tartrate de sodium, bicarbonate de sodium dans solution de NaOH 0,1 M (pH = 11,25))
- Solution 4 % (p/v) de sulfate de cuivre (CuSO₄, 5H₂O)
- Solution standard de protéines (bovine serum albumine) 1 mg.mL⁻¹

Protocole :

Le réactif est préparé extemporanément par ajout de 50 mL de la solution de BCA à 1 mL de la solution de sulfate de cuivre.

A 100 µL de la solution de polysaccharides aux concentrations de 5 mg/mL et 10 mg/mL sont ajoutés 2 mL de réactif.

Le mélange est agité et placé dans un bain-marie à 37°C. Après refroidissement, l'absorbance est lue à 562 nm.

Chaque essai est doublé.

L'étalonnage est effectué en prélevant 10 à 50 µL d'une solution standard de protéines (1 mg.mL⁻¹), que l'on complète à 100 µL avec de l'eau milli-Q, et traités dans les mêmes conditions.

2.1.4 – Dosage des sulfates par turbidimétrie (Craigie *et al.*, 1984)

Principe :

Les ions sulfates du polysaccharide sont libérés au cours d'une hydrolyse chlorhydrique, et vont former, en présence de chlorure de baryum, un précipité de sulfate de baryum (maintenu en suspension par la gélatine), dont l'apparition est suivie en spectrophotométrie à 550 nm.

Réactifs :

- Chlorure de Baryum (BaCl₂) / Gélatine : 600 mg de gélatine sont dissous dans 200 mL d'eau osmosée portée à 60-70°C. La solution est refroidie puis mise à 4°C pendant 16 heures. Elle est ensuite réchauffée 1 à 2 heures à température ambiante, et 2 g de BaCl₂.2H₂O sont ajoutés (réactif stable un mois).
- Solutions d'acide chlorhydrique HCl 0,5 N et 2 N
- Solution de sulfate de potassium (K₂SO₄) réalisée en dissolvant 0,545 g de K₂SO₄ dans 100 mL d'eau osmosée (concentration en sulfate de 3 mg/mL)

Protocole :

10 mg de polysaccharides lyophilisés sont hydrolysés par 0,5 mL d'acide chlorhydrique 2 N pendant 2 heures à 100°C dans un tube en verre hermétiquement fermé. L'hydrolysate et les rinçages du tube sont portés à 10 mL dans une fiole jaugée, puis centrifugés à 5 000 G pendant 10 minutes.

L'étalonnage est effectué à partir de la solution de K_2SO_4 , en prélevant de 10 à 200 μL (soit 30 à 600 μg d'ions SO_4^{2-}), que l'on complète à 1 mL.

Le dosage turbidimétrique est réalisé en plaçant dans un tube :

- 1 mL de surnageant (ou de solution étalon)
- 9 mL d'eau osmosée
- 1 mL d'HCl 0,5 N
- 0,5 mL de réactif $BaCl_2$ / Gélatine

Le tube est laissé 30 min à température ambiante, agité, et l'absorbance est lue à 550 nm contre un blanc.

La teneur en sulfates du polysaccharide est déterminée par rapport aux absorbances mesurées de la courbe étalon.

L'exactitude du dosage est vérifiée par l'emploi d'un polysaccharide dont la teneur en sulfate est connue exactement, traité dans les mêmes conditions.

2.1.5 – Dosage des 3,6-anhydrogalactoses (Yaphe & Arsenault, 1965)

Principe :

La méthode colorimétrique la plus reproductible pour doser les 3,6-anhydrogalactoses est celle qui emploie un réactif à base de résorcinol.

La coloration rose qui se développe au cours de la réaction est alors suivie à 555 nm.

Réactifs :

- Solution d'acétal préparée en diluant 1 mL d'acétal dans 100 mL d'eau milli-Q (stable environ 1 mois)
- Solution de résorcinol préparée par dilution de 150 mg de résorcinol dans 100 mL d'eau milli-Q (stable 7 jours, à l'abri de la lumière).
- Acide chlorhydrique 10 N

- D-fructose

Protocole :

50 et 100 μL de la solution de polysaccharides à doser (contenant au maximum 20 μg de 3,6-anhydrogalactose) sont introduits dans des tubes en verre. Le volume est complété à 200 μL à l'aide d'eau milli-Q.

Le réactif au résorcinol est préparé de façon extemporanée en ajoutant à 100 mL d'HCl 10 N, 9 mL de la solution de résorcinol et 1 mL de la solution d'acétal diluée au 1/25. Ce réactif n'est stable que 3 heures dans une bouteille teintée.

Aux 200 μL de la solution de polysaccharides à doser sont ajoutés 1 mL du réactif au résorcinol.

Après agitation, les tubes sont laissés au repos pendant 4 minutes, puis placés dans un bain-marie à 80°C pendant 10 minutes. Ils sont ensuite transférés dans un bain de glace pendant 1 minute 30, et l'absorbance doit être lue dans les 15 minutes qui suivent la réaction à 555 nm.

Des solutions standards contenant 1 à 7 mL d'une solution aqueuse de D-fructose (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) complétées à 10 mL avec de l'eau milli-Q sont réalisées.

En effet, il a été démontré (Yaphe & Arsenault, 1965), que les courbes d'absorbance à 555 nm en fonction de la concentration en monosaccharide sont identiques aussi bien pour le D-fructose que pour le 3,6-anhydrogalactose. Ce premier est donc choisi comme étalon en raison de sa disponibilité.

L'étalonnage est ainsi effectué à partir de 200 μL de ces solutions standards, traités dans les mêmes conditions que les échantillons.

2.1.6 – Dosage des groupements pyruvate

Principe :

La quantité de groupements pyruvate est déterminée par le dosage colorimétrique mis au point par Sloneker et Orentas (Sloneker & Orentas, 1962).

La libération de l'acide pyruvique au cours d'une hydrolyse acide est suivie par un dosage colorimétrique au cours duquel l'acide se condense avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine.

Réactifs :

- Solution d'acide chlorhydrique 1 N
- Acide pyruvique
- Solution de 2,4-dinitrophénylhydrazine 0,5% (357 mg de 2,4-dinitrophénylhydrazine 70% dans 50 mL d'acide chlorhydrique 2 N)
- Acétate d'éthyle
- Solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 10%
- H_2O milli-Q

Protocole :

5 mg de polysaccharides sont placés dans un tube en verre et sont hydrolysés par 1 mL d'acide chlorhydrique 1 N, pendant 3 heures à 100°C dans un bain à sec.

200 μL d'hydrolysats sont introduits dans des tubes en verre. 100 μL de la solution de 2,4-dinitrophénylhydrazine sont ajoutés, le mélange est agité puis laissé au repos 5 minutes. 500 μL d'acétate d'éthyle sont alors additionnés au mélange, puis, après agitation, la phase aqueuse est éliminée.

L'acide pyruvique est extrait de la phase organique 3 fois par 1 mL de la solution de Na_2CO_3 , les phases aqueuses sont regroupées et complétées à 8 mL avec la même solution.

L'absorbance est alors mesurée à 375 nm.

L'étalonnage est effectué en prélevant 5 à 200 μL d'une solution d'acide pyruvique (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), que l'on complète si nécessaire à 200 μL , et traités dans les mêmes conditions.

2.2 – Identification et dosages des résidus glycosidiques

2.2.1 - Analyse des résidus glycosidiques sous forme de dérivés triméthylsilylés

Principe :

Cette analyse nécessite une dépolymérisation préalable des polysaccharides afin de libérer les résidus glycosidiques. Cette dépolymérisation est effectuée par le biais d'une méthanolyse, et les résidus glycosidiques générés sont alors transformés en méthylglycosides O-triméthylsilylés selon la méthode de Kamerling *et al.* (Kamerling *et al.*, 1975) modifiée par Montreuil *et al.* (Montreuil *et al.*, 1986) afin d'être analysés par chromatographie en phase gazeuse.

Chaque monosaccharide est alors identifié par comparaison de ses temps de rétention relatifs (par rapport à un étalon interne), avec ceux de monosaccharides purs traités dans les mêmes conditions. De même, un coefficient de réponse est calculé pour chaque monosaccharide par rapport à ce même étalon interne, afin de définir la proportion de chacun au sein du polysaccharide.

Il est nécessaire de préciser que les différents pics obtenus pour chaque monosaccharide correspondent en réalité aux formes anomériques α et β des conformations pyranose et furanose. Cet équilibre tautomérique en solution étant plus ou moins déplacé vers une forme plutôt qu'une autre, tous les pics d'un même monosaccharide ne seront pas forcément visibles.

Réactifs :

- Monosaccharides standards: D-galactose, D-xylose, D-glucose...
- H₂O milli-Q
- Méthanol chlorhydrique (MeOH/HCl) 0,5 N et 3 N (Supelco)
- myo-Inositol
- Méthanol
- Pyridine anhydre (Sigma)

- Bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide : triméthylchlorosylane (BSTFA : TMCS) 99 : 1 (Sylon BFT, Supelco)
- Dichlorométhane

Protocole :

500 mL de MeOH/HCl 2 N (réalisés par mélange de 3 mL de méthanol chlorhydrique 3 N et 2 mL de méthanol chlorhydrique 0,5 N) sont ajoutés à 250 µg de polysaccharides lyophilisés en présence de 50 µg de myo-Inositol (étalon interne).

Chaque échantillon (standard ou polysaccharide) est réalisé en triplicata.

Les tubes hermétiquement fermés sont placés dans un bain à sec réglés à 80°C, pendant 16 heures. Après refroidissement, le méthanolysat est évaporé sous jet d'azote et neutralisé par co-évaporations successives avec du méthanol avant d'être ramené à sec sous jet d'azote.

Les méthylglycosides obtenus sont alors triméthylsilylés par ajout de 50 µL de pyridine et de 50 µL de Sylon. Le mélange réactionnel est laissé au moins 2 heures à température ambiante, puis les réactifs en excès sont évaporés sous jet d'azote.

Les méthylglycosides triméthylsilylés sont repris dans 500 µL de dichlorométhane pour l'injection en chromatographie en phase gazeuse.

L'appareil de chromatographie est un GC 8000 (Fisons) équipé d'un système d'injection automatique « on-column », d'un détecteur à ionisation de flamme (porté à 300°C), d'une colonne capillaire apolaire en silice fondue CP-SIL-5CB (0,32 mm x 60 m, Chrompack). Le gaz vecteur est l'hydrogène, et le programme de montée en température dédié à l'identification des méthylglycosides triméthylsilylés est le suivant : 50°C maintenus pendant 1 min, suivi d'un gradient de 20°C/min jusqu'à 120°C, puis d'un gradient de 2°C/min jusqu'à 240°C maintenus 3 min suivi enfin d'un gradient de 20°C/min jusqu'à 280°C maintenus pendant 5 min.

2.2.2 - Analyse des oses neutres sous forme d'acétates d'alditols

Principe :

Après hydrolyse des polysaccharides, les monosaccharides neutres libérés sont dérivés et identifiés sous forme d'acétates d'alditols par chromatographie en phase gazeuse.

L'hydrolyse est une hydrolyse réductrice (Stevenson & Furneaux, 1991) qui fait intervenir un réducteur, le 4-Méthyl-Morpholine-Borane (4-MMB), évitant ainsi la dégradation des oses sensibles à l'hydrolyse acide tels que le 3,6-anhydrogalactose.

Les oses neutres sont alors réduits en alditols, puis acétylés selon la méthode de Harris *et al.* (Harris *et al.*, 1984) afin d'obtenir des acétates d'alditols séparés par chromatographie en phase gazeuse.

L'identification s'effectue par comparaison des temps de rétention relatifs à un étalon interne, avec ceux d'oses standards traités dans les mêmes conditions.

Comme dans le cas du dosage des monosaccharides sous forme de dérivés triméthylsilylés, des coefficients de réponse sont calculés pour chaque monosaccharide par rapport à ce même étalon interne, afin de définir la proportion de chacun au sein du polysaccharide.

Cette méthode a l'avantage par rapport à la triméthylsilylation de faire apparaître chaque monosaccharide sous forme d'un pic unique, car réduit, levant ainsi toute ambiguïté sur leur identification, et surtout de ne pas dégrader les 3,6-anhydrogalactoses, qui peuvent alors être identifiés et dosés.

Réactifs :

- Monosaccharides standards: D-galactose, D-xylose, D-glucose, Erythritol et 3,6-anhydrogalactose
- H₂O milli-Q
- 4-Méthyl-Morpholine-Borane (4-MMB)
- Acide trifluoroacétique (TFA) 6 N et 4 N
- Acétonitrile

- Acétate d'éthyle
- Anhydride acétique
- Acide perchlorique 70%
- 1-Méthylimidazole
- Dichlorométhane

Protocole :

Des solutions d'oses standards à la concentration de 5 mg.mL^{-1} sont réalisées dans une solution d'érythritol à 5 mg.mL^{-1} . 10 mg de polysaccharides sont dissous dans 1 mL de la solution d'érythritol à 5 mg.mL^{-1} .

100 μL de cette solution de polysaccharides, ainsi que 100 μL des solutions standards sont transférés en triplicata dans des tubes en verre.

50 μL d'une solution de 4-MMB fraîchement préparée (80 mg.mL^{-1} , dissous à $50\text{-}55^\circ\text{C}$) ainsi que 100 μL de TFA 6 N sont ajoutés, et les tubes sont placés dans un bain à sec réglé à 80°C pendant 30 minutes. Après refroidissement, 50 μL de la solution de 4-MMB sont ajoutés, et les échantillons sont évaporés sous jet d'azote.

Ils sont alors repris par 100 μL d'eau milli-Q et 100 μL de TFA 4 N, avant d'être portés à 120°C pendant 1 heure.

Après refroidissement et ajout de 100 μL de la solution de 4-MMB, les échantillons sont à nouveau ramenés à sec sous jet d'azote.

L'étape d'acétylation est alors effectuée. Les échantillons sont repris par 500 μL d'acétonitrile, puis sont évaporés sous jet d'azote.

500 μL d'acétate d'éthyle, 1,5 mL d'anhydride acétique, et 50 μL d'acide perchlorique sont alors ajoutés, les tubes fermés sont agités et placés dans un bain à ultrasons pendant 10 min pour favoriser la remise en suspension des échantillons.

Ils sont ensuite laissés à température ambiante pendant 15 minutes, puis 5 mL d'eau milli-Q (pour décomposer l'excès d'anhydride acétique) et 50 μL de 1-méthylimidazole sont ajoutés. Les tubes sont de nouveau agités, puis laissés à température ambiante pendant 10 minutes.

L'extraction des acétates d'alditols s'effectue par ajout de 2 mL de dichlorométhane. Après agitation vigoureuse et décantation, la phase organique est lavée 3 fois par 5 mL d'eau milli-Q, puis séchée, filtrée et évaporée.

Les acétates d'alditols sont alors repris dans 2 mL de dichlorométhane en vue de leur injection en chromatographie en phase gazeuse.

L'appareillage, ainsi que les conditions de température sont les mêmes que dans le cas de l'analyse des monosaccharides sous forme de dérivés triméthylsilylés : 50°C maintenus pendant 1 min, suivi d'un gradient de 20°C/min jusqu'à 120°C, puis d'un gradient de 2°C/min jusqu'à 240°C maintenus 3 min suivi enfin d'un gradient de 20°C/min jusqu'à 280°C maintenus pendant 5 min.

2.2.3 - Détermination de la configuration absolue des résidus glycosidiques

Principe :

La détermination de la configuration absolue des monosaccharides est basée sur la conversion en présence d'un agent chiral des énantiomères (D/L) en diastéréoisomères séparables par chromatographie en phase gazeuse (Gerwig *et al.*, 1978; Leontein *et al.*, 1978). Après hydrolyse du polysaccharide en présence d'un alcool optiquement actif (le R-(-)-2-butanol), les glycosides obtenus sont analysés sous forme de dérivés triméthylsilylés par chromatographie en phase gazeuse.

Réactifs :

- Standards monosaccharides : D-galactose, D-xylose, D-glucose, Erythritol
- H₂O milli-Q
- (R)-(-)-2-butanol (Aldrich)
- Chlorure d'acétyle
- Pyridine
- Bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide : triméthylchlorosylane (BSTFA : TMCS) 99 : 1 (Sylon BFT, Supelco)
- Dichlorométhane

Protocole :

1 mL de (R)-(-)-2-butanol ainsi qu'une goutte de chlorure d'acétyle sont ajoutés à 2 mg de polysaccharides lyophilisés en présence de 400 µg d'érythritol (étalon interne).

Dans le cas des standards, 0,5 mL d'alcool optiquement actif ainsi qu'une goutte de chlorure d'acétyle sont ajoutés à 500 µg de monosaccharide lyophilisés en présence de 100 µg d'érythritol.

Chaque échantillon (standard ou polysaccharides) est réalisé en triplicata.

Les tubes hermétiquement fermés sont placés dans un bain à sec réglé à 80°C, pendant 16 heures.

Après refroidissement, le méthanolysat est évaporé sous jet d'azote et neutralisé par co-évaporations successives avec du méthanol avant d'être ramené à sec sous jet d'azote.

Les butylglycosides obtenus sont alors triméthylsilylés par ajout de 500 µL de pyridine et de 500 µL de Sylon (seulement 100 µL dans le cas des standards).

Le mélange réactionnel est laissé au moins 2 heures à température ambiante, puis les réactifs en excès sont évaporés sous jet d'azote.

Les butylglycosides triméthylsilylés sont repris dans 5 mL de dichlorométhane pour l'injection en chromatographie en phase gazeuse.

Leur identification est réalisable grâce au programme de température suivant : 50°C maintenus pendant 1 min, suivi d'un gradient de 20°C/min jusqu'à 120°C, puis d'un gradient de 2°C/min jusqu'à 240°C maintenus 3 min suivi enfin d'un gradient de 20°C/min jusqu'à 280°C maintenus pendant 5 min.

Comme dans le cas du dosage des monosaccharides sous forme de dérivés triméthylsilylés, chaque monosaccharide est alors identifié par comparaison de ses temps de rétention relatifs (par rapport à un étalon interne), avec ceux de monosaccharides purs traités dans les mêmes conditions. Les pics supplémentaires correspondant alors à l'énantiomère L de ce monosaccharide.

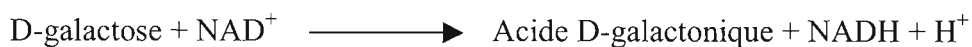
De même, un coefficient de réponse est calculé pour chaque monosaccharide par rapport à ce même étalon interne, afin de définir la proportion de chacun au sein du polysaccharide.

2.2.4 – Dosage enzymatique du D-galactose

Principe :

Le dosage est effectué à l'aide d'un Kit de dosage (Test de combinaison Lactose / D-Galactose, Boehringer Mannheim n° E0176303).

Le D-galactose est oxydé à pH 8,6 par la β -galactose déshydrogénase (Gal-DH), en présence de NAD (nicotinamide adénine dinucléotide).



La réaction étant stœchiométrique, la quantité de NADH formée est équivalente à la quantité de D-galactose oxydée. Elle sera suivie par la mesure de l'absorbance à 340 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée à partir de D-galactose.

Réactifs :

- D-galactose
- H₂O milli-Q
- Acide trifluoroacétique (TFA) 2 M
- Solution de soude NaOH 0,05 M

Protocole :

15 mg de polysaccharides sont hydrolysés par 1 mL d'acide trifluoroacétique 2 M pendant 90 minutes à 120°C.

20 mg de D-galactose sont également hydrolysés dans les mêmes conditions.

Les hydrolysats sont évaporés trois fois au Rotavapor, en reprenant à chaque fois dans de l'eau distillée, puis redissous dans 10 mL d'eau milli-Q pour le polysaccharide, ou dans 100 mL d'eau milli-Q pour le D-galactose.

Le pH de ces deux solutions est alors ajusté à 6,6 (pH du tampon citrate du kit de dosage) à l'aide de la soude 0,05 M.

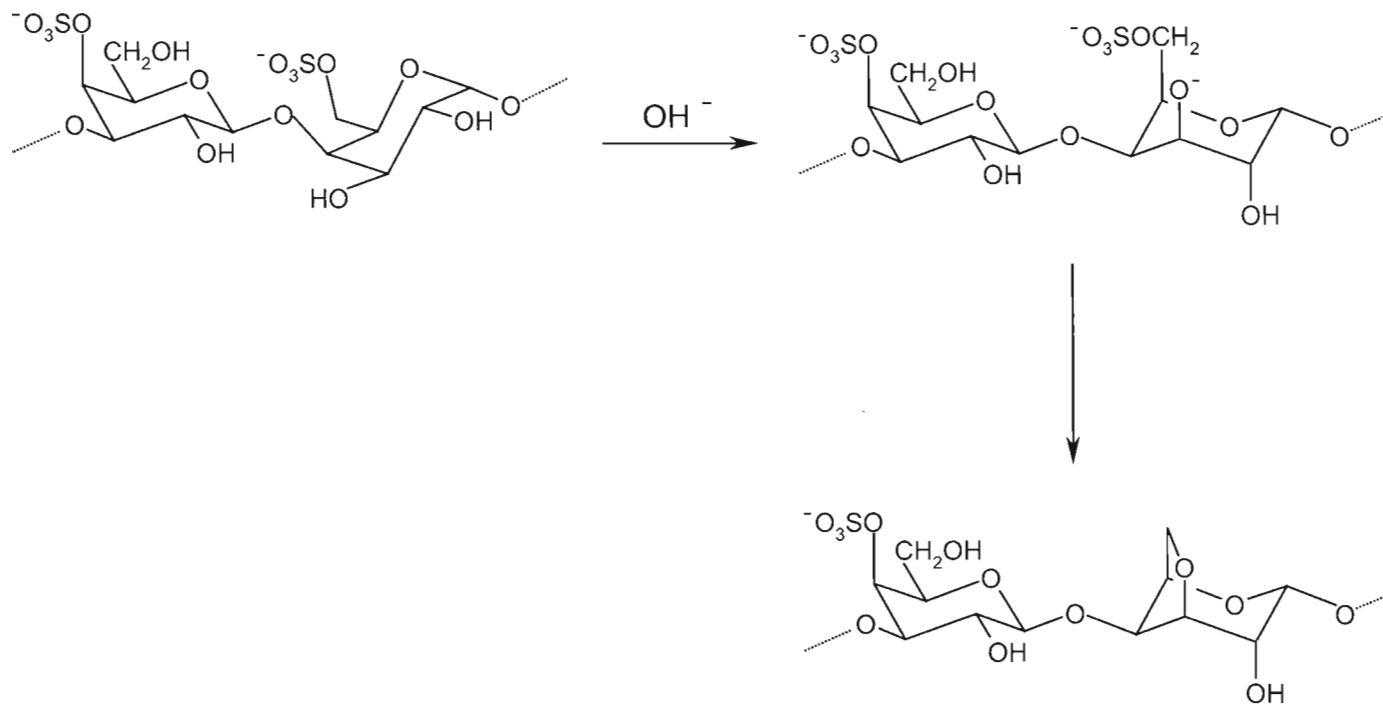


Figure 36 : Formation de 3,6-anhydrogalactose par traitement alcalin

100 et 200 μL de la solution de polysaccharides à la concentration de $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ sont placés dans des tubes en verre et dosés suivant les indications du kit.

100 à 500 μL de la solution de D-galactose à la concentration finale de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ sont prélevés afin de réaliser la courbe d'étalonnage.

L'absorbance est lue au bout de 45 minutes à la longueur d'onde de 340 nm, et la quantité de D-galactose contenue dans le polysaccharide est calculée par rapport à la courbe étalon réalisée à partir du D-galactose.

Connaissant la quantité totale de galactose contenue par le polysaccharide (dosés sous forme d'acétates d'alditols), on en déduit la quantité de L-galactose au sein de ce même polysaccharide.

2.2.5 - Détermination du taux de galactose lié en 4, sulfaté en 6 (formation de résidus 3,6-anhydro-D-galactopyranose)

Principe :

Le traitement en milieu alcalin des carraghénanes conduit à l'élimination de l'ester sulfate primaire porté par le carbone 6 de l'unité galactose liée en 4, en faveur de la formation d'un 3,6-anhydrogalactose (figure 36) (Rees, 1961).

Cette transformation est basée sur un mécanisme qui s'effectue en deux temps (De Ruyter & Rudolph, 1997).

Dans un premier temps, l'unité α -galactose-6- SO_3^- passe de la conformation ${}^4\text{C}_1$ à la conformation ${}^1\text{C}_4$ par élévation de la température, de manière à placer l'ester sulfate porté par le carbone 6 et le groupement hydroxyle libre porté par le carbone 3 en positions axiales. La présence de base forte dans le milieu entraîne alors l'ionisation des hydroxyles libres (en 3, voire en 2,3), générant ainsi des ions O^- .

La seconde étape de ce processus consiste en une substitution nucléophile effectuée par l'anion porté par le carbone 3 sur l'ester sulfate porté par le carbone 6, résultant en la

formation d'un pont 3,6-anhydro sur ce résidu, et la libération du groupement sulfate correspondant.

Une synthèse bibliographique a été réalisée, à l'issue de laquelle deux types de cinétiques pour la formation des 3,6-anhydrogalactoses ont été retenues :

- Formation directe des 3,6-anhydrogalactoses sans réaction préliminaire.
- Formation des 3,6-anhydrogalactoses nécessitant une préparation préliminaire des polysaccharides.

Dans tous les cas, une cinétique sur 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h et 24h est effectuée aux températures suivantes : 70°C, 80°C, 90°C, 100°C.

Le suivi de la formation des 3,6-anhydrogalactoses est effectué par dosage colorimétrique, selon la méthode de Yaphe et Arsenault (Yaphe & Arsenault, 1965), décrite au chapitre 2.1.5.

Réactifs :

- Pastilles de soude NaOH
- Borohydrure de sodium, NaBH₄
- Acide acétique, AcOH
- H₂O milli-Q

Protocole :

Formation directe des 3,6-anhydrogalactoses sans réaction préliminaire (Falshaw & Furneaux, 1994; Furneaux & Stevenson, 1990; Miller et al., 1995)

Pour chaque mesure, 40 mg de polysaccharides sont placés dans un tube en verre, et sont dissous dans 4 mL d'une solution de NaBH₄ 4 g/L réalisée à partir d'une solution de NaOH 1 M.

Les tubes sont alors placés dans un bain à sec porté aux différentes températures choisies.

A la fin du temps requis, l'échantillon est placé dans un bain de glace, et neutralisé par ajout goutte à goutte d'acide acétique.

50 μL de cette solution sont alors prélevés pour y effectuer un dosage colorimétrique permettant d'estimer le taux de 3,6-anhydrogalactoses présents, après avoir complété le volume à 200 μL avec de l'eau milli-Q (cf. dosage des 3,6-anhydrogalactoses, chapitre 2.1.5).

Formation des 3,6-anhydrogalactoses nécessitant une préparation préliminaire des polysaccharides.

◆ **Inspirée de Falshaw & Furneaux (1998)**

Pour chaque mesure, 5 mg de polysaccharides sont placés dans un tube en verre, et sont dissous dans 1 mL d'eau contenant 1 mg de NaBH_4 . L'ensemble est laissé sous agitation à température ambiante pendant la nuit.

0,5 mL d'une solution de NaOH 3 M contenant 3 mg de NaBH_4 sont alors ajoutés, et les tubes placés dans le bain à sec.

Comme précédemment, l'échantillon est placé dans un bain de glace à l'issue du temps de réaction désiré, et neutralisé par ajout goutte à goutte d'acide acétique.

100 μL de cette solution sont alors prélevés pour y doser le taux de 3,6-anhydrogalactoses présents selon la méthode colorimétrique précitée, après ajout de 100 μL d'eau milli-Q.

◆ **Inspirée de Estevez *et al.* (2000)**

Pour chaque point de cinétique réalisé, 5 mg de polysaccharides sont placés dans un tube en verre et sont dissous dans 2,5 mL d'eau contenant 0,25 mg de NaBH_4 . L'ensemble est laissé à température ambiante pendant 24 heures.

1,25 mL d'une solution de NaOH 3 M contenant 0,19 mg de NaBH_4 sont alors ajoutés, et les tubes placés dans le bain à sec.

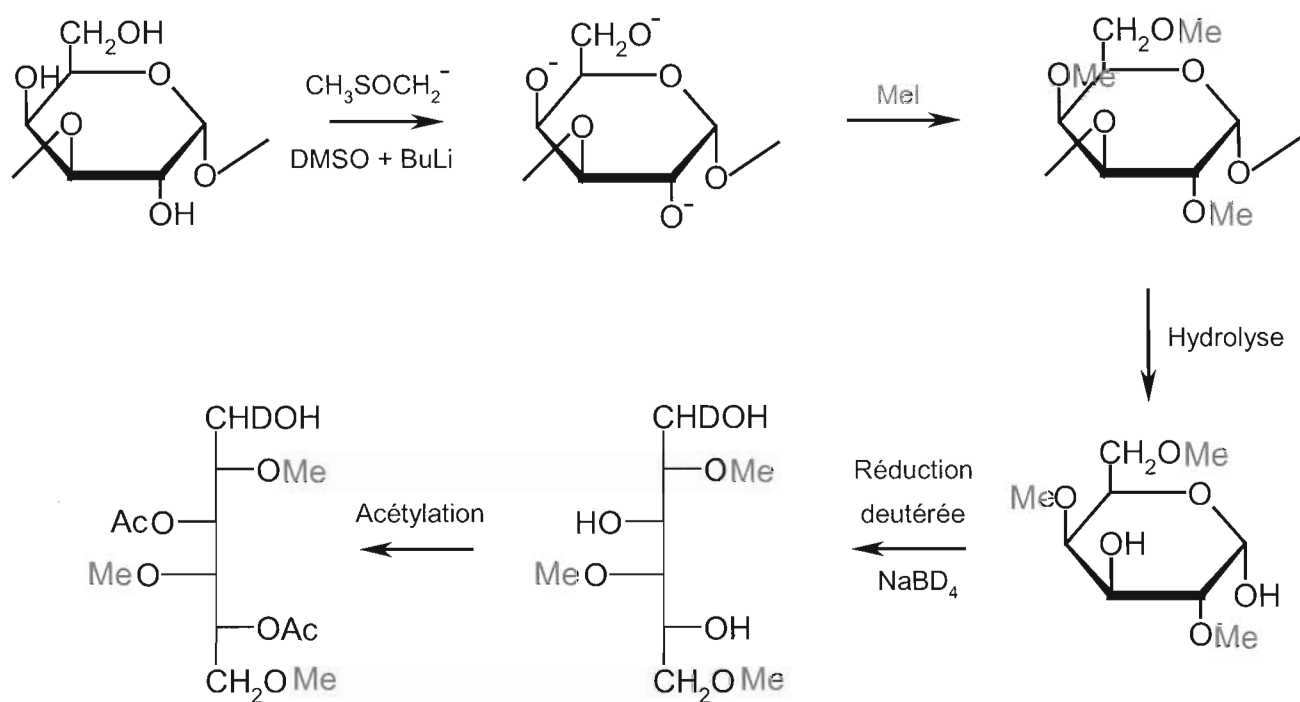


Figure 37 : Formation des acétates d'alditols partiellement méthylés

A la fin du temps de réaction désiré, l'échantillon est placé dans un bain de glace, et neutralisé par ajout goutte à goutte d'acide acétique.

200 μ L de cette solution sont alors prélevés pour y doser directement le taux de 3,6-anhydrogalactoses présents.

3 – Détermination de la nature des liaisons glycosidiques

3.1 – Méthylation des polysaccharides

Cette technique permet d'une part de déterminer la position des liaisons glycosidiques au sein du polysaccharide, et d'autre part d'établir la position des substituants pour chaque résidu constitutif de ce polymère.

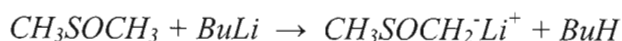
Après méthylation des fonctions hydroxyle libres, le polysaccharide méthylé est hydrolysé afin de libérer les fonctions hydroxyle engagées dans les liaisons glycosidiques. Les monosaccharides ainsi libérés subissent une réduction deutérée, et les fonctions hydroxyle libres de ces alditols sont peracétylés afin d'obtenir des acétates d'alditols partiellement méthylés séparés et identifiés par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG/SM) (figure 37).

La position des groupements sulfate, quant à elle, est déterminée par comparaison des spectres CG/SM des polysaccharides natifs et désulfatés perméthylés.

Principe :

Les polysaccharides sont dans un premier temps convertis en polyalcooates par déprotonation des groupements hydroxyle libres et autres fonctions à proton labile par une base. Ces derniers sont alors transformés en éthers méthyliques par substitution nucléophile sur l'iodométhane (Hakomori, 1964).

Pour ce faire, l'emploi d'une base telle que le carbanion du méthylsulfinyl de lithium, issu de l'action directe du butyllithium (BuLi) sur le diméthylsulfoxyde (DMSO) est appliqué (Blakeney & Stone, 1985) :



Depuis Kvernheim (Kvernheim, 1987), ce carbanion est formé *in situ* par addition directe du butyllithium sur le polysaccharide dissous dans le DMSO. Les groupements alcoolate sont alors méthylés par ajout d'iodométhane (IMe).

Il est cependant nécessaire d'effectuer un traitement préliminaire sur les polysaccharides avant de réaliser cette étape de méthylation.

Dans le cas des polysaccharides natifs, donc sulfatés, le problème majeur rencontré en appliquant cette technique est l'obtention d'une méthylation partielle des groupements hydroxyle.

Stevenson et Furneaux (1991) ont démontré qu'en convertissant au préalable les groupements sulfate sous forme de sels de triéthylammonium, une méthylation complète était ainsi obtenue. Barker *et al.* (1984) ayant montré auparavant que la conversion des polysaccharides sulfatés sous forme de sels de pyridinium conduisait à une bonne solubilité de ces derniers dans le DMSO ainsi qu'à une bonne O-méthylation, c'est cette alternative qui a été choisie.

Cependant, le fait que les sels de pyridinium soient moins stables dans la durée que les sels de triéthylammonium nous a conduit à effectuer cette étape extemporanément. Cette différence de stabilité proviendrait de la différence de pKa entre ces deux types de sels (5,25 pour le premier et 11,01 pour le second). La pyridine, base faible, peut ainsi être amenée à se dissocier lentement des sels de pyridinium et s'évaporer, laissant alors un ester de sulfate libre capable de catalyser la dégradation des polysaccharides. Ce qui n'est pas le cas de la triéthylamine, base forte, qui forme un cation stable.

Une étape de dialyse est ensuite réalisée pour isoler et purifier les polysaccharides sulfatés méthylés.

Les polysaccharides désulfatés sont quant à eux placés sous leur forme acide par passage sur résine échangeuse de cations (DOWEX) afin de faciliter leur solubilisation dans le DMSO.

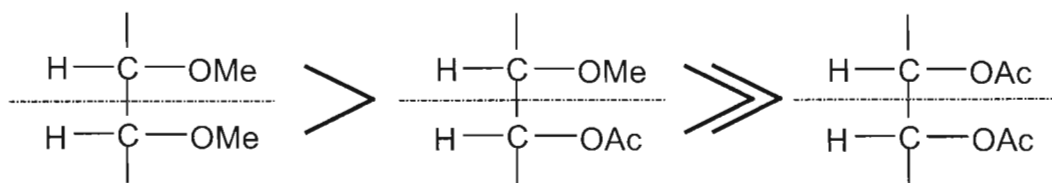


Figure 38 : Ordre de clivage préférentiel au sein des acétates d'alditols perméthylés

Après méthylation des groupements alcoolate par de l'iodométhane, les produits méthylés sont ensuite isolés et purifiés de tout composé polaire par extraction en phase solide par chromatographie en phase inverse (Waeghe *et al.*, 1983).

Une hydrolyse est alors effectuée afin de libérer les fonctions hydroxyle engagées dans les liaisons glycosidiques. Les monosaccharides ainsi libérés subissent ensuite une réduction deutérée, et les fonctions hydroxyle libres de ces alditols sont peracétylés afin d'obtenir des acétates d'alditols partiellement méthylés (**PMMA**) séparés et identifiés par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG/SM).

Il est nécessaire de préciser (Aspinall, 1982) que le spectre de masse de ces PMMA n'est pas sensible aux différences stéréochimiques. C'est pourquoi une séparation préalable par chromatographie en phase gazeuse est nécessaire, afin de distinguer les dérivés provenant des résidus de même nature (hexose, pentose, déoxyose...), en se basant sur leurs temps de rétention relatifs qui sont différents.

Ces PMMA subissent alors une fragmentation dans le spectromètre de masse. Cette fragmentation est provoquée par un impact électronique qui génère une ionisation sur n'importe quel atome d'oxygène de la liaison éther (formation d'un ion parent positif). Le transfert d'électron provoque la rupture de la chaîne carbonée, entraînant la formation d'un radical et d'un ion positif qui est détecté, appelé fragment primaire.

Il existe cependant une limitation à la caractérisation des PMMA par cette méthode : dans le cas d'un résidu hexose lié en position 6 (ou d'un résidu pentose lié en position 5). Dans ce cas précis, la réduction deutérée des résidus glycosidiques en alditols élimine toute symétrie structurale, permettant ainsi la différenciation du carbone anomérique de celui portant le groupement hydroxyle primaire non méthylé.

La position des substituants peut également être déterminée lorsque ces derniers résistent à l'étape de méthylation, faisant ainsi apparaître les liaisons dues à la présence de ces groupements (c'est le cas notamment des groupements sulfate).

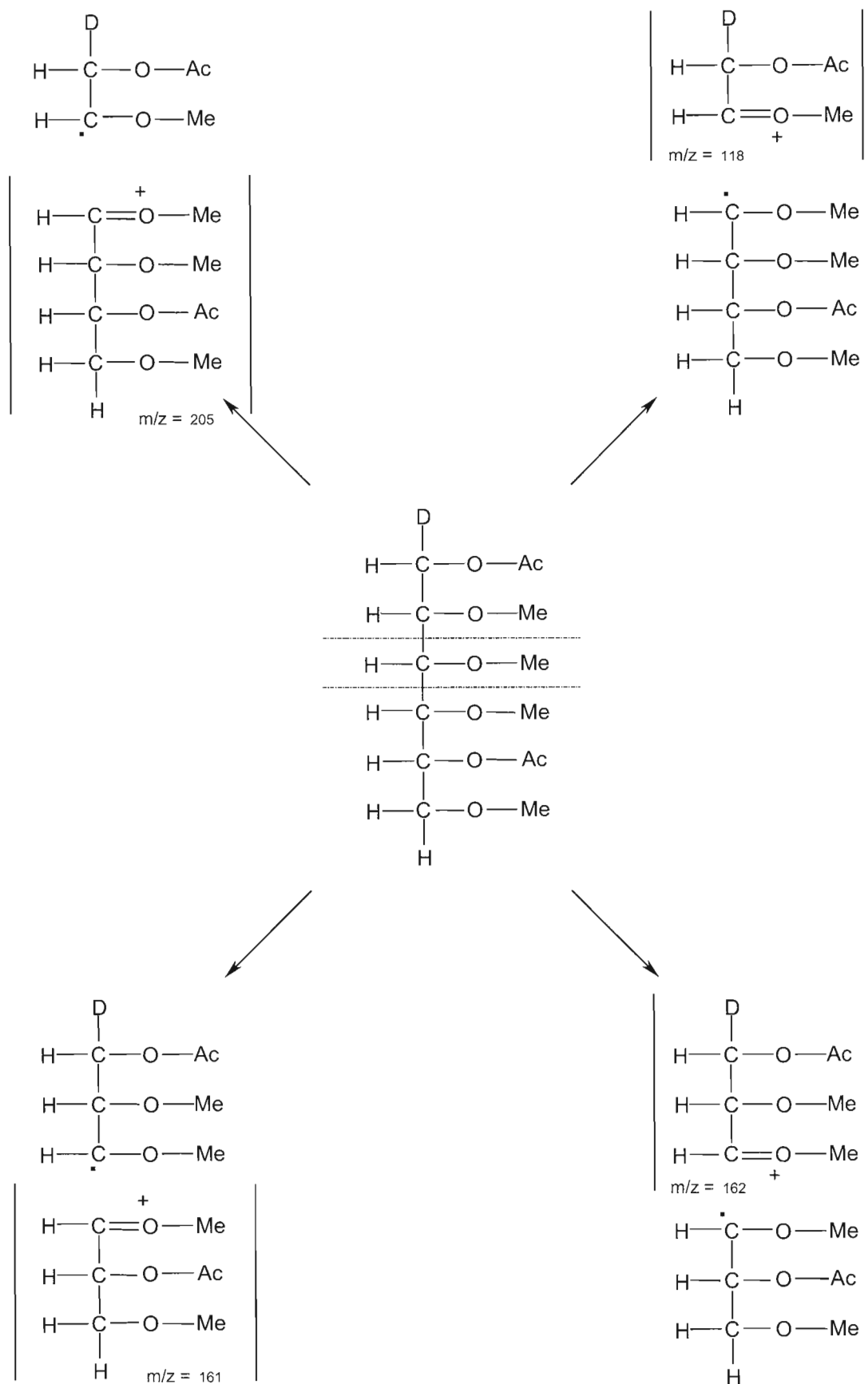


Figure 39 : Fragments principaux obtenus en spectrométrie de masse à impact électronique du 1,5-di-O-acétyl-2,3,4,6-tétra-O-méthylhexitol

Chaque type de PMMA génère une fragmentation qui est caractéristique de la position des groupements méthyle et acétyle, obéissant aux règles suivantes et illustrées figures 38, 39 et 40 (Hellerqvist, 1990; Lindberg, 1972; York *et al.*, 1985) :

- i) Lorsque les alditols partiellement O-méthylés, O-acétylés sont marqués par un atome de deutérium au niveau du carbone 1, la masse m/z du fragment comportant le carbone 1 est paire, celle du fragment comportant le carbone 6 est impaire.
- ii) Le clivage de la chaîne d'alditol se fait préférentiellement entre deux carbones porteurs de groupements O-méthyle (la charge étant portée par l'un ou l'autre de ces groupements), par rapport au clivage entre un carbone porteur d'un groupement O-méthyle et un carbone porteur d'un groupement O-acétyle. Quant au clivage entre deux carbones porteurs de groupements O-acétyle, il est très difficile à observer.
- iii) La charge est toujours portée par le fragment dont le carbone adjacent au site de clivage porte le groupement O-méthyle.
- iv) Des fragments secondaires peuvent être générés à partir des fragments primaires par la perte de méthanol ou d'acide acétique. Elle s'effectue préférentiellement au niveau du carbone en position β par rapport à celui qui porte la charge.

Ces règles de fragmentation simples permettent de déterminer la position des groupements méthyle et acétyle de chaque acétate d'alditol partiellement méthylé.

La position des carbones engagés dans des liaisons glycosidiques en est ainsi déduite.

Réactifs :

- Résine échangeuse de cations « forte » : Dowex, 50WX8-100, forme hydrogène (Sigma)
- Pyridine
- Résine échangeuse de cations : Dowex, 50W X8, forme hydrogène (Bio-Rad)
- Diméthylsulfoxyde anhydre (DMSO)
- Butyl Lithium BuLi 2,5 M dans l'hexane (Aldrich)
- Iodométhane ICH₃(Sigma)
- Thiosulfate de sodium Na₂S₂O₃
- Cartouche Sep-Pak C18 (Waters)
- Acétonitrile

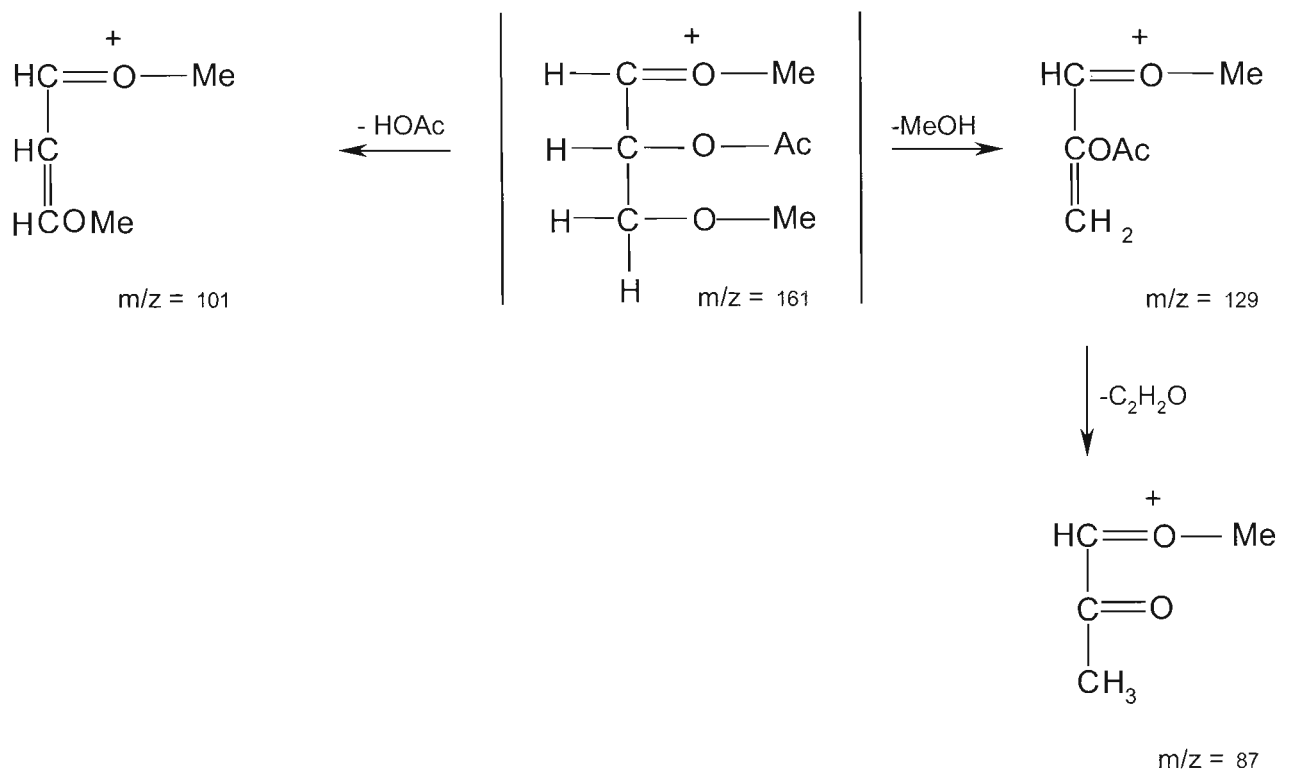


Figure 40 : Exemples de fragments secondaires issus d'un fragment m/z 161

- Acide trifluoroacétique 2 M
- Erythritol
- Solution d'ammoniaque NH_4OH 2 M
- Borohydrure de sodium deutéré NaBD_4
- Acide acétique glacial
- Solution de méthanol : acide acétique 9 :1 (v/v)
- Méthanol
- Pyridine
- Anhydride acétique
- Dichlorométhane

Protocole :

Traitement préliminaire

Formation des sels de pyridinium (polysaccharides natifs)

100 mg de polysaccharides sont dissous dans 5 mL d'eau distillée. Quelques mg de résine échangeuse de cations « forte » (Sigma) sont ajoutés sous agitation, jusqu'à l'obtention d'un pH de l'ordre de 1. La solution ainsi que les rinçages de la résine sont alors filtrés, puis le volume est réduit par évaporation au Rotavapor.

De la pyridine est alors ajoutée au milieu jusqu'à sa neutralisation. La solution est ensuite évaporée trois fois au Rotavapor, en reprenant à chaque fois dans de l'eau distillée, puis lyophilisée.

Préparation des polysaccharides désulfatés

Une solution aqueuse contenant environ 2 mg de polysaccharides est passée sur une colonne de résine échangeuse de cations Dowex (Bio-Rad) (2mL). L'échantillon est ensuite élué avec de l'eau, puis lyophilisé.

Méthylation

2 mg de polysaccharides lyophilisés sont dissous dans 500 μ l de DMSO anhydre sous agitation magnétique, dans un tube en verre hermétiquement fermé purgé sous azote.

Après dissolution de l'échantillon, le tube est placé dans un bain de glace et 500 μ L de BuLi sont alors ajoutés lentement. Le tube à nouveau purgé sous azote est alors placé sous agitation pendant une heure, à température ambiante.

La méthylation s'effectue par ajout de 500 μ L de iodométhane sur l'échantillon à nouveau placé dans la glace.

Après une heure sous agitation à température ambiante, le réaction est stoppée par ajout de 1 mL d'eau et addition de quelques grains de thiosulfate de sodium afin de réduire l'excès d'iode présent dans le milieu.

L'échantillon est alors placé sous jet d'azote afin d'éliminer l'agent méthylant en excès, ce qui correspond à l'obtention d'une phase inférieure limpide.

Extraction des polysaccharides méthylés

Cas des polysaccharides natifs

Ces derniers peuvent être considérés comme chargés, en raison de la présence des groupements sulfate. Ils sont donc extraits par dialyse (seuil de coupure 3,5 kDa, Spectra/Por) contre de l'eau distillée pendant 24 heures, puis lyophilisés.

Cas des polysaccharides désulfatés

L'échantillon est purifié sur une colonne Sep-Pak C18 préalablement conditionnée par élution de 8 mL d'acétonitrile et de 8 mL d'eau.

Les polysaccharides sont déposés sur cette colonne, lavés par 8 mL d'eau, puis élués par 6 mL d'acétonitrile pour être enfin évaporés sous jet d'azote.

La procédure de méthylation est éventuellement réitérée sur les échantillons méthylés afin d'éviter les risques de sous-méthylation, ou méthylation partielle.

Hydrolyse des polysaccharides perméthylés

500 μL d'acide trifluoroacétique 2 M sont ajoutés à l'échantillon, ainsi que 20 μL d'érythritol (1 mg/mL) utilisé comme référence interne.

Le tube fermé est porté à 100°C pendant 2 heures dans un bain à sec, puis l'hydrolysate est évaporé sous jet d'azote.

Réduction des monosaccharides partiellement méthylés

250 μL d'une solution de NaBD_4 10 mg/mL réalisée à partir d'une solution de NH_4OH 2 M sont ajoutés à l'échantillon.

La solution est agitée au vortex, puis laissée 2 heures à température ambiante.

La réaction est stoppée par addition goutte à goutte d'acide acétique glacial jusqu'à l'arrêt de l'effervescence, correspondant à la neutralisation de l'excès de réducteur.

Ces derniers sont alors éliminés par 3 co-distillations avec le mélange méthanol : acide acétique (9 : 1), suivies de 3 co-distillations avec le méthanol seul.

O-acétylation

L'échantillon bien sec est acétylé par ajout de 100 μL de pyridine et 100 μL d'anhydride acétique. Le tube hermétiquement fermé est porté à 100°C pendant 45 min.

Après refroidissement et évaporation des réactifs sous jet d'azote, l'échantillon est repris par 2 mL d'un mélange dichlorométhane : eau (1 : 1). La phase organique est asséchée, filtrée et évaporée.

Les acétates d'alditols partiellement méthylés sont repris dans le dichlorométhane en vue de leur injection en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Identification des acétates d'alditols perméthylés

Les analyses sont effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse (Agilent, 6890 Series) couplée à un spectromètre de masse de type quadrupôle (Mass Agilent, 5973 Network).

La séparation des composés est réalisée sur une colonne capillaire apolaire en silice fondue CP-SIL-5CB (0,25 mm x 60 m, Chrompack), avec l'hélium comme gaz vecteur.

Le mode d'ionisation par impact électronique (IE) nécessite une énergie de 70 eV.

La programmation en température est la suivante : 50°C suivi d'un gradient de 20°C/min jusqu'à 120°C, puis d'un gradient de 4°C/min jusqu'à 240°C maintenus pendant 10 minutes.

Des témoins de perméthylation sont réalisés en effectuant volontairement une méthylation partielle d'oses standards selon la méthode développée par Doares *et al.* (Doares *et al.*, 1991).

Cette technique permet de produire des alditols partiellement O-méthylés et partiellement O-acétylés pour chaque monosaccharide, simulant ainsi toute la gamme de substitutions possibles.

Leur analyse par CG/SM permet alors d'établir pour chacun de ces alditols partiellement « substitués » leur temps de rétention respectif, ainsi que la nature des fragments qui en résulte, corrélée au nombre de substitutions.

Par comparaison des différents temps de rétention relatifs, ainsi que des fragments résultants, il est ainsi relativement aisé d'identifier la nature des monosaccharides constitutifs d'un polysaccharide donné, ainsi que leurs degrés de substitution.

3.2– Détermination de la position des groupements sulfate

La position des esters sulfates sur le squelette carboné est déterminé par comparaison des résultats de méthylation réalisées sur les polysaccharides avant et après désulfatation (Kovensky *et al.*, 1990).

Pour ce faire, il a été nécessaire d'appliquer la procédure de désulfatation décrite ci-dessous (Nagasawa *et al.*, 1977), optimisée par Haslin *et al.* (2000).

Le protocole classique de méthylation décrit précédemment est alors appliqué aux polysaccharides désulfatés.

Principe :

Les polysaccharides placés sous forme de sels de pyridinium sont désulfatés dans un mélange de solvant approprié, selon les conditions optimisées par Haslin *et al.* (Haslin *et al.*, 2000).

La présence de pyridine évite que l'acide sulfurique formé au cours de la désulfatation ne dépolymérise les polysaccharides.

Réactifs :

- Résine échangeuse de cations « forte » : Dowex, 50WX8-100, forme hydrogène (Sigma)
- Pyridine
- Diméthylsulfoxyde anhydre (DMSO)
- Méthanol
- NaOH 0,1 M
- Membrane de dialyse 6-8,000 Da, Spectra/Por

Protocole :

Formation des sels de pyridinium

100 mg de polysaccharides lyophilisés sont dissous dans 5 mL d'eau milli-Q. Quelques grammes de résine échangeuse de cations sont alors ajoutés sous agitation, jusqu'à l'obtention d'un pH de l'ordre de 1.

La solution ainsi que les rinçages de la résine sont filtrés, et le volume final est réduit au Rotavapor.

Cette solution de polysaccharides est ensuite neutralisée par de la pyridine, puis évaporée trois fois au Rotavapor en reprenant à chaque fois dans de l'eau, et lyophilisée.

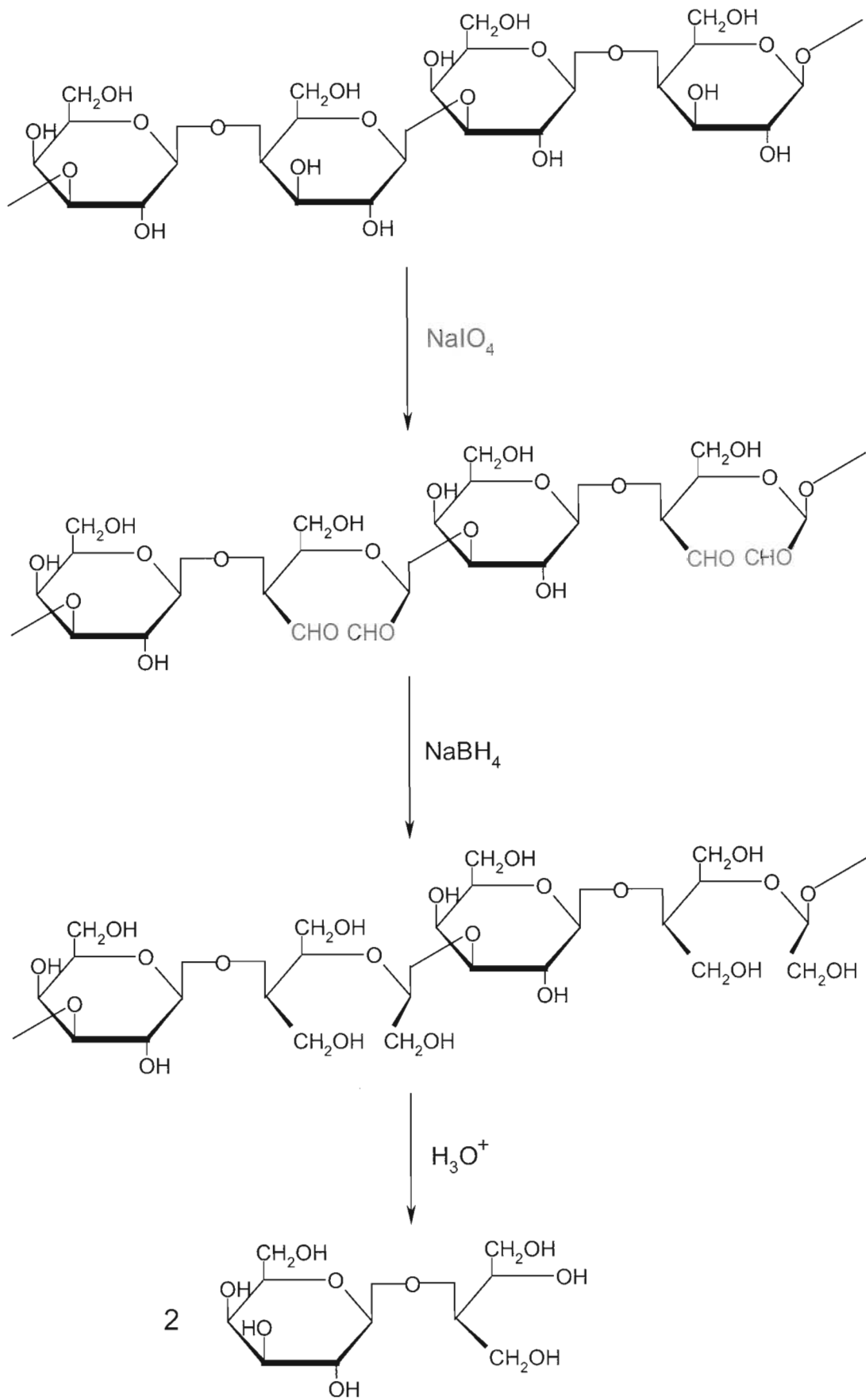


Figure 41 : Dégradation de Smith

Désulfatation

Ce lyophilisat est alors dissous dans 10 mL du mélange réactionnel DMSO/méthanol (14 % de méthanol dans le DMSO), puis porté à 100°C sous agitation pendant 3h25 dans un tube hermétiquement fermé. La réaction est stoppée par ajout de 10 mL d'eau milli-Q, et le pH ajusté à 9,1 à l'aide de la solution de NaOH 0,1 M. L'ensemble est alors dialysé pendant 2 jours contre de l'eau milli-Q (Spectra/Por, seuil de coupure 6-8,000 Da), puis lyophilisé. La désulfatation des 25 mg de polysaccharides désulfatés obtenus est confirmée par analyse élémentaire.

Les polysaccharides désulfatés subissent alors la procédure de méthylation classique, puis sont analysés par CG/SM.

4 - Détermination de la séquence glycosidique

4.1 – Dégradation de Smith (Goldstein *et al.*, 1965)

L'oxydation périodique des polysaccharides est une technique usuelle pour déterminer la structure de ces derniers, et plus particulièrement pour confirmer la position des liaisons glycosidiques, ou déterminer la position de substituants sur les résidus monosaccharidiques.

Principe :

Le *metapériodate* de sodium clive la liaison carbone-carbone de carbones adjacents porteurs de groupements hydroxyle libres. La consommation en oxydant peut être suivie par lecture de l'absorbance à 223 nm et 305 nm (Kolender & Matulewicz, 2002).

Le produit oxydé est alors réduit à l'aide de borohydrure de sodium, puis le polyalcool formé est hydrolysé au cours d'une hydrolyse contrôlée (limitant l'hydrolyse des liaisons glycosidiques) pour former les résidus saccharidiques correspondants accompagnés d'érythritol (Figure 41).

Réactifs :

- *metapériodate* de sodium NaIO_4
- Ethylène glycol
- Borohydrure de sodium NaBH_4
- Solution d'ammoniaque NH_4OH 2 M
- Borohydrure de sodium deutéré NaBD_4
- Acide acétique

Protocole :

50 mg de polysaccharides sont dissous dans 25 mL de NaIO_4 50 mM. La réaction est maintenue 5 jours à 4°C et à l'obscurité.

10 gouttes d'éthylène glycol sont alors ajoutées afin de consommer le *metapériodate* en excès, puis 75 mg de NaBH_4 sont additionnés.

Après une nuit de réduction à température ambiante, la réaction est stoppée par addition d'acide acétique goutte à goutte jusqu'à l'arrêt de l'effervescence, correspondant à la neutralisation de l'excès de réducteur.

Le produit est alors dialysé 2 jours contre de l'eau distillée (Spectra/Por, seuil de coupure 500 Da), puis lyophilisé.

Il est ensuite hydrolysé par 5 mL de d'acide acétique 1,5%, à 100°C pendant 1h30, puis neutralisé par co-évaporations avec du MeOH.

5 mL d'une solution d'ammoniaque 2 M contenant 50 mg de NaBD_4 sont alors ajoutés, et l'ensemble est laissé une nuit à température ambiante. Après neutralisation de l'excès de NaBD_4 par ajout d'acide acétique, le produit est dialysé deux jours contre de l'eau distillé (seuil de coupure : 500 Da), puis lyophilisé.

Purification :

La séparation des produits issus de la dégradation de Smith est effectuée par chromatographie de filtration sur gel.

20 mg de produit sont solubilisés dans 1 mL d'eau milli-Q contenant 0,02% de NaN_3 . Après filtration (0,45 μm), 750 μL de cette solution sont déposés sur une colonne de 100 x 1,6 cm

contenant un Bio-Gel P2 (100-1800 Da, Bio-Rad), puis élués par de l'eau milli-Q (+ 0,02% de NaN_3). Le débit est maintenu à 13 mL.h^{-1} par une pompe péristaltique, et l'élué des produits est suivie par un détecteur réfractométrique (ERC-7510, Erma Optical Works.LTD).

Le volume d'exclusion et le volume total sont préalablement déterminés par injection de $500 \mu\text{L}$ d'une solution aqueuse contenant 5 mg de D-glucose ainsi que 5 mg de dextrane de masse 55 000 Da. La colonne est également étalonnée à l'aide de dextranses de différentes masses molaires, obtenus par hydrolyse acide d'un dextrane de masse 9 400 Da (HCl 0,1 N, 3h, 100°C). Une bonne résolution de $dp = 1$ à $dp = 8$, a ainsi pu être observée.

La fraction éluée avec le volume d'exclusion est alors lyophilisée puis déposée sur une colonne de $100 \times 1,6 \text{ cm}$ contenant un Bio-Gel P10 (1500-20000 Da, Bio-Rad) dont le volume d'exclusion et le volume total ont été déterminés au préalable par injection de $500 \mu\text{L}$ d'une solution de NaCl 1 M contenant 5 mg de D-glucose ainsi que 5 mg de dextrane de masse 500 000 Da.

La fraction déposée est ensuite élue par une solution de NaCl 1 M (+ 0,02% de NaN_3). Le débit est maintenu à 15 mL.h^{-1} , et l'élué des produits est suivie par détection réfractométrique.

4.2 – Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

4.2.1 – Analyse par RMN

La RMN est une technique non destructrice qui permet d'obtenir et/ou de confirmer de nombreuses informations structurales relatives au polysaccharide.

Elle permet d'établir sans ambiguïté la nature des monosaccharides constitutifs de ce polysaccharide, leur anomérie respective (α ou β), leur séquence, ainsi que la position des liaisons glycosidiques les unissant, et la présence de substituants.

Cette technique apporte donc des informations complémentaires à celles déjà acquises par le biais de la voie chimique (CG, CG/SM). Elle reste cependant limitée à des échantillons de grande pureté, disponibles en quantités importantes (20 mg de polysaccharides).

En spectroscopie RMN, les signaux correspondant aux carbones et protons anomériques sont généralement séparés des autres signaux en raison de leur déplacement vers les champs faibles, ce qui les rend facilement identifiables.

Les analyses en haut champs en mode homonucléaire COSY (Correlation Observed SpectroscopY) et TOCSY (Total Observed Correlation SpectroscopY) permettent d'établir les déplacements chimiques des protons de chaque résidu. Le spectre COSY permet de visualiser le couplage 3J entre deux protons vicinaux, et le spectre TOCSY permet, dans le meilleur des cas, d'établir les corrélations existant entre tous les protons d'un même résidu.

Le déplacement chimique des carbones correspondant aux protons de chaque résidu est déterminé à partir des spectres réalisés en mode hétéronucléaire HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), qui permettent de visualiser la corrélation qui existe entre un carbone et le proton qui lui est directement lié (1J).

La séquence HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) permet quant à elle d'établir les informations relatives aux enchaînements des résidus, par le biais des couplages 2J et 3J entre les atomes situés de part et d'autre de la liaison glycosidique. L'analyse en mode homonucléaire NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY) qui établit les corrélations entre les protons d'un même résidu, ainsi qu'entre les protons situés de part et d'autre de la liaison glycosidique, permet de compléter et de confirmer les résultats obtenus.

4.2.2 – Préparation de l'échantillon

10 à 20 mg de polysaccharides dissous dans de l'oxyde de deutérium D_2O à 99,97%, sont soumis à trois cycles d'échange-lyophilisation par 1 mL de D_2O , puis sont finalement repris dans 750 μL de D_2O 100% pour analyse.

4.2.3 – Appareillage et séquence

Les spectres de RMN à une et deux dimensions, homo- et hétéronucléaires, ont été enregistrés à 298 K sur un appareil Bruker AVANCE DRX-500 équipé d'un logiciel X-WIN NMR, au laboratoire de Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire de l'Université de Bretagne Occidentale de Brest (Dr R. Pichon).

Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm relativement au 2,2,3,3-tétradeutéro-3-(triméthylsilyl)-propionate de sodium.

Les séquences impulsionnelles ont été réalisées conformément aux programmes standards fournis par Bruker.

5 - Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Les spectres d'Infra-Rouge à Transformée de Fourier sont réalisés au Laboratoire d'Analyses Brest Océan de Plouzané.

Les échantillons sont analysés sous forme de pastilles obtenues par broyage et compression de 2 mg de polysaccharides avec 200 mg de KBr. Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre Bruker Vector 22, de résolution 4 cm^{-1} sur une région de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$.

6 – Détermination de la masse molaire moyenne du polysaccharide natif

L'établissement de la masse molaire a été réalisé à l'Université du Maine au Mans sur un échantillon de polysaccharide natif dialysé (seuil de coupure 6-8,000 Da), centrifugé et lyophilisé.

Une détection simple (en équivalent pullulanes), aboutit à une masse moyenne en nombre M_n de 76 kDa, et une masse moyenne en poids M_w de 350 kDa. La détection par diffusion de la lumière a donné, quant à elle, une M_w de 166 kDa.

III – RESULTATS ET DISCUSSION

1 – Production de polysaccharides

La production de polysaccharides à partir de l'algue *Asparagopsis armata* a fait l'objet d'une optimisation, tant au niveau opératoire, qu'au niveau des conditions d'extraction (Garon, 1999).

Ainsi, différentes températures d'extraction et différents temps de réaction à différents pH ont été testés. Bien que le pH ait une influence sur la nature du polysaccharide produit, ce dernier paramètre a quand même été testé, tout en sachant qu'un pH alcalin favoriserait la formation de 3,6-anhydrogalactoses au détriment des galactoses liés en 4 et sulfatés en 6, et qu'un pH acide pourrait être à l'origine d'une dépolymérisation partielle du polysaccharide.

En ce qui concerne les conditions d'extraction de ces polysaccharides, différents adjuvants à la précipitation (NaCl, AcONa ...), ont été testés dans différentes proportions.

A l'issue de cette série d'optimisation, les conditions établies pour l'obtention de polysaccharides avec le meilleur rendement sont les suivantes : 6 heures à 70°C avec alcalinisation préliminaire du broyat d'algue (pH = 8/9). Cependant, pour les raisons évoquées ci-dessus, le pH est seulement ramené à neutralité afin d'éviter toute dégradation ou modification de la structure du polysaccharide. Quant à l'ajout d'adjuvant facilitant la précipitation des polysaccharides par augmentation de la force ionique du milieu, seul l'ajout de chlorure de sodium à raison de 0,8% en poids serait à l'origine de meilleurs rendements d'extraction.

La fraction polysaccharidique est obtenue dans ces conditions avec un rendement de 6% (masse de polysaccharides séchés par rapport à la masse d'algue sèche introduite au départ).

2 - Caractérisation chimique des polysaccharides

2.1 – Composition globale

La composition globale des polysaccharides extraits d'*Asparagopsis armata* est établie grâce aux dosages colorimétriques.

Ceux-ci ont permis de mettre en évidence le fait que la fraction polysaccharidique était constituée principalement d'oses neutres sulfatés. Ils ont également démontré la nécessité de l'étape de purification (dialyse + centrifugation), à l'issue de laquelle la majorité des protéines co-précipitées avec les polysaccharides sont éliminées (passage de 5,5% de protéines à moins de 3%).

La perte de matière au cours de ce processus de purification est de l'ordre de 20%.

Le taux de sulfate contenu dans la fraction polysaccharidique est déduit du pourcentage de soufre déterminé par analyse élémentaire, multiplié par un facteur de correction de 3,22. Ce taux de sulfate est également corroboré par le dosage turbidimétrique. De plus, de manière à prouver que ces sulfates sont bien liés de façon covalente à la chaîne polysaccharidique, l'extrait polysaccharidique est passé sur une colonne de filtration sur gel Bio-Rad de type P2 (seuil de coupure : 100-1800 Da), afin de séparer d'éventuels groupements sulfate complexés par cette fraction, de cette dernière.

Les dosages effectués sur l'ensemble des polysaccharides à l'issue de cette étape de purification montrent clairement que la totalité des sulfates dosés la première fois sont tous liés de manière covalente aux polysaccharides.

Les résultats des dosages colorimétriques effectués sur les polysaccharides purifiés (dialyse, seuil de coupure 6-8,000 Da + centrifugation, 2h, 20 000 G), sont résumés dans le tableau 6.

	Oses neutres	Acides uroniques	Sulfates (SO ₃ ⁻ Na ⁺)	Protéines
Polysaccharides purifiés	52 %	3 %	27 %	3 %

Tableau 6 : Composition globale des polysaccharides extraits de l'algue *Asparagopsis armata*, établie selon les méthodes de dosage colorimétrique (taux exprimés en % massiques)

Le fait que le taux de recouvrement à l'issue des dosages colorimétriques soit différent de 100% est principalement dû au fait que la fraction polysaccharidique conserve un taux d'humidité non négligeable, notamment en raison de l'affinité naturelle des groupements sulfate pour l'eau. De plus, les polysaccharides étant précipités sous leur forme saline, les contre-ions sodium des groupements sulfate interviennent dans la masse totale du polysaccharide.

2.2 – Identification et dosage des monosaccharides

2.2.1 – Analyse par chromatographie en phase gazeuse

Cette analyse nécessite une libération préliminaire des unités glycosidiques afin de pouvoir les identifier et les quantifier.

Cette dépolymérisation des polysaccharides en unités glycosidiques est délicate, car les conditions d'hydrolyse employées doivent être suffisamment importantes pour cliver les liaisons glycosidiques, sans pour autant dégrader les monosaccharides libérés.

Pour ce faire, deux approches différentes ont été testées. La première consiste en une méthanolyse « douce » des polysaccharides, suivie d'une identification et d'un dosage par chromatographie en phase gazeuse des méthylglycosides libérés, transformés en dérivés triméthylsilylés.

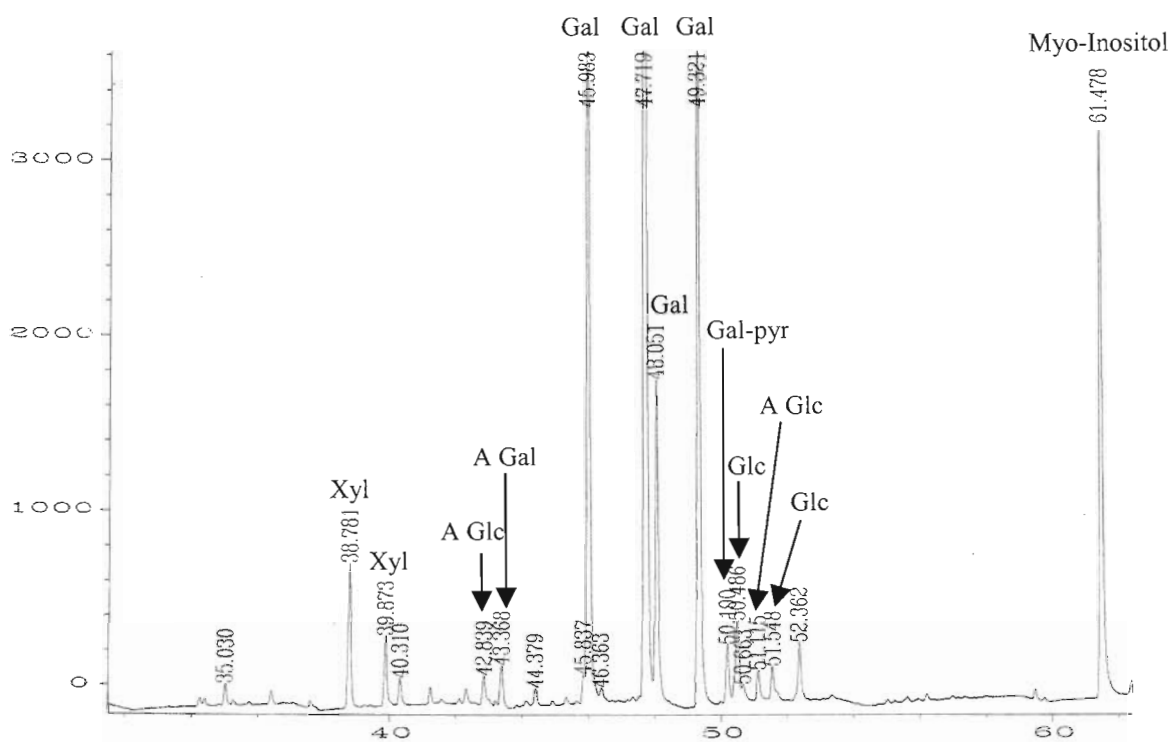


Figure 42 : Chromatogramme des méthylglycosides O-triméthysilylés issus de la méthanolyse des polysaccharides d'*Asparagopsis armata*

Le principal avantage de cette méthode est le respect des substituants tels que les groupements pyruvate par exemple, qui ne sont pas dégradés au cours de l'hydrolyse. Cependant, les conditions employées ne permettent pas la conservation des 3,6-anhydrogalactoses qui sont complètement détruits lors de l'hydrolyse acide des autres liaisons glycosidiques (Usov, 1992).

Les conditions de libération des monosaccharides ont été optimisées afin de générer des résultats fiables et reproductibles. C'est ainsi que des méthanolyses plus ou moins longues (4 h, 16 h) en présence de méthanol chlorhydrique de concentrations différentes (3 N, 2 N) ont été testées à différentes températures (100°C, 80°C).

Les résultats les plus reproductibles sont obtenus pour une méthanolyse de 16 heures à 80°C, en présence de méthanol chlorhydrique 2N. Ils sont illustrés par la figure 42 et le tableau 7.

On peut d'ailleurs noter que les formes anomériques α et β des conformations pyranose et furanose du galactose sont toutes aisément visibles sur le chromatogramme sous la forme de quatre pics distincts.

Nature de l'ose	Pourcentage massique
Galactose	37%
Xylose	2,4%
Glucose	2%
Fucose	Traces
Mannose	Traces
Acide Galacturonique	0,7%
Acide Glucuronique	1%

Tableau 7 : Identification et dosage par chromatographie en phase gazeuse des méthylglycosides O-triméthylsilylés issus de la méthanolyse des polysaccharides de l'algue rouge *Asparagopsis armata*

La seconde méthode implique une hydrolyse acide plus drastique mais qui, combinée à l'emploi d'un complexe spécifique, le 4-Méthyl-Morpholine-Borane, évite la dégradation des oses sensibles aux conditions acides tels que le 3,6-anhydrogalactose. Les oses neutres

ainsi libérés sont, après réduction et peracétylation, identifiés par chromatographie en phase gazeuse sous forme d'acétates d'alditols. Du fait de la réduction, chaque monosaccharide apparaît sous la forme d'un pic unique sur le chromatogramme.

Les résultats obtenus par le biais de cette méthode sont regroupés dans le tableau 8.

	Pourcentage massique	Rapports molaires
Galactose	36	10
D-xylose	3,4	1,13
D-glucose	1,7	0,47
3,6-anhydrogalactose	1,06	0,33
D-fucose	0,4	0,12
D-mannose	0,2	0,05
SO ₃ ⁻	27	16,9

Tableau 8 : Identification et dosage par chromatographie en phase gazeuse des résidus glycosidiques sous forme d'acétates d'alditols, formés à partir des polysaccharides d'*Asparagopsis armata*

Aux vues des résultats obtenus dans les deux cas, il en est déduit que l'extrait polysaccharidique d'*Asparagopsis armata* est majoritairement constitué de galactose, et possède de faibles taux de xylose, de glucose et de 3,6-anhydrogalactose. Les 3% d'acides uroniques dosés par colorimétrie n'ont pu être identifiés que sous forme de dérivés triméthylsilylés, et sont assimilés à de l'acide glucuronique et de l'acide galacturonique.

Il est à noter que sur les chromatogrammes des dérivés triméthylsilylés des polysaccharides d'*Asparagopsis armata*, on peut mettre en évidence un très faible pic correspondant à du galactose pyruvaté, mais qui ne peut être dosé car présent sous forme de traces. La présence de pyruvate est d'ailleurs démontrée par spectroscopie RMN, où des signaux caractéristiques de ce type de substituant sont visibles chez nos polysaccharides.

La teneur en groupements pyruvate est alors estimée au cours du dosage colorimétrique approprié. Malheureusement, la proportion de ces derniers semble être trop faible pour être détectée par colorimétrie.

Un traitement acide doux (AcOH 2%, 2 heures, 100°C) est alors appliqué aux polysaccharides, afin d'éliminer les groupements pyruvate tout en conservant la structure principale. Les oses constitutifs de ce polysaccharide traité sont alors dosés sous forme de dérivés O-triméthylsilylés afin de déterminer, par comparaison des taux de galactose au sein du polysaccharide natif et du polysaccharide ayant subi une hydrolyse douce, la proportion de galactose portant un groupement pyruvate. La teneur de ce dernier semble cependant trop faible pour être estimée correctement.

En conclusion, les polysaccharides d'*Asparagopsis armata* comportent également une très faible quantité de groupements pyruvate, portés par des galactoses, mais qui ne peuvent être dosés.

2.2.2 – Détermination de la configuration absolue des résidus glycosidiques

La détermination de la configuration absolue des monosaccharides est basée sur la détection par chromatographie en phase gazeuse des diastéréoisomères correspondants, formés par conversion en présence d'un agent chiral des énantiomères (D/L) libérés au cours de l'hydrolyse acide du polymère.

Cette méthode a permis de mettre en évidence la présence des deux énantiomères D et L pour le galactose, mais n'a malheureusement pas permis de les quantifier. En effet, les coefficients de réponse obtenus pour le D-galactose sont très hétérogènes, et ce, malgré la répétition de l'expérience.

C'est pourquoi il a été nécessaire de se tourner vers une autre méthode de quantification du D-galactose : le dosage enzymatique.

Ce dernier, spécifique du D-galactose, s'est avéré très sensible à la présence de substituants sur celui-ci. Ainsi, des résultats très disparates ont été enregistrés entre les polysaccharides natifs et désulfatés (tableau 9).

	% massique de galactose total	% massique de D-galactose	% massique de L-galactose
Polysaccharides natifs	37	33,1	3,9
(sous forme $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$)	100	89,5	10,5
Polysaccharides natifs	37	14,88	22,12
(sous forme $\text{SO}_3^- \text{H}^+$)	100	40,23	59,77
Polysaccharides désulfatés	58,95	46,3	12,65
	100	78,5	21,5

---- : Pourcentages ramenés à 100% de galactose total

Tableau 9 : Teneurs en D- et L-galactose de l'extrait polysaccharidique d'*Asparagopsis armata*, obtenues par dosage enzymatique. (le % massique de galactose total est obtenu par dosage des acétates d'alditols en CG)

La présence de D- et de L-galactose est indéniable dans l'extrait polysaccharidique de l'*Asparagopsis armata*, mais il est très difficile d'estimer la proportion de chacun. Le fait que le dosage enzymatique soit spécifique du D-galactose tel quel (sans substituant), suggérerait que les valeurs les plus proches de la réalité soient celles obtenues dans le cas du polysaccharide désulfaté, à savoir environ 80% de D-galactose, 20% de L-galactose.

2.2.3 – Détermination du taux de galactose lié en 4, sulfaté en 6

Cette estimation est effectuée à travers le dosage des 3,6-anhydrogalactoses formés au cours du traitement alcalin de l'extrait polysaccharidique comportant ce type de résidu saccharidique spécifique : le 4-Gal-6- SO_3^- .

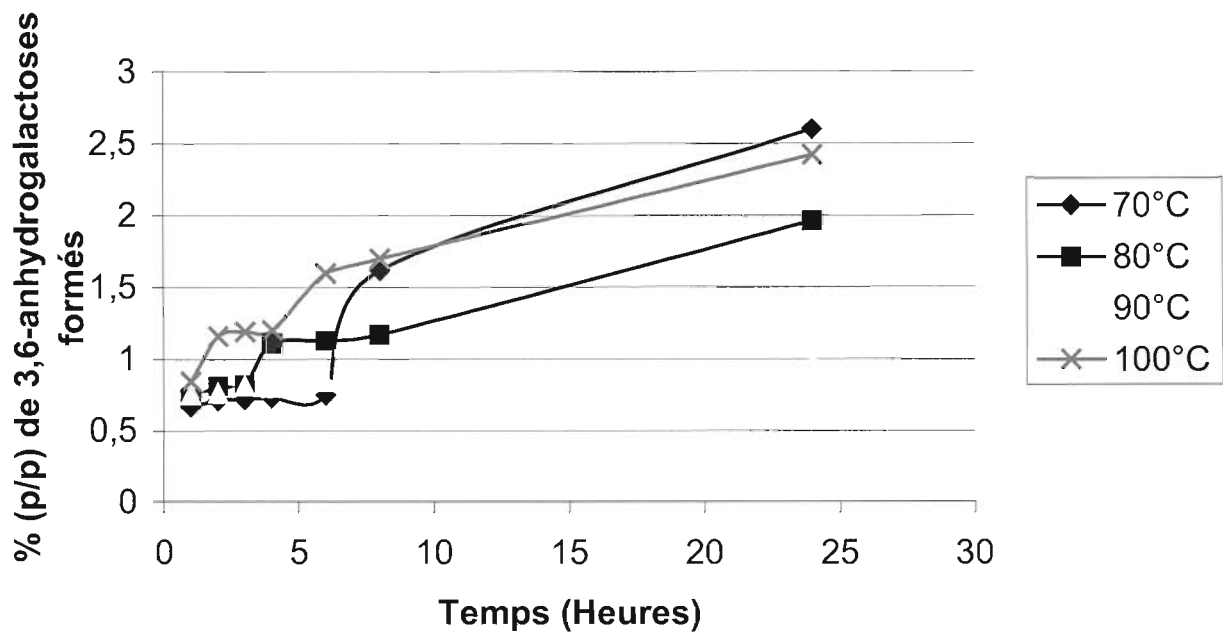


Figure 43 : Formation directe des 3,6-anhydrogalactoses sans réaction préliminaire (Falshaw & Furneaux, 1994; Furneaux & Stevenson, 1990; Miller, Falshaw & Furneaux, 1995)

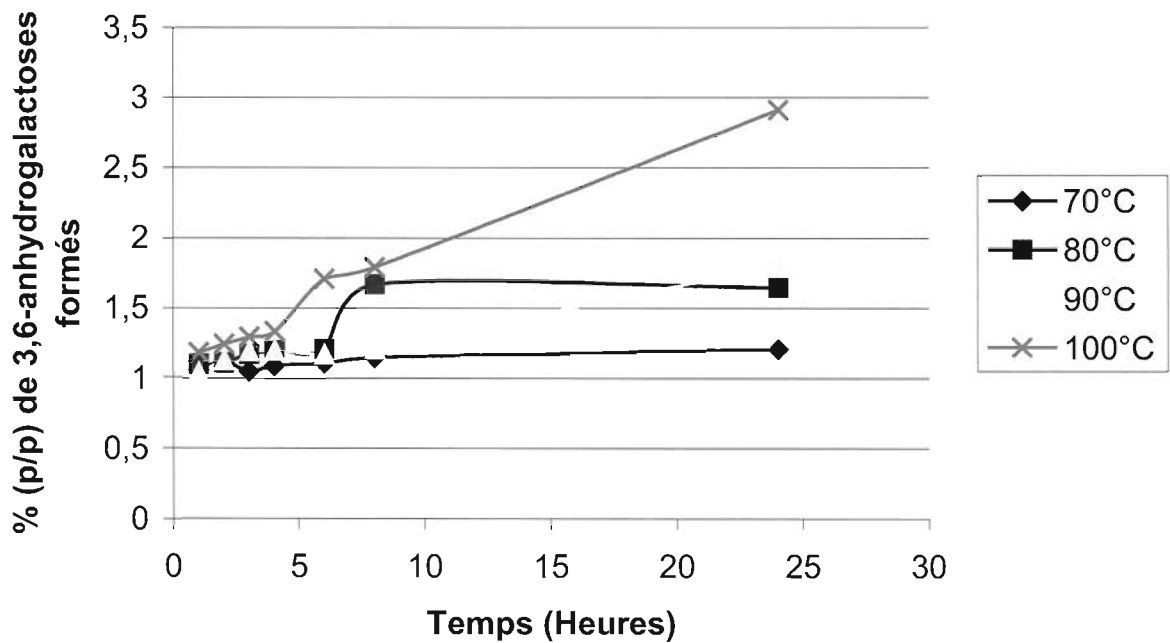


Figure 44 : Formation des 3,6-anhydrogalactoses nécessitant une préparation préliminaire des polysaccharides. Inspirée de Falshaw *et al.* (Falshaw & Furneaux, 1998)

En effet, un traitement en milieu alcalin des galactoses liés en 4 portant un sulfate primaire sur le carbone 6, conduit à la formation de 3,6-anhydrogalactoses dosés directement par dosage colorimétrique. Rappelons que les conditions opératoires employées génèrent une ionisation des groupements hydroxyle libres. C'est le cas notamment de celui porté par le carbone 3, qui par le biais d'une substitution nucléophile sur l'ester sulfate porté par le carbone 6, va résulter en la formation d'un pont 3,6-anhydro sur le résidu, et la libération du groupement sulfate correspondant. Une température élevée au cours de la réaction permet de placer les deux acteurs principaux en position favorable pour cette substitution nucléophile (position axiale).

Le dosage colorimétrique des 3,6-anhydrogalactoses ainsi formés permet donc de remonter au taux de 4-galactoses sulfatés en 6 initialement présents dans nos polysaccharides.

Diverses cinétiques effectuées dans des conditions opératoires différentes sont testées (*cf.* chapitre II-2.2.5). Dans tous les cas (figures 43, 44 et 45), le taux de 3,6-anhydrogalactose formé reste faible, toujours inférieur à 3% (figure 46).

Deux conclusions majeures peuvent être déduites de ces résultats (Noseda *et al.*, 1999) :

- Soit l'oxygène porté par le carbone 3 est déjà substitué (soit par un groupement sulfate, soit par une unité glycosidique)

- Soit la proportion de carbone 6 portant un sulfate primaire est très faible

Dans les deux cas, il est alors très difficile de former des 3,6-anhydrogalactoses, et ce, quelles que soient les conditions employées.

Cette expérimentation permet donc d'apporter des informations structurales sur nos polysaccharides, à défaut d'évaluer le pourcentage précis d'un résidu spécifique : le 4-Gal-6-SO₃⁻.

En résumé, la caractérisation chimique des polysaccharides extraits de l'algue *Asparagopsis armata* nous a d'ores et déjà permis de dégager quelques informations relatives à leur structure. En effet, les résultats du dosage des résidus glycosidiques sous forme

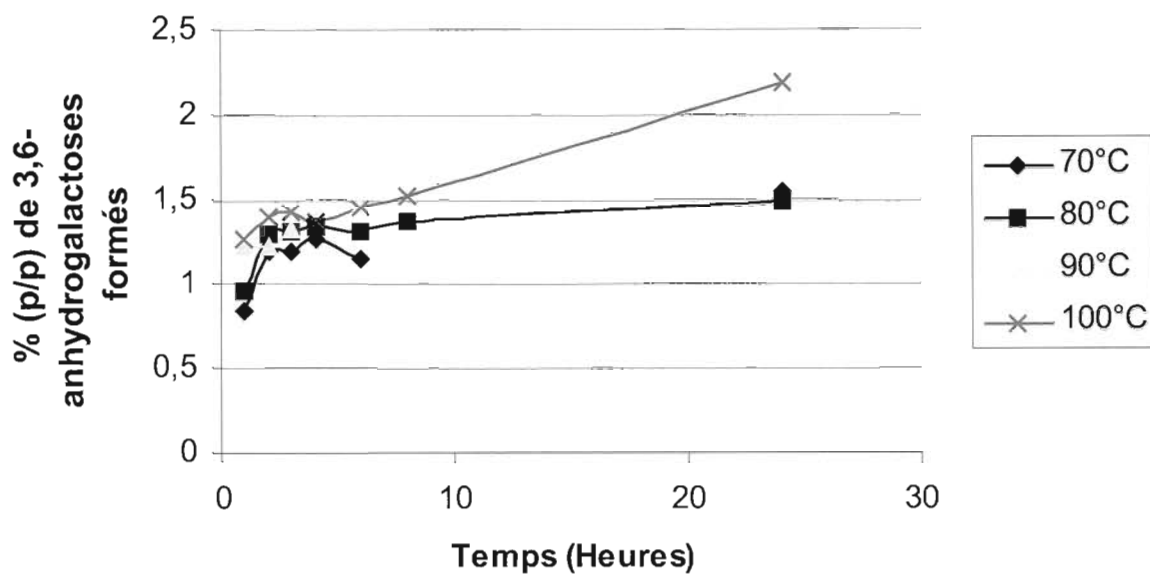


Figure 45 : Formation des 3,6-anhydrogalactoses nécessitant une préparation préliminaire des polysaccharides. Inspirée de Estevez *et al.* (Estevez, Ciancia & Cerezo, 2000)

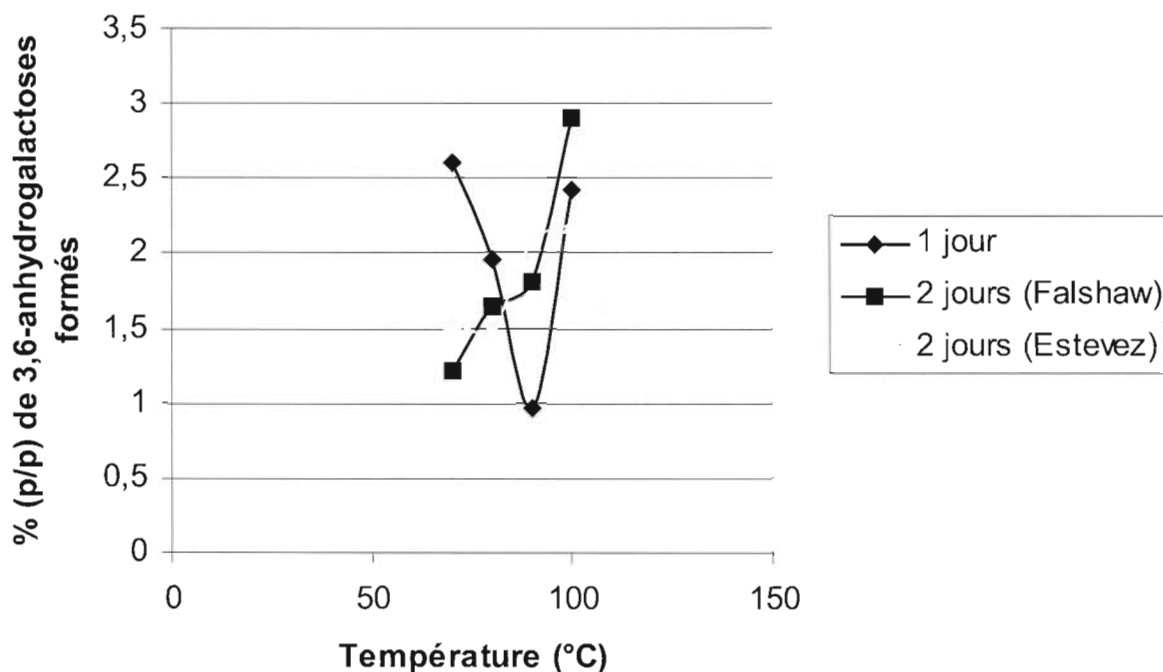


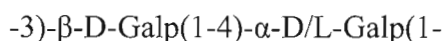
Figure 46 : Bilan des cinétiques de formation des 3,6-anhydrogalactoses à partir des polysaccharides de l'algue *Asparagopsis armata*.

d'acétates d'alditols indiquent que ces polysaccharides sont constitués majoritairement de galactose, xylose et de sulfate selon les rapports molaires respectifs 10 :1 :17.

D'après l'étude bibliographique, nous savons que les polysaccharides d'algues rouges sont décrits comme étant des galactanes, dont il existe deux catégories principales : les agarocolloïdes et les carraghénanes. Les agarocolloïdes sont constitués de D- et de L-galactose, alternant régulièrement le long de la chaîne principale ; et les carraghénanes sont constitués uniquement de D-galactose.

L'unité L-galactose des agarocolloïdes se trouve généralement sous forme de 3,6-anhydrogalactose, et ils sont de manière générale beaucoup moins sulfatés comparés aux carraghénanes.

Le squelette de base des galactanes d'algues rouges peut ainsi être schématisé comme suit :



Nous avons également vu au cours de cette synthèse bibliographique qu'il existait une troisième famille de polysaccharides d'algues rouges, mélange d'agarocolloïdes et de carraghénanes : les carragars.

Il semblerait que nous soyons dans ce troisième cas de figure, et les proportions annoncées pour nos polysaccharides (80% de D-galactose et 20% de L-galactose) suggèrent que le carragar identifié comporterait 40% d'agarocolloïdes et 60% de carraghénanes.

Mais il paraît évident que les unités qui constituent nos polysaccharides ne sont pas assimilées à des carraghénanes purs ou des agarocolloïdes purs en tant que tels.

En effet, si nos polysaccharides comportaient réellement 40% d'agarocolloïdes, le pourcentage de 3,6-anhydro-L-galactose correspondant devrait être conséquent, ce qui n'est pas le cas. Nous sommes d'ailleurs plus proches d'une structure de type agaroiïde (moins de 3,6-anhydro-L-galactose, plus de sulfate) qu'agar.

Il semble donc plus judicieux de préciser simplement le pourcentage de D- et de L-galactose pour décrire nos polysaccharides, plutôt que d'annoncer la présence de 60% de carraghénanes et 40% d'agarocolloïdes. Une alternative pourrait consister en la précision : 60% de structure de type carraghénane et 40% de structure de type agarocolloïde.

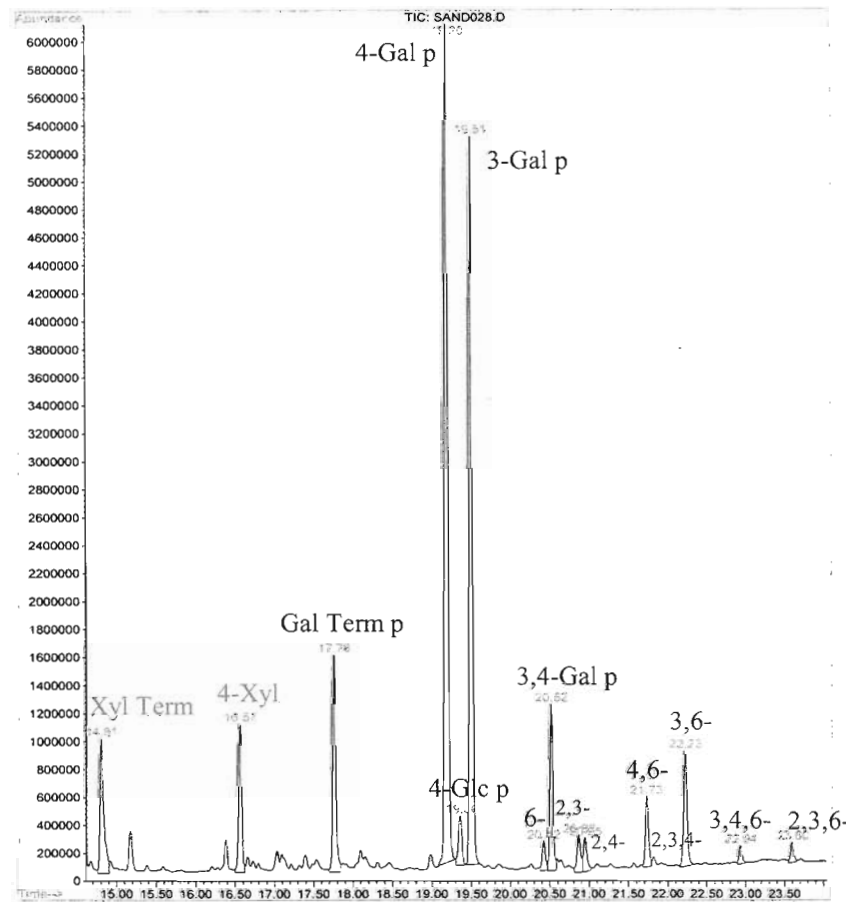
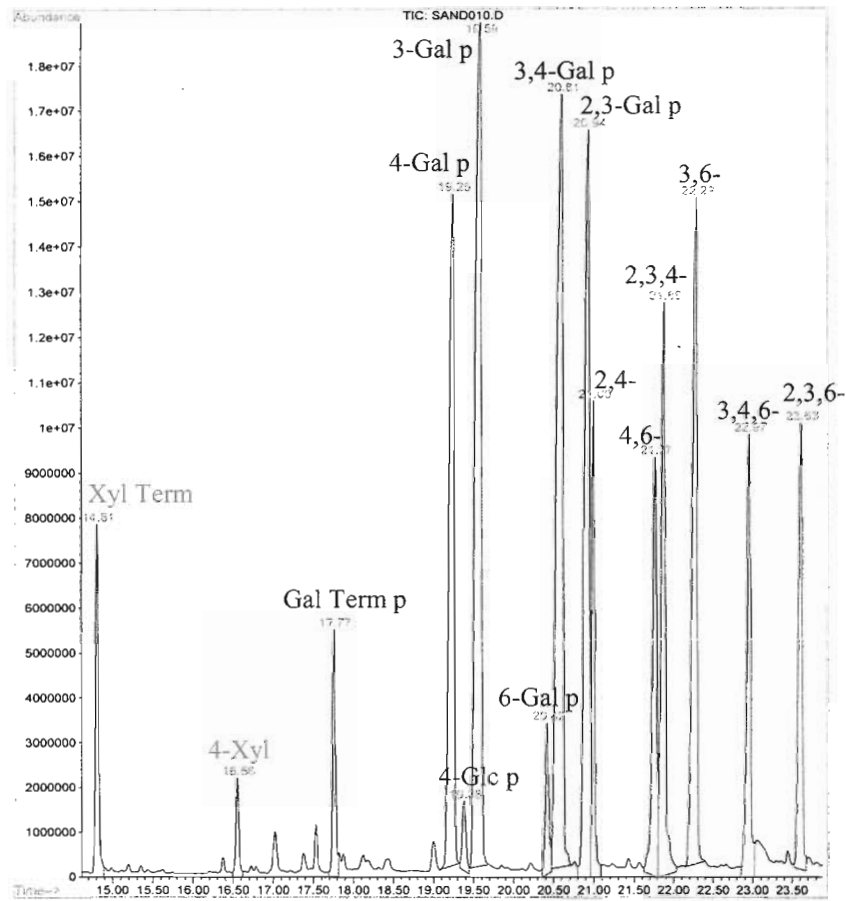


Figure 47 : Comparaison des spectres de CG/SM des polysaccharides natifs d'*Asparagopsis armata* avant (en haut) et après (en bas) désulfatation

3 – Détermination de la nature des liaisons glycosidiques

3.1 – Méthylation des polysaccharides

Cette étape permet de différencier les groupements hydroxyle libres de ceux engagés dans une liaison osidique. Dans le cas de polysaccharides sulfatés, la position des esters sulfates est déterminée par comparaison des spectres CG/SM des échantillons méthylés avant et après désulfatation (figure 47).

Quelle que soit la nature des polysaccharides traités (natifs ou désulfatés), l'étape de méthylation est réitérée sur les échantillons méthylés afin d'assurer une méthylation complète. Les oses perméthylés sont alors identifiés par leurs temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse et leur spectre de masse (tableau 10).

Les résultats de l'analyse élémentaire par CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés de l'extrait polysaccharidique de l'*Asparagopsis armata* confirme la présence majoritaire de galactose au sein de ces polymères.

Les quantités non négligeables d'oses terminaux, notamment dans la fraction désulfatée, prouvent l'existence de ramifications sur ces polysaccharides. De plus, le fait que leur proportion augmente notablement après désulfatation incite à penser que ces derniers sont partiellement sulfatés.

Dans la littérature, les polysaccharides d'algues rouges sont tous décrits comme ayant pour squelette de base une alternance régulière entre les unités 3- β -D-galactopyranose, et 4- α -D/L galactopyranose. En se basant sur cette hypothèse, nous pouvons donc raisonnablement penser que notre extrait polysaccharidique est constitué à 50% d'unités galactose liées en 1,4 et à 50% d'unités galactose liées en 1,3 pour sa chaîne principale.

Or, après désulfatation complète de l'échantillon, nous ne disposons que de 40% de galactose lié en 1,4 et de 30% de galactose lié en 1,3. Cela signifie donc que 30% des unités de notre extrait polysaccharidique sont à priori ramifiées (il ne peut s'agir de groupements sulfate résistants à la désulfatation, cette dernière ayant été confirmée par analyse élémentaire). Pour 20% d'entre elles, il s'agirait de galactoses liés en 1,3, et les 10% restants seraient vraisemblablement des unités galactose liées en 1,4.

Acétates d'alditols partiellement méthylés	Temps de rétention (min) ^a	Fragments primaires (m/z)	Résidu substitué correspondant	Réponse du détecteur (%)	
				I	II
2,3,4-Me ₃ Xyl ^b	1,4	117, 118, 161, 162	Xylp-(1→	3,5	4,54
2,3-Me ₂ Xyl	3,15	118, 189	→4)-Xylp-(1→	1,24	2,46
2,3,4,6-Me ₄ Gal	4,36	118, 161, 162, 205	Galp-(1→	2,09	10,58
2,3,6-Me ₃ Gal	5,84	118, 233	→4)-Galp-(1→	10,23	40,2
2,4,6-Me ₃ Gal	6,18	118, 161, 234, 277	→3)-Galp-(1→	15,86	29,8
2,3,4-Me ₃ Gal	7,01	118, 162, 189, 233	→6)-Galp-(1→	1,54	0,46
2,6-Me ₂ Gal	7,2	118, 305	→3,4)-Galp-(1→	15,16	6,95
4,6-Me ₂ Gal	7,53	161, 262	→2,3)-Galp-(1→	11,55	0,78
3,6-Me ₂ Gal	7,6	190, 233	→2,4)-Galp-(1→	3,97	0,63
2,3-Me ₂ Gal	8,36	118, 261	→4,6)-Galp-(1→	5,83	0,82
2,4-Me ₂ Gal	8,88	118, 189, 234, 305	→3,6)-Galp-(1→	9,99	2,8
6-MeGal	8,47	-	→2,3,4)-Galp-(1→	7,54	-
2-MeGal	9,56	118, 333	→3,4,6)-Galp-(1→	5,7	-
4-MeGal	10,22	189, 262	→2,3,6)-Galp-(1→	5,75	-
2,3,6-Me ₃ Glc	5,97	118, 233	→4)-Glc p-(1→	0,66	1,3

^aTr = Temps de rétention de l'acétate d'alditol relatif à celui du tétraacétate d'érythritol (Tr = 1,00)

^b2,3,4-Me₃Xyl = 1,5-di-O-acétyl-2,3,4-tri-O-méthyl-xylitol

Tableau 10 : Identification par CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés produits par l'extrait polysaccharidique de l'*Asparagopsis armata* natif (I) et désulfaté (II).

La position des esters sulfates ainsi que celle des branchements est déterminée par comparaison des résultats de méthylations réalisées sur les polysaccharides avant et après désulfatation. L'augmentation du pourcentage des unités galactose liées en 1,3 et 1,4 après désulfatation indique clairement que ces deux unités sont partiellement sulfatées (30% des unités 4-galactose comporterait des groupements sulfate, ainsi que 14% des unités 3-galactose).

De plus, le fait que certains résidus restent polysubstitués après désulfatation donne une indication sur les points de ramification.

Ainsi, la comparaison des pourcentages d'oses perméthylés avant et après désulfatation, permettent de déduire certaines conclusions concernant la structure :

❖ Galactoses liés en 1,3 et 1,4

Dans le paragraphe précédent, nous avons déjà noté que l'espèce désulfatée ne contenait que 40% de galactose lié en 1,4, et 30% de galactose lié en 1,3. En se basant sur une alternance régulière des unités 1,3 et 1,4 (50%-50%), nous avons alors conclu que 10% des unités 1,4 et 20% des unités 1,3 étaient substituées. De plus, la comparaison des espèces avant et après désulfatation montre que 30% des 4-galactoses et 14% des 3-galactoses étaient sulfatés sur une des positions restantes (2, 3 ou 4, ou 6).

Enfin, les pourcentages de ces types de galactoses monosubstitués avant désulfatation (10% pour le 1,4 et 16% pour le 1,3) génèrent deux hypothèses : soit il s'agit d'unités faisant partie de la chaîne principale tels quels, sans groupements sulfate ni ramifications ; soit ces unités sont des ramifications, branchées sur la chaîne principale, et sont elles-mêmes soit ramifiées (en 3 ou 4), soit sulfatées (et sont à l'origine d'une augmentation du taux de galactose terminal après désulfatation).

❖ Galactoses trisubstitués avant désulfatation

Des unités galactose trisubstituées en 2, 3 et 6 (correspondant au 4-Me Gal), il est déduit que 6% des galactoses liés en 1,3 possèdent des groupements sulfate en position 2 et 6.



Le cas des unités 2-Me Gal et 6-Me Gal est plus délicat à traiter, puisque l'on ne sait pas s'il s'agit d'unités 1,3 disulfatées (en 4,6 ou 2,4), ou d'unités 1,4 disulfatées (en 3,6 ou 2,3), voire les deux dans des proportions variables. On ne peut donc rien conclure de ces deux cas sans information supplémentaire.

❖ Galactoses disubstitués avant désulfatation

A partir des 2,8% d'unités 2,4-Me₂ Gal résiduels obtenus après l'élimination des sulfates, on peut déduire que la structure comporte environ 7% d'unités 1,3 sulfatées en 6 (9,99%~10% - 2,8%), et aux alentours de 3% d'unités 1,3 comportent un substituant en position 6. De même, les pourcentages obtenus pour le 2,3 Me₂ Gal indiquent que 5% des unités 1,4 sont sulfatées en position 6, et un peu moins de 1% comporte un substituant en cette position.

Des considérations identiques pour l'évolution des pourcentages du 3,6 Me₂ Gal et 4,6 Me₂ Gal montrent qu'environ 3% (3,3%) des unités 1,4 sont sulfatées en 2, et 0,6% substituées en 2. De même, presque 11% des unités 1,3 sont sulfatées en 2 et un peu moins de 1% substituées sur cette même position.

Le cas du 2,6-di-O-méthyl-galactose (correspondant à un galactose lié en 1,3 et 4) est plus ambigu. En effet, deux interprétations peuvent être déduites des 7% résiduels de ce résidu après désulfatation : soit il s'agit d'un galactose lié en 1,4 ramifié en 3, soit il s'agit d'un galactose lié en 1,3 ramifié en 4, soit les deux, dans des proportions variables. De plus, la diminution du pourcentage de 15 à 7% pour ce type de résidu après désulfatation suggère qu'il soit sulfaté à raison de 8%. Ici encore, on ne peut dire s'il s'agit d'un sulfate porté par le carbone 3 du galactose lié en 1,4, ou l'inverse : un sulfate porté par le carbone 4 du galactose lié en 1,3.

Cependant, la présence d'un ester sulfate en C-4 du galactose lié en 3 semble vraisemblable aux vues des spectres Infra-Rouge de l'extrait polysaccharidique natif (*cf.* chapitre 5). En effet, le spectre de cette espèce présente deux absorbances caractéristiques d'un ester sulfate axial en C-4, à 845 et 930 cm⁻¹ (Lloyd *et al.*, 1961; Rochas *et al.*, 1986). Cette hypothèse est d'ailleurs confortée par le fait que si l'ester sulfate était porté par le

carbone 3 du galactose lié en 1,4, il aurait été éliminé au cours du traitement alcalin en faveur de la formation de 3,6-anhydrogalactose. Or, ce n'est pas le cas (cf. chapitre 2.2.3).

Il semble donc que notre extrait polysaccharidique comporte 8% de galactoses liés en 1,3, unités portant en partie un ester sulfate en position 4.

❖ Oses monosubstitués et non substitués

A partir des pourcentages de 2,3,4 Me₃ Gal avant et après désulfatation, on en déduit la présence de galactoses terminaux dont 1% d'entre eux sont sulfatés en 6 et 0,5% substitués sur cette même position.

Les pourcentages de 2,3,4,6 Me₄ Gal (galactose terminal) permettent de confirmer le fait qu'une partie soit sulfatée à raison de 8,6% et que 2% environ existent en tant que tels (déduction réalisée à partir du taux de galactose terminal présent avant désulfatation).

Le fait que l'on travaille sur le polysaccharide natif et non dépolymérisé suggère que les unités de fin de chaîne (les extrémités de chaîne) sont peu nombreuses. Les galactoses terminaux observés seraient donc à priori des ramifications de la chaîne principale.

Les cas des 2,3,6 Me₃ Gal et 2,4,6 Me₃ Gal, et l'ambiguïté qu'ils soulèvent, ont quant à eux déjà été interprétés (galactoses liés en 1,3 et 1,4).

Quant au xylose, les pourcentages de xyloses terminaux indiquent clairement que 3,5% d'entre eux sont des ramifications de la chaîne principale et que parmi les ramifications de cette même chaîne, il faut compter en plus, 1% de xylose sulfaté.

L'augmentation du pourcentage de 2,3 Me₂ Xyl après désulfatation est plus difficile à interpréter. En effet, elle proviendrait de la désulfatation d'espèces xyloses polysubstituées non détectées et non détectables. Malgré la forte incertitude à ce sujet, les 2,5% résiduels après désulfatation ne sont pas à négliger, et l'on peut déduire à partir des résultats obtenus pour cette espèce que environ 1% de xylose était sulfaté en position 4, et environ 1% supplémentaire substitué sur cette même position (soit par un sulfate également, soit par un substituant). Ici encore, il est très difficile de trancher sans informations complémentaires.

Enfin, les résultats obtenus pour le 2,3,4 Me₃ Glc permettent de conclure à la présence de Glucose lié en 4, provenant probablement d'amidon floridien contenu dans nos polysaccharides (Falshaw *et al.*, 2001). Il est donc dans un premier temps dosé, puis n'est plus pris en compte pour le calcul des pourcentages des oses polysaccharidiques perméthylés.

En résumé, et en partant du postulat que notre squelette polysaccharidique soit construit sur une alternance régulière entre les unités 3-β-D-galactopyranose, et 4-α-D/L galactopyranose (50-50), nous avons pu tirer à partir des acétates d'alditols partiellement méthylés de la fraction polysaccharidique certaines conclusions concernant la structure de cette dernière.

Il apparaît cependant que de nombreuses incertitudes quant à l'attribution de certaines positions n'ont pu être levées. Notamment lorsque l'on effectue le bilan des espèces sulfatées, on se rend compte que dans le cas du galactose lié en 4, on ne recouvre pas la totalité des 30% estimés au départ, alors que pour le galactose lié en 3, on dépasse largement les 14% supposés d'espèces sulfatées. Dans ce dernier cas par exemple, même si l'on supposait que les 16% de 2,4,6 Me₃ Gal initiaux correspondaient à des espèces galactoses terminales sulfatées en 3, et donc que les 30% obtenus après désulfatation ne proviendraient que d'espèces galactoses liées en 3 polysulfatées au départ, le taux de galactose terminal obtenu après élimination des sulfate nous rappelle que cette théorie n'est que partiellement possible puisque la désulfatation des 16% de galactoses « sulfatés » en 3 devrait générer dans ce cas 16% de galactoses terminaux. Or ce taux n'est que de 10,6%, sans tenir compte des 2% initialement présents.

De même, même si les spectres Infra-Rouge nous laissent envisager l'hypothèse de galactose lié en 3 et sulfaté en 4 plutôt que l'inverse dans le cas du 2,6 Me₂ Gal, cette hypothèse ne semble que partiellement vraie aux vues de ces résultats.

En fait, l'ambiguïté majeure réside dans le fait que lorsque les positions 3 et 4 d'un même galactose sont concernées, il est impossible de savoir en utilisant de telles conditions s'il s'agit d'un galactose lié en 3 et substitué en position 4 ou l'inverse.

Ce que nous pouvons cependant affirmer concernant la structure de nos polysaccharides, et ce, en partant sur la base d'une alternance régulière entre les unités 3-β-D-galactopyranose, et 4-α-D/L galactopyranose (50-50) :

◆ **Unités 3- β -D-galactopyranose**

- 7% d'entre elles sont sulfatées en 6
3% " " substituées en 6
- 11% d'entre elles sont sulfatées en 2
0,8% " " substituées en 2
- 5,75% d'entre elles sont sulfatées en 2,6

◆ **Unités 4- α -D/L galactopyranose**

- 5% d'entre elles sont sulfatées en 6
0,8% " " substituées en 6
- 3,3% d'entre elles sont sulfatées en 2
0,6% " " substituées en 2

Tout le reste ne repose que sur des probabilités de structure, et reste donc incertain.

Pour que nos résultats soient cohérents, il faudrait par exemple que ce soit les unités 4-galactose qui portent les sulfate en 3 (8%), en 3,6 (5,7%), et en 2,3 (7,5%), de manière à justifier l'origine des 30% d'unités 4-galactose sulfatées estimées au départ.

En ce qui concerne les taux de substitution estimés (10% d'unités 4-galactose, 20% d'unités 3-galactose), il est impossible d'en attribuer l'origine, ces espèces étant probablement ramifiées de manières diverses dans des proportions variables par des xyloses et des galactoses terminaux notamment.

C'est pourquoi, sans informations supplémentaires permettant notamment d'identifier clairement les résidus liés en 4 de ceux liés en 3, il sera impossible d'établir correctement la structure de nos polysaccharides, malgré certaines hypothèses structurales sérieuses, mais incomplètes.

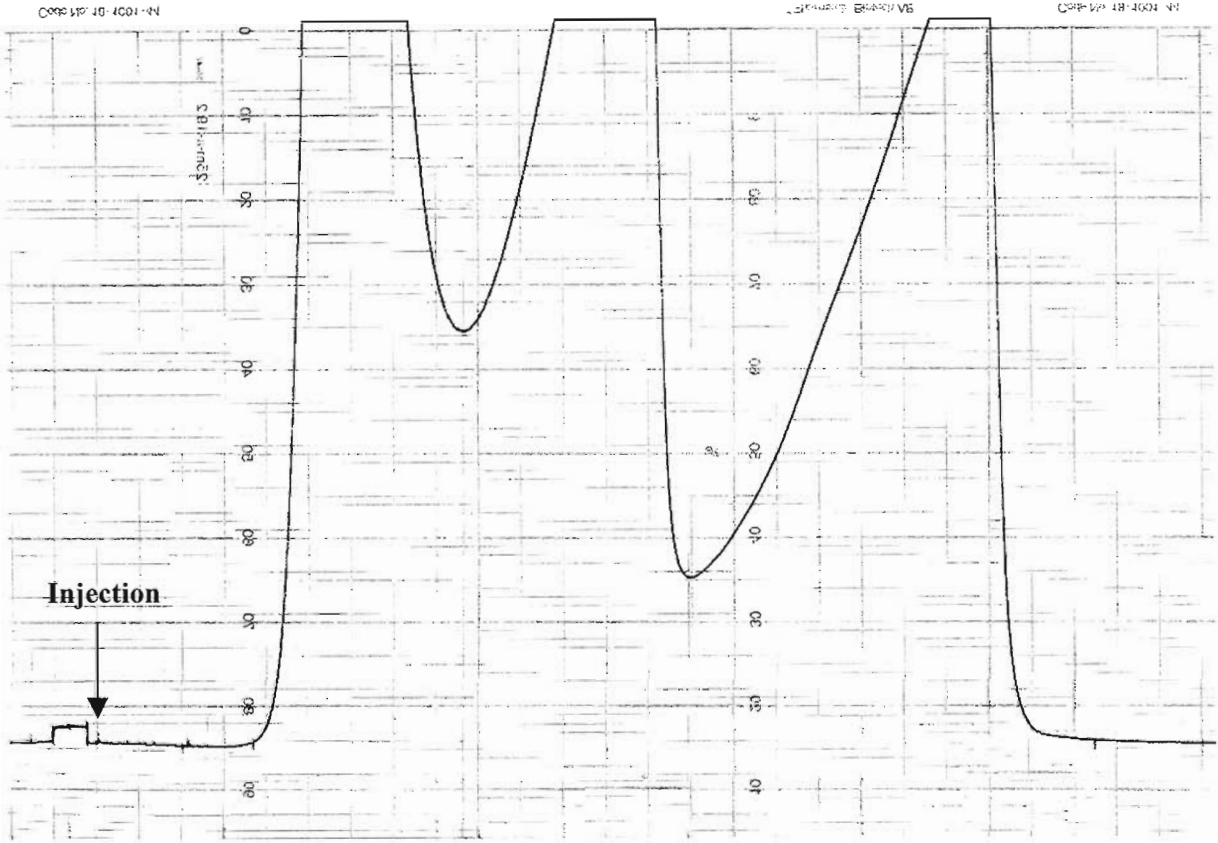


Figure 48 : Profil d'élution de la chromatographie de filtration sur gel P2 des produits issus de la dégradation de Smith

4 – Détermination de la séquence osidique

4.1 – Dégradation de Smith

Rappelons que cette méthode permet le clivage de liaisons carbone-carbone de carbones adjacents porteurs de groupements hydroxyle libres.

Elle permet donc dans notre cas de déduire la présence de certains substituants (osidiques ou non) sur la chaîne principale, substituants empêchant ce clivage de s'effectuer.

Les chaînes formées, stabilisées (rendement = 49%), sont alors purifiées et séparées par chromatographie de filtration sur gel de type Bio-Gel P2 (100-1800 Da, Bio-Rad).

Le profil obtenu (figure 48), permet de mettre en évidence trois fractions :

- Une fraction de masse supérieure à 1800 Da (majoritaire, de l'ordre de **89%**)
- Une fraction de produit dont la masse est comprise entre 1200 et 1400 Da, comportant 8 à 9 unités saccharidiques (**7%**)
- Une fraction de produit dont la masse est comprise entre 900 et 1100 Da, comportant 6 à 7 unités saccharidiques (**4%**)

La fraction majoritaire éluée avec le volume d'exclusion de la colonne Bio-Gel P2 (de masse supérieure à 1800 Da) est alors déposée sur une colonne contenant un gel de chromatographie de filtration de type Bio-Gel P10 (1500-20000 Da, Bio-Rad). Le seuil de coupure plus élevé de cette colonne permet ainsi de voir si cette fraction de masse supérieure à 1800 Da est homogène ou non.

En l'occurrence, le profil de cette fraction s'est révélé très polydisperse, des produits étant clairement détectés par réfractométrie tout au long de l'élution de la fraction. De plus, une fraction est également éluée avec le volume d'exclusion de cette colonne.

A partir des profils obtenus à l'issue du passage de nos produits sur les colonnes de chromatographie de filtration sur gel, nous pouvons en déduire quelques informations complémentaires de nos hypothèses de structure.

En effet, partant du postulat que notre polysaccharide est construit sur la base d'un enchaînement régulier d'unités saccharidiques de type 3- β -D-galactopyranose et 4- α -D/L

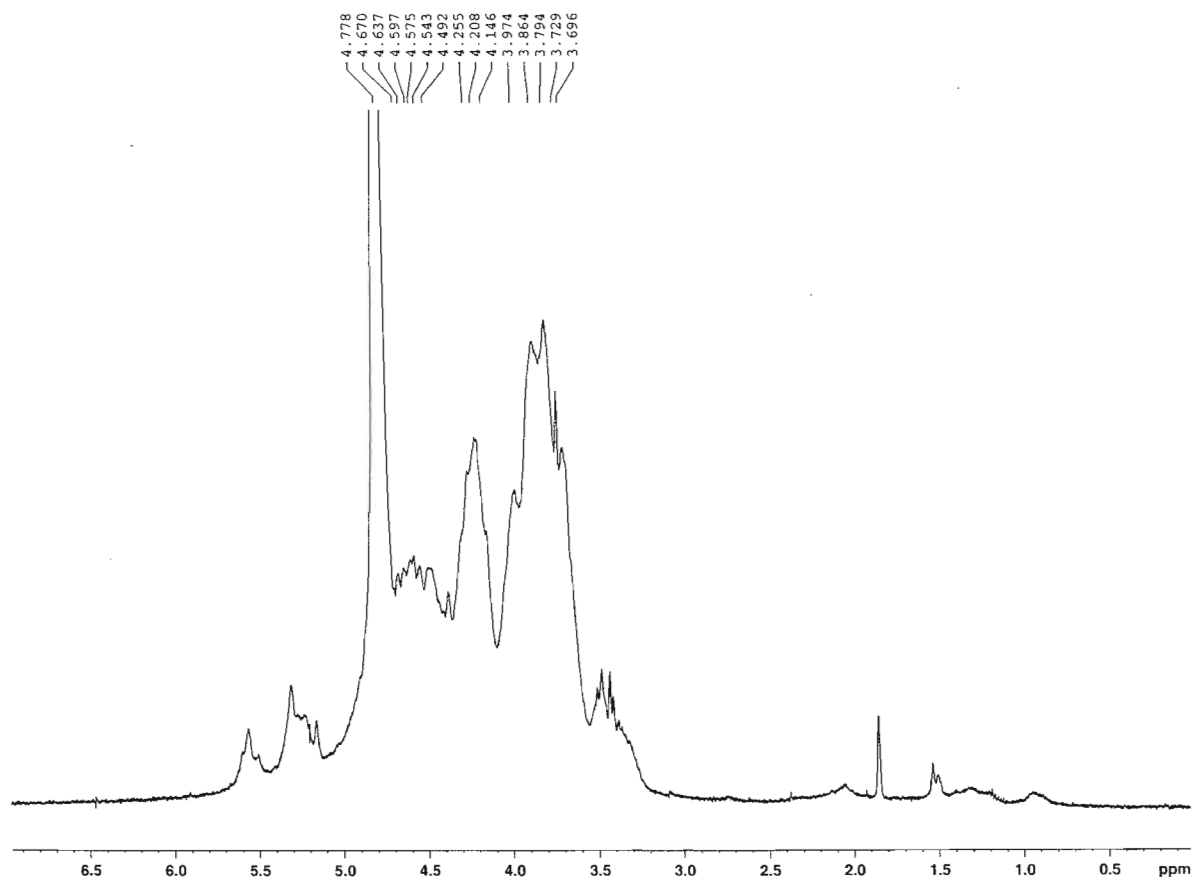


Figure 49 : Spectre de RMN ^1H des polysaccharides natifs de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (298 K, 400 MHz)

galactopyranose dans des proportions 50-50, nous en déduisons que les seuls résidus glycosidiques susceptibles d'être sensibles à la dégradation de Smith sont les monosaccharides liés en 4, car ce sont les seuls pouvant éventuellement posséder deux groupements hydroxyle concomitants (si ces derniers ne sont pas substitués). En effet, sur le 3-galactopyranose, en raison de la liaison glycosidique en 3, aucun clivage n'est possible.

A l'issue de la dégradation de Smith, outre l'obtention de deux fractions comportant 6 à 7 unités saccharidiques d'une part, et 8 à 9 unités saccharidiques d'autre part, nous obtenons également une multitude de produits dont le nombre d'unités osidiques varie entre 10 et 123 (seuil de coupure de la colonne Bio-Gel P10 : 1500-20000 Da).

Cela signifie que la chaîne de notre polysaccharide est constituée de « blocs » plus ou moins importants d'unités saccharidiques dont les résidus 4-galactopyranose sont tous substitués en 2 ou en 3 voire sur les deux positions par un groupement sulfate ou osidique, ce qui leur permet de résister à la dégradation de Smith. Entre ces blocs, se trouvent des résidus 4-galactopyranose où les deux groupements hydroxyle positionnés en 2 et 3 sont libres.

Les résultats obtenus par cette réaction permettent donc de mettre en avant le fait que les unités 4-galactopyranose sont largement sulfatées ou substituées en position 2 et/ou 3, et ce, de manière très irrégulière puisque ces unités possèdent ponctuellement des positions 2 et 3 libres. Ceci confirme la complexité de notre polysaccharide, et pourrait corroborer l'hypothèse d'unités 4-galactopyranose largement sulfatées ou substituées en 3.

4.2 – RMN

Le spectre ^1H enregistré à 298 K de la fraction polysaccharidique d'*Asparagopsis armata* reflète la grande complexité de cette dernière (figure 49).

Les déplacements chimiques des signaux correspondants aux protons anomériques des unités saccharidiques sont facilement identifiables car situés un peu à l'écart des autres. Cela provient du fait que le proton H-1 porté par le carbone C-1 soit déblindé par deux atomes d'oxygène géminés, ce qui génère un signal dans les champs faibles.

De plus, leurs déplacements chimiques dépendent de leur position par rapport au cycle du résidu, axiale ou équatoriale, et donc de la configuration α ou β de la liaison glycosidique.

Ainsi, les signaux relatifs aux protons anomériques de configuration α se situent au-delà de 5 ppm, alors que ceux des protons anomériques de configuration β se trouvent entre 4,5 et 4,8 ppm.

Dans le cas de notre polysaccharide, on note la présence des deux types de protons anomériques (configuration α et β), sans pouvoir toutefois les dénombrer, faute de résolution. Cependant, l'analyse du spectre en mode hétéronucléaire HMQC permet de mettre en évidence une dizaine de signaux correspondant à des protons et des carbones anomériques, situés dans les bas champs (7 d'anomérie α , et 3 d'anomérie β).

Le massif correspondant aux autres protons des résidus saccharidiques est lui aussi très complexe, ce qui génère des spectres bidimensionnels également très complexes, difficilement interprétables.

Il est ainsi impossible de remonter le système de spins des différents oses identifiés, et donc d'en déduire leurs enchaînements.

Par contre, un signal situé vers les hauts champs (déplacement chimique situé à 1,5 ppm) est observable sur le spectre ^1H .

Il s'agit des protons du groupement méthyle appartenant à un groupement pyruvate. Le déplacement chimique observé à 27,6 ppm sur le spectre HMQC, correspondant au carbone C-8 de ce groupement méthyle, permet de confirmer la présence d'un groupement pyruvate sur la chaîne saccharidique de nos polysaccharides d'algue.

5 - Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (FTIR)

L'exploitation des spectres Infra-Rouge de l'extrait polysaccharidique permet d'une part d'observer les bandes correspondant au squelette de base des résidus osidiques, et d'autre part de mettre en évidence les différences entre ces unités saccharidiques : présence et position de groupements sulfate, présence d'oses particuliers tels que les acides uroniques ou les osamines, ou encore les 3,6-anhydrogalactoses, etc...

Ainsi, on note la présence d'une bande très large au-delà de 3000 cm^{-1} qui correspond aux vibrations d'élongation des liaisons hydroxyle des polysaccharides et de l'eau résiduelle contenue par ces derniers.

La bande située à 2940 cm^{-1} correspond quant à elle aux vibrations d'élongation des liaisons C-H des résidus glycosidiques. Cette bande est généralement plus faible en intensité et assez large, et se situe entre 3050 et 2800 cm^{-1} .

Une bande intense et relativement fine se profilant aux alentours de 1640 cm^{-1} est attribuée aux vibrations de déformation angulaire symétrique des liaisons hydroxyle de l'eau, observables en théorie à 1645 cm^{-1} .

D'autres bandes de faible intensité situées entre 1450 et 1350 cm^{-1} résultent des vibrations de déformation angulaire des liaisons C-C-H.

Enfin, les bandes situées autour de 1140 - 1150 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'élongation des liaisons C-C et des liaisons C-O du cycle, confirmées en cela par l'épaule à 1050 cm^{-1} qui correspond aux vibrations d'élongation des liaisons C-O et C-O-H.

En ce qui concerne les particularités spécifiques à notre fraction polysaccharidique, on peut noter que la bande intense située aux alentours de 1250 - 1260 cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongation asymétrique des liaisons O=S=O des groupements sulfate (Stancioff & Stanley, 1969), alors que celle autour de 1030 cm^{-1} correspond à leurs vibrations d'élongation symétrique. L'intensité de ces bandes est cohérente avec un pourcentage en sulfate important au sein de notre extrait polysaccharidique.

La région située entre 1000 et 800 cm^{-1} est d'ailleurs intéressante à ce sujet, puisqu'elle permet d'établir la position de certains groupements sulfate par visualisation des vibrations d'élongation des liaisons C-O-S. Ainsi par exemple, une longueur d'onde à 805 cm^{-1} est caractéristique d'une galactose sulfaté en 4 et en 2, alors qu'à 820 - 830 cm^{-1} , il s'agit plutôt d'un galactose sulfaté en 6 (Liao *et al.*, 1996), voire en 6 et en 2 lorsque le spectre présente une bande majoritaire vers 840 cm^{-1} avec un épaulement à 820 cm^{-1} (Falshaw & Furneaux, 1994).

Dans notre cas, le spectre présente clairement une bande unique vers 845 cm^{-1} caractéristique de la présence d'un ester sulfate secondaire axial placé en position 4 d'un galactose lié en 3 (Lloyd *et al.*, 1961; Rochas *et al.*, 1986).

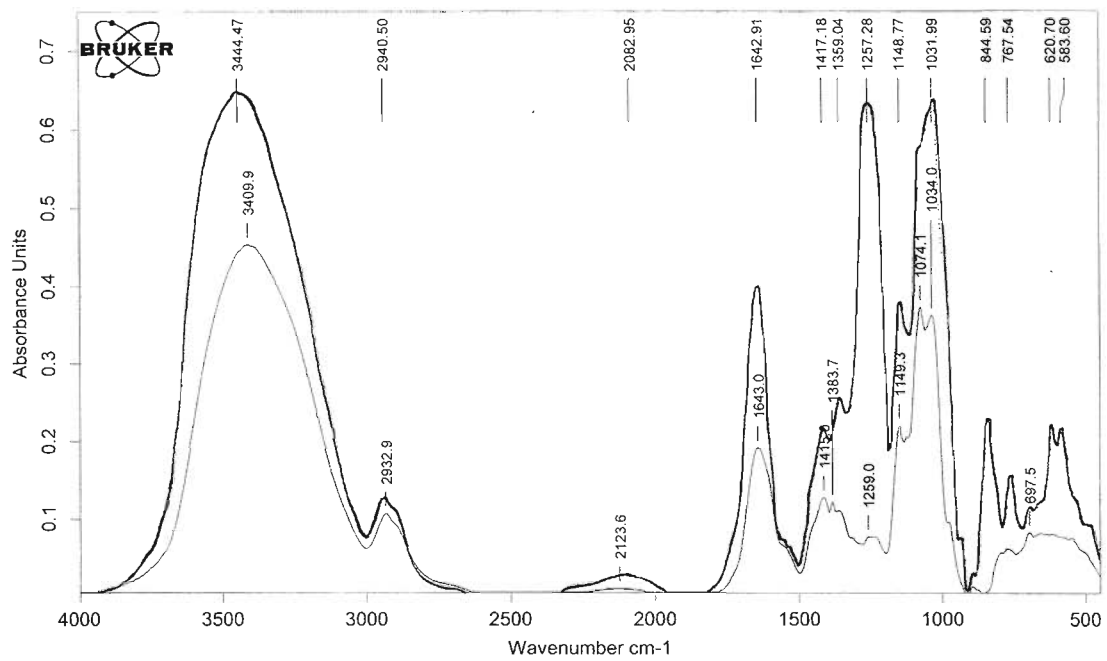


Figure 50 : Spectres Infra-Rouge des polysaccharides de l'algue *Asparagopsis armata* natifs (---) et désulfatés (---)

Enfin, l'épaule située aux alentours de 935 cm^{-1} (Chiovitti *et al.*, 1997) est caractéristique des vibrations d'élongation des liaisons C-O d'un 3,6-anhydrogalactose. Le fait que cette bande soit très faible en intensité corrobore le pourcentage de cet ose évalué au cours des dosages des acétates d'alditols par chromatographie en phase gazeuse.

Quant à la présence de groupements pyruvate, elle devrait se voir vers 1605 cm^{-1} (Chiovitti *et al.*, 1997). Mais cette dernière est masquée par la large bande située à 1640 cm^{-1} correspondant aux vibrations déjà explicitées de l'eau.

La simplification du spectre Infra-Rouge de la fraction polysaccharidique après désulfatation confirme l'élimination totale des groupements sulfate. En effet, toutes les bandes ayant un rapport avec les vibrations d'esters sulfates ont disparu, en particulier celles situées vers 1250 cm^{-1} et 1030 cm^{-1} , ne laissant plus ainsi que les vibrations relatives au squelette saccharidique de notre polymère (figure 50).

6 – Comparaison avec les travaux réalisés par Haslin *et al.* (2000)

A ce stade de l'étude, une comparaison peut être réalisée entre nos résultats et ceux obtenus par Haslin *et al.* en 2000 qui portaient sur les polysaccharides issus du même type d'algue *Asparagopsis armata*, mais n'ayant subi aucun pré-traitement à l'acide.

Dans un premier temps, on peut noter la différence de rendement d'extraction des polysaccharides obtenus dans les deux cas de figure (20% chez Haslin *et al.* contre 6% dans notre cas). Cette différence peut s'expliquer par la nature différente du matériel de départ. En effet, Haslin *et al.* ont travaillé sur des algues « brutes », alors que dans notre cas, les polysaccharides sont extraits de l'algue ayant déjà subi un traitement acide préliminaire dans le but de réaliser l'extrait cellulaire commercialisé. Ce traitement acide peut donc être à l'origine d'une éventuelle dégradation partielle des polysaccharides contenus dans l'algue. Cependant, il est intéressant de noter que la composition globale des polysaccharides obtenus dans les deux cas sont identiques, ce qui signifie qu'il y a préservation de la composition chimique globale des polysaccharides lors du traitement acide de l'algue.

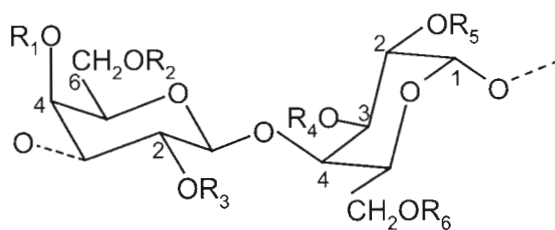
Par contre, lorsque l'on s'intéresse à la structure plus fine des polysaccharides obtenus dans les deux cas de figure, on se rend compte qu'au cours des travaux réalisés par Haslin *et al.*, aucun ose terminal n'est détecté, contrairement à nos polysaccharides où ils sont présents

en quantité non négligeable, révélateurs de la présence probable de ramifications de la chaîne saccharidique principale.

De plus, les proportions des unités 4-galactose et 3-galactose substituées par un résidu osidique sont très éloignées entre les polysaccharides extraits par Haslin *et al.* et nos polysaccharides. En particulier, aucun 3-galactose substitué par un ose n'est détecté chez ces premiers, alors que 40% de ce même type d'unités sont détectés dans notre cas. Donc pour les polysaccharides extraits par Haslin *et al.*, seules les unités 4-galactose peuvent être substituées par un résidu osidique, alors que dans notre cas, les deux types d'unités 4- et 3-galactose sont concernées.

Enfin, lors des travaux réalisés par Haslin *et al.*, seule l'interprétation des spectres Infra-Rouge est employée pour résoudre l'ambiguïté structurale que nous n'avions pu élucider : à savoir la distinction d'unités 3-galactose sulfatées en 4, d'unités 4-galactose sulfatées en 3. Ainsi, l'interprétation des spectres Infra-Rouge de leurs polysaccharides leur permet d'affirmer que seules les unités 3-galactose sont sulfatées en position 4, en raison de la présence d'un pic caractéristique de ce type de substitution situé à 845 nm.

La structure précise de nos polysaccharides étant différente de celle des polysaccharides obtenus dans le cas des travaux d'Haslin *et al.* d'une part, et l'exploitation seule des spectres Infra-Rouge de ces polysaccharides ne nous semblant pas assez résolutive d'autre part, nous avons décidé de poursuivre la caractérisation structurale des polysaccharides d'*Asparagopsis armata* obtenus dans notre cas, de manière à confirmer ou infirmer les résultats obtenus par Haslin *et al.*.



3-β-D-galactopyranose

4-α-L-galactopyranose
(également présent sous la forme D)

Polysaccharides natifs	
Unités 3-β-D-galactopyranose	
R ₃ = SO ₃ ⁻	11%
R ₂ = SO ₃ ⁻	7%
R ₂ = R ₃ = SO ₃ ⁻	5,8%
R ₂ = Substituant	3%
R ₃ = Substituant	Traces
Unités 4-α-D/L-galactopyranose	
R ₅ = SO ₃ ⁻	3,3%
R ₆ = SO ₃ ⁻	5%
R ₅ = Substituant	Traces
R ₆ = Substituant	Traces
Incertitudes	
Unités 3-β-D-galactopyranose	
R ₁ = R ₂ = R ₃ = H	16 % / Nature position 3 ? (chaîne principale ou ramification substituée)
R ₁ = SO ₃ ⁻ ou Substituant	? %
R ₁ = R ₂ = SO ₃ ⁻	? %
R ₁ = R ₃ = SO ₃ ⁻	? %
Unités 4-α-D/L-galactopyranose	
R ₄ = R ₅ = R ₆ = H	10 % / Nature position 4 ? (chaîne principale ou ramification substituée)
R ₄ = SO ₃ ⁻ ou Substituant	? %
R ₄ = R ₆ = SO ₃ ⁻	? %
R ₄ = R ₅ = SO ₃ ⁻	? %

Tableau 11 : Pourcentages massiques des différents types d'oses constitutifs de l'extrait polysaccharidique natif de l'algue rouge *Asparagopsis armata*

IV – CONCLUSION

L'étude structurale des polysaccharides natifs extraits de l'algue rouge *Asparagopsis armata* a permis de mettre en évidence le fait qu'ils soient majoritairement constitués de galactose sulfaté.

Le fait que les résidus galactose soient présents sous les deux formes, D- et L-, permet de préciser que la structure de nos polysaccharides repose à 60% sur une structure de type carraghénane, et à 40% sur une structure de type agarocolloïdes. Il s'agirait donc d'une structure hybride, appelée par certains « carragar ». En particulier, le faible taux de résidus 3,6-anhydrogalactose, associé à la quantité importante de groupements sulfate suggère que la partie de type agarocolloïde de notre structure appartienne à la famille des agaroides.

De plus, la chaîne saccharidique principale de ces polysaccharides n'est pas linéaire, elle comporte en effet de nombreux substituants, qu'il s'agisse de groupements sulfate ou d'unités osidiques terminales telles que les xyloses ou les galactoses.

De manière générale, on note la présence de trois groupements sulfate pour deux résidus galactose, et d'un résidu xylose pour dix résidus galactose.

La nature de l'enchaînement des oses au sein de la chaîne principale a également été mise en évidence.

Comme la plupart des agarocolloïdes ou des carraghénanes, il s'agit d'unités β -D-galactopyranose liées à des unités α -D/L-galactopyranose par le biais de liaisons (1,3) et (1,4). L'hétérogénéité de la position des substituants a rendu leur attribution plus délicate. Cependant, quelques tendances et certaines suggestions de structure ont pu être dégagées, argumentées par des réactions de modifications chimiques complémentaires (*cf.* tableau 11). Ainsi, il a été démontré que les résidus 3- β -D-galactopyranose étaient fortement sulfatés sur les positions 2 et 6, que les résidus 4- α -D/L-galactopyranose étaient également sulfatés sur les positions 2 et 6, et vraisemblablement fortement substitués sur leur position 3 par des groupements sulfate ou osidiques.

La proportion non négligeable d'oses terminaux (galactoses et xyloses) éventuellement sulfatés suggère également la présence de nombreuses ramifications sur la chaîne principale.

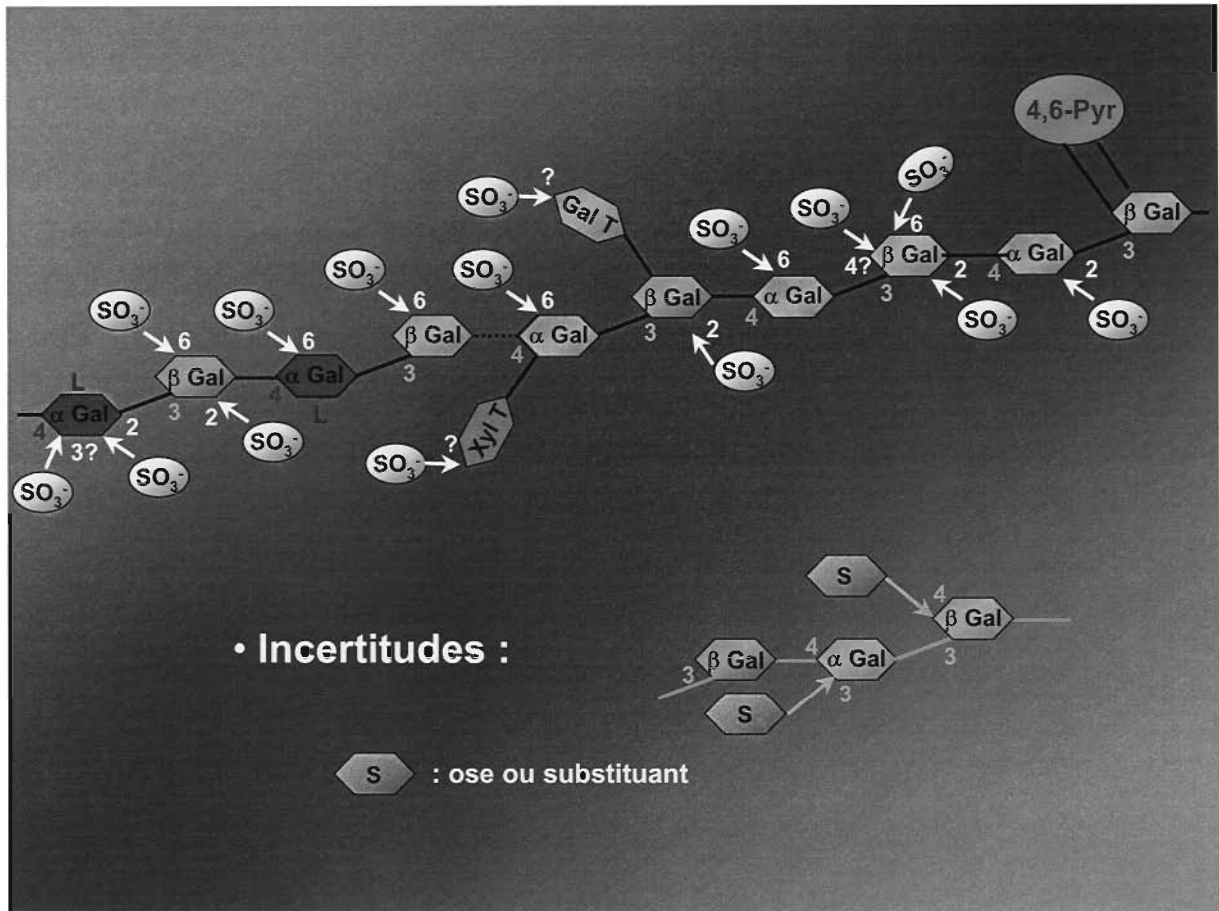


Schéma 1 : Hypothèse de structure des polysaccharides natifs de l'algue rouge *Asparagopsis armata*

Cependant, la difficulté majeure réside dans l'impossibilité de distinguer les résidus 3-galactose des résidus 4-galactose lorsque ceux-ci sont substitués respectivement en position 4 et en position 3, ce qui rend l'attribution des substitutions, et donc la caractérisation structurale, très complexes (schéma 1).

Des études supplémentaires telles que les analyses spectroscopiques ont apporté quelques compléments d'information, mais ont surtout confirmé l'hétérogénéité et la complexité des fractions étudiées.

Ainsi, l'étude des spectres Infra-Rouge des fractions natives et désulfatées a confirmé d'une part le faible taux de résidus 3,6-anhydrogalactose au sein de nos fractions, et d'autre part a permis de mettre en évidence la présence d'unités 3- β -D-galactopyranose portant des groupements sulfate en position 4.

Cela ne signifie pas pour autant que les résidus 4- α -D/L-galactopyranose ne portent pas de substituants en position 3, au contraire. En effet, les conclusions tirées de la réaction de la dégradation de Smith réalisée sur nos polysaccharides natifs ont clairement montré que les unités 4- α -D/L-galactopyranose portent régulièrement des substituants sur leurs positions 2 ou 3, voire 2 et 3.

Lors du traitement alcalin de nos polysaccharides natifs dans le but de former des unités 3,6-anhydrogalactose, nous avons remarqué que quelles que soient les conditions opératoires employées, le taux de transformation des unités 4- α -D/L-galactopyranose en cet ose était toujours très faible, ce qui avait alors généré deux explications possibles : soit l'oxygène porté par le carbone 3 était déjà substitué (par un groupement sulfate, ou une unité glycosidique), soit la proportion de carbone 6 portant un sulfate primaire était très faible. Les informations obtenues à partir de l'analyse des acétates d'alditols partiellement méthylés par CG/SM corroborent ces hypothèses. En effet, bien que le taux de sulfate en position 6 de l'unité 4- α -D/L-galactopyranose ne soit pas très élevé (5%), cette unité comporte toutefois 30% de groupements sulfate. Sa sulfatation en position 2 n'étant que de 3%, et bien que les positions de « di-sulfatation » ne soient pas clairement établies, il est raisonnable de penser que la position 3 du résidu 4- α -D/L-galactopyranose comporte de temps en temps un groupement sulfate, ce qui expliquerait la difficulté à former des résidus 3,6-anhydrogalactose, et à cliver ces unités 4- α -D/L-galactopyranose lors de la dégradation de Smith.

En ce qui concerne l'analyse des spectres de Résonance Magnétique Nucléaire de nos polysaccharides natifs, elle a permis de mettre en évidence la présence de substituants qui n'avaient pu être clairement détectés jusqu'à présent, en l'occurrence des groupements pyruvate.

Mais ces spectres de RMN reflètent surtout la grande complexité de nos fractions saccharidiques.

C'est pourquoi une purification générant une simplification des fractions à étudier est apparu nécessaire afin de mener à bien la caractérisation structurale.

PARTIE 1 :

OBTENTION DE POLYSACCHARIDES DE FAIBLES MASSES MOLAIRES PAR DEPOLYMERISATION RADICALE

I – INTRODUCTION

Dans ce chapitre, est décrite l'obtention par dépolymérisation radicalaire de fractions oligosaccharidiques à partir des polysaccharides natifs de l'algue *Asparagopsis armata*. Cette dépolymérisation est une des premières voies testées pour simplifier l'étude structurale de ces macromolécules.

La mise en place de nouvelles méthodes de modifications chimiques adaptées à ces oligosaccharides, ainsi que les étapes de purification des molécules obtenues y sont également développées.

Enfin, l'étude structurale de ces oligosaccharides est abordée, permettant la progression des connaissances concernant la structure, et l'élaboration de nouvelles hypothèses.

Précisons que ces dernières étapes (modifications chimiques, purification et structure) ont été réalisées au sein du Complex Carbohydrate Research Center d'Athens (CCRC, Georgia, USA), dans le laboratoire de Dr. Russ W. Carlson.

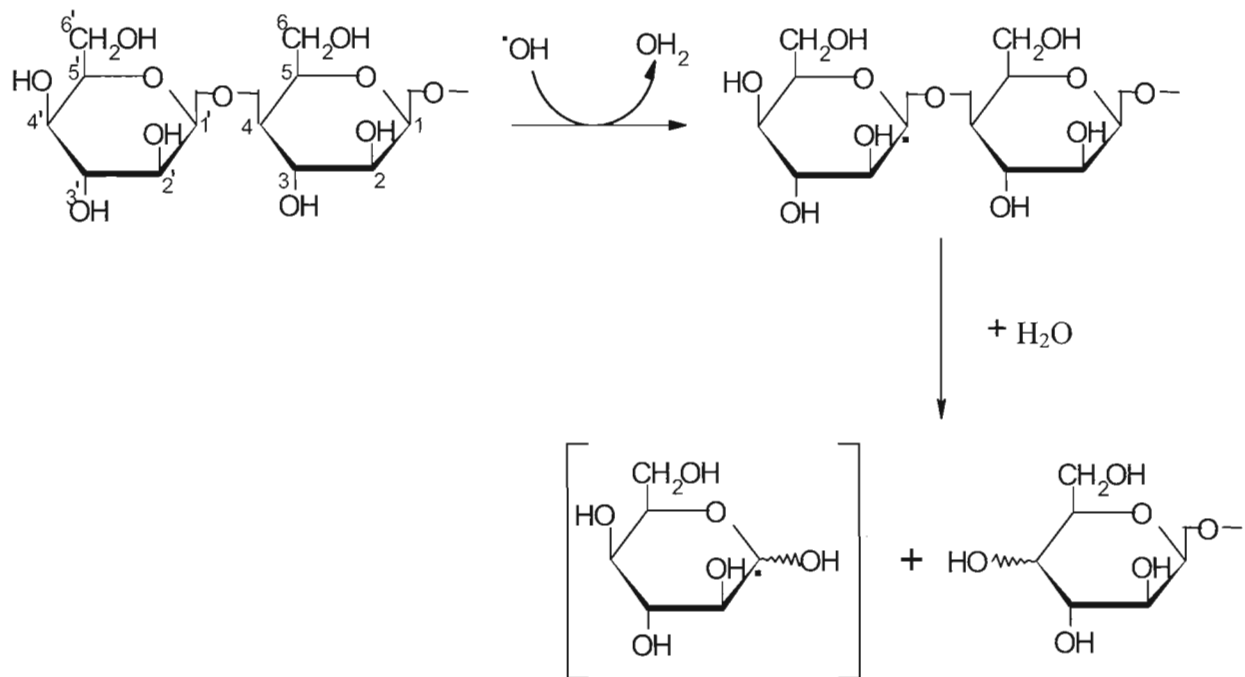


Figure 51 : Dépolymérisation par voie radicalaire d'une chaîne polysaccharidique

II – MATERIEL ET METHODES

1 – Obtention d’oligosaccharides de faibles masses par dépolymérisation radicalaire

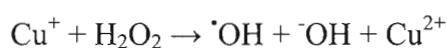
1.1 – Formation des oligosaccharides

Principe

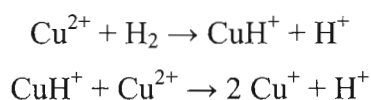
La dépolymérisation par voie radicalaire des polysaccharides repose sur la formation de radicaux libres $\cdot\text{OH}$ à partir du système redox $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cu}^{2+}$ selon la réaction de Fenton (Miller & Fry, 2001).

Les radicaux ainsi formés sont très réactifs envers le squelette carboné des polysaccharides, puisqu’ils clivent les liaisons glycosidiques de ces derniers, ce qui engendre une dépolymérisation. Après élimination des réactifs, une étape de réduction est alors nécessaire afin de stabiliser les chaînes oligosaccharidiques formées.

Les radicaux $\cdot\text{OH}$ sont générés par réduction du peroxyde d’hydrogène par l’ion métallique Cu^+ selon la réaction de Fenton :



Le catalyseur introduit dans le milieu réactionnel étant sous forme de Cu^{2+} , les ions Cu^+ sont obtenus par réaction avec l’hydrogène dissous dans le milieu :



La réaction de dépolymérisation peut s’effectuer sur toutes les positions d’un résidu osidique (C1, C2, C3, C4, C5 et même C6), les différents radicaux formés pouvant subir des réarrangements de type divers par perte de molécules d’eau par exemple (Von Sonntag, 1980) à l’origine de la rupture de liaisons glycosidiques (figure 51).

Réactifs :

- Peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à 0,33% (Panréac)
- Acétate de cuivre Cu(CH₃COO)₂ (Fluka)
- Solution de soude NaOH 1 M
- Antimousse : Pluronic PE 6 100 (BASF)
- Borohydrure de sodium NaBH₄ (Sigma)
- Acide acétique 10 M
- Résine Chelex 100 (Bio-Rad)
- H₂O milli-Q

Protocole

3 g de polysaccharides sont réhydratés par 200 mL d'eau milli-Q pendant une nuit sous agitation lente à 20°C.

La solution est ensuite transférée dans un réacteur double enveloppe maintenu à 60°C pendant toute la réaction. 600 mg d'acétate de cuivre sont alors ajoutés ([Cu²⁺] = 0,015 M), ce qui provoque une acidification du milieu, tamponnée par un ajout de soude jusqu'à l'obtention d'un pH de l'ordre de 7. Le pH est ensuite maintenu à 7,5 tout au long de la réaction par addition de NaOH 1 M grâce à un pH stat (Taccussel).

Une solution de H₂O₂ est alors ajoutée à un débit de 1 mL.min⁻¹ pendant 4 heures à l'aide d'une pompe péristaltique (Minipuls 3, Gilson). La quantité de peroxyde d'hydrogène à ajouter est calculée de manière à ce qu'au final, le rapport H₂O₂ / PS soit de 10 (p/p).

Dans notre cas (3 g de polysaccharides), 30 g d'H₂O₂ doivent être ajoutés sur une période de 4 heures à un débit de 1 mL.min⁻¹, ce qui permet de calculer la concentration de la solution d'H₂O₂ à réaliser pour remplir les conditions requises.

La mousse qui se forme lors de l'apport du peroxyde d'hydrogène est évitée par ajout dès le départ d'antimousse.

A l'issue de la réaction, on note la présence d'un dépôt vert qui est éliminé par filtration sous vide sur Büchner (filtre en microfibrilles de verre, GF/C Whatman, 0,7 µm).

Le filtrat est alors réduit par ajout de borohydrure de sodium (2 g dilués dans 30 mL d'eau milli-Q), pendant deux heures sous agitation à température ambiante.

L'excès de NaBH_4 est neutralisé par ajout d'acide acétique 10 M, ce qui entraîne la formation d'un précipité noir, éliminé par filtration sur Büchner dans les mêmes conditions que précédemment.

La solution d'oligosaccharides est alors concentrée au tiers par passage sur module d'ultrafiltration (Millipore Pellicon 2, Membrane Pall, seuil de coupure 1000 Da), avant d'être purifiée par passage sur une résine de type Chelex 100 qui permet de chélater le cuivre résiduel encore présent dans la solution. Cette dernière est alors à nouveau purifiée par passage sur module d'ultrafiltration dans les mêmes conditions, concentrée, puis lyophilisée.

1.2 – Estimation de la masse molaire des oligosaccharides formés par HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography)

Principe :

La masse molaire des oligosaccharides formés par dépolymérisation radicalaire est déterminée par chromatographie d'exclusion stérique haute performance.

Elle permet d'évaluer pour chaque oligosaccharide la masse molaire moyenne en nombre (M_n), la masse molaire en poids (M_w), la masse molaire au pic (M_p), ainsi que l'indice de polydispersité I_p ($=M_w/M_n$) caractéristique de l'homogénéité des chaînes polysaccharidiques.

L'étalonnage est réalisé à partir de standards pullulanes (Nardella *et al.*, 1996). Il s'agit de glucanes, polysaccharides neutres, alors que les oligosaccharides issus d'*Asparagopsis armata* sont fortement sulfatés. C'est pourquoi les masses estimées pour ces oligosaccharides par cette méthode peuvent être assimilées à des masses en « équivalent pullulanes », mais ne représentent en aucun cas la masse réelle de nos oligosaccharides.

Cette méthode est toutefois très utile pour comparer entre elles des fractions obtenues au cours de dépolymérisations radicalaires réalisées dans des conditions différentes.

Protocole

Les échantillons ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) sont analysés par un système HPLC Kontron sur une colonne de type Superdex Peptide PC 3,2/30 dont le domaine de séparation est compris entre

700 et 12000 g.mol⁻¹. L'éluant employé est un tampon acétate d'ammonium 0,1 M dont le débit est de 0,1 mL.min⁻¹.

La détection est réalisée par réfractométrie (ERC 7512, Erma Inc.), et le signal obtenu est traité par le logiciel Aramis (JMBC Développement, Le Fontanil).

1.3 – Profil des fractions oligosaccharidiques obtenues

L'homogénéité des fractions oligosaccharidiques générées au cours des dépolymérisations radicalaires est évaluée par passage de ces dernières en chromatographie de filtration sur gel dont le seuil de coupure est adapté à leur masse molaire.

Dans le cas d'oligosaccharides obtenus dans les conditions du paragraphe 1.1 (4 heures de dépolymérisation radicalaire), le profil de la fraction obtenue est réalisé sur une colonne contenant un Bio-Gel de type P4 (800-4000 Da, Bio-Rad).

10 mg d'oligosaccharides solubilisés dans 500 µL d'eau milli-Q sont déposés après filtration (0,45 µm) sur une colonne (80 x 2 cm) remplie de Bio-Gel P4.

L'éluion est effectuée par de l'eau milli-Q à un débit de 6 mL.h⁻¹ obtenu par gravité. Le volume d'exclusion et le volume total sont préalablement déterminés par injection de 500 µL d'une solution aqueuse contenant 5 mg de D-glucose et 5 mg de dextrane de masse 66 900 Da.

Des fractions de 1,5 mL par tube sont collectées, et la détection des oses s'effectue par le biais d'un dosage colorimétrique à l'anthrone.

Dosage à l'anthrone (Dische, 1962)

Réactifs

- Solution d'anthrone 0,2% (p/v) dans de l'acide sulfurique concentré
- D-galactose

Protocole

50 μL de solution sont prélevés de chaque tube de fractionnement issu de la colonne de Bio-Gel P4, auxquels sont ajoutés 200 μL de la solution d'anthrone préparée extemporanément. Après agitation, les échantillons sont laissés pendant 5 minutes dans un bain-marie à 100°C, puis refroidis à température ambiante.

L'absorbance est lue à 620 nm.

L'étalonnage est effectué en prélevant 5 à 50 μL d'une solution standard de D-galactose (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), que l'on complète à 50 μL avec de l'eau milli-Q, et que l'on traite dans les mêmes conditions.

2 – Désulfatation des oligosaccharides

2.1 – Solvolyse

Les oligosaccharides sont désulfatés selon le protocole mis au point pour les polysaccharides natifs décrit au chapitre 1.

Ils sont dans un premier temps placés sous forme de sels de pyridinium avant de subir une solvolyse (DMSO contenant 14% de méthanol) pendant 3h25 à 100°C.

A l'issue de la réaction, et après ajustement du pH à 9,1, le milieu réactionnel est dialysé pendant deux jours contre de l'eau milli-Q (Spectra/Por, seuil de coupure 500 Da), puis lyophilisé.

La désulfatation est confirmée par le dosage des sulfates résiduels par turbidimétrie décrit au chapitre 1, et par dosage du soufre par analyse élémentaire.

Mais cette méthode génère pour ce type d'oligosaccharides une désulfatation partielle, ce qui est à l'origine du développement d'une nouvelle méthode de désulfatation.

2.2 – Nouvelle méthode de désulfatation des oligosaccharides

Inspirée de Miller et Blunt (Miller & Blunt, 1998).

Principe

La désulfatation des oligosaccharides par cette méthode nécessite la formation d'un complexe intermédiaire au sein duquel le groupement sulfate est transféré à une molécule tierce. Cette réaction ne peut s'effectuer qu'en milieu acide, et ne semble pas dégrader la chaîne polysaccharidique principale.

Les conditions retenues sont celles développées pour le lambda-carraghénane dont la structure (absence de 3,6-anhydrogalactose et présence de trois groupements sulfate par unité disaccharidique) semble proche de celle des oligosaccharides générés.

Réactifs

- Diméthylsulfoxyde anhydre (DMSO)
- Trioxyde d'arsenic As_2O_3
- Acide pyromellitique (benzène-1,2,4,5-tétracarboxylique)
- Pyridine
- Hydrogénocarbonate de sodium $NaHCO_3$
- H_2O milli-Q

Protocole

22,5 mL de DMSO anhydre purgés sous un flux d'azote sont portés à 120°C sous agitation dans un bain d'huile.

500 mg d'oligosaccharides sont alors ajoutés et le milieu est à nouveau purgé sous azote.

Après une heure d'agitation à 120°C, on rajoute au milieu réactionnel 1,25 mL de pyridine, 500 mg d' As_2O_3 , 375 mg d'acide pyromellitique puis à nouveau 2,5 mL de pyridine. Le milieu est alors laissé pendant trois heures sous agitation à 120°C, après avoir été purgé sous N_2 .

A l'issue des trois heures, le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante, puis on y ajoute 12,5 mL d'eau milli-Q contenant 0,75 g de NaHCO₃. Après agitation, la solution est dialysée pendant deux jours contre de l'eau milli-Q (Spectra/Por, seuil de coupure 500 Da), puis lyophilisée.

3 – Purification des oligosaccharides désulfatés

Quelle que soit la méthode de désulfatation employée (solvolyse, ou réaction employant As₂O₃), la désulfatation de nos oligosaccharides reste incomplète, d'où la nécessité de purifier ces oligosaccharides partiellement sulfatés.

En effet, comme dans le cas des polysaccharides natifs (*cf.* chapitre 1), la détermination de la nature des liaisons glycosidiques ainsi que de la position des substituants passe par la comparaison des produits de méthylation « natifs » et « désulfatés ». Ce sont donc les oligosaccharides totalement désulfatés qui sont intéressants dans notre cas, et que l'on souhaite isoler.

3.1 – Chromatographie échangeuse d'ions

Notre fraction oligosaccharidique étant partiellement chargée, sa purification par chromatographie échangeuse d'ions devrait permettre de récupérer une fraction neutre d'une part et une fraction chargée d'autre part.

30 mg d'oligosaccharides dissous dans 30 mL de tampon Tris 50 mM (pH 8) sont déposés sur une colonne (2,5 cm x 31 cm) contenant un gel de résine échangeuse d'ions DEAE 650 M (Supelco). L'élution de la fraction neutre est obtenue par ajout de tampon Tris seul (3 fois le volume de la colonne, soit 460 mL).

La fraction chargée est récupérée par ajout de tampon Tris contenant 0,5 M de NaCl (460 mL), et les résidus osidiques très chargés éventuellement encore retenus par la résine sont élués par 460 mL de tampon Tris contenant 2 M de NaCl.

L'élution des différentes fractions est effectuée par gravité, et la teneur en oses de chacune d'entre elles est estimée qualitativement par analyse colorimétrique (dosage par le phénol

sulfurique), après concentration préalable effectuée au Rotavapor (volume final de l'ordre de 20 mL).

Dosage des oses par le phénol sulfurique (Dubois *et al.*, 1956)

Réactifs

- Solution de phénol à 5% (p/v) réalisée dans de l'eau milli-Q
- Acide sulfurique H₂SO₄ concentré
- D-galactose

Protocole

A 200 µL de la solution à doser sont ajoutés 200 µL de la solution de phénol à 5%. Après agitation, 1 mL d'acide sulfurique concentré est ajouté rapidement et directement à la surface de la solution, en évitant de toucher les parois du tube. La solution est laissée refroidir à température ambiante avant de lire l'absorbance à 490 nm après agitation.

Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de D-galactose (1 mg.mL⁻¹), en prélevant 5 à 100 µL de cette solution, complétés à 200 µL par de l'eau milli-Q, et traités dans les mêmes conditions.

A l'issue du dosage colorimétrique, les fractions contenant des oses subissent alors pendant deux jours une dialyse contre de l'eau milli-Q (Spectra/Por, seuil de coupure 500 Da) afin d'éliminer le tampon d'éluion ainsi que les sels. Elles sont ensuite lyophilisées.

3.2 – Chromatographie de filtration sur gel

Dans le but de vérifier l'homogénéité en masse des fractions neutres récupérées à l'issue du passage sur la colonne échangeuse d'ions, le profil de ces dernières est réalisé par

chromatographie de filtration sur gel de type Bio-Gel P2 dans un premier temps, puis Bio-Gel P4.

Bio-Gel P2 (100-1800 Da, Bio-Rad)

50 mg de fraction oligosaccharidique issue du passage sur la colonne échangeuse d'ions DEAE, dissous dans 500 μL d'eau milli-Q et filtrés (0,45 μm), sont déposés sur une colonne contenant du Bio-Gel P2 (150 x 1,5 cm).

L'élution est effectuée par de l'eau milli-Q à un débit de 6,5 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ obtenu par gravité. Le volume d'exclusion et le volume total sont déterminés au préalable par injection dans les mêmes conditions de 500 μL d'une solution aqueuse contenant 5 mg de D-glucose et 5 mg de dextrane de masse 66 900 Da.

Des fractions de 1,5 mL sont collectées, et la détection des oses se fait, comme dans le cadre du paragraphe 1.3, par dosage colorimétrique à l'antrone.

Bio-Gel P4 (800-4000 Da, Bio-Rad)

100 mg de fraction oligosaccharidique dissous dans 300 μL d'eau milli-Q et filtrés (0,45 μm) sont déposés sur une colonne remplie de Bio-Gel P4 (80 x 2 cm), le volume d'exclusion et le volume total ayant été déterminés dans le paragraphe 1.3.

L'élution est effectuée par de l'eau milli-Q à un débit de 6 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ obtenu par gravité.

4 – Perméthylation

Les conditions de perméthylation développées et optimisées pour les polysaccharides natifs (Chapitre 1, paragraphe 3), sont appliquées à ces oligosaccharides purifiés.

Rappelons simplement qu'après méthylation des fonctions hydroxyle libres, les oligosaccharides méthylés sont hydrolysés afin de libérer les fonctions hydroxyle engagées dans les liaisons glycosidiques. Après réduction deutérée des résidus méthylés en alditols, puis acétylation des fonctions hydroxyle libres, les acétates d'alditols partiellement méthylés

sont identifiés par analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG/SM).

La position des groupements sulfate est déterminée par comparaison des spectres CG/SM des oligosaccharides natifs et totalement désulfatés (fraction neutre à l'issue de la DEAE) perméthylés. Natifs et désulfatés sont astreints à des conditions opératoires qui leur sont propres, liées à la présence ou non de groupements sulfate, décrites au chapitre 1 paragraphe 3.

Les acétates d'alditols partiellement méthylés formés à partir des oligosaccharides obtenus par dépolymérisation radicalaire sont analysés sur les appareils du Complex Carbohydrate Research Center (CCRC, Athens, USA).

Le chromatographe en phase gazeuse est un HP 5890 A. La séparation des composés est réalisée sur une colonne capillaire polaire en silice fondue SP 2330 (0,25 mm x 30 m, Supelco), utilisant de l'hélium comme gaz vecteur. Ce chromatographe est couplé à un spectromètre de masse de type quadripôle (HP 5970 Series Mass), et l'ionisation par impact électronique emploie une énergie de 70 eV.

Le programme de température est le suivant : 80°C maintenus pendant 2 min, suivi d'un gradient de 30°C/min jusqu'à 170°C, puis d'un gradient de 4°C/min jusqu'à 240°C maintenus pendant 20 minutes.

5 – Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

5.1 – Choix des échantillons à analyser

Les groupements sulfate sont connus pour perturber les spectres RMN, et en particulier pour modifier la valeur des déplacements chimiques.

En effet, ils sont à l'origine de déplacements chimiques déblindés (signaux déplacés vers les champs faibles) pour les carbones situés en α de ces groupements sulfate (de l'ordre de 6-10 ppm), et de déplacements chimiques blindés (signaux déplacés vers les champs forts) pour les carbones positionnés en β par rapport à ces mêmes groupements (de l'ordre de 1-1,25 ppm) (Duarte *et al.*, 2002).

Au niveau du spectre proton ^1H , ces groupements sulfate déblindent également les déplacements chimiques des protons géminés et vicinaux (Usov, 1984).

De manière générale, la présence de groupements sulfate est à l'origine de spectres moins bien résolus, les signaux étant plus larges à la base. C'est pourquoi les spectres RMN seront réalisés sur des échantillons affranchis de leurs groupements sulfate.

Dans notre cas, c'est la fraction neutre des oligosaccharides partiellement désulfatés, purifiée (colonne de filtration sur gel), qui est utilisée pour réaliser les spectres RMN ^1H et ^{13}C à une et deux dimensions.

5.2 – Préparation de l'échantillon

10 à 20 mg de ces oligosaccharides purifiés sont dissous dans de l'oxyde de deutérium à 99,97%. Après lyophilisation, ils sont soumis à deux autres échanges contre cette eau deutérée, puis sont finalement repris dans 750 μL de D_2O 100% pour analyse.

5.3 – Appareillage et séquence

Les spectres de RMN à 1 et 2 dimensions, homo- et hétéronucléaires, sont enregistrés à 298 K au CCRC (Athens, USA), sur des appareils de type Varian (Mercury 300 MHz, Inova 500 MHz et Inova 600 MHz), équipés du logiciel VNMR.

6 – Détermination des masses réelles des fractions dépolymérisées

6.1 – MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption – Time Of Flight)

L'emploi de la spectrométrie de masse Maldi-TOF est réalisé pour confirmer la pureté ainsi que la masse des oligosaccharides obtenus par dépolymérisation radicalaire.

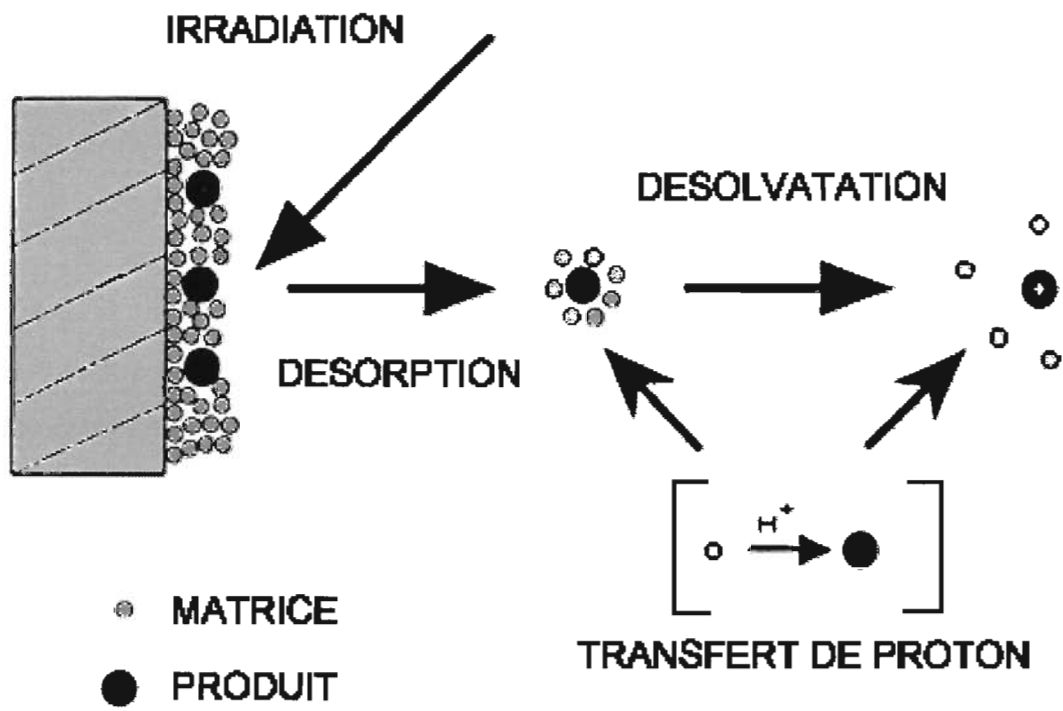


Figure 52 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse MALDI-TOF

6.1.1 – Principe

Les molécules à analyser sont mélangées à une quantité importante de matrice qui absorbe à la longueur d'onde du laser utilisé, ce qui cause l'évaporation de la matrice, entraînant avec elle l'échantillon en phase gazeuse.

Les molécules ionisées de la matrice transfèrent un proton aux molécules de l'échantillon dans la phase ainsi obtenue. Les ions ainsi formés (MH^+) sont alors accélérés jusqu'à 20 KeV grâce à une haute tension appliquée sur une grille, et envoyés dans un tube de vol où ils volent jusqu'au détecteur (figure 52).

Le tube de vol est maintenu sous vide et comme les ions ont la même énergie, la ségrégation entre les ions s'effectue en fonction de leur masse (les ions les plus lourds volent le plus lentement, ils arrivent donc plus tard sur le détecteur). La détection des ions à l'issue du tube de vol se fait à l'aide d'un multiplicateur d'électrons, et est enregistrée.

6.1.2 – Protocole

La matrice employée est le DHB (acide 2,5-dihydroxybenzoïque).

Une solution d'oligosaccharides à 2 mg/mL est réalisée dans de l'eau. 1 μ L de cette solution est placée dans un eppendorf, auquel 1 μ L de matrice DHB est ajouté.

Après agitation vigoureuse, 0,5 μ L du mélange est prélevé, placé sur le support et évaporé sous vide avant d'être désorbé. La détection peut se faire en polarité mode positif ou négatif.

L'appareil est un MALDI HP G2025 A, LD-TOF System, couplé à un logiciel de traitement des données HP Vectra XM (CCRC, Athens, USA).

6.2 – Electrospray

6.2.1 – Principe

La spectrométrie de masse en mode électrospray (ESI pour ElectroSpray Ionization) consiste à appliquer un fort champ électrique à pression atmosphérique à un liquide passant à travers un tube capillaire avec un faible débit. L'échantillon en solution (eau ou méthanol par

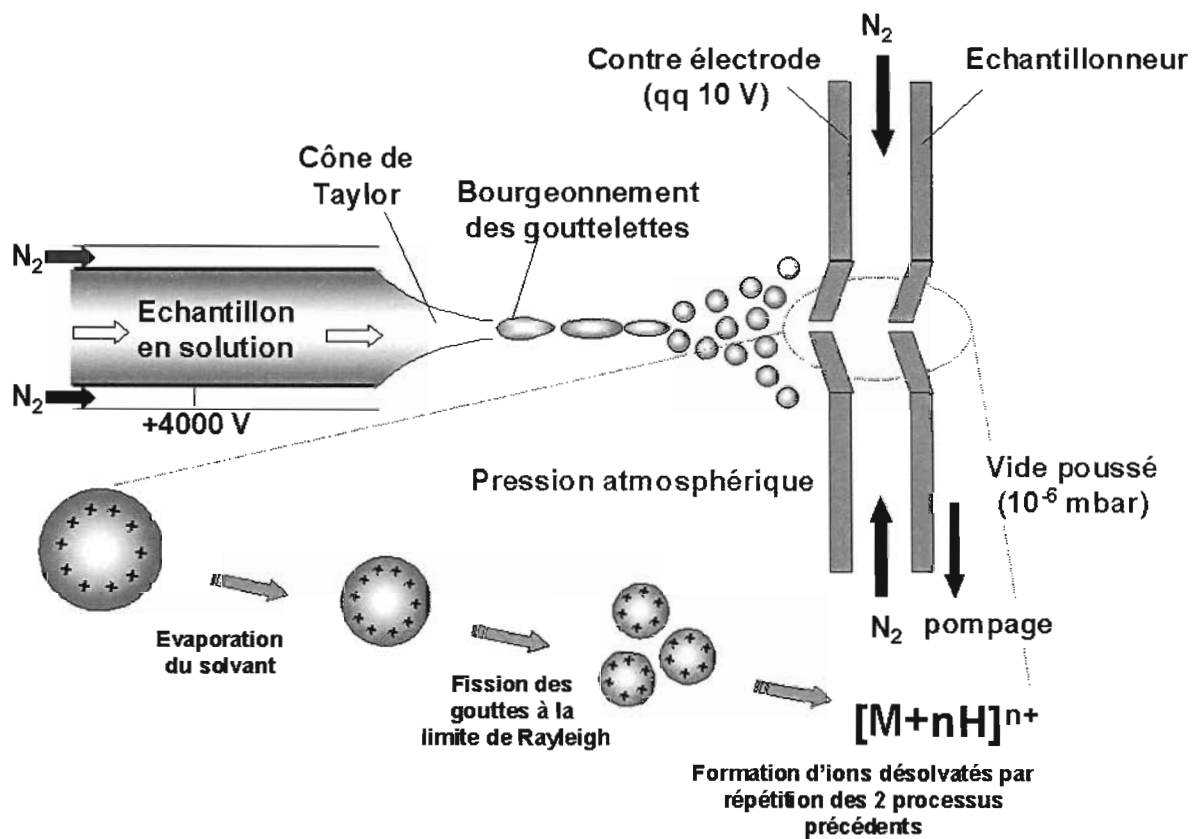


Figure 53 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse Electrospray

exemple) est introduit dans un capillaire qui est porté à un haut potentiel électrique. Sous l'influence de ce champ intense, la solution est nébulisée (formation d'un nuage de gouttelettes chargées).

La taille des gouttelettes diminue par évaporation du solvant et par explosion coulombiennes (l'excès de charges électriques dans chaque gouttelette conduit à un point où les répulsions coulombiennes excèdent les forces de cohésion de celle-ci, ce qui entraîne une division spontanée de la gouttelette chargée en gouttelettes plus petites).

Les ions ainsi formés sont envoyés vers l'analyseur où règne un vide poussé (figure 53).

Ce mode d'ionisation génère des ions pseudomoléculaires polychargés qui, en mode positif, sont des espèces multiprotonées $[(M + nH)^{n+}, (M + (n+1)H)^{(n+1)+} \dots]$.

Des ions de cationisation ou adduits (de type $M + Na^+$ par exemple) peuvent également être observés.

6.2.2 – Protocole

Les analyses des oligosaccharides en mode électrospray sont réalisées au sein du CRMPO (Centre Régional des Mesures Physiques de l'Ouest) à Rennes, par le Dr. Philippe Jéhan. Les solutions sont réalisées dans du méthanol, et les spectres sont acquis en mode positif.

6.3 – HPSEC

Lors de l'évaluation de la masse par HPSEC des oligosaccharides formés à l'issue de la dépolymérisation par voie radicalaire, les standards utilisés étaient des pullulanes (paragraphe 1.2). Les masses estimées pour nos oligosaccharides dans ces conditions ne représentaient donc pas la masse réelle de ces derniers, puisqu'ils sont chargés, et ces masses étaient alors exprimées en « équivalent pullulanes ».

D'autres standards de calibration, plus adaptés à nos oligosaccharides sulfatés, sont les héparines de bas poids moléculaires. Elles permettent d'estimer la masse molaire de dérivés

sulfatés de masses comprises entre 1 000 et 10 000 g.mol⁻¹, ce qui semble adapté à nos oligosaccharides.

Les mesures des masses molaires de nos oligosaccharides employant les héparines de bas poids moléculaires comme standards de calibration sont réalisées au « National Institute for Biological Standards and Control » par le Dr. Barbara Mulloy (Laboratory for Molecular Structure, Hertfordshire, UK).

Le protocole utilisé est décrit dans la publication de Mulloy *et al.* (Mulloy *et al.*, 1997).

Les colonnes utilisées sont une colonne TSK G3000 SW-XL et une colonne TSK G2000 SW-XL montées en série. L'éluant est une solution d'acétate d'ammonium à 0,1 M, et le débit appliqué est de 0,5 mL.min⁻¹. La détection se fait par réfractométrie (Refractomonitor W, LDC, Analytical, Stone, Saffs., UK).

Le traitement des données se fait par le biais d'un logiciel fourni par la société Polymer Laboratories, Church Stretton, UK.

III – RESULTATS ET DISCUSSION

La dépolymérisation de polysaccharides dans le but d'obtenir des espèces de masses molaires plus petites peut se faire par le biais de différentes techniques.

La plus répandue, et la moins onéreuse, reste la dépolymérisation acide. Cependant, il s'agit d'une méthode difficilement contrôlable dans le sens où les positions attaquées sur la chaîne polysaccharidique ne peuvent être maîtrisées, ce qui peut être à l'origine de l'obtention de fractions hétérogènes. De plus, les produits de dépolymérisation peuvent avoir subi des modifications de structure telles que la perte de substituants sensibles à l'hydrolyse acide, ou de chaînes latérales, ou encore la destruction de monosaccharides fragiles.

Cette voie de dépolymérisation n'a donc pas été envisagée dans notre cas, la présence de groupements sulfate (sensibles aux conditions acides), de chaînes latérales ou encore d'oses instables en milieu acide tels que les 3,6-anhydrogalactoses, étant une source potentielle de modification de la structure au cours de la dépolymérisation.

La dépolymérisation par voie enzymatique est quant à elle très performante en ce qui concerne l'homogénéité des fractions obtenues. En effet, la spécificité de chaque enzyme fait qu'elle n'est capable de cliver qu'un seul type de liaison glycosidique dans des conditions particulières, sans altérer le reste de la structure.

Cette sélectivité nécessite cependant une bonne connaissance du polysaccharide de départ, et notamment de la nature des liaisons qui unissent les résidus saccharidiques entre eux au sein de la chaîne polysaccharidique.

Cependant, outre le coût de l'enzyme, cette technique ne peut être appliquée à nos polysaccharides. En effet, la chaîne principale de ces derniers est construite sur la répétition régulière d'unités disaccharidiques α -galactopyranose et β -galactopyranose, plus ou moins sulfatées. Les enzymes commerciales sont des α -galactosidases ou des β -galactosidases, adaptées à des galactoses seuls, ne portant pas de groupements sulfate. C'est pourquoi elles ne seraient pas efficaces sur les polysaccharides natifs mais seulement sur les polysaccharides désulfatés. Dans ce cas précis, elles n'engendreraient alors que des disaccharides, en raison de la nature de la chaîne polysaccharidique, unités trop courtes pour obtenir des informations structurales pertinentes.

Le dernier type de dépolymérisation envisagée pour nos polysaccharides est la dépolymérisation par voie radicalaire. C'est celle qui a été retenue pour l'obtention de produits de faibles masses molaires à partir de nos polysaccharides d'algue.

Cette voie de dépolymérisation est choisie par analogie avec la caractérisation structurale des fucanes réalisée au sein du laboratoire. En effet, la structure de ces polysaccharides a pu être élucidée grâce à l'emploi de ce type de dépolymérisation qui a permis d'engendrer des oligosaccharides sur lesquels la structure a été déterminée. L'homologie qui existe entre les fucanes et nos polysaccharides (homopolymères, polysubstitués et polysulfatés) fait de la dépolymérisation radicalaire une méthode de choix pour la résolution de la structure des polysaccharides d'*Asparagopsis armata*.

Bien que le mécanisme d'action ne soit pas parfaitement connu, la dépolymérisation par voie radicalaire est capable de générer des oligosaccharides de manière reproductible et à grande échelle, notamment sur les héparines et les dermatanes sulfatés (Volpi, 1993; Volpi *et al.*, 1992), ce qui peut être intéressant dans le cadre d'applications industrielles futures. De telles conditions de dépolymérisation appliquées aux fucanes semblent également être à l'origine des mêmes conclusions (Nardella *et al.*, 1996).

1 – Obtention d'oligosaccharides de faibles masses par dépolymérisation radicalaire

1.1 – Formation des oligosaccharides

A partir des conditions définies pour la dépolymérisation radicalaire des polysaccharides d'*Asparagopsis armata* décrites dans le paragraphe II-1.1, une cinétique est réalisée afin de voir l'évolution de la masse molaire des oligosaccharides générés en fonction du temps. C'est ainsi que des prélèvements de 20 mL sont réalisés toutes les heures au cours de la réaction de dépolymérisation, et la réaction est stoppée au bout de quatre heures, ce qui correspond à des rapports H₂O₂/PS (p/p) respectifs de 2,5 (1h), 5 (2h), 7,5 (3h) et de 10 (4h).

Les fractions prélevées en cours de réaction, en raison de leur faible volume, sont traitées un peu différemment, puisque seule la connaissance des masses molaires nous intéresse : après filtration pour éliminer le dépôt vert présent, elles sont directement purifiées par passage sur la résine de type Chelex 100, puis dialysées contre de l'eau milli-Q pendant deux jours (Spectra/Por, seuil de coupure 3,5 KDa).

Les masses molaires de ces différentes fractions après traitement (1h, 2h, 3h et 4h) sont dans un premier temps estimées par HPSEC dans les conditions décrites au paragraphe II-1.2. Pour les raisons évoquées dans celui-ci, ces masses ne peuvent être exprimées qu'en équivalent pullulanes, mais une comparaison entre elles reste toutefois possible. Elles seront déterminées plus tard de manière précise (*cf.* paragraphe 6).

Les masses molaires en équivalent pullulanes des différentes fractions obtenues, ainsi que leurs rendements d'obtention sont regroupés dans le tableau 11.

H₂O₂/PS (p/p)	Temps de réaction	Mp (Da)	Mw	Mn	Ip	Rendement (% massique)
2,5	1h	9000	15000	4600	3,26	40%
5	2h	6300	7600	4200	1,82	34%
7,5	3h	4700	6500	2700	2,43	21,5%
10	4h	3400	4200	3100	1,36	43%

Tableau 11 : Masses molaires en équivalent pullulanes et rendements massiques obtenus au cours d'une cinétique de dépolymérisation par voie radicalaire des polysaccharides natifs d'*Asparagopsis armata*.

Mp (Masse molaire au pic), Mw (Masse molaire moyenne en poids), Mn (Masse molaire moyenne en nombre), Ip (Indice de polydispersité = Mw/Mn).

La masse molaire moyenne en poids des polysaccharides natifs estimée en équivalent pullulanes dans le chapitre 1 paragraphe 6, est de l'ordre de 350 000 Da.

On peut donc noter une chute très rapide de la masse molaire des oligosaccharides formés par voie radicalaire, et ce, dès la première heure de dépolymérisation.

Les masses obtenues sont logiquement inversement proportionnelles au rapport H₂O₂/PS (p/p) employé ; plus celui-ci est important, plus la dépolymérisation des chaînes est conséquente. Les rendements massiques décroissent cependant avec les temps de réaction de dépolymérisation. Ils restent toutefois « étonnamment » élevé dans le cas de la dépolymérisation de quatre heures.

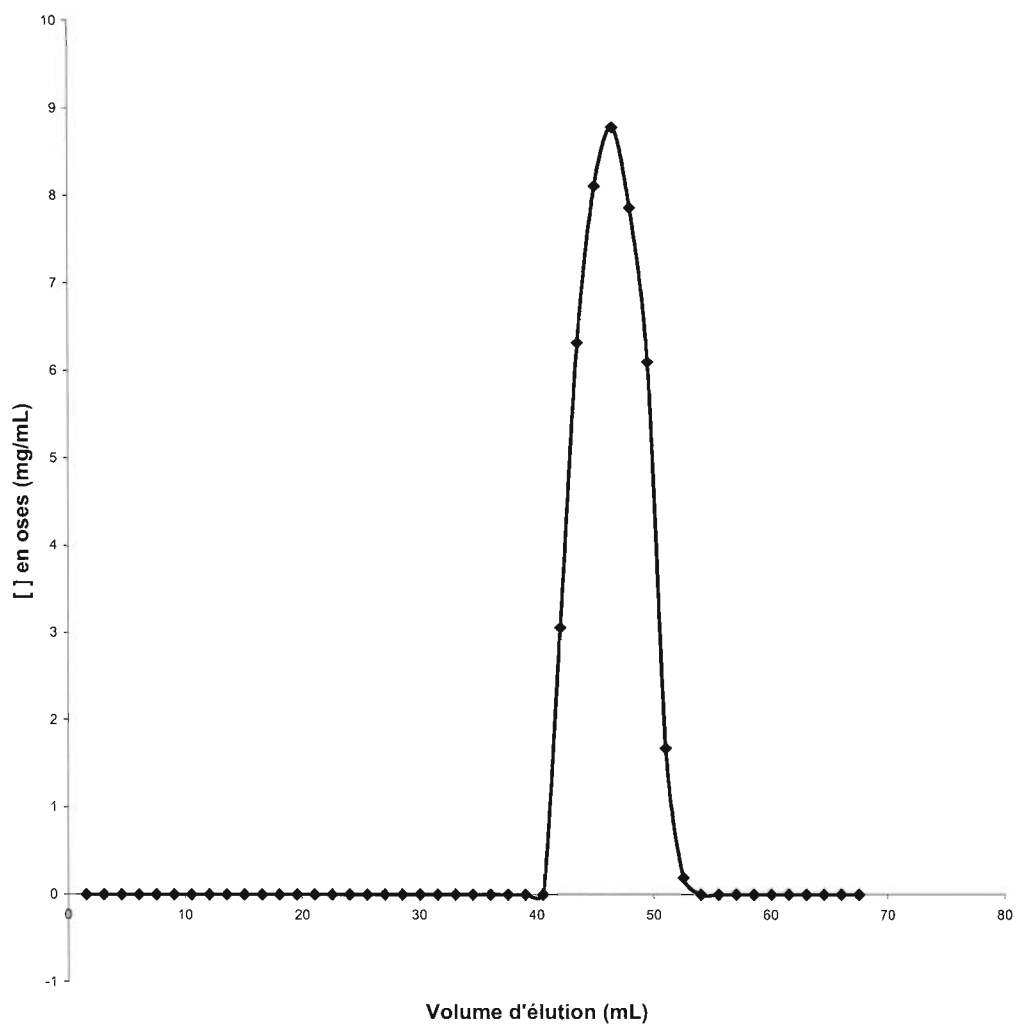


Figure 54 : Profil chromatographique de la fraction oligosaccharidique DR 4 obtenu sur colonne de filtration sur gel P4.

L'indice de polydispersité I_p , qui exprime l'homogénéité de la distribution des masses au sein de l'échantillon, reflète la pureté des oligosaccharides obtenus. Les produits considérés comme homogènes en masse sont ceux pour lesquels l' I_p est inférieur à 1,8.

Aux vues de ces contraintes (pureté des oligosaccharides engendrés, rendement...), la dépolymérisation radicalaire de quatre heures semble être celle pour laquelle les meilleures conditions sont réunies.

1.2 – Pureté des oligosaccharides obtenus

Dans le but de confirmer l'homogénéité en masse des oligosaccharides obtenus au cours de la dépolymérisation radicalaire de quatre heures, le passage de la fraction oligosaccharidique en chromatographie de filtration sur gel de type Bio-Gel P4 (800–4000 Da) est réalisé. Par soucis de simplification, cette fraction oligosaccharidique sera désormais nommée DR 4.

Le profil obtenu à l'issue de cette chromatographie (figure 54) montre clairement que la fraction DR 4 est homogène en masse, et qu'aucune purification supplémentaire n'est nécessaire. Les études structurales se poursuivront donc sur cette fraction oligosaccharidique DR 4 dans sa globalité.

1.3 – Composition chimique des oligosaccharides DR 4 obtenus

La dépolymérisation par voie radicalaire des polysaccharides natifs d'*Asparagopsis armata* semble générer au bout de quatre heures des oligosaccharides, DR 4, relativement homogènes en masse, avec un rendement massique acceptable.

Il est cependant nécessaire de vérifier que cette voie de dépolymérisation n'a pas altéré la structure des espèces engendrées par rapport au polysaccharide natif.

1.3.1 - Composition globale des oligosaccharides DR 4

Les teneurs en oses neutres, acides uroniques, protéines et sulfates sont déterminées au cours de dosages colorimétriques décrits dans le chapitre 1, paragraphe 2. La teneur en sulfate est confirmée par analyse élémentaire (Service de Microanalyse du CNRS, Gif sur Yvette). Les résultats obtenus, comparés aux valeurs déjà établies pour les polysaccharides natifs d'*Asparagopsis armata*, sont représentés dans le tableau 12.

	Mw (équivalent pullulanes, Da)	Oses neutres	Acides uroniques	Sulfates (SO ₃ ⁻ Na ⁺)	Protéines
Polysaccharides natifs	350 000	50%	3%	27%	3%
Fraction DR 4	4 200	47%	3%	31%	2,3%

Tableau 12 : Comparaison des compositions globales des polysaccharides « natifs » extraits d'*Asparagopsis armata*, et des oligosaccharides générés par dépolymérisation radicalaire de 4h (taux exprimés en pourcentages massiques).

Le dosage élémentaire du cuivre résiduel encore présent dans la fraction DR 4 montre que celui-ci a été majoritairement chélaté par la résine de type Chélex. La composition globale des oligosaccharides obtenus ne semble pas altérée aux vues des dosages colorimétriques. Il est intéressant de remarquer que la teneur en groupements sulfate n'a pas diminué, au contraire, elle a légèrement augmentée par rapport au pourcentage d'oses neutres présents dans les oligosaccharides DR 4.

1.3.2 – Dosage des monosaccharides présents dans les oligosaccharides DR 4

Ce dosage est effectué par le biais d'une méthanolyse douce, les dérivés triméthylsilylés étant analysés par chromatographie en phase gazeuse. Les conditions employées sont celles optimisées pour les polysaccharides natifs, chapitre 1, paragraphe 2.2. Les résultats obtenus pour les oligosaccharides DR 4 sont rassemblés dans le tableau 13, et comparés à ceux des polysaccharides natifs traités dans les mêmes conditions.

	Polysaccharides natifs	DR 4
Galactose	37%	37,5%
Xylose	2,4%	1,5%
Glucose	2%	0,7%
Acide galacturonique	0,7%	Traces
Acide glucuronique	1%	Traces

Tableau 13 : Comparaison des dosages par chromatographie en phase gazeuse des méthylglycosides O-triméthylsilylés issus de la méthanolyse des polysaccharides natifs de l'algue rouge *Asparagopsis armata*, et des oligosaccharides DR 4.

Les résultats obtenus pour les oligosaccharides DR 4 montrent que la composition en monosaccharides de ces derniers n'a pas été modifiée par rapport aux polysaccharides natifs. En particulier, la présence résiduelle de xylose après dépolymérisation est rassurante. En effet, d'après les études préliminaires effectuées sur les polysaccharides natifs, et en particulier l'analyse par CG/SM des PMMA (acétates d'alditols partiellement méthylés), la majorité des xyloses étaient des xyloses terminaux, identifiés à des ramifications de la chaîne principale. Le fait qu'ils soient encore présents après dépolymérisation radicalaire semble indiquer qu'une telle voie de dépolymérisation ne modifie pas la structure des polysaccharides auxquels elle est appliquée.

Associé au fait que la teneur en groupements sulfate n'ait pas non plus diminué, on peut donc en conclure qu'aucune modification majeure de la chaîne polysaccharidique (si ce n'est une diminution de sa taille) n'a été effectuée.

La dépolymérisation par voie radicalaire des polysaccharides bruts de l'algue *Asparagopsis armata* permet l'obtention d'oligosaccharides stables, relativement homogènes en masse, et de composition très proche de celle des polysaccharides natifs. En particulier, la conservation des chaînes latérales et des substituants confirme le choix effectué pour ce type de dépolymérisation.

2 – Désulfatation des oligosaccharides

L'élucidation de la structure des oligosaccharides nécessite, comme dans le cas des polysaccharides natifs, la détermination de la nature des liaisons glycosidiques qui lient les unités saccharidiques entre elles, ainsi que la connaissance de la position des substituants. Pour ce faire, il est nécessaire de pouvoir comparer les produits de méthylation des oligosaccharides « natifs » et « totalement désulfatés », analysés par CG/SM. Une désulfatation complète des oligosaccharides DR 4 est donc obligatoire.

2.1 – Solvolyse

Les conditions de désulfatation optimisées pour les polysaccharides natifs employant une solvolyse (DMSO/MeOH) sont appliquées aux oligosaccharides DR 4.

Cette méthode n'entraîne qu'une désulfatation partielle de nos oligosaccharides qui comportent encore en fin de réaction 50% de leurs groupements sulfate (soit environ 14% de sulfates). Cela s'explique par le fait que les conditions de solvolyse sont très spécifiques à chaque type de polysaccharide (nature, masse, etc...). Par exemple, les conditions de solvolyse établies par Inoue et Nagasawa (1976) et Nagasawa *et al.* en 1977 (1977) étaient optimales pour la désulfatation de l'héparine, mais n'entraînent qu'une désulfatation partielle de nos polysaccharides (de l'ordre de 20% environ).

C'est pourquoi Haslin *et al.* (2000), ont été obligés de mettre en place un plan d'expérience complexe afin d'établir les conditions de désulfatation optimales pour les polysaccharides de l'algue *Asparagopsis armata*. Ce sont ces conditions qui ont été appliquées à nos polysaccharides, entraînant une désulfatation complète de ceux-ci.

Mais ces conditions de désulfatation ne sont efficaces qu'à 50% sur nos oligosaccharides. Cette perte d'efficacité est vraisemblablement due au fait que les chaînes des oligosaccharides générés sont différentes par rapport aux polysaccharides natifs. En effet, elles sont d'une part plus courtes que celles des polysaccharides natifs, mais leur nature (en raisons des traitements subis) peut également être légèrement différente (taux de sulfate par unité disaccharidique un peu plus important, chaînes ayant subi une réduction, etc...). Les conditions de désulfatation étant très spécifiques à la nature de la chaîne saccharidique concernée, elles ne sont plus optimales pour ces oligosaccharides différents.

Deux possibilités ont alors été envisagées concernant la désulfatation de nos DR 4 : soit l'optimisation des conditions de solvolysse pour nos oligosaccharides, soit l'emploi de conditions totalement différentes, issues de la littérature. C'est cette deuxième alternative qui a été choisie. En effet, Miller et Blunt ont publié un article concernant la désulfatation des galactanes algaux (Miller & Blunt, 1998) dont nous nous sommes inspirés pour réaliser la désulfatation des oligosaccharides obtenus par dépolymérisation radicalaire.

2.2 – Désulfatation des oligosaccharides selon Miller et Blunt (Miller & Blunt, 1998)

Plusieurs méthodes de désulfatation concernant différents types de polysaccharides algaux (ι -, λ -, κ -carraghénanes et porphyranes) sont décrites, avec les résultats correspondants (désulfatation totale ou partielle, produits obtenus, etc...).

Dans tous les cas, ces réactions s'effectuent en milieu acide, et nécessitent la présence d'un « accepteur » (As_2O_3 dans notre cas), sur lequel le groupement sulfate libéré provenant de la chaîne saccharidique va être transféré. Le milieu acide est modéré par la présence de pyridine, ce qui évite la dégradation de la chaîne osidique.

Les conditions retenues pour nos oligosaccharides DR 4 sont celles développées pour le λ -carraghénane. En effet, sa structure (trois groupements sulfate par unité disaccharidique et l'absence de 3,6-anhydrogalactose), est relativement proche de celle de nos polysaccharides natifs (d'après les conclusions concernant leur structure issues du chapitre 1).

Ces conditions particulières ont d'ailleurs généré pour le λ -carraghénane mais aussi pour les porphyranes une désulfatation totale dans les expérimentations de Miller et Blunt.

Les oligosaccharides DR 4 désulfatés par cette voie sont obtenus avec un rendement de 34% environ, mais comportent encore entre 3 et 6% de groupements sulfate résiduels. Bien que cette voie de désulfatation soit plus efficace que la solvolysse, elle ne génère pas des oligosaccharides totalement désulfatés, nécessaires à la formation d'acétates d'alditols partiellement méthylés analysés par CG/SM.

C'est pourquoi des méthodes de purification sont mises en place afin d'isoler une fraction oligosaccharidique neutre à partir des oligosaccharides partiellement désulfatés, sur laquelle des analyses complémentaires seront réalisées.

3 – Purification des oligosaccharides DR 4 désulfatés

L'obtention d'une fraction oligosaccharidique neutre à partir des oligosaccharides partiellement désulfatés est effectuée grâce à une colonne échangeuse d'ions DEAE.

Bien que la deuxième méthode de désulfatation soit plus efficace (3 à 6% de sulfates résiduels contre 14% pour la solvolysse), les oligosaccharides partiellement désulfatés issus des deux types de désulfatation seront purifiés de cette manière. Ainsi, des informations complémentaires voire corroboratives pourront être obtenues.

La pureté et les profils des fractions neutres obtenues dans les deux cas sont établis par le biais d'un passage sur une colonne de filtration sur gel, dans le but d'isoler une fraction neutre la plus pure et la plus homogène possible afin d'y effectuer des analyses complémentaires.

3.1 – Oligosaccharides DR 4 désulfatés par solvolyse

Cette voie de désulfatation génère des oligosaccharides comportant encore 14% de sulfates résiduels.

3.1.1 – Chromatographie échangeuse d'ions DEAE

Les oligosaccharides DR 4 partiellement désulfatés sont purifiés par passage sur une colonne de ce type.

Deux fractions à l'issue de la purification sont récupérées. Une fraction neutre et une fraction chargée. La détection des oligosaccharides des différentes fractions est effectuée par dosage colorimétrique au phénol sulfurique.

Il ressort du passage sur cette colonne des oligosaccharides DR 4 traités par solvolyse que la fraction majoritaire obtenue est la fraction neutre, accompagnée d'une fraction chargée minoritaire en quantité.

La fraction neutre récupérée, après dialyse, est éluée en chromatographie de filtration sur gel.

3.1.2 – Chromatographie de filtration sur gel

Le profil de la fraction neutre est effectué dans un premier temps par chromatographie de filtration sur gel de type Bio-Gel P2, afin de vérifier son homogénéité en masse.

Bio-Gel P2 (100-1800 Da, Bio-Rad)

Il s'avère que la très grande majorité de la fraction neutre est éluée avec le volume d'exclusion, ce qui permet de conclure que sa masse est supérieure ou de l'ordre de 1800 Da (figure 55). Les fractions de masses inférieures à 1800 Da sont très minoritaires et ne sont pas prises en compte. La fraction éluée avec le volume d'exclusion, majoritaire en masse, est alors injectée sur une colonne de filtration sur gel de seuil de coupure plus élevé, afin d'en déterminer le profil.

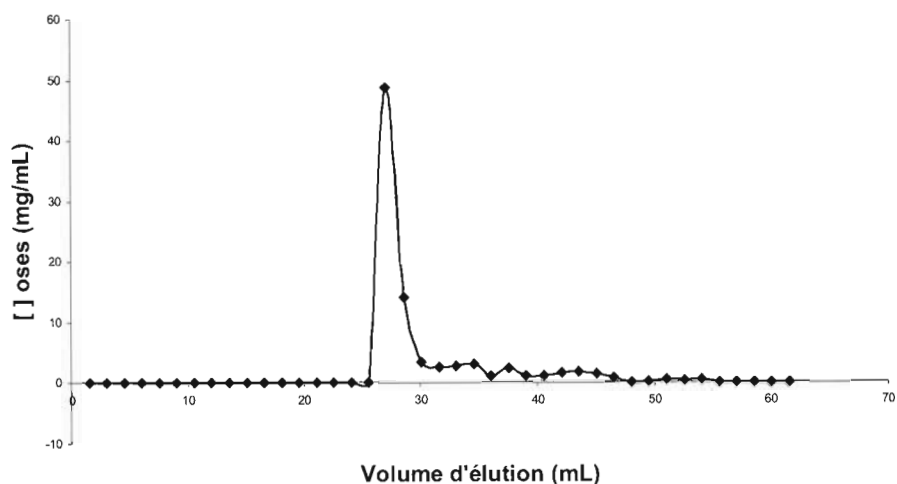
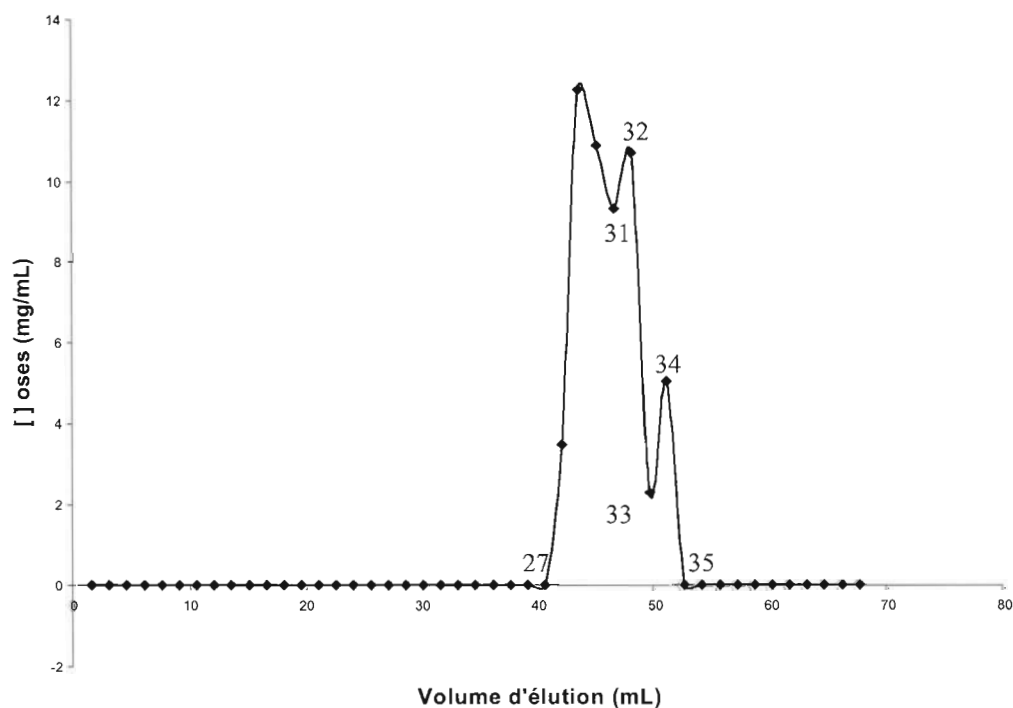


Figure 55 : Profil chromatographique de la fraction oligosaccharidique DR 4 désulfatée par solvolysé purifiée par chromatographie échangeuse d'ions (fraction neutre), obtenu sur colonne de filtration sur gel P2.



Fraction 27-31 : 40,5 mL - 46,5 mL

Fraction 32-33 : 48 mL - 49,5 mL

Fraction 34-35 : 51 mL - 52,5 mL

Figure 56 : Profil chromatographique de la fraction oligosaccharidique DR 4 désulfatée par solvolysé purifiée par chromatographie échangeuse d'ions (fraction neutre), obtenu sur colonne de filtration sur gel P4.

Bio-Gel P4 (800 – 4000 Da, Bio-Rad)

Le passage de la fraction neutre en chromatographie Bio-Gel P4 montre clairement la présence de trois produits, dont deux majoritaires (figure 56).

La fraction la plus importante en quantité sera utilisée pour y effectuer les analyses par RMN. Il s'agit de la fraction (27-31), correspondant à des volumes d'élution compris entre 40,5 mL et 46,5 mL.

En ce qui concerne la perméthylation des oligosaccharides désulfatés dans le but de former des acétates d'alditols partiellement méthylés, la fraction neutre dans sa globalité (à l'issue de la colonne échangeuse d'ions) sera employée, pour des raisons de quantités de produits disponibles.

3.2 - Oligosaccharides DR 4 désulfatés selon Miller et Blunt (Miller & Blunt, 1998)

Cette voie engendre des oligosaccharides désulfatés comportant entre 3 et 6% de sulfates résiduels. Les mêmes techniques de purification que dans le cas des DR 4 désulfatés par solvolysé sont employées.

3.2.1 - Chromatographie échangeuse d'ions DEAE

Ici encore, deux fractions sont récupérées : une fraction neutre et une fraction chargée. Seules la fraction neutre et la fraction chargée comportent des composés saccharidiques, la fraction neutre étant majoritaire en masse. Après dialyse, cette fraction neutre est éluee en chromatographie de filtration sur gel.

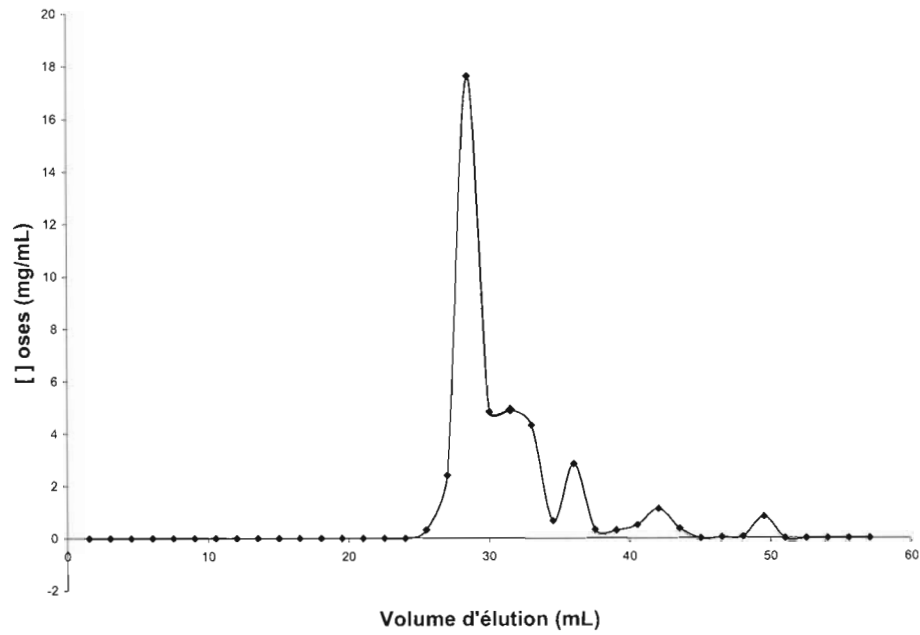


Figure 57 : Profil chromatographique de la fraction oligosaccharidique DR 4 désulfatée selon la méthode de Miller & Blunt (1998) purifiée par chromatographie échangeuse d'ions (fraction neutre), obtenu sur colonne de filtration sur gel P2.

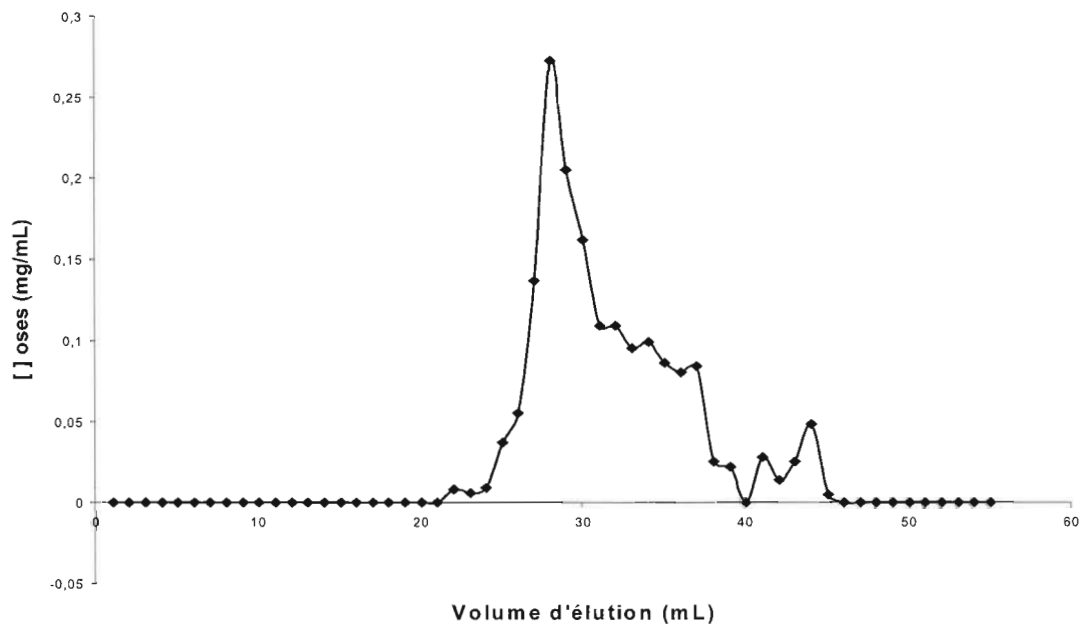


Figure 58 : Profil chromatographique de la fraction oligosaccharidique DR 4 désulfatée selon la méthode de Miller & Blunt (1998) purifiée par chromatographie échangeuse d'ions (fraction neutre), obtenu sur colonne de filtration sur gel P4.

3.2.2 - Chromatographie de filtration sur gel

Bio-Gel P2 (100-1800 Da, Bio-Rad)

La fraction neutre majoritaire issue de la chromatographie d'échange d'ions est éluee principalement avec le volume d'exclusion de la colonne de type P2 (figure 57). Mais elle comporte également différents types d'oligosaccharides de taille diverses élues progressivement, qui laissent présager une légère dégradation de nos composés au cours de la désulfatation.

La fraction principale (éluee avec le volume d'exclusion) est alors analysée par passage sur une colonne de filtration sur gel de type P4.

Bio-Gel P4 (800 – 4000 Da, Bio-Rad)

Le passage sur une telle colonne de la fraction majoritaire issue de la filtration sur gel de type P2 montre la présence de nombreux produits au sein de cette fraction (figure 58).

En effet, outre une fraction principale éluee au début, on peut noter la présence de nombreux produits, de tailles très proches les unes des autres (mal séparés), élues progressivement. Ce type de profil laisse également penser à une dégradation des oligosaccharides survenue au cours de l'étape de désulfatation, d'où la multitude de sous-produits de masses différentes mis en évidence par passage sur les colonnes de filtration sur gel.

Cependant, et pour des raisons de quantités disponibles, la fraction neutre issue de la colonne échangeuse d'ions est employée dans sa globalité pour la formation des acétates d'alditols partiellement méthylés.

4 – Perméthylation

La position des groupements sulfate est déterminée par comparaison des spectres CG/SM des oligosaccharides natifs et totalement désulfatés sous forme d'acétates d'alditols partiellement méthylés.

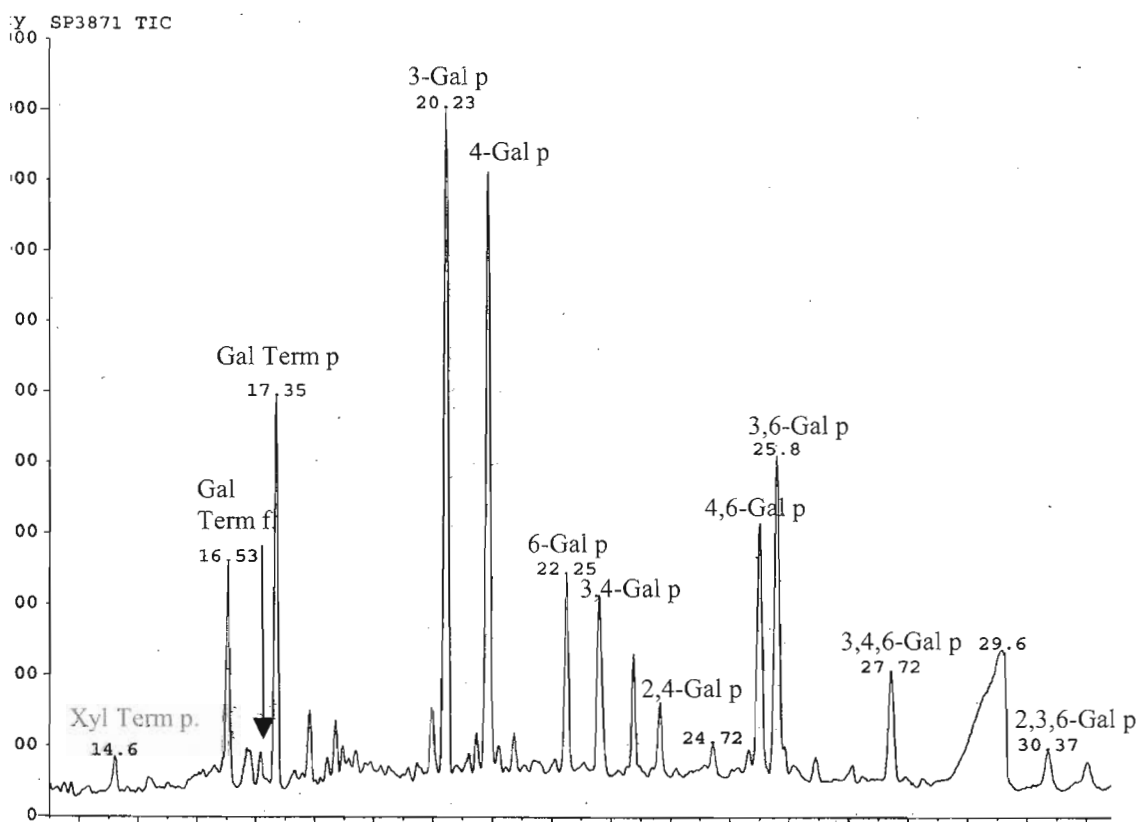
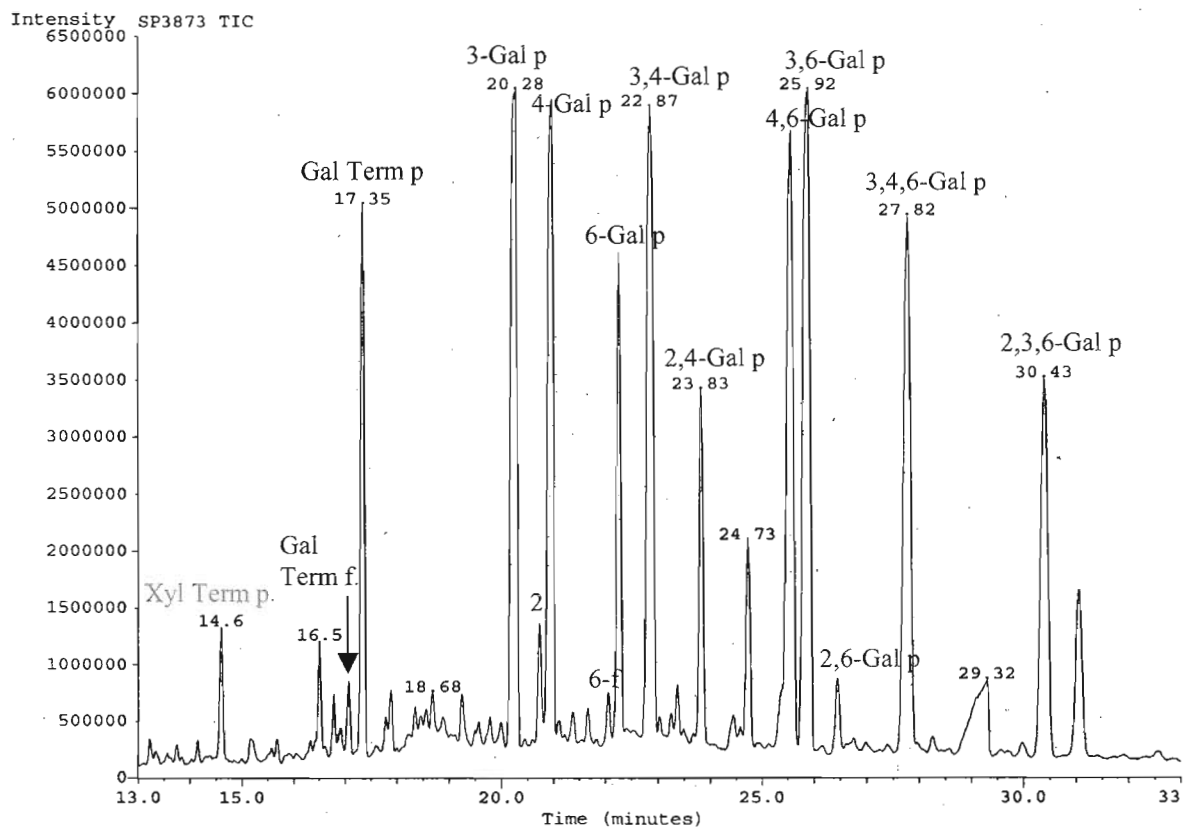


Figure 59 : Comparaison des spectres de CG/SM des oligosaccharides DR 4 d'*Asparagopsis armata* avant (en haut) et après (en bas) désulfatation

4.1 - Oligosaccharides DR 4 désulfatés par solvolysse

Les réactions de perméthylation dans le but d'obtenir des acétates d'alditols partiellement méthylés analysables par CG/SM sont effectuées sur les oligosaccharides DR 4 natifs tels quels, et les oligosaccharides DR 4 désulfatés par solvolysse, purifiés par chromatographie échangeuse d'ions (fraction neutre, complètement désulfatée).

Ainsi, comme dans le cas des polysaccharides natifs, la comparaison des pourcentages d'oses perméthylés avant et après désulfatation (figure 59) permet de tirer certaines conclusions concernant la structure de ces oligosaccharides. Les résultats obtenus pour les oligosaccharides natifs et désulfatés sont regroupés dans le tableau 14. Les temps de rétention des différents oses perméthylés sont différents de ceux déterminés en France pour les polysaccharides natifs, puisque les analyses chromatographiques sont effectuées dans des conditions différentes (emploi de colonne capillaire polaire, CCRC, Athens, USA).

En ce qui concerne l'interprétation des résultats de perméthylation des oligosaccharides DR 4, la même hypothèse que pour les polysaccharides natifs au sujet du squelette de base peut être faite, à savoir une alternance régulière entre les unités 3- β -D-galactopyranose (50%) et 4- α -D/L-galactopyranose (50%).

Or, après désulfatation complète de l'échantillon, nous ne sommes en présence que de 17% de galactose lié en 1,4, et de 19% de galactose lié en 1,3. Ces résultats sont beaucoup plus faibles que dans le cas des polysaccharides natifs (40% et 30% respectivement). A partir de ces résultats très différents, deux hypothèses peuvent être émises :

- soit 64% des unités de l'extrait saccharidique dépolymérisé DR 4 sont ramifiées (dont 31% de galactose lié en 1,3 et 33% de galactose lié en 1,4).
- Soit nous sommes dans un cas de sous-méthylation de nos échantillons, ce qui génère certaines aberrations au niveau de l'interprétation structurale, puisque tous les sites libres ne sont pas détectés tels quels, mais certains apparaissent comme substitués .

La deuxième hypothèse semble être la plus vraisemblable. En effet, rien ne peut justifier le fait que le polysaccharide natif, qui ne possède « que » 30% d'unités ramifiées génère des fractions dépolymérisées comportant 64% de ramifications. Cette hypothèse de sous-méthylation peut être corroborée par le fait que les pourcentages résiduels des unités encore trisubstituées ou disubstituées après désulfatation restent relativement élevés.

Acétates d'alditols partiellement méthylés	Temps de rétention (min) ^a	Fragments primaires (m/z)	Résidu substitué correspondant	Réponse du détecteur (%)	
				I	II
2,3,4-Me ₃ Xyl ^b	3,1	117, 118, 161, 162	Xylp-(1→	1,5	2,08
2,3,5,6-Me ₄ Gal	5,55	89, 118, 205, 278	Gal _f -(1→	1,1	2,27
2,3,4,6-Me ₄ Gal	5,87	118, 161, 162, 205	Gal _p -(1→	5,6	9,38
2,3,6-Me ₃ Gal	9,48	118, 233	→4)-Gal _p -(1→	10,34	17,21
2,4,6-Me ₃ Gal	8,82	118, 161, 234, 277	→3)-Gal _p -(1→	10,24	19,04
2,3,5-Me ₃ Gal	10,75	117, 118, 233	→6)-Gal _f -(1→	1,48	-
2,3,4-Me ₃ Gal	10,8	118, 162, 189, 233	→6)-Gal _p -(1→	5,73	9,12
3,4,6-Me ₃ Gal	9,27	161, 190, 205, 234	→2)-Gal _p -(1→	1,82	2,42
2,6-Me ₂ Gal	11,42	118, 305	→3,4)-Gal _p -(1→	11,39	10,72
3,4-Me ₂ Gal	15,03	189, 190, 233, 234	→2,6)-Gal _p -(1→	1,77	1,84
3,6-Me ₂ Gal	12,38	190, 233	→2,4)-Gal _p -(1→	5,36	5,83
2,3-Me ₂ Gal	14,15	118, 261	→4,6)-Gal _p -(1→	12,21	8,18
2,4-Me ₂ Gal	14,5	118, 189, 234, 305	→3,6)-Gal _p -(1→	12,37	7,24
2-MeGal	16,42	118, 333	→3,4,6)-Gal _p -(1→	10,79	4,83
4-MeGal	19,07	189, 262	→2,3,6)-Gal _p -(1→	8,42	-
2,3,6-Me ₃ Glc	9,73	118, 233	→4)-Glc _p -(1→	0,6	-

^aTr = Temps de rétention de l'acétate d'alditol relatif à celui du tétraacétate d'érythritol (Tr = 1,00)

^b 2,3,4-Me₃Xyl = 1,5-di-O-acétyl-2,3,4-tri-O-méthyl-xylitol

Tableau 14 : Identification par CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés produits par les oligosaccharides obtenus par dépolymérisation par voie radicalaire natifs (I) et désulfatés par solvolysse (II).

Acétates d'alditols partiellement méthylés	Temps de rétention (min) ^a	Fragments primaires (m/z)	Résidu substitué correspondant	Réponse du détecteur (%)	
				I	II
2,3,4-Me ₃ Xyl ^b	3,1	117, 118, 161, 162	Xylp-(1→	1,5	1,8
2,3,5,6-Me ₄ Gal	5,55	89, 118, 205, 278	Galp-(1→	1,1	-
2,3,4,6-Me ₄ Gal	5,87	118, 161, 162, 205	Galp-(1→	5,6	6,42
2,3,6-Me ₃ Gal	9,48	118, 233	→4)-Galp-(1→	10,34	17,65
2,4,6-Me ₃ Gal	8,82	118, 161, 234, 277	→3)-Galp-(1→	10,24	18,41
2,3,5-Me ₃ Gal	10,75	117, 118, 233	→6)-Galp-(1→	1,48	-
2,3,4-Me ₃ Gal	10,8	118, 162, 189, 233	→6)-Galp-(1→	5,73	9,23
3,4,6-Me ₃ Gal	9,27	161, 190, 205, 234	→2)-Galp-(1→	1,82	7,2
2,6-Me ₂ Gal	11,42	118, 305	→3,4)-Galp-(1→	11,39	10,2
3,4-Me ₂ Gal	15,03	189, 190, 233, 234	→2,6)-Galp-(1→	1,77	-
3,6-Me ₂ Gal	12,38	190, 233	→2,4)-Galp-(1→	5,36	5,34
2,3-Me ₂ Gal	14,15	118, 261	→4,6)-Galp-(1→	12,21	8,69
2,4-Me ₂ Gal	14,5	118, 189, 234, 305	→3,6)-Galp-(1→	12,37	9,97
2-MeGal	16,42	118, 333	→3,4,6)-Galp-(1→	10,79	5,09
4-MeGal	19,07	189, 262	→2,3,6)-Galp-(1→	8,42	-
2,3,6-Me ₃ Glc	9,73	118, 233	→4)-Glc p-(1→	0,6	-

^aTr = Temps de rétention de l'acétate d'alditol relatif à celui du tétraacétate d'érythritol (Tr = 1,00)

^b 2,3,4-Me₃Xyl = 1,5-di-O-acétyl-2,3,4-tri-O-méthyl-xylitol

Tableau 15 : Identification par CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés produits par les oligosaccharides obtenus par dépolymérisation par voie radicalaire natifs (I) et désulfatés selon la méthode de Miller et Blunt (II).

Le seul moyen de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse de sous-méthylation, et donc la complexité des fractions oligosaccharidiques, est l'analyse par RMN de ces fractions dépolymérisées DR 4 désulfatées (cf. paragraphe 5).

On peut cependant d'ores et déjà dire au regard de leur zone anomérique relativement simple que la fraction oligosaccharidique ne contient pas une multitude d'oses multisubstitués, au contraire.

C'est pourquoi l'origine des 64% d'unités ramifiées trouvées pour les oligosaccharides ne serait due qu'à une perméthylation partielle de ces derniers. Cette perméthylation incomplète est vraisemblablement due au fait que les conditions de perméthylation mises au point pour les polysaccharides natifs ne sont plus adaptées aux oligosaccharides qu'ils génèrent par dépolymérisation radicalaire, leur structure étant différente (taille beaucoup plus petite, extrémités réductrices beaucoup plus nombreuses et qui plus est, réduites, etc...).

L'idéal aurait donc été d'optimiser à nouveau les conditions de perméthylation pour nos oligosaccharides DR 4 natifs et désulfatés. Cependant, les études RMN faites sur les oligosaccharides DR 4 désulfatés (paragraphe 5 à venir) suggérant la présence d'un mélange complexe de composés, et faute de temps, il nous est paru inutile de se focaliser sur l'obtention de conditions de perméthylation plus adaptées à nos produits, mais plutôt de s'intéresser à la recherche de nouvelles voies de purifications.

4.2 - Oligosaccharides DR 4 désulfatés selon Miller et Blunt (Miller & Blunt, 1998)

Les analyses de CG/SM sont effectuées sur les acétates d'alditols partiellement méthylés obtenus à partir des oligosaccharides DR 4 natifs et totalement désulfatés. Comme dans le cas des oligosaccharides DR 4 désulfatés par solvolysé, il s'agit de la fraction neutre issue de la chromatographie échangeuse d'ions DEAE.

Les pourcentages d'oses perméthylés avant et après désulfatation sont représentés dans le tableau 15. Les analyses des produits perméthylés sont dans ce cas également réalisées au CCRC (Athens, USA).

Une fois encore, nous sommes face à un problème de sous-méthylation des espèces perméthylées, ce qui explique les pourcentages d'oses encore trisubstitués ou disubstitués après désulfatation.

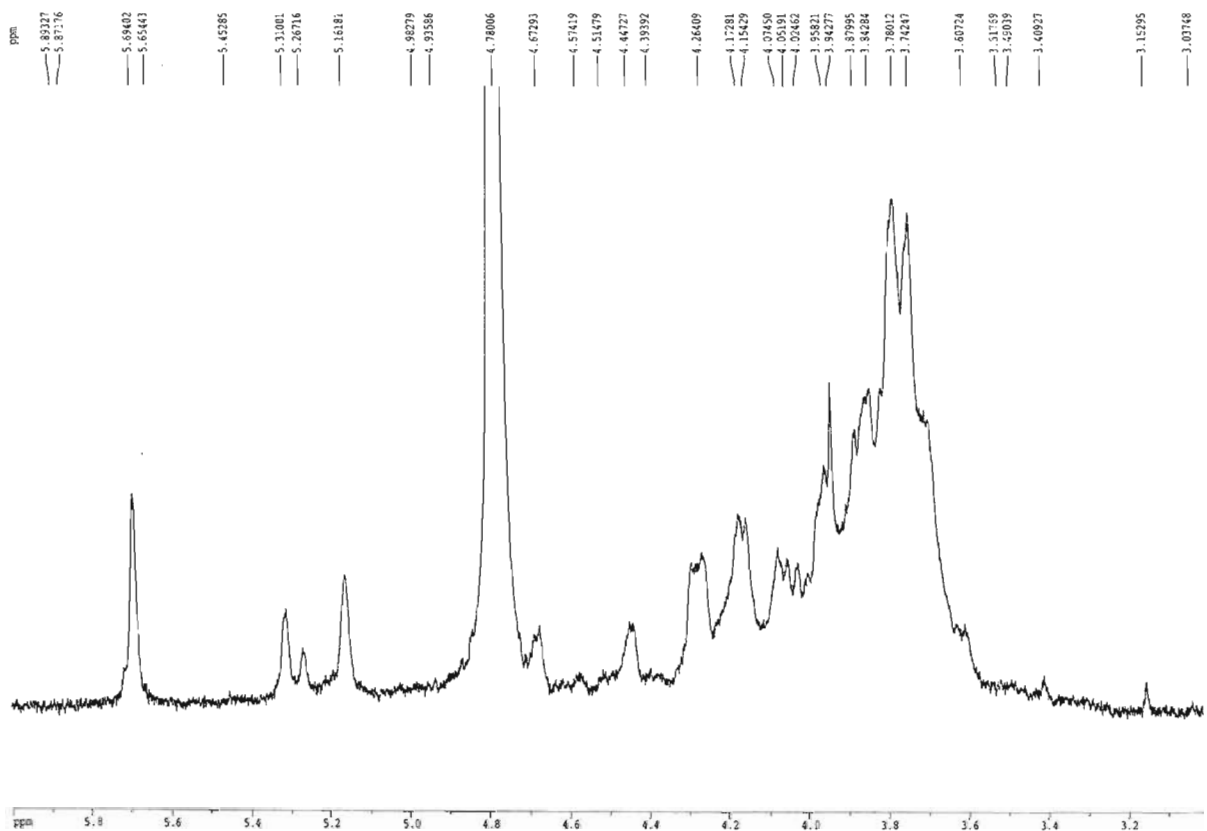


Figure 60 : Spectre de RMN ^1H des oligosaccharides DR 4 désulfatés selon la méthode de Miller et Blunt (1998), purifiés sur une colonne échangeuse d'ions (298 K, 500 MHz)

Comme dans le cas des oligosaccharides désulfatés par solvolysse, la RMN nous confirme que notre fraction oligosaccharidique désulfatée dans le cas présent est beaucoup moins complexe que cela, tout en laissant entrevoir la présence d'un mélange compliqué d'oligosaccharides. C'est pourquoi, plutôt que de reporter notre attention sur l'optimisation des conditions de perméthylation pour notre fraction oligosaccharidique, nous avons préféré également nous tourner vers une nouvelle méthode de purification.

5 – Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

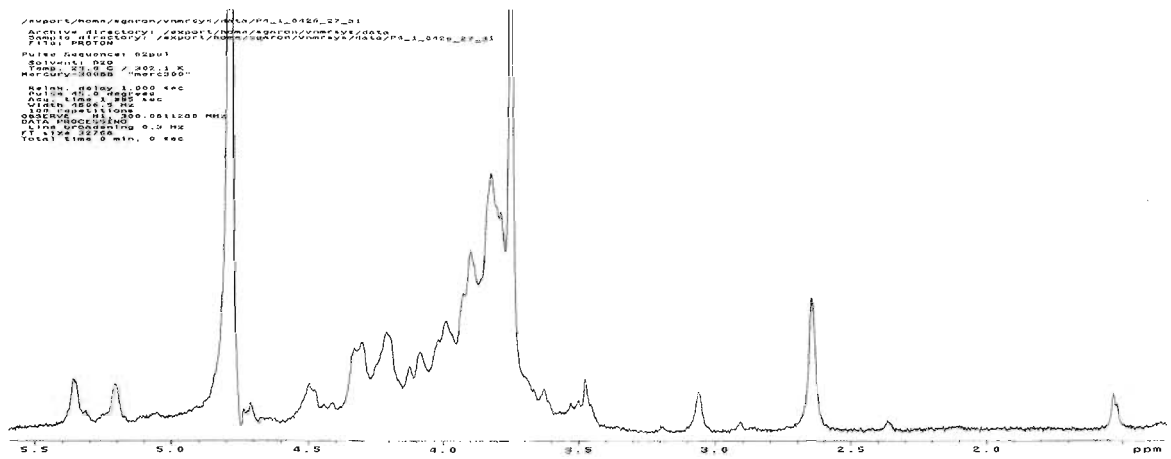
5.1 – Choix de l'échantillon

Comme il a été précisé dans la partie expérimentale correspondant à ce chapitre, les spectres sont réalisés sur des oligosaccharides affranchis de leurs groupements sulfate, afin d'affiner la résolution spectrale de ceux-ci. De façon à obtenir les spectres RMN les moins complexes possibles, une fraction à analyser la plus « pure » possible est souhaitable. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser une des fractions issues de la chromatographie de filtration sur gel réalisée à partir de la fraction totalement désulfatée (neutre) obtenue par chromatographie échangeuse d'ions.

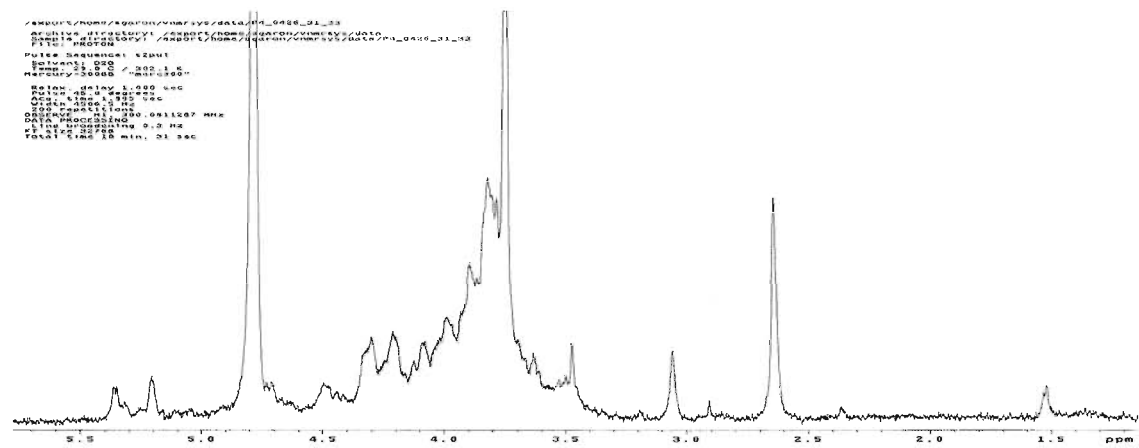
Dans le cas des oligosaccharides DR 4 désulfatés par solvolysse, il s'agit de la fraction (27-31) issue de la colonne Bio-Gel de type P4 (cf. paragraphe 3.1.2).

Par contre, pour les oligosaccharides DR 4 désulfatés selon la méthode de Miller et Blunt (1998), il s'est avéré à l'issue du passage de la fraction neutre sur colonne de filtration sur gel que cette méthode de désulfatation était probablement à l'origine d'une dégradation des oligosaccharides, ce qui se traduisait par la formation d'une multitude de produits de masses différentes (paragraphe 3.2.2).

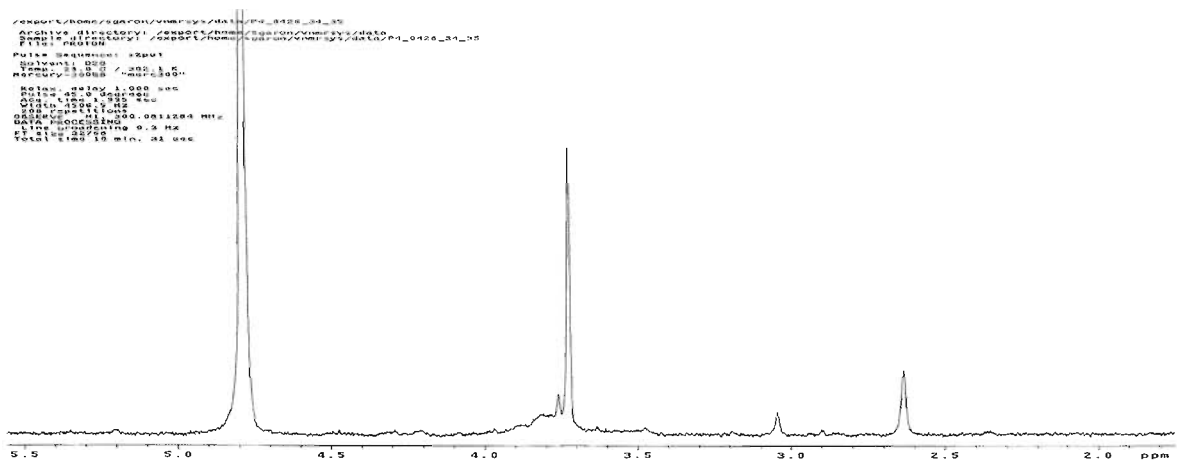
Malgré la présence majoritaire en poids d'un produit de masse homogène, il n'a pas été possible, pour des raisons de temps, d'accumuler suffisamment de produit de ce type pour réaliser des spectres RMN 2D de bonne qualité. De plus, le fait que cette fraction oligosaccharidique désulfatée soit probablement dégradée n'incite pas à pousser plus avant l'interprétation structurale des spectres RMN, puisque ces derniers ne correspondent pas à la réalité de nos chaînes saccharidiques.



Fraction (27-31)



Fraction (32-33)



Fraction (34-35)

Figure 61 : RMN ^1H 300 MHz (298 K) des oligosaccharides DR 4 désulfatés par solvolysse purifiés sur une colonne échangeuse d'ions et sur une colonne de filtration sur gel P4.

Un spectre RMN ^1H est cependant acquis sur la fraction neutre dans sa globalité. Ainsi, l'étude de sa zone anomérique a permis de montrer que le produit était beaucoup moins complexe qu'aurait pu le suggérer l'étude des produits perméthylés, et a donc confirmé la sous-méthylation de ces derniers. En effet, si le produit comportait réellement une multitude de ramifications, il présenterait de nombreux protons anomériques différents les uns des autres car placés dans un environnement différent, ce qui n'est pas le cas (figure 60).

5.2 – Analyse par RMN de la fraction oligosaccharidique DR 4 désulfatée par solvolysse

L'analyse RMN est donc réalisée sur la fraction oligosaccharidique DR 4 totalement désulfatée la plus simple possible.

Pour ce faire, la fraction neutre obtenue à l'issue de la chromatographie d'échange d'ions après désulfatation est purifiée par passage en chromatographie de filtration sur gel qui se caractérise par la présence de trois produits de masses différentes (cf. paragraphe 3.1.2).

Ces trois produits sont alors analysés et comparés par RMN 300 MHz (Varian, Mercury 300 MHz) (figure 61). Il s'avère que les deux premières fractions [(27-31) et (32-33)] ont des profils en RMN ^1H quasiment identiques, alors que la dernière fraction (34-35) est totalement différente, et ne comporte vraisemblablement que des contaminants (résidus de la réaction de désulfatation).

La première fraction (27-31) étant plus importante en quantité, les analyses RMN bidimensionnelles sont réalisées sur cette fraction.

Analyse RMN de la fraction désulfatée (27-31)

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C , 1D et 2D (homo- et hétéronucléaires) sont acquis sur un appareil de type Varian, Inova 500 MHz à 298 K au CCRC (Athens, USA).

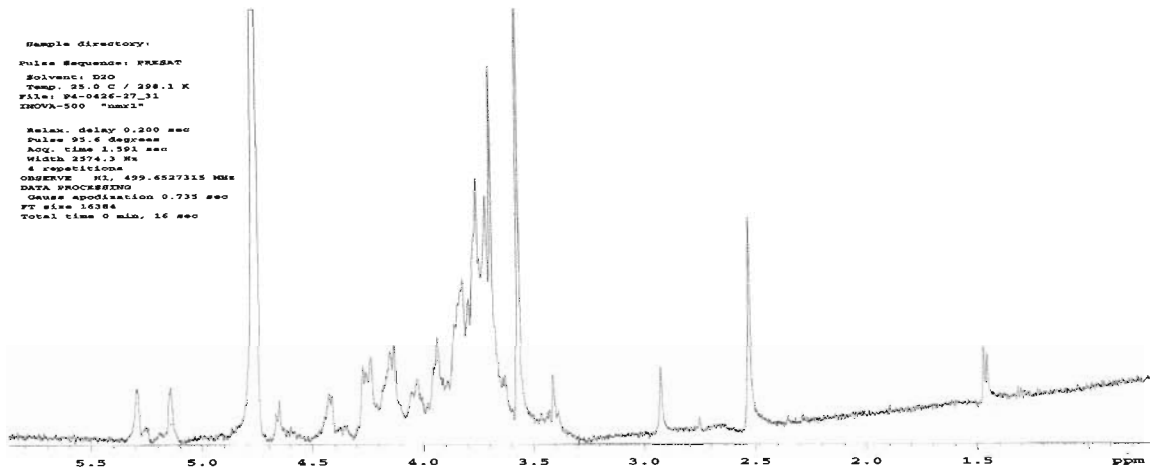


Figure 62 : Spectre RMN ^1H de la fraction oligosaccharidique désulfatée (27-31) (500 MHz, 298 K)

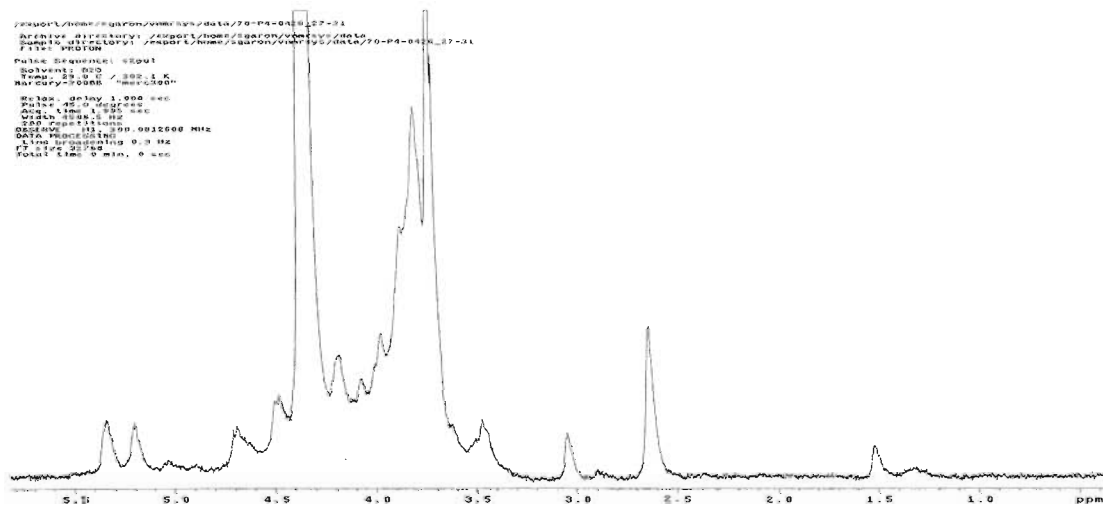


Figure 63 : Spectre RMN ^1H de la fraction oligosaccharidique désulfatée (27-31) (300 MHz, 320 K)

5.2.1 - Configuration anomérique des liaisons glycosidiques

Nous avons déjà noté (chapitre 1, paragraphe II 4.2 et III 4.2) que les déplacements chimiques des signaux correspondant aux carbones et protons anomériques étaient généralement séparés des autres signaux en raison de leurs déplacements vers les champs faibles, ce qui permet de les identifier facilement.

Ainsi, les signaux correspondant aux protons et carbones anomériques se situent respectivement entre 4,5 et 5,5 ppm et 95 et 105 ppm. En particulier, les protons anomériques de configuration α se situent au-delà de 5 ppm, alors que ceux de configuration β se trouvent entre 4,5 et 4,8 ppm.

Le spectre RMN ^1H de notre fraction (27-31) (figure 62) montre clairement deux signaux de déplacements chimiques supérieurs à 5 ppm, correspondant donc à des protons anomériques de configuration α . La région située entre 4,5 et 4,8 ppm est par contre plus complexe et plus difficile à exploiter, notamment en raison de la présence du signal correspondant à l'eau résiduelle situé dans cette région.

C'est pourquoi un autre spectre ^1H est réalisé à 320 K afin de déplacer ce signal correspondant à l'eau (figure 63). Cette nouvelle acquisition spectrale permet de mettre en évidence au moins deux protons anomériques de configuration β .

Il est cependant nécessaire de confirmer l'existence de ces quatre protons anomériques, voire d'établir la présence éventuelle d'autres protons de ce type. Ceci est réalisé grâce à l'analyse du spectre en mode hétéronucléaire HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) qui permet de caractériser les signaux correspondant aux protons et carbones anomériques (figure 64) situés vers les bas champs.

Ainsi, quatre taches de corrélation C-1/H-1 sont notables, correspondant à deux résidus d'anomérisation α (5,29/103,4 ; 5,14/98,2 ppm) et à deux résidus d'anomérisation β (4,66/107 ; 4,44/105,9 ppm).

Cependant, lorsque l'on s'intéresse au spectre en mode homonucléaire COSY (Correlation Observed Spectroscopy) qui permet de visualiser le couplage ^3J entre deux protons vicinaux (figure 65), on peut noter dans la région spécifique des protons anomériques deux nouveaux résidus non détectés, d'anomérisation α , situés respectivement à 5,24 ppm et 5,13 ppm. La valeur des déplacements chimiques des carbones correspondants est déterminée par

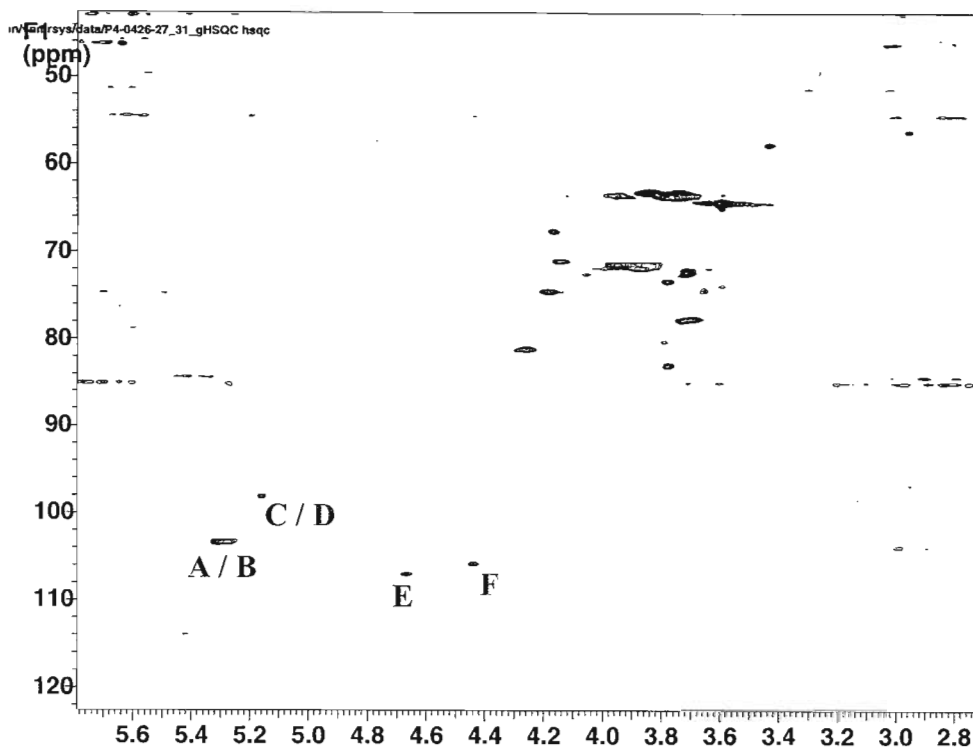


Figure 64 : Spectre RMN hétéronucléaire HSQC de la fraction oligosaccharidique désulfatée (27-31) (500 MHz, 298 K)

Résidu	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$					
	1	2	3	4	5	6
A	5,29 103,4	3,85	3,95 71,6	4,24		
B	5,24 103,4	3,81	3,92 71,6	3,98		
C	5,14 98,2	3,93	4,04	4,27 81,2		
D	5,13 98,2	3,85	3,93 71,6	4,01		
E	4,66 107	3,71	3,78	4,15 71		
F	4,44 105,9	3,76				

Tableau 16 : Déplacements chimiques en ppm des signaux de la fraction oligosaccharidique désulfatée purifiée (27-31), obtenus à partir des spectres RMN ^1H et ^{13}C .

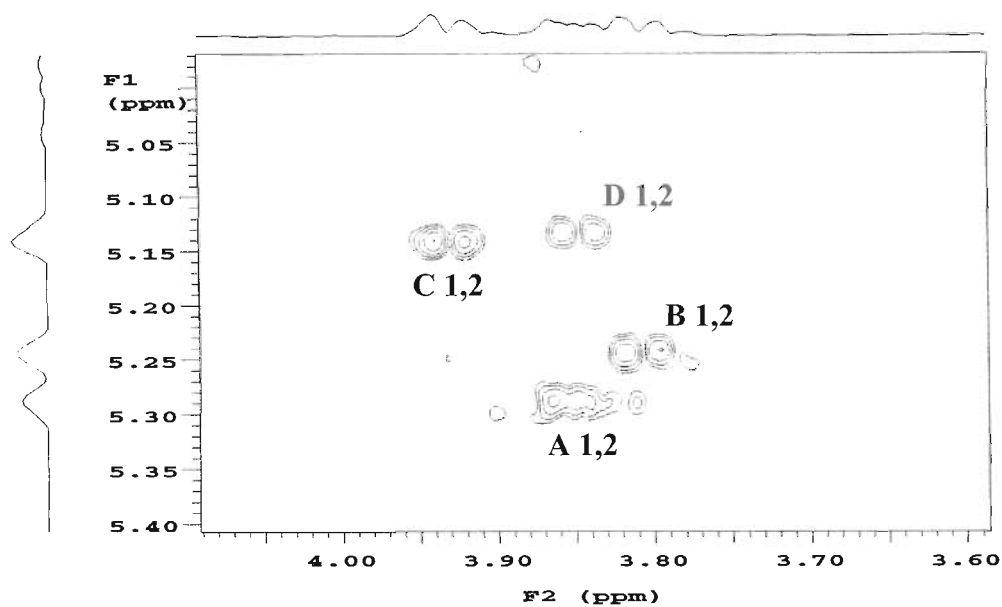
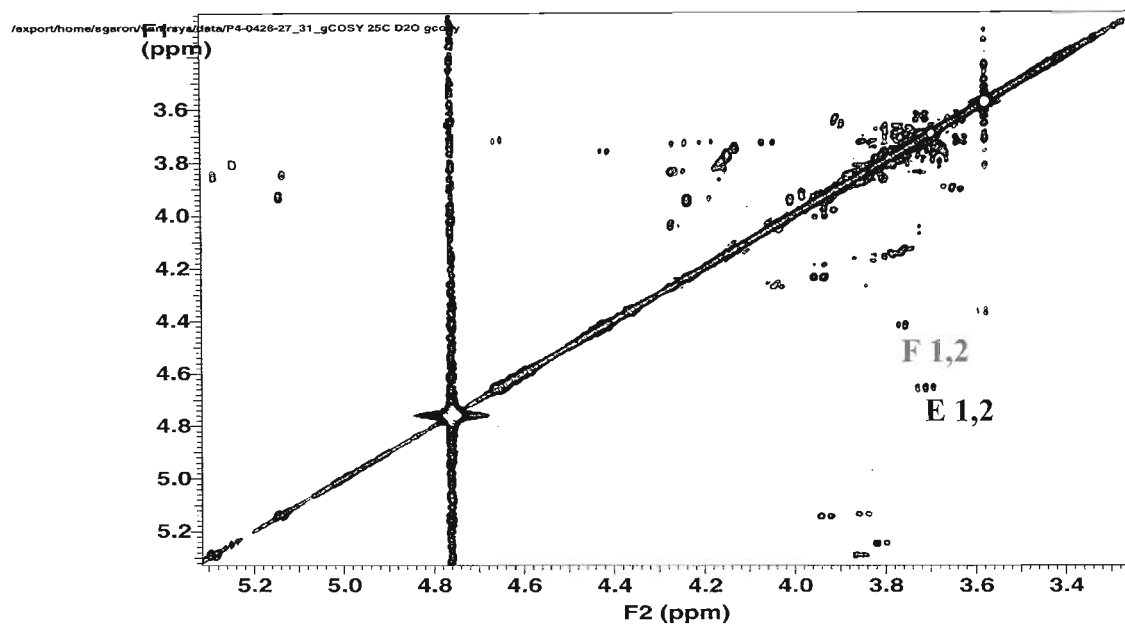


Figure 65 : Spectres RMN homonucléaires COSY de la fraction oligosaccharidique désulfatée (27-31) (500 MHz, 298 K)

le spectre en mode hétéronucléaire HSQC. Nous sommes donc en présence de six résidus glycosidiques, dont **quatre d'anomérie α** :

- 5,29 (103,4)
- 5,24 (103,4)
- 5,14 (98,2)
- 5,13 (98,2)

et **deux d'anomérie β** :

- 4,66 (107)
- 4,44 (105,9)

Ils sont nommés de A à F dans l'ordre décroissant des déplacements chimiques de leurs protons anomériques.

L'attribution des signaux des différents protons de chaque résidu est obtenue à partir des spectres homonucléaires COSY et TOCSY (Total Observed Correlation Spectroscopy) (figure 66). Le premier permettant de visualiser les couplages 3J entre deux protons vicinaux, et le second permettant dans le meilleur des cas d'établir les corrélations existant entre tous les protons d'un même résidu. Les déplacements chimiques des carbones correspondants sont établis à partir du spectre HSQC (tableau 16).

La totalité des signaux n'a cependant pu être attribuée, en raison principalement de recouvrements de certains signaux entre eux.

En ce qui concerne l'identification des résidus, les études préliminaires ont montré la présence d'un résidu xylose pour dix résidus galactose. Les résidus galactose peuvent facilement être identifiés en RMN car d'une part, leurs protons et carbones positionnés en 3 et 4 sont toujours plus déblindés que ceux des autres résidus osidiques (David, 1995), et d'autre part, ils se caractérisent au sein des spectres COSY par des couplages $^3J_{3,4}$ et $^3J_{4,5}$ très faibles. Il est cependant difficile de déterminer à partir du spectre COSY obtenu dans notre cas les constantes de couplages entre les protons 3 et 4, et 4 et 5, et donc d'assimiler tous nos résidus à des galactoses. Toutefois, les valeurs des déplacements chimiques obtenus pour les protons positionnés en 4 suggèrent fortement que tous ces résidus soient effectivement des résidus galactose.

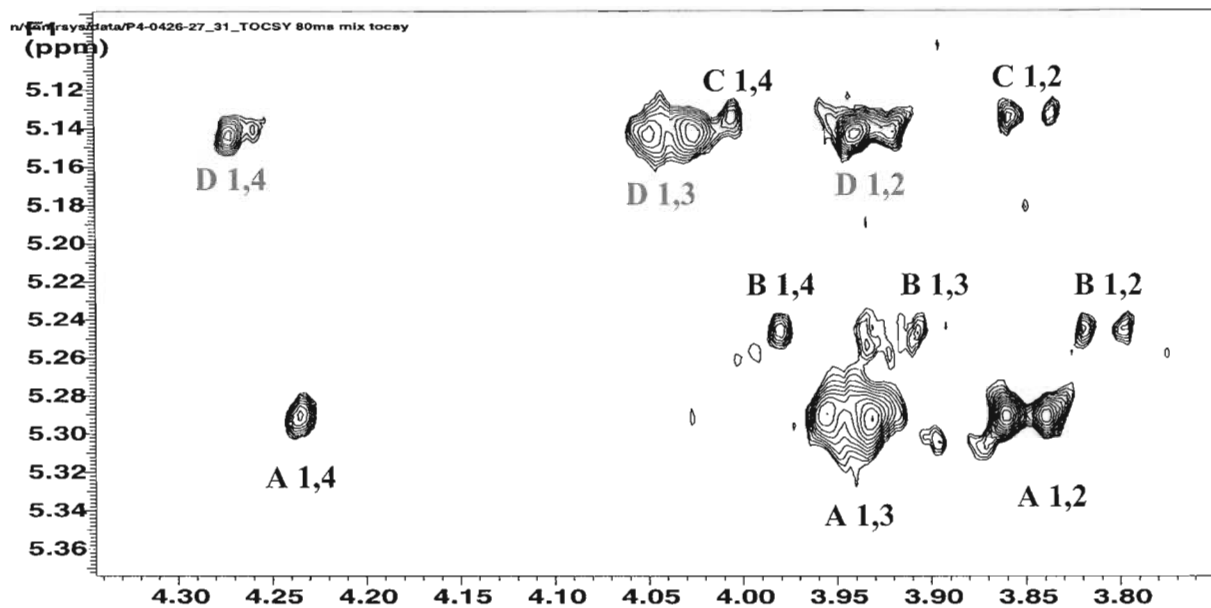
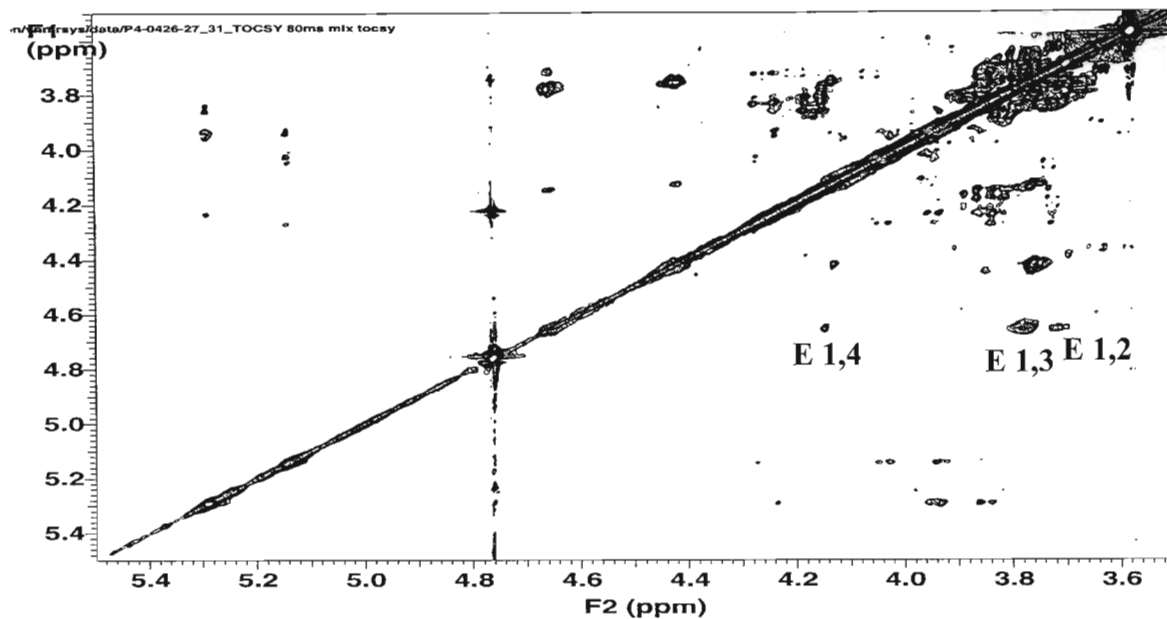


Figure 66 : Spectres RMN homonucléaires TOCSY de la fraction oligosaccharidique désulfatée (27-31) (500 MHz, 298 K)

5.2.2 – Enchaînement des résidus glycosidiques

La séquence glycosidique est déduite de l'interprétation des spectres en mode homonucléaire NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy).

En effet, le spectre NOESY comporte un certain nombre de corrélations, voire toutes, qui existent entre les protons d'un même résidu, mais également entre les protons situés de part et d'autre d'une liaison glycosidique.

L'analyse du spectre en mode homonucléaire NOESY (figure 67) nous permet de mettre en évidence un certain nombre de corrélations inter-résidus au sujet des résidus A, C, E et F.

Dans le cas du résidu **A** (H-1 = 5,29 ppm), on peut voir clairement deux corrélations : une à 3,85 ppm, qui correspond à une corrélation entre le proton anomérique de A et le proton positionné en 2 sur ce même résidu, et une nouvelle à 3,75 ppm, qui correspond à une corrélation inter-résidus entre le proton anomérique de A et H-2 de E, H-3 de E, ou encore H-2 de F. Le problème est que le signal H-1 de A ne présente pas d'autres taches de corrélation « à distance » avec l'un ou l'autre de ces résidus E ou F (H-2, H-3...), ce qui aurait pu permettre de trancher pour savoir lequel de ces deux oses est lié avec A.

Pour le résidu **C** (H-1 = 5,14 ppm), trois taches de corrélations apparaissent sur le spectre NOESY. Une à 3,93 ppm qui correspond au proton placé en 2 de ce même résidu, et deux à 3,78 et 4,15 ppm respectivement, qui correspondent à des corrélations inter-résidus entre le proton anomérique de C, et H-3 de E (3,78ppm), et H-4 de E (4,15ppm). La tache de corrélation étant plus prononcée avec H-4 de E qu'avec son H-3, on peut en déduire que le résidu C est lié par l'intermédiaire de sa position anomérique à la position 4 du résidu E. La corrélation entre H-1 de C et H-3 de E ne correspond alors qu'à une corrélation « longue distance » entre ces deux résidus liés.

En ce qui concerne le résidu **E** (H-1 = 4,66), seule la corrélation de son proton anomérique avec le proton situé en position 4 sur le résidu C est visible, ce qui correspond vraisemblablement à un point de jonction.

Enfin, pour le résidu **F** (H-1 = 4,44), trois taches de corrélations sont visibles. Une à 3,76 ppm (correspondant à H-2 de F), et deux respectivement à 4,23 ppm (corrélation inter-résidus entre H-1 de F et H-4 de A), et à 3,7 ppm (corrélation entre H-1 de F et H-2 de E).

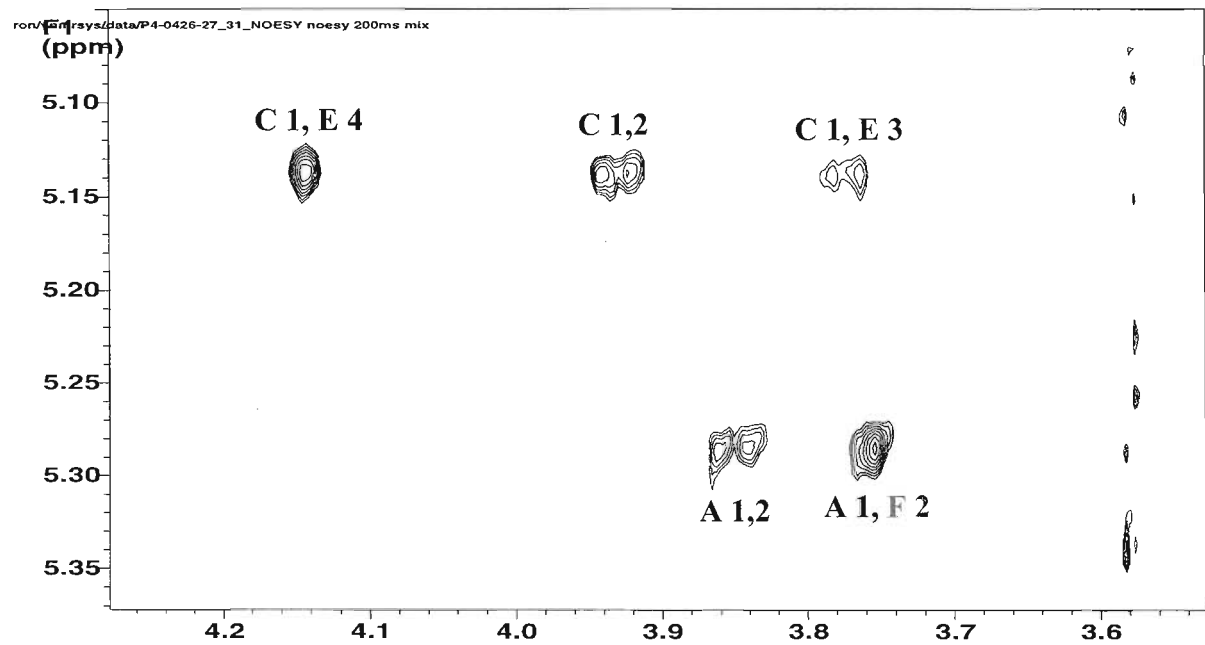
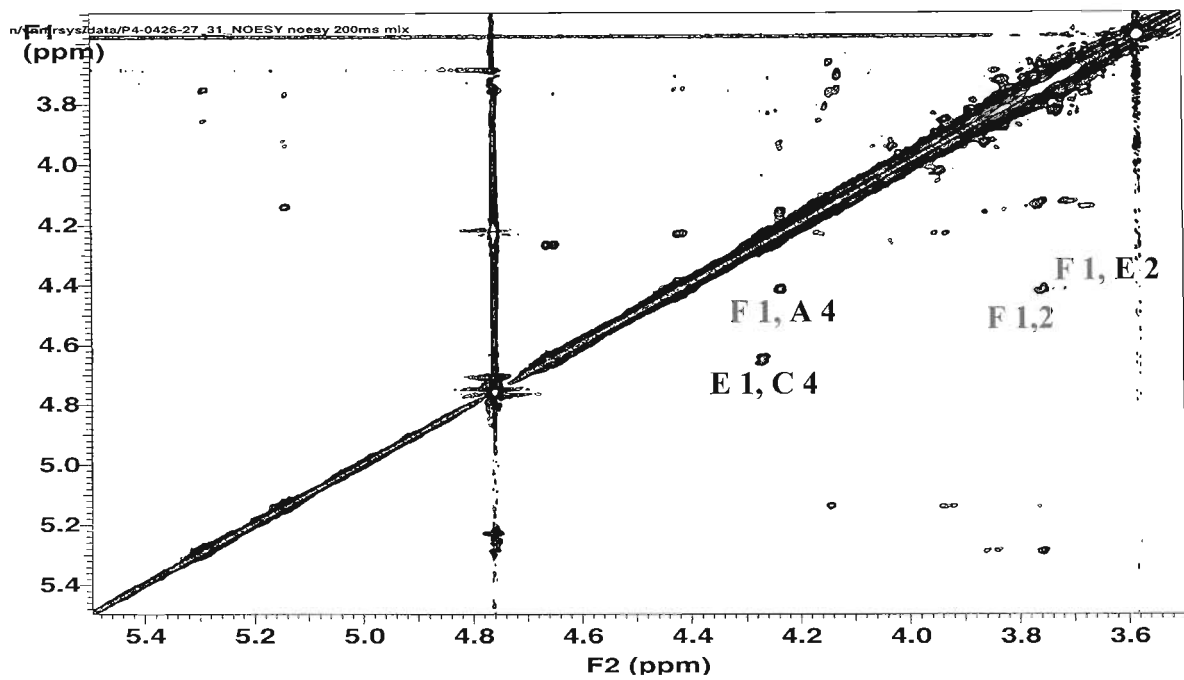
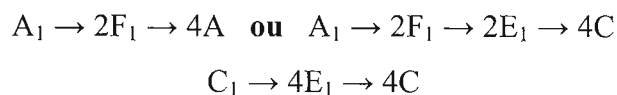


Figure 67 : Spectres RMN homonucléaires NOESY de la fraction oligosaccharidique désulfatée (27-31) (500 MHz, 298 K)

Les informations obtenues à partir du spectre en mode homonucléaire NOESY permettent d'affirmer que les résidus A, C, E et F présentent des corrélations inter-résidus permettant d'établir certaines hypothèses de structure :



L'unité répétitive des oligosaccharides DR 4 serait donc au maximum un tétrasaccharide ($A_1 \rightarrow 2F_1 \rightarrow 2E_1 \rightarrow 4C$), voire deux trisaccharides ($A_1 \rightarrow 2F_1 \rightarrow 4A$) et ($C_1 \rightarrow 4E_1 \rightarrow 4C$).

En ce qui concerne les deux autres résidus B et D, pour lesquels aucune tache de corrélation inter-résidus n'a été mise en évidence sur le spectre NOESY, mais qui sont aisément visibles sur le spectre COSY, ils correspondent à des oses supplémentaires, appartenant peut-être à un mélange d'oses très proches de celui caractérisé (A, C, E, F), et qui n'a pu être isolé lors du passage sur la colonne de filtration sur gel.

Seul un spectre en mode hétéronucléaire HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), qui permet d'obtenir des informations relatives aux enchaînements des résidus par le biais des couplages 2J et 3J entre les atomes situés de part et d'autre de la liaison glycosidique, pourrait nous permettre de recueillir des informations complémentaires concernant la séquence osidique, voire de confirmer cette dernière. Malheureusement, faute de produit, aucun spectre HMBC de bonne qualité n'a pu être acquis. Aucune information complémentaire concernant la structure de nos oligosaccharides n'est donc recueillie.

Tous ces résultats nous prouvent donc que nous sommes encore en présence d'un mélange relativement complexe et difficile à séparer. Une purification supplémentaire pouvant générer la séparation d'un tel mélange serait le passage de cette fraction (27-31) en chromatographie ionique DIONEX, dont la séparation des différents produits d'un mélange est basée sur leurs différences de pKa respectifs dans un éluant spécifique.

Cependant, les informations obtenues à l'issue de l'analyse CG/SM (dégradation probable des oligosaccharides désulfatés), associées au fait que la quantité de la fraction à purifier n'est pas très élevée et que l'optimisation des conditions d'éluion en chromatographie DIONEX puisse prendre du temps, nous poussent à explorer une nouvelle voie de purification totalement différente pour les polysaccharides de l'algue *Asparagopsis armata*.

6 – Détermination des masses réelles des fractions dépolymérisées

Les masses des oligosaccharides obtenus par dépolymérisation radicalaire n'ont été jusque-là qu'exprimées en équivalent pullulanes, et n'ont jamais été estimées exactement.

Dans le but de déterminer la masse exacte des oligosaccharides obtenus par cette voie de dépolymérisation, ainsi que de vérifier l'homogénéité en masse de ces derniers, des analyses en spectrométries de masse Maldi-TOF et Electrospray, ainsi qu'en chromatographie d'exclusion stérique HPSEC mais utilisant les standards adéquats, sont réalisées.

Rappelons que la masse molaire moyenne en poids en équivalent pullulanes estimée par HPSEC pour nos oligosaccharides DR 4 est de 4 200 Da, et que les fractions obtenues sont considérées comme homogènes en masses.

6.1 – Maldi-TOF

L'analyse de nos oligosaccharides générés par la dépolymérisation radicalaire de quatre heures en spectrométrie de masse Maldi-TOF montre que leur masse est de l'ordre de 1000 Da, et que de plus, ceux-ci sont partiellement dégradés.

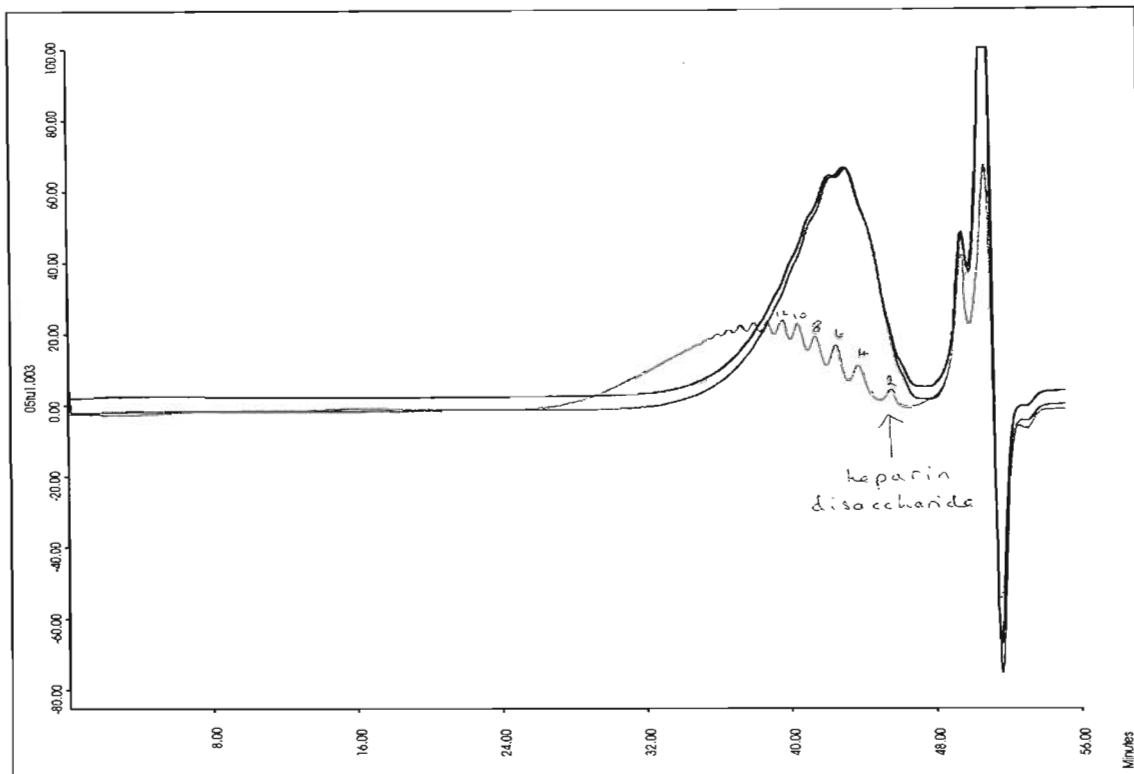
Il est cependant nécessaire de préciser que la détection de ces derniers n'a pas été évidente, et qu'elle est effectuée en mode positif.

6.2 – Electrospray

L'analyse des oligosaccharides est effectuée dans du méthanol et les spectres sont acquis en mode positif.

Un ion majoritaire à $m/z = 933$ se détache du spectre, accompagné d'un ion moins intense à 1012 Da.

Cependant, d'autres ions sont également présents sur le spectre, appuyant l'hypothèse d'une certaine hétérogénéité pour notre échantillon.



----- et ----- : Oligosaccharides DR 4 (duplicata)
 ----- : Calibrant : Héparines de bas poids moléculaires

Figure 68 : Profil de la détermination de la masse des oligosaccharides DR 4 par HPSEC

6.3 – HPSEC

La détermination de la masse de nos oligosaccharides DR 4 par HPSEC est réalisée en utilisant des standards de calibration plus adaptés à nos oligosaccharides sulfatés : les héparines de bas poids moléculaires.

Ainsi, avec un indice de polydispersité ($I_p = M_n/M_w$) de 1,45, les différentes masses trouvées pour nos oligosaccharides sont respectivement :

Masse molaire au pic **M_p** : 1 428 Da

Masse molaire moyenne en nombre **M_n** : 1 614 Da

Masse molaire moyenne en poids **M_w** : 2 342 Da

Cependant, et malgré un indice de polydispersité représentatif d'une certaine homogénéité en masse, le profil de nos oligosaccharides sur ces colonnes montre clairement que nous sommes en présence d'un mélange d'oligomères, différents les uns des autres par un incrément régulier en masse de l'ordre de deux unités saccharidiques (figure 68).

Cette technique de détermination de la masse de nos oligosaccharides semble être la plus proche de la réalité en raison de l'emploi de colonnes adaptées à nos produits et de standards similaires à nos oligosaccharides. Elle démontre clairement que nous sommes en présence d'un mélange d'oligosaccharides de masse molaire moyenne en poids M_w de l'ordre de 2 300 Da, et que ce mélange est constitué de chaînes différentes les unes des autres d'un motif de répétition qui est un disaccharide, ce qui est cohérent avec la structure des polysaccharides d'algues rouges.

IV – CONCLUSION

La dépolymérisation par voie radicalaire des polysaccharides de l'algue rouge *Asparagopsis armata* dans le but d'obtenir des oligosaccharides de structure plus simple s'est avérée non adaptée à l'étude structurale des macromolécules.

En effet, les oligosaccharides engendrés par cette voie ne sont pas très homogènes, et même s'ils semblent relativement proches les uns des autres en masse, il s'agit quand même d'un mélange complexe d'oligomères. Cependant, la structure globale des chaînes saccharidiques semble conservée (taux de sulfate similaire, présence des ramifications...).

De plus, les techniques de modification chimique optimisées pour les polysaccharides natifs d'*Asparagopsis armata*, et qui permettaient d'obtenir des informations concernant la structure, ne sont plus valides pour ces oligosaccharides, en raison de leurs caractéristiques différentes (masses beaucoup plus petites, extrémités réduites, etc...). C'est pourquoi, il a fallu redéfinir d'autres conditions de modification chimique, telle que la désulfatation de nos oligosaccharides, qui se sont révélées elles-mêmes dégradatives pour nos chaînes saccharidiques et ont nécessité des étapes de purification supplémentaires. A l'issue de ces étapes de purifications, il est clairement apparu que les informations obtenues n'étaient que partielles, en raison de la complexité du produit.

L'analyse par CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés n'a pas non plus apporté d'information supplémentaire par rapport aux polysaccharides natifs. Au contraire, les conditions adaptées aux polysaccharides ont généré pour les oligosaccharides des sous-méthylations, à l'origine de résultats complexes inexploitable.

Des informations nouvelles ont cependant pu être retirées de l'analyse des spectres RMN de la fraction oligosaccharidique désulfatée.

La présence d'un mélange y est analysée, mais l'existence d'un tétrasaccharide ou de deux trisaccharides au sein de ce mélange est détectée, ainsi que la présence d'oses pour lesquels aucune corrélation inter-résidus n'a pu être mise en évidence.

Malheureusement, faute de résolution, il est difficile d'aller plus en avant dans l'interprétation structurale de ces spectres. En particulier, il manque de nombreuses informations concernant la connexion des oses entre eux, et les résultats mis en évidence ici sont loin de la structure

idéale des chaînes saccharidiques des polysaccharides/oligosaccharides d'algues rouges, où les unités 3- β -D-galactopyranose sont liées à des unités 4- α -D/L- galactopyranose.

C'est pourquoi, et plutôt que de chercher à optimiser les conditions de modification de nos oligosaccharides afin d'en tirer des informations structurales (qui de toutes façons seront obsolètes en raison de la dégradation initiale des échantillons), nous avons décidé de nous tourner vers une nouvelle voie de purification des polysaccharides natifs d'*Asparagopsis armata*, totalement différente de celle-ci, en espérant en simplifier la structure tout en évitant la dégradation de celle-ci.

PARTIE 2 :

PURIFICATION DES POLYSACCHARIDES NATIFS PAR CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'ANIONS

I – INTRODUCTION

La formation d'oligosaccharides (décrite dans la partie 1 de ce même chapitre) dans le but de simplifier l'étude structurale des polysaccharides extraits de l'algue rouge *Asparagopsis armata* n'ayant pu fournir les informations nécessaires quant à la détermination de leur structure, nous nous sommes tournés vers une nouvelle voie de purification des polysaccharides natifs totalement différente.

En effet, les études préliminaires réalisées sur les polysaccharides bruts extraits d'*Asparagopsis armata* (chapitre 1) ont laissé entrevoir une certaine complexité quant à la répartition des groupements sulfate le long de la chaîne saccharidique principale.

Dans le but d'obtenir des fractions les plus simples possibles, une purification préliminaire basée sur les masses molaires de nos polysaccharides est dans un premier temps réalisée. Puis une séparation basée sur cette hétérogénéité de structure est alors envisagée, consistant au passage de la fraction polysaccharidique brute sur une colonne échangeuse d'anions.

De plus, afin de résoudre les ambiguïtés structurales soulevées lors de l'analyse par CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés issus des polysaccharides natifs (chapitre 1), et notamment la caractérisation et la différenciation des galactoses liés en 3 et sulfatés en 4 de ceux liés en 4 et sulfatés en 3, une nouvelle méthode de modification chimique pour l'obtention d'acétates d'alditols partiellement méthylés est développée.

Enfin, la caractérisation par résonance magnétique nucléaire (RMN) des différentes fractions sélectionnées a permis d'affiner leur analyse structurale.

II – MATERIEL ET METHODES

1 – Obtention de fractions purifiées par chromatographie préparative d'échange d'ions DEAE à partir des polysaccharides bruts d'*Asparagopsis armata*

1.1 – Séparation préliminaire en masse

Au cours du chapitre 1 concernant la caractérisation structurale des polysaccharides natifs de l'algue *Asparagopsis armata*, les masses molaires estimées pour ceux-ci suggéraient fortement une certaine hétérogénéité massique (masse molaire moyenne en nombre M_n de 76 kDa, et en poids M_w de l'ordre de 350 kDa en équivalent pullulanes).

C'est pourquoi une purification préliminaire basée sur les masses est réalisée dans le but d'obtenir deux fractions : une fraction de masse supérieure à 100 kDa, et une fraction de masse comprise entre 10 et 100 kDa (seuils de coupure classiquement utilisés au laboratoire pour la purification des polysaccharides).

Pour ce faire, 20 g de polysaccharides bruts non purifiés sont dissous dans deux litres d'eau milli-Q. Après agitation à température ambiante, ils subissent une centrifugation à 10 000 G pendant 10 minutes environ, à l'issue de laquelle un précipité (7 g soit 35% p/p) et un surnageant (13 g soit 65% p/p) sont récupérés. Le précipité, qui permet seulement de s'affranchir de la partie insoluble de nos polysaccharides, n'est pas conservé.

Le surnageant est alors traité par passage sur un module d'ultrafiltration (Millipore Pellicon 2, membrane Pall, seuil de coupure 100 000 Da), ce qui permet de générer une fraction de masse supérieure à 100 000 Da d'une part, appelé rétentat, et d'autre part une fraction de masse inférieure à 100 000 Da, le perméat.

Le rétentat ($M > 100$ kDa) est directement lyophilisé (9,06 g, soit 45% p/p), alors que le perméat ($M < 100$ kDa) est à nouveau purifié par passage sur le module d'ultrafiltration équipé d'une membrane dont le seuil de coupure est différent (10 000 Da). A l'issue de ce deuxième fractionnement, deux nouvelles fractions sont alors récupérées : une de masse supérieure à 10 kDa mais inférieure à 100 kDa, le rétentat (1,57 g après lyophilisation, soit 8% p/p), et une de masse inférieure à 10 kDa, le perméat (2,3 g soit 11% p/p) qui ne sera pas conservée.

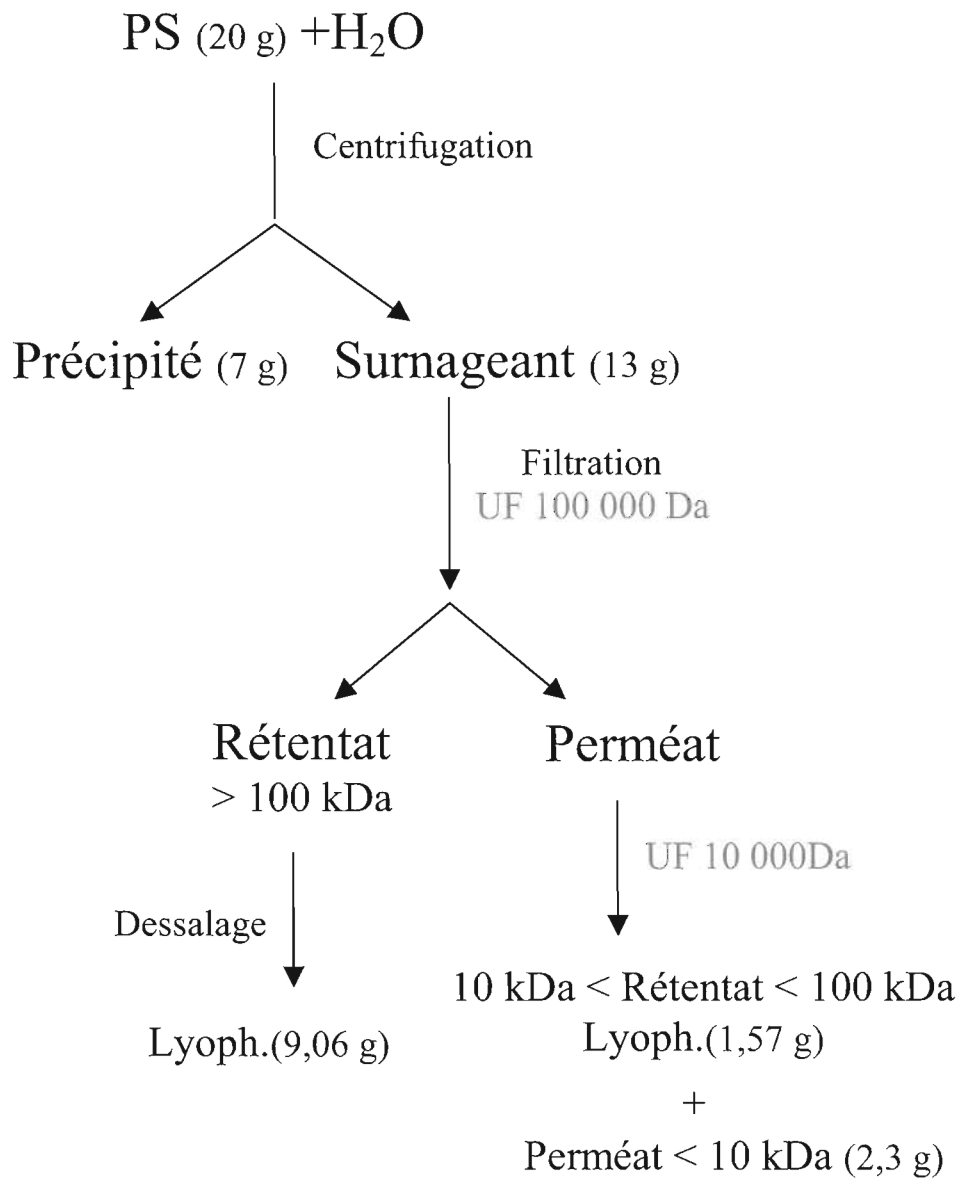


Figure 69 : Purification des polysaccharides natifs de l'algue rouge *Asparagopsis armata* basée sur leur masse

La purification des polysaccharides natifs de l'algue rouge *Asparagopsis armata* basée sur leur séparation en masse est résumée dans la figure 69. Elle permet d'isoler deux fractions principales sur lesquelles des purifications plus approfondies seront réalisées : une de masse supérieure à 100 kDa, et une de masse comprise entre 10 et 100 kDa.

1.2 – Séparation des fractions isolées par chromatographie préparative échangeuse d'ions

Les fractions sélectionnées et lyophilisées à l'issue des passages sur le module d'ultrafiltration sont fractionnées sur une colonne échangeuse d'ions DEAE Fast Flow XK 26-40 (2,6 cm de diamètre, 40 cm de hauteur).

Après dépôt sur la colonne du produit à purifier (de l'ordre de 400 mg dilués dans 20 mL d'eau milli-Q), l'équivalent d'un volume de colonne (soit 200 mL) d'eau milli-Q est élué sur cette colonne. L'éluion des différents produits est ensuite réalisée par application d'un gradient linéaire en NaCl de 0 à 2 M en solution dans de l'eau. Le débit qui était pour l'injection de 2 mL/min est par la suite maintenu à 5 mL/min pour l'éluion à l'aide d'une pompe péristaltique. La sortie des produits de la colonne est suivie d'une part par la mesure conductimétrique de la teneur en NaCl, et d'autre part par détection réfractométrique (132 RI Detection Gilson) des polysaccharides.

Des fractions de 10 mL par tube sont réalisées, et la teneur en groupements sulfate des polysaccharides contenus dans ces fractions est évaluée par dosage colorimétrique à l'azure A (*cf.* paragraphe II-1.4).

1.3 – Détermination de la masse des fractions sélectionnées

Les profils et les masses des fractions sélectionnées à l'issue de la chromatographie échangeuse d'ions sont déterminés par HPSEC sur différents types de colonnes. Ainsi, chacune des fractions a été analysée selon deux méthodes : une que l'on peut qualifier de « qualitative » et une, plus précise, que l'on peut désigner de « quantitative ».

En ce qui concerne les fractions de masses comprises entre 10 et 100 kDa, leurs profils sont réalisés sur une colonne de type S-100 HR 10/30 (domaine de séparation : 1 000 – 100 000 Da équivalent protéines).

100 μL d'une solution de l'échantillon à analyser (15 mg/mL) sont analysés par un système HPLC Kontron employant la colonne S-100 HR 10/30. L'éluant utilisé est du chlorure de sodium 0,2 M à un débit de 1 mL.min⁻¹. La détection est réalisée par un réfractomètre (ERC 7512, Erma Inc.), et le signal obtenu est traité par le logiciel ARAMIS (JMBC Développement, Le Fontanil).

Pour les fractions de masses supérieures à 100 kDa, les mêmes systèmes d'HPLC et de détection sont utilisés, seule la nature de la colonne diffère (en raison de la masse des échantillons traités). Il s'agit dans ce cas précis d'une colonne de type S-300 HR 10/30 (domaine de séparation compris entre 2 000 – 400 000 Da équivalent dextranses). L'éluant ainsi que le débit auquel il est appliqué sont les mêmes que ceux décrits précédemment.

Pour ce qui est de la détermination précise des masses, celles des fractions de masses comprises entre 10 et 100 kDa sont estimées sur ce même système HPLC Kontron, mais à l'aide d'une colonne de type Superdex Peptide PC 3,2/30 (domaine de séparation compris entre 1 000 – 100 000 Da équivalent dextranses).

20 μL d'échantillon (2 mg.mL⁻¹) sont analysés sur ce système avec un débit de 0,1 mL.min⁻¹ en tampon acétate d'ammonium 0,1 M. Le signal détecté en sortie de colonne par le réfractomètre ERC 7512 (Erma Inc.) est traité par le logiciel Aramis déjà cité, ce qui permet de déterminer, à partir d'un étalonnage effectué avec des standards pullulanes, leurs masses molaires respectives. Ces masses obtenues exprimées en équivalents pullulanes ne correspondent donc pas aux masses réelles de nos échantillons, mais permettent la comparaison des différentes fractions entre elles.

Quant aux masses des fractions de masses supérieures à 100 kDa, , elles sont également analysées à l'Université du Maine au Mans. Les masses molaires moyennes en poids sont estimées par réfractométrie couplée à une détection par diffusion de la lumière.

1.4 – Détermination du taux de sulfate des différentes fractions

Dosage à l'azure A (Jacques *et al.*, 1968)

Principe :

L'azure A est un colorant qui se lie avec les polysaccharides sulfatés tels que l'héparine, les chondroïtines sulfates ou les fucanes.

La coloration violette est semi-quantitative, donnant un ordre de grandeur (micro-grammes) de la concentration d'un échantillon.

Réactifs :

- Dextrane sulfate 5000 ou 500 000 Da
- Azure A

Protocole :

Une solution d'azure A de concentration finale $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ est obtenue par dilution au centième d'une solution de 1 mg.mL^{-1} d'azure A. Cette solution peut être stockée à 4°C pendant 2 mois. L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une série de dilutions de la solution de dextrane sulfate entre 0 et $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

$10 \mu\text{L}$ des solutions de polysaccharides, ou des solutions d'étalonnage sont placés dans des cuves de 1 mL. $400 \mu\text{L}$ de la solution d'azure A à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sont ajoutés, et l'absorbance est lue à 620 nm. La longueur d'onde classique pour ce type de dosage est généralement de 535 nm, mais cette longueur d'onde de 620 nm est plus sensible pour ce type de polysaccharide sulfaté.

Ce dosage est plus qualitatif que quantitatif, mais l'ordre de grandeur de la teneur en sulfate des polysaccharides contenus dans chaque tube permet de comparer et de regrouper certaines fractions entre elles pour poursuivre l'analyse structurale.

Ces fractions regroupées sont dans un premier temps affranchies de leurs sels, puis concentrées par passage sur le module d'ultrafiltration dont le seuil de coupure des

membranes est adapté aux masses des fractions traitées (100 kDa pour les fractions de masses supérieures à 100 kDa, et 10 kDa pour les fractions de masses comprises entre 10 kDa et 100 kDa). Elles sont ensuite lyophilisées.

La teneur en groupements sulfate des différentes fractions sélectionnées est également déterminée par analyse élémentaire au service de microanalyse du CNRS de Gif sur Yvette, ce qui permet d'estimer exactement le pourcentage de soufre présent dans l'échantillon.

2 – Perméthylation des différentes fractions sélectionnées

Afin de connaître la position des liaisons glycosidiques au sein des chaînes polysaccharidiques de nos fractions et de déterminer la position des substituants sur chaque résidu, il est nécessaire, comme dans le cas des polysaccharides natifs, de procéder à une modification chimique de ces fractions dans le but d'obtenir des acétates d'alditols partiellement méthylés analysables par CG/SM.

Le principe en est le même, à savoir qu'après méthylation des fonctions hydroxyle libres, le polysaccharide méthylé est hydrolysé afin de libérer les fonctions hydroxyle engagées dans les liaisons glycosidiques. Les monosaccharides ainsi libérés subissent une réduction deutérée, et les fonctions hydroxyle libres de ces alditols sont peracétylés afin d'obtenir des acétates d'alditols partiellement méthylés séparés et identifiés par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG/SM).

La position des groupements sulfate, quant à elle, est déterminée par comparaison des spectres CG/SM des polysaccharides natifs et désulfatés perméthylés.

Il est donc nécessaire de vérifier que la procédure de désulfatation valide pour les polysaccharides natifs reste valable pour ces nouvelles fractions saccharidiques purifiées.

De plus, un autre problème avait été soulevé lors de l'analyse par CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés obtenus à partir des polysaccharides natifs, à savoir l'ambiguïté qui résidait au sujet de la distinction des galactoses liés en 3 et sulfatés en 4, de ceux liés en 4 et sulfatés en 3.

C'est pourquoi une modification de la procédure de perméthylation a été réalisée pour ces fractions, dans le but de lever cette ambiguïté structurale.

2.1 – Désulfatation des fractions

Il s'avère que la méthode de désulfatation développée pour les polysaccharides natifs et qui consiste en une solvolysse de ces derniers, reste efficace pour les fractions saccharidiques purifiées par chromatographie échangeuse d'ions.

Les conditions de désulfatation sont décrites au chapitre 1, paragraphe II-3.2. En résumé, les fractions polysaccharidiques sont dans un premier temps placées sous forme de sels de pyridinium avant de subir une méthanolyse (DMSO contenant 14% de MeOH) de 3h25 à 100°C.

Les polysaccharides désulfatés sont ensuite soumis à la procédure de méthylation avant d'être analysés par CG/SM.

2.2 – Perméthylation des fractions sélectionnées

Comme il a été précisé, la procédure appliquée aux polysaccharides natifs dans le but de former des acétates d'alditols partiellement méthylés analysables par CG/SM a soulevé quelques ambiguïtés structurales.

Cette méthode est donc modifiée afin d'identifier et de doser sans équivoque les différents résidus osidiques sous forme d'acétates d'alditols partiellement méthylés. En effet, le principal doute était lié à la distinction des galactoses liés en 3 et sulfatés en 4 de ceux liés en 4 et sulfatés en 3 du fait que les acétates d'alditols partiellement méthylés pour ces deux types de galactoses apparaissaient par la procédure de méthylation classique sous la même forme.

C'est pourquoi une technique permettant de distinguer ces deux types d'oses au sein de la chaîne saccharidique a été mise au point et appliquée à nos fractions purifiées.

Principe

Inspirée de la publication de Duarte *et al.* (Duarte *et al.*, 2002), elle consiste dans un premier temps à méthyler toutes les fonctions hydroxyle libres des chaînes saccharidiques de manière classique. Ces chaînes perméthylées subissent ensuite une étape de désulfatation, ce qui libère de nouvelles fonctions hydroxyle qui sont alors à nouveau perméthylées, mais avec de l'iodométhane deutéré permettant ainsi de les distinguer des premières par CG/SM.

Les chaînes saccharidiques sont alors hydrolysées pour libérer les fonctions hydroxyle engagées dans les liaisons glycosidiques et subissent la procédure classique de formation des acétates d'alditols partiellement méthylés (réduction deutérée des résidus libérés suivie d'une peracétylation des alditols formés).

Les acétates d'alditols partiellement méthylés ainsi générés peuvent alors être séparés et identifiés sans ambiguïté par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse puisque les positions portant un groupement sulfate sont marquées par la présence d'un deutérium et peuvent ainsi se distinguer des positions engagées dans une liaison glycosidique, ces dernières se trouvant sous forme acétylées.

Réactifs :

- Résine échangeuse de cations « forte » : Dowex, 50WX8-100, forme hydrogène (Sigma)
- Pyridine
- Diméthylsulfoxyde anhydre (DMSO)
- Buthyl lithium BuLi 2,5 M dans l'hexane (Aldrich)
- Iodométhane ICH₃ (Sigma)
- Iodométhane deutéré ICD₃ (Sigma)
- Thiosulfate de sodium Na₂S₂O₃
- Cartouche Sep-Pak C18 (Waters)
- Acétonitrile
- Acide trifluoroacétique 2 M
- Erythritol
- Solution d'ammoniaque NH₄OH 2 M
- Borohydrure de sodium deutéré NaBD₄

- Acide acétique glacial
- Solution de méthanol : acide acétique 9 :1 (v/v)
- Méthanol
- Anhydride acétique
- Dichlorométhane
- Solution de soude NaOH 0,1 M
- Membranes de dialyse Spectra/Por, seuils de coupure 6-8,000 Da et 3 500 Da

Protocole :

Le protocole est majoritairement similaire à celui appliqué aux polysaccharides natifs décrit dans le chapitre 1, paragraphe 3. Cependant, afin d'éviter toute confusion, il est décrit à nouveau dans son intégralité, les nouvelles étapes de modification y étant précisées.

Ce protocole est valable quelle que soit la fraction sélectionnée à l'issue de la chromatographie échangeuse d'ions. Par simplification, la fraction de masse supérieure à 100 000 Da choisie sera nommée : F > 100, et celle de masse comprise entre 10 000 et 100 000 Da : F 10-100.

Traitement préliminaire : *Formation des sels de pyridinium*

100 mg de polysaccharides issus de la chromatographie échangeuse d'ions sont dissous dans 5 mL d'eau distillée. Quelques mg de résine échangeuse de cations « forte » sont ajoutés sous agitation, jusqu'à l'obtention d'un pH de l'ordre de 1. La solution ainsi que les rinçages de la résine sont alors filtrés, puis le volume est réduit par évaporation au Rotavapor.

De la pyridine est alors ajoutée au milieu jusqu'à sa neutralisation. La solution est ensuite évaporée trois fois au Rotavapor, en reprenant à chaque fois dans de l'eau distillée, puis lyophilisée.

Méthylation

100 mg de polysaccharides lyophilisés sont dissous dans 10 mL de DMSO anhydre sous agitation magnétique dans un ballon de 50 mL en verre hermétiquement fermé et purgé sous azote. Après dissolution de l'échantillon, le ballon est placé dans un bain de glace et 10 mL de BuLi sont alors ajoutés lentement. Le ballon à nouveau purgé sous azote est alors placé sous agitation pendant une heure, à température ambiante.

La méthylation s'effectue par ajout de 10 mL de iodométhane sur l'échantillon à nouveau placé dans la glace.

Après une heure sous agitation à température ambiante, la réaction est stoppée par ajout de 20 mL d'eau et addition de quelques grains de thiosulfate de sodium afin de réduire l'excès d'iode présent dans le milieu.

L'échantillon est alors placé sous jet d'azote afin d'éliminer l'agent méthylant en excès, ce qui correspond à l'obtention d'une phase inférieure limpide.

Extraction des polysaccharides méthylés

Ces derniers sont considérés comme chargés, en raison de la présence des groupements sulfate. Ils sont donc extraits par dialyse (Spectra/Por, seuil de coupure de 6-8,000 Da pour F > 100 000 Da et de 3 500 Da pour F 10-100) contre de l'eau distillée pendant 24 heures, puis lyophilisés.

La procédure est réitérée sur les sels de pyridinium à nouveau formés à partir du produit perméthylé.

Désulfatation

Les polysaccharides perméthylés sont à nouveau placés sous forme de sels de pyridinium avant de subir la réaction de désulfatation.

100 mg environ de polysaccharides perméthylés sous forme de sels de pyridinium lyophilisés sont dissous dans 10 mL du mélange réactionnel DMSO / méthanol (14 % de méthanol dans le DMSO), puis porté à 100°C sous agitation pendant 3h25 dans un ballon hermétiquement fermé. La réaction est stoppée par ajout de 10 mL d'eau milli-Q, et le pH ajusté à 9,1 à l'aide de la solution de NaOH 0,1 M.

L'ensemble est alors dialysé pendant 2 jours contre de l'eau milli-Q (Spectra/Por, seuil de coupure de 6-8,000 Da pour F > 100 000 Da et 3 500 Da pour F 10-100), puis lyophilisé.

La désulfatation de nos fractions polysaccharidiques est confirmée par analyse élémentaire. Les polysaccharides perméthylés désulfatés sont alors soumis à une méthylation deutérée avant de poursuivre la procédure de méthylation classique.

Méthylation deutérée

Les fractions polysaccharidiques (F > 100 et F 10-100) perméthylées désulfatées sont placées dans des tubes contenant chacun 2 mg de ces fractions.

Le contenu de chaque tube va alors subir la procédure suivante :

2 mg de polysaccharides perméthylés désulfatés lyophilisés sont dissous dans 500 µL de DMSO anhydre sous agitation magnétique dans le tube en verre hermétiquement fermé et purgé sous azote.

Après dissolution de l'échantillon, le tube est placé dans un bain de glace et 500 µL de BuLi sont alors ajoutés lentement. Le tube à nouveau purgé sous azote est alors placé sous agitation pendant une heure, à température ambiante.

La méthylation deutérée s'effectue par ajout de 500 µL de iodométhane-D₃ sur l'échantillon à nouveau placé dans la glace.

Après une heure sous agitation à température ambiante, la réaction est stoppée par ajout de 1 mL d'eau et l'addition de quelques grains de thiosulfate de sodium afin de réduire l'excès d'iode présent dans le milieu.

L'échantillon est alors placé sous jet d'azote afin d'éliminer l'agent méthylant en excès (obtention d'une phase inférieure limpide).

Extraction des polysaccharides perméthylés, désulfatés, et perméthylés-D₃

L'échantillon est purifié sur une colonne Sep-Pak C18 préalablement conditionnée par élution de 8 mL d'acétonitrile et de 8 mL d'eau.

Les polysaccharides sont déposés sur cette colonne, lavés par 8 mL d'eau, puis élués par 6 mL d'acétonitrile pour être enfin évaporés sous jet d'azote.

La procédure de méthylation deutérée est alors réitérée.

Hydrolyse des polysaccharides ainsi modifiés

500 μL d'acide trifluoroacétique 2 M sont ajoutés à l'échantillon, ainsi que 20 μL d'érythritol (1 mg/mL) utilisé comme référence interne.

Le tube fermé est porté à 100°C pendant 2 heures dans un bain à sec, puis l'hydrolysate est évaporé sous jet d'azote.

Réduction des monosaccharides partiellement méthylés

250 μL d'une solution de NaBD₄ 10 mg.mL⁻¹ réalisée à partir d'une solution de NH₄OH 2 M sont ajoutés à l'échantillon.

La solution est agitée au vortex, puis laissée 2 heures à température ambiante.

La réaction est stoppée par addition goutte à goutte d'acide acétique glacial jusqu'à l'arrêt de l'effervescence, correspondant à la neutralisation de l'excès de réducteur.

Ces derniers sont alors éliminés par 3 co-distillations avec le mélange méthanol : acide acétique (9 : 1), suivies de 3 co-distillations avec le méthanol seul.

O-acétylation

L'échantillon bien sec est acétylé par ajout de 100 μL de pyridine et 100 μL d'anhydride acétique. Le tube hermétiquement fermé est porté à 100°C pendant 45 min.

Après refroidissement et évaporation des réactifs sous jet d'azote, l'échantillon est repris par 2 mL d'un mélange dichlorométhane : eau (1 : 1). La phase organique est asséchée, filtrée et évaporée.

Les acétates d'alditols partiellement méthylés sont repris dans le dichlorométhane en vue de leur injection en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Identification des acétates d'alditols perméthylés

Comme dans le cas des polysaccharides natifs, les analyses sont effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse (Agilent, 6890 Series) couplée à un spectromètre de masse de type quadrupôle (Mass Agilent, 5973 Network).

La séparation des composés est réalisée sur une colonne capillaire apolaire en silice fondue CP-SIL-5CB (0,25 mm x 60 m, Chrompack), avec l'hélium comme gaz vecteur.

Le mode d'ionisation par impact électronique (IE) nécessite une énergie de 70 eV.

La programmation en température est la suivante : 50°C suivi d'un gradient de 20°C/min jusqu'à 120°C, puis d'un gradient de 4°C/min jusqu'à 240°C maintenus pendant 10 min.

Chaque acétate d'alditol partiellement méthylé, désulfaté et partiellement méthylé-D₃, que l'on désignera pour simplifier par IMe, -SO₃⁻, IMe-D₃ est alors identifié grâce aux fragments qu'il génère en spectrométrie de masse. Ainsi, la position des liaisons glycosidiques sur chaque monosaccharidique, ainsi que la position exacte de chacun de ses substituants (inorganique ou saccharidique) peuvent être révélées sans ambiguïté.

Par contre, afin de corroborer les résultats obtenus par ce type de procédure, des méthylation classiques (décrites au chapitre 1, paragraphe 3.1 et 3.2) sont appliquées aux fractions polysaccharidiques F > 100 et F 10-100, natives et désulfatées.

3 – Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

3.1 – Choix des échantillons

Dans le chapitre 2, partie 1 paragraphe 5, nous avons précisé que la présence de groupements sulfate était reconnue pour perturber les spectres de RMN, puisqu'ils étaient à l'origine de modifications des valeurs des déplacements chimiques des carbones qui les portaient, ainsi que des protons situés dans leur voisinage.

De plus, ils sont également à l'origine de spectres moins bien résolus, générant des signaux plus larges à la base.

C'est pourquoi les spectres RMN ^1H et ^{13}C , 1 D et 2 D sont réalisés sur des fractions affranchies de leurs groupements sulfate. Les fractions choisies pour la réalisation de ces spectres sont donc des fractions sélectionnées à l'issue de la chromatographie échangeuse d'ions, F > 100 et F 10-100 désulfatées.

3.2 – Préparation des échantillons

20 mg de fraction désulfatée dissous dans de l'oxyde de deutérium D_2O à 99,97%, sont soumis à trois cycles d'échange - lyophilisation par 1 mL de D_2O , puis sont finalement repris dans 750 μL de D_2O 100% pour analyse.

3.3 – Appareillage et séquence

Les spectres de RMN à une et deux dimensions, homo- et hétéronucléaires, ont été enregistrés à 328 et 298 K sur un appareil Bruker AVANCE DRX-500 équipé d'un logiciel X-WIN NMR, au laboratoire de Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire de l'Université de Bretagne Occidentale de Brest (Dr. R. Pichon). Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm relativement au 2,2,3,3-tétradeutéro-3-(triméthylsilyl)-propionate de sodium. Les séquences impulsionsnelles ont été réalisées conformément aux programmes standards fournis par Bruker.

III – RESULTATS ET DISCUSSION

1 – Obtention de fractions purifiées par chromatographie préparative d'échange d'ions DEAE à partir des polysaccharides bruts d'*Asparagopsis armata*

Avant de fractionner les polysaccharides natifs d'*Asparagopsis armata* sur une colonne échangeuse d'ions, une purification préalable basée sur la dispersité relative de leurs masses est réalisée.

1.1 - Séparation préliminaire en masse

Les polysaccharides natifs sont donc traités par passage sur un module d'ultrafiltration avec deux types de seuils de séparation : 100 kDa et 10 kDa. C'est ainsi que deux fractions majoritaires sont récupérées : une de masse supérieure à 100 kDa (45% p/p), et une de masse comprise entre 10 et 100 kDa (8% p/p) (cf. figure 67 paragraphe II-1.1).

La fraction de masse inférieure à 10 kDa (11% p/p), jugée trop petite pour être représentative des polysaccharides de départ, est mise à l'écart.

Ce sont donc ces deux fractions, de masse supérieure à 100 kDa et de masse comprise entre 10 et 100 kDa, qui sont séparées par chromatographie échangeuse d'ions.

1.2 - Séparation des fractions isolées par chromatographie échangeuse d'ions

1.2.1 - Chromatographie préparative d'échange d'ions

Les fractions issues du passage sur le module d'ultrafiltration sont fractionnées par chromatographie échangeuse d'ions avec l'application d'un gradient linéaire en NaCl (de 0 à 2 M). Outre la détection par réfractométrie de l'élution des produits, la teneur en groupements sulfate pour chacune des fractions de 10 mL obtenue est réalisée par dosage colorimétrique à l'azure A, ce qui permet d'obtenir les profils d'élution présentés.

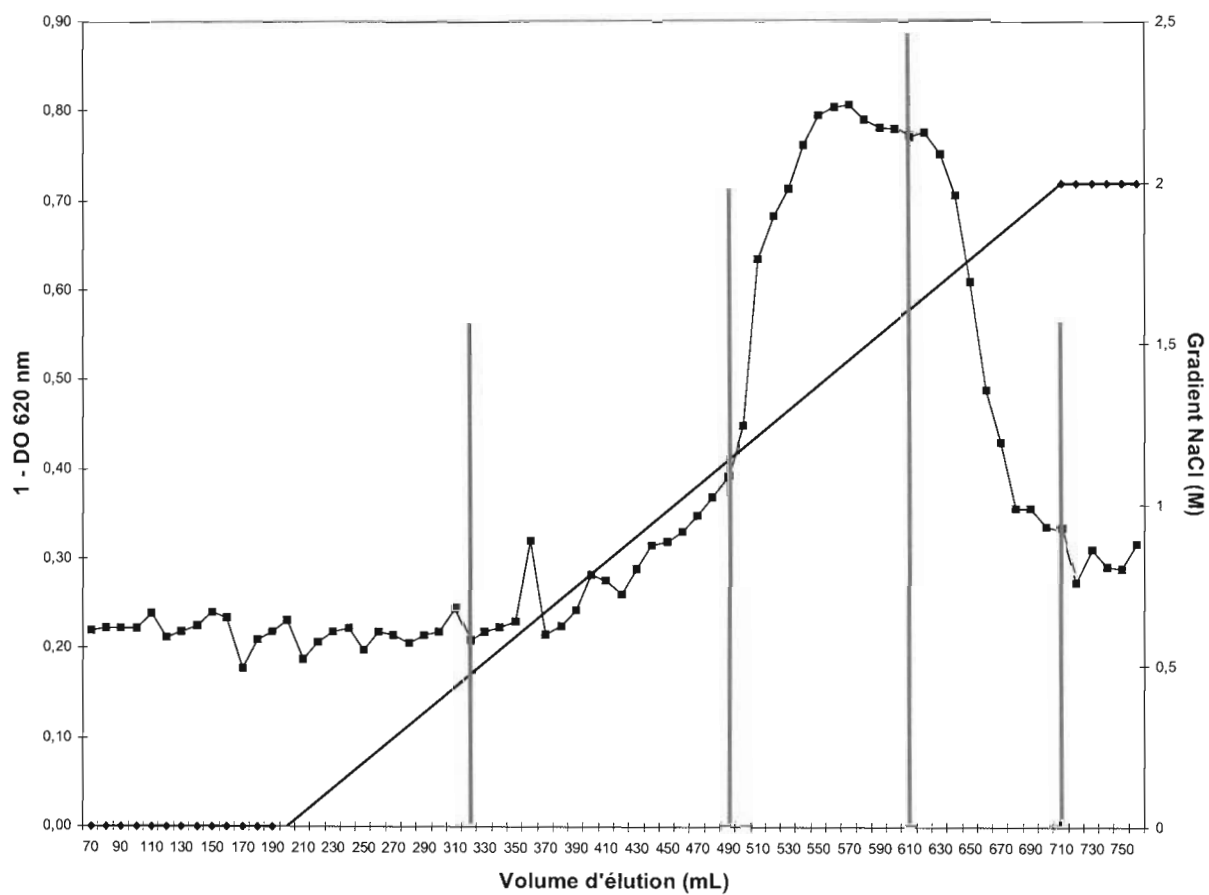


Figure 70 : Profil d'élution de la fraction $F > 100$ KDa par chromatographie échangeuse d'ions DEAE, obtenu par dosage colorimétrique à l'azure A (620 nm).

1.2.2 - F > 100

Le profil d'élution de la fraction de masse supérieure à 100 kDa en chromatographie d'échange d'ions est représenté par la figure 70.

Les résultats du découpage suggéré par l'allure du chromatogramme, ainsi que les quantités obtenues et les taux de sulfate des fractions regroupées correspondantes sont résumées dans le tableau 17.

Fractions	Quantités obtenues (mg)	Taux de sulfate (%)	Molarité NaCl (M)
70 – 320 mL	31,1	11,8	0 – 0,44
330 – 490 mL	31,8	6	0,44 – 1,12
500 – 610 mL	113,1	27,8	1,12 – 1,6
620 – 710 mL	60,1	29,6	1,6 – 2
720 – 860 mL	11	10,8	2

Tableau 17 : Résultats de l'élution de la fraction de masse supérieure à 100 kDa en chromatographie échangeuse d'ions DEAE.

Le rendement massique du passage de la fraction de masse supérieure à 100 kDa en chromatographie d'échange d'ions est de l'ordre de 77%.

L'allure du chromatogramme qui représente donc la teneur en groupements sulfate des polysaccharides contenus dans les différents tubes présente un pic principal qui est fractionné en deux, correspondant à des fractions éluées pour des concentrations en NaCl comprises entre 1,12 et 1,6 M d'une part (fraction 1), et 1,6 et 2 M d'autre part (fraction 2).

En raison des quantités obtenues pour chacune de ces deux fractions, ainsi que de leur teneur en sulfate respective qui les distinguent des autres fractions regroupées, elles sont donc conservées, dessalées par passage en ultrafiltration et lyophilisées dans le but de déterminer leurs masses molaires respectives. Ainsi, en fonction de leurs profils en masse, elles sont soit

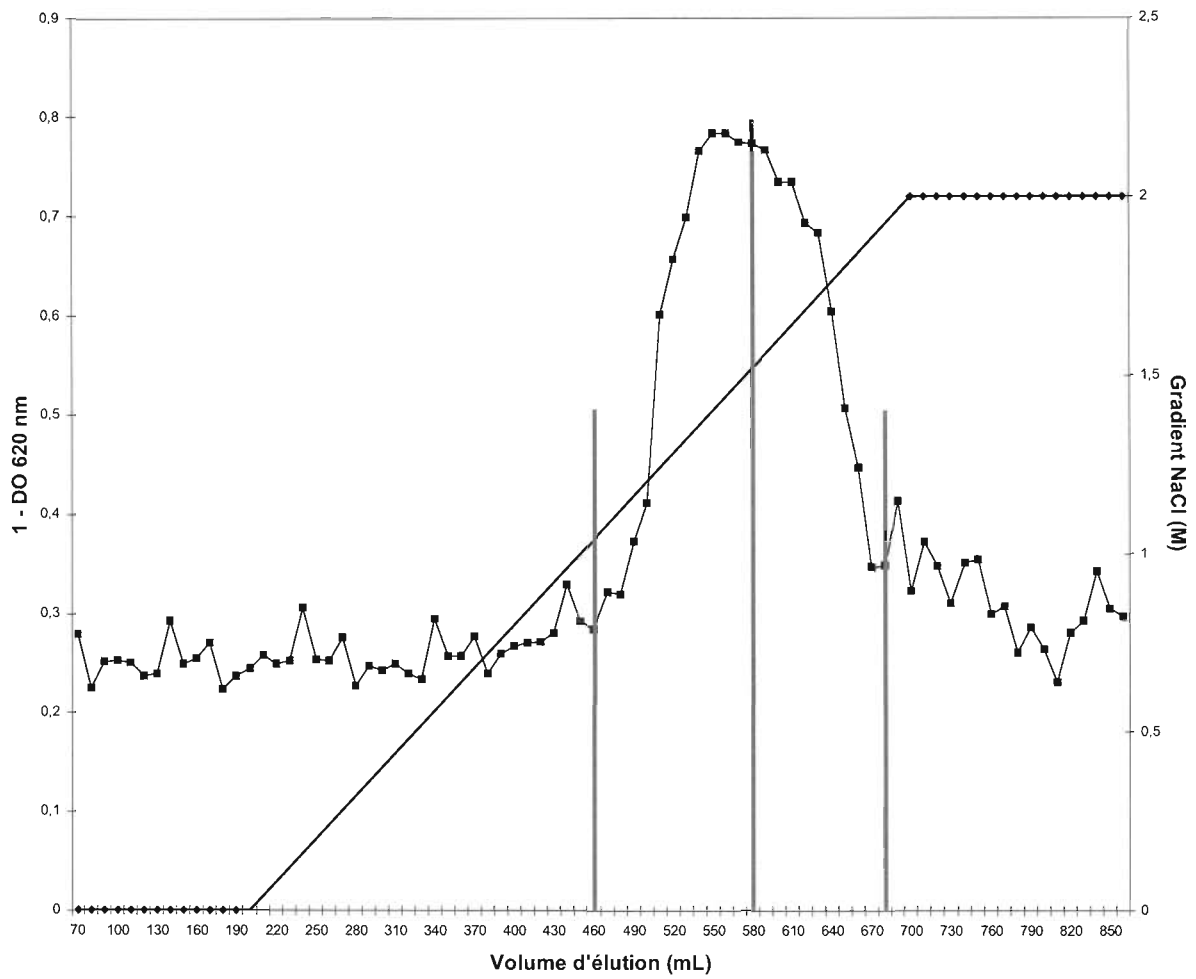


Figure 71 : Profil d'élution de la fraction F 10-100 KDa par chromatographie échangeuse d'ions DEAE, obtenu par dosage colorimétrique à l'azure A (620 nm).

regroupées, soit, le cas échéant, conservées telles quelles afin de poursuivre la caractérisation structurale.

1.2.3 – F 10 – 100

Le profil de l'élution de la fraction de masse comprise entre 10 et 100 kDa en chromatographie d'échange d'ions est représenté par la figure 71.

L'allure du chromatogramme suggère le regroupement de certaines fractions entre elles, dont la teneur en groupements sulfate et les quantités respectives sont présentées dans le tableau 18.

Fractions	Quantités obtenues (mg)	Taux de sulfate (%)	Molarité NaCl (M)
70 – 460 mL	25	4	0 – 1
470 – 580 mL	192,5	29,8	1 – 1,48
590 – 680 mL	108,7	35,2	1,48 – 1,88
690 – 870 mL	6,2	nd	1,88 – 2

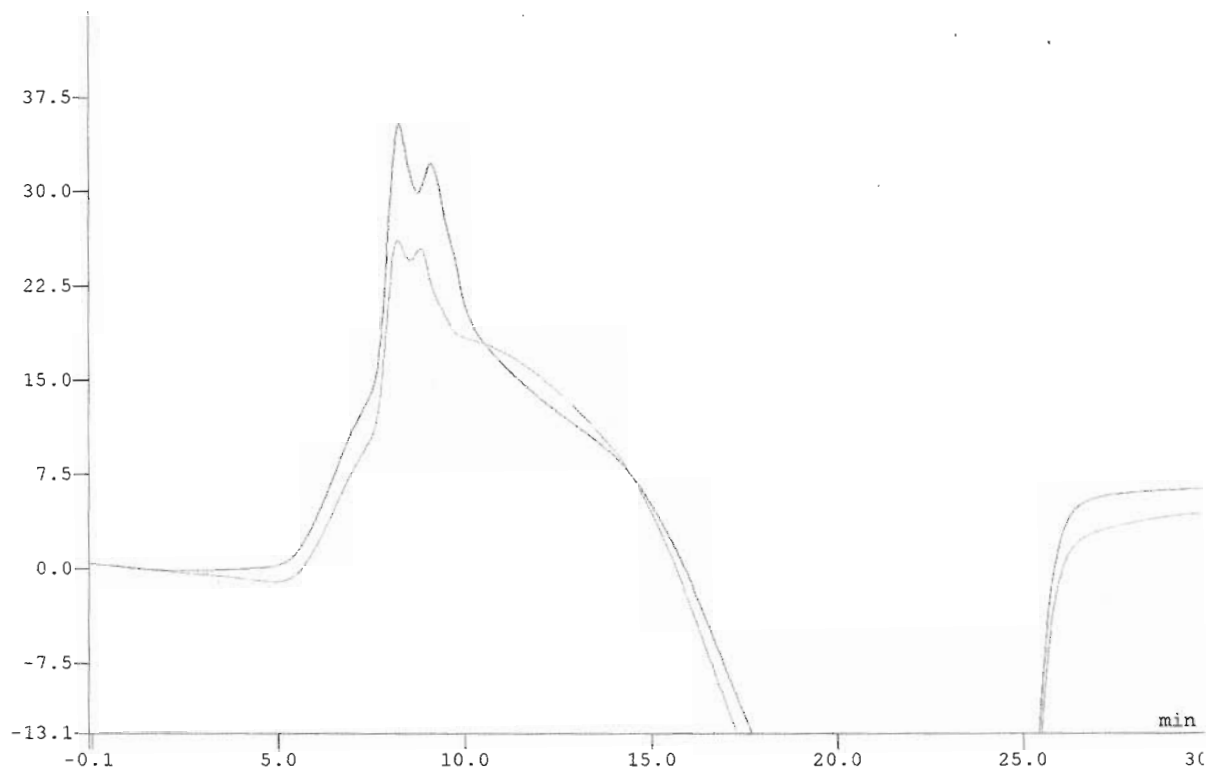
nd : non détectable

Tableau 18 : Résultats de l'élution de la fraction de masse comprise entre 10 et 100 kDa en chromatographie échangeuse d'ions DEAE.

A l'issue du passage en chromatographie d'échange d'ions, le rendement massique pour cette fraction est de 83%.

Deux fractions sont sélectionnées, en raison de leurs quantités respectives ainsi que leurs teneurs en sulfate. Une correspond aux fractions éluées pour des concentrations en NaCl comprises entre 1 et 1,48 M (fraction 3), et une regroupe les fractions éluées pour des concentrations en NaCl comprises entre 1,48 et 1,88 M (nommée fraction 4). Ces deux fractions sont ensuite dessalées et lyophilisées avant de poursuivre leur analyse structurale.

L'estimation de leurs masses molaires respectives permettra éventuellement de les regrouper ou non.



---- : Fraction 1 : 1,12 M – 1,6 M NaCl

---- : Fraction 2 : 1,6 M – 2 M NaCl

Figure 72 : Comparaison des profils des masses des fractions > 100 KDa 1 et 2 par HPSEC (colonne : S-300 HR 10/30)

1.3 – Détermination de la masse des fractions sélectionnées

Les profils ainsi que les masses molaires des différentes fractions sélectionnées et regroupées à l'issue de leur passage en chromatographie échangeuse d'ions sont déterminés par HPSEC, sur des colonnes appropriées à leurs types de masses respectives.

1.3.1 – F > 100

Le profil des fractions 1 (1,12 – 1,16 M NaCl) et 2 (1,6 – 2 M NaCl) est évalué sur une colonne de type S-300 HR 10/30, et est représenté sur la figure 72.

Le profil très similaire obtenu pour ces deux fractions, accompagné du fait que leur teneur en groupements sulfate soit également forte et semblable dans les deux cas suggère fortement un regroupement de ces deux fractions en une seule, nommée F > 100, sur laquelle toute les analyses structurales seront réalisées.

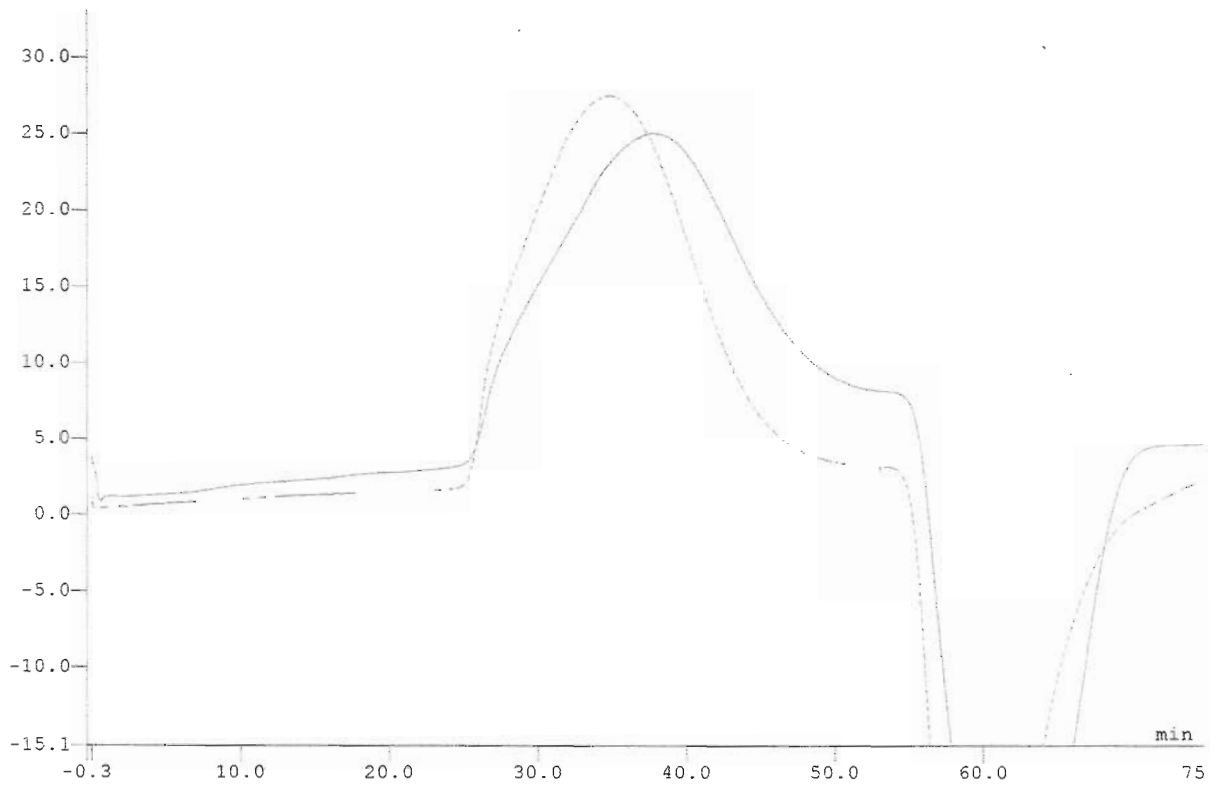
Cette tendance est confirmée par l'estimation des masses molaires moyennes en poids par diffusion de la lumière réalisée à l'Université du Mans. En effet, cette méthode a déterminé une masse M_w pour la fraction 1 de 130 000 Da ($I_p = 2,26$), et de 150 000 Da ($I_p = 2,47$) pour la fraction 2.

Pour toutes les raisons évoquées (profils de masse identiques, masses molaires moyennes en poids proches, teneurs en groupements sulfate proches et élevées), les fractions 1 et 2 sont donc regroupées sous une seule et même fraction nommée F > 100.

1.3.2 – Fractions comprises entre 10 et 100 KDa

Le profil des fractions 3 (1 – 1,48 M NaCl) et 4 (1,48 – 1,88 M NaCl) est réalisé sur une colonne de type S-100 HR 10/30 par HPSEC, et est représenté sur la figure 73.

On peut remarquer que les profils de ces deux fractions sont décalés : ils ont donc à priori des masses molaires différentes. La détermination de leurs masses respectives en équivalent



---- : Fraction 3 : 1 M – 1,48 M NaCl
 ---- : Fraction 4 : 1,48 M – 1,88 M NaCl

Figure 73 : Comparaison des profils des masses des fractions 10 - 100 KDa 3 et 4 par HPSEC (colonne : S-100 HR 10/30)

pullulanes par passage sur une colonne de type Superdex Peptide PC 3,2/30 en HPSEC révèle une masse de 15 507 Da pour la fraction 3 et 19 718 Da pour la fraction 4.

Bien qu'il ne s'agisse pas des masses molaires réelles de nos fractions pour les raisons déjà évoquées, les masses obtenues en équivalent pullulanes par le biais de cette méthode peuvent être comparées entre elles.

La différence de masse existant entre ces deux fractions est trop importante au regard de la taille de chacune d'entre elles pour les assimiler à des fractions identiques. De plus, le fait que leur taux de sulfate respectif soit relativement différent, bien que tous deux élevés, nous conforte dans l'idée de ne pas regrouper ces deux fractions 3 et 4.

Cependant, pour des raisons de quantités disponibles d'une part et de temps restant d'autre part, une seule de ces fractions subira une analyse structurale plus approfondie. Il s'agit en l'occurrence de la fraction 3, nommée par la suite F 10 – 100.

Les caractéristiques des deux types de fractions sélectionnées pour subir une analyse structurale complète à l'issue de leur passage en chromatographie échangeuse d'ions (F > 100 et F 10 – 100), sont résumées dans la tableau 19.

Fraction	Masse molaire Mw* (Da)	Taux de sulfate (%)
F > 100	140 000	28,7%
F 10 – 100	15 500	29,8%

* : Mw déterminée par diffusion de la lumière pour F > 100, et exprimée en équivalent pullulanes pour F 10 – 100

Tableau 19 : Caractéristiques des fractions sélectionnées F > 100 et F 10 – 100

2 – Perméthylation des différentes fractions retenues

Afin d'émettre des hypothèses concernant la structure de nos fractions sélectionnées, ce sont les acétates d'alditols partiellement méthylés réalisés dans des conditions classiques (chapitre 1, paragraphes 3.1 et 3.2) qui seront dans un premier temps analysés par CG/SM.

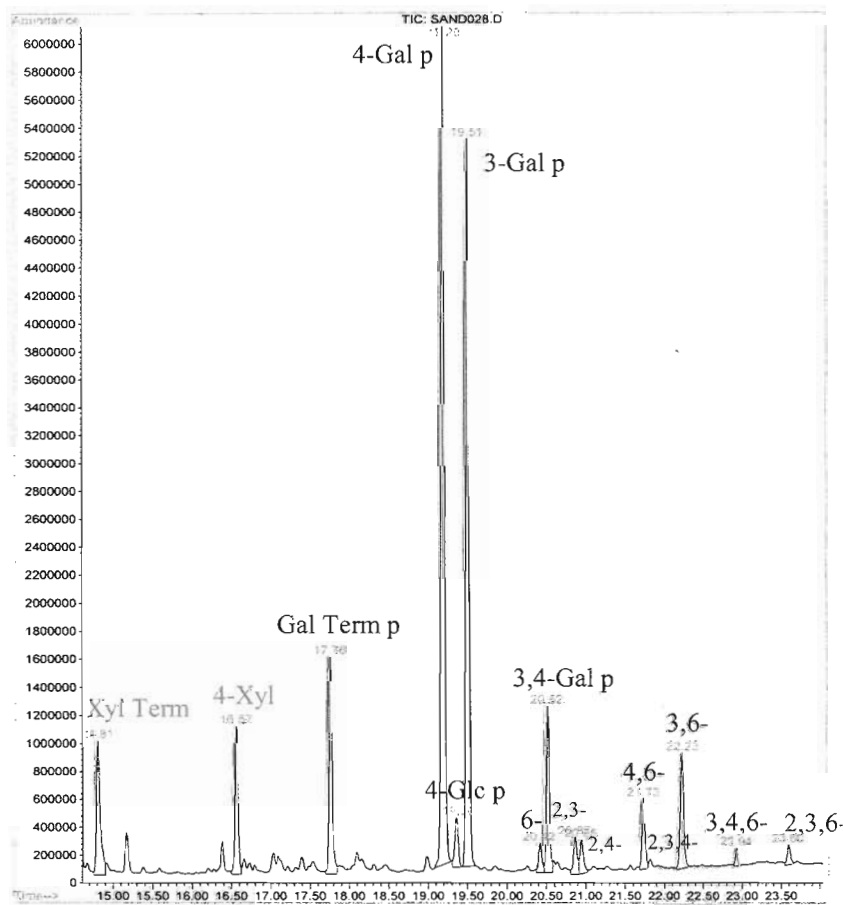
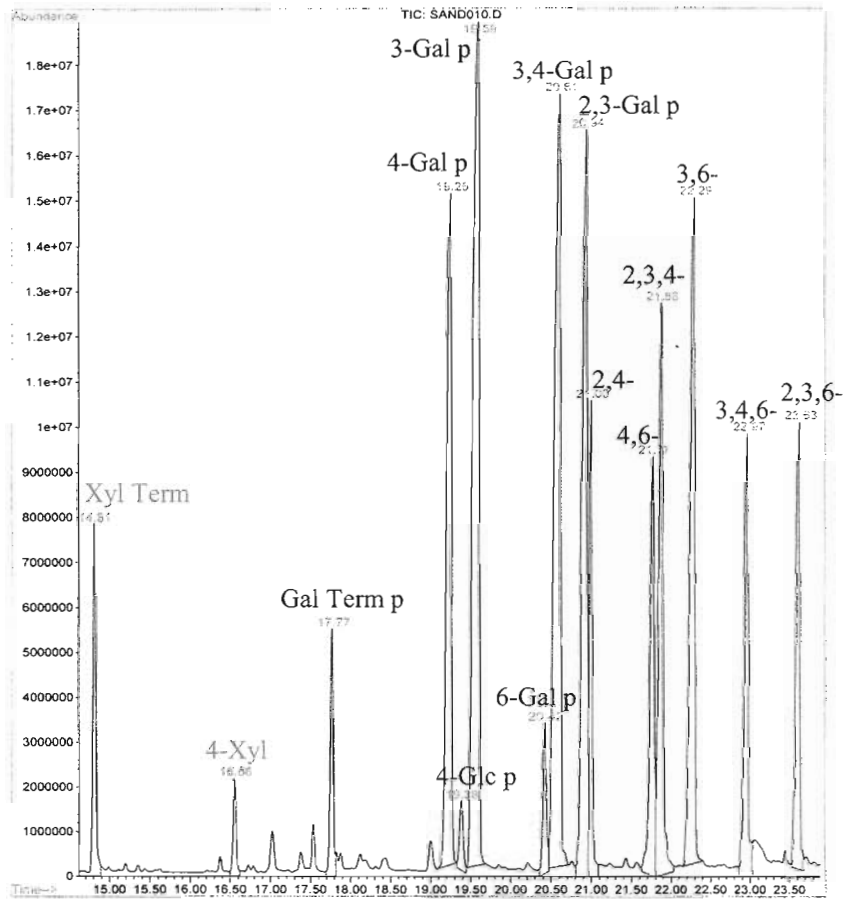


Figure 74 : Comparaison des spectres de CG/SM de la fraction F > 100 KDa avant (en haut) et après (en bas) désulfatation

La comparaison des résultats obtenus pour ces fractions « natives » et « désulfatées » devrait ainsi permettre de déterminer la position des liaisons glycosidiques au sein de la chaîne saccharidique ainsi que d'établir la position des substituants sur chacun des résidus de la chaîne.

Les doutes concernant la structure des fractions seront dans un deuxième temps levés par l'analyse CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés formés selon la méthode de perméthylation modifiée permettant ainsi d'identifier sans ambiguïté les différents résidus de la chaîne polysaccharidique.

2.1 - F > 100

Rappelons que la méthode de désulfatation employée dans le but d'obtenir une fraction F > 100 KDa totalement désulfatée est celle mise au point pour les polysaccharides natifs de l'algue *Asparagopsis armata*.

Elle permet ainsi d'obtenir une fraction dont le taux de sulfate est inférieur à 0,74%. Une désulfatation totale de notre échantillon peut donc être considérée comme acquise.

Méthylation classique

L'interprétation des résultats obtenus par analyse des spectres de CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés réalisés selon la méthode de méthylation classique s'effectue en plusieurs étapes.

De manière générale, un raisonnement identique à celui appliqué aux acétates d'alditols partiellement méthylés formés à partir des polysaccharides natifs peut être réalisé.

A partir des spectres CG/SM des échantillons méthylés natifs et désulfatés (figure 74), ainsi que des pourcentages respectifs des différents oses perméthylés pour ces deux fractions (tableau 20), certaines conclusions peuvent être mises en place.

L'hypothèse structurale de départ est toujours une chaîne saccharidique formée par l'alternance régulière entre les unités 3-β-D-galactopyranose et 4-α-D/L-galactopyranose, ce

Acétates d'alditols partiellement méthylés	Temps de rétention (min) ^a	Fragments primaires (m/z)	Résidu substitué correspondant	Réponse du détecteur (%)	
				I	II
2,3,4-Me ₃ Xyl ^b	1,4	117, 118, 161, 162	Xylp-(1→	3,57	3,57
2,3-Me ₂ Xyl	3,15	118, 189	→4)-Xylp-(1→	0,29	1,02
2,3,4,6-Me ₄ Gal	4,36	118, 161, 162, 205	Galp-(1→	2,10	4,98
2,3,6-Me ₃ Gal	5,84	118, 233	→4)-Galp-(1→	11,54	43,81
2,4,6-Me ₃ Gal	6,18	118, 161, 234, 277	→3)-Galp-(1→	22,08	37,83
2,3,4-Me ₃ Gal	7,01	118, 162, 189, 233	→6)-Galp-(1→	1,31	0
2,6-Me ₂ Gal	7,2	118, 305	→3,4)-Galp-(1→	18,07	2,98
4,6-Me ₂ Gal	7,53	161, 262	→2,3)-Galp-(1→	11,19	0,519
3,6-Me ₂ Gal	7,6	190, 233	→2,4)-Galp-(1→	4,55	0,619
2,3-Me ₂ Gal	8,36	118, 261	→4,6)-Galp-(1→	4,79	0,79
2,4-Me ₂ Gal	8,88	118, 189, 234, 305	→3,6)-Galp-(1→	8,55	3,54
6-MeGal	8,47	-	→2,3,4)-Galp-(1→	4,79	-
2-MeGal	9,56	118, 333	→3,4,6)-Galp-(1→	4,89	-
4-MeGal	10,22	189, 262	→2,3,6)-Galp-(1→	2,26	-

^aTr = Temps de rétention de l'acétate d'alditol relatif à celui du tétraacétate d'érythritol (Tr = 1,00)

^b 2,3,4-Me₃Xyl = 1,5-di-O-acétyl-2,3,4-tri-O-méthyl-xylitol

Tableau 20 : Identification par CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés produits par la fraction F > 100 KDa native (I) et désulfatée (II).

qui génère donc 50% d'unités galactose liées en 1,3, et 50% d'unités galactose liées en 1,4 pour la chaîne principale.

❖ Galactoses liés en 1,3 et 1,4

Après désulfatation complète de l'échantillon, nous ne disposons que de 43,8% de galactoses liés en 1,4 et 37,8% de galactoses liés en 1,3. Nous pouvons donc en conclure que 6,2% d'unités galactose liées en 1,4 sont ramifiées, ainsi que 12,2% d'unités galactose liées en 1,3.

La comparaison des espèces avant et après désulfatation montre que 32,3% des 4-galactoses et 15,7% des 3-galactoses étaient sulfatés sur une des positions restantes (2, 3 ou 4, ou 6).

Les pourcentages de ces deux types d'oses avant désulfatation correspond soit à des unités appartenant à la chaîne principale tels quels (non sulfatées ou ramifiées), soit il s'agit de résidus substitués appartenant à la chaîne principale, sulfatés ou substitués en cette position, soit il s'agit des deux possibilités dans des proportions variables.

❖ Galactoses trisubstitués avant désulfatation

◆ Unités trisubstituées en 2,3 et 6

2,3% des galactoses liés en 1,3 sont sulfatés en position 2 et 6.

◆ Unités trisubstituées en 2,3,4 et 3,4,6

Dans ces conditions de perméthylation, il est impossible de savoir s'il s'agit d'unités 3-galactose sulfatées en 2,4 ou 4-galactose sulfatées en 2,3 pour le premier cas (4,8%), et d'unités 3-galactose sulfatées en 4,6 ou 4-galactose sulfatées en 3,6 dans le second (4,9%).

❖ **Galactoses disubstitués**

◆ **Unités disubstituées en 3,6**

A partir des 3,5% d'unités 2,4-Me₂ Gal résiduels obtenus après désulfatation, on en déduit que notre chaîne saccharidique comporte 5% (8,5% - 3,5%) d'unités 3-galactose sulfatées en 6 et 3,5% d'unités 3-galactose comportant un substituant autre qu'un sulfate sur cette même position.

◆ **Unités disubstituées en 2,3**

De même, on peut déduire des pourcentages des unités 4,6-Me₂ Gal que la structure comporte 10,7% d'unités 3-galactose sulfatées en 2.

◆ **Unités disubstituées en 4,6 et 2,4**

Des unités 2,3-Me₂ Gal et 3,6-Me₂ Gal, on en déduit que 4% des unités galactose liées en 4 sont sulfatées en 6 et que 4% des unités galactose liées en 4 sont sulfatées en 2.

◆ **Unités disubstituées en 3,4**

Enfin, des unités 2,6-Me₂ Gal (correspondant à un galactose lié en 1,3 et 4), deux types d'hypothèses peuvent être émises, sans toutefois pouvoir trancher entre elles sans information complémentaire.

Soit il s'agit d'unités 3-galactose dont 15,1% sont sulfatés en 4 et 3% substitués en 4, soit il s'agit d'unités 4-galactose dont 15,1% sont sulfatés en 3 et 3% substitués en 3. Un cas extrême pourrait être ces deux possibilités dans des proportions variables.

❖ **Oses monosubstitués et non substitués**

A partir des pourcentages des unités 2,3,4-Me₃ Gal avant et après désulfatation, on en déduit que notre structure comporte 1,3% de galactoses terminaux sulfatés en position 6, qui sont vraisemblablement des ramifications de la chaîne principale. En effet, en raison de la taille de notre échantillon, les extrémités de chaîne sont à priori peu nombreuses. La seule possibilité pour rencontrer des oses terminaux est donc que ceux-ci soient sous forme de ramifications.

Les pourcentages de 2,3,4,6-Me₄ Gal (galactose terminal seul) permettent d'affirmer que 2,9% de ces galactoses terminaux sont sulfatés (en 2,3,4 ou 6), dont 1,3% le sont en position 6 (conclusion tirée du paragraphe précédent).

La chaîne saccharidique comporte donc 2,9% de galactoses terminaux sulfatés, 1,3% en position 6 et 1,6% en position 2,3 ou 4. De plus, 2,1% des ces galactoses terminaux existent en tant que tels : il s'agit de ramifications seules.

Enfin, des pourcentages de xyloses terminaux, on en déduit que nous disposons majoritairement de 3,6% de xyloses terminaux seuls (ramifications).

Ce que nous pouvons affirmer, en se basant sur une alternance régulière entre les unités 3-β-D-galactopyranose et 4-α-D/L-galactopyranose (50-50) :

◆ **Unités 3-β-D-galactopyranose**

- 22,1% existent telles qu'elles (éventuellement une partie existe sous forme de galactose terminal 3-sulfaté ou 3-substitué)
- Sulfatation de ces unités
 - ✓ 10,7% en position 2
 - ✓ 5% en position 6
 - ✓ 2,3% en position 2 et 6
- Substitution de ces unités
 - ✓ 3,5% en position 6
 - ✓ Traces en position 2

◆ **Unités 4-α-D/L-galactopyranose**

- 11,5% existent telles qu'elles (éventuellement une partie existe sous forme de galactose terminal 4-sulfaté ou 4-substitué)
- Sulfatation de ces unités
 - ✓ 4% en position 2
 - ✓ 4% en position 6

- Substitution de ces unités
 - ✓ Traces en position 2
 - ✓ Traces en position 6

- ◆ **Galactose terminal**
 - 2,1% existent tel quel
 - Sulfatation de ces unités
 - ✓ 1,3% en position 6
 - ✓ 1,6% en position 2,3 ou 4

- ◆ **Xylose**
 - 3,6% de xylose terminal

- ◆ **Incertitudes (unités 3-galactopyranose ou 4-galactopyranose)**
 - 15,1% sulfatées en 4 (pour le 3-gal) ou en 3 (pour le 4-gal)
+ 3% substituées sur ces mêmes positions
 - 4,8% sulfatées en 4 (pour le 3-gal) ou en 3 (pour le 4-gal) et en 2
 - 4,9% sulfatées en 4 (pour le 3-gal) ou en 3 (pour le 4-gal) et en 6

On peut noter que ces incertitudes portent principalement sur les unités galactose liées en 4 et en 3, pour lesquelles il est difficile dans ces conditions de perméthylation de trancher entre les unités liées en 3 et substituées en 4 (par un groupement sulfate ou autre) de la réciproque.

C'est pourquoi une méthode modifiée de perméthylation est appliquée à notre fraction F > 100, dans le but de lever ces ambiguïtés.

Méthylation modifiée

Rappelons que dans le cadre de cette méthode, les échantillons subissent dans un premier temps une perméthylation classique (ce qui permet de méthyler les fonctions hydroxyle libres alors présentes), puis sont désulfatés pour dans un deuxième temps réaliser la

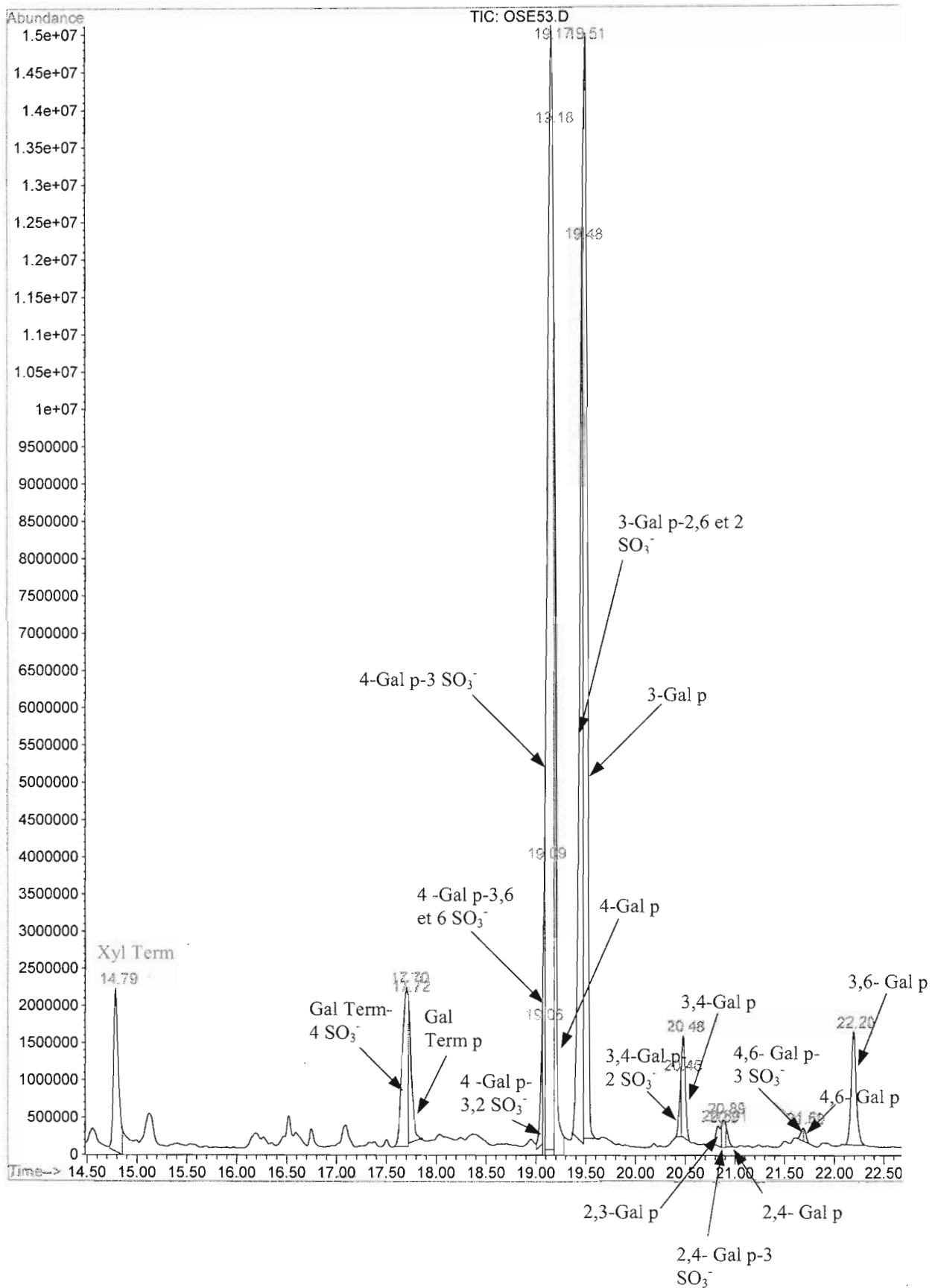


Figure 75 : Spectre CG/SM de la perméthylation deutérée de la fraction F > 100 KDa native

perméthylation des fonctions hydroxyle libérées par de l'iodométhane deutéré. Cette étape permet de les distinguer des premières en spectrométrie de masse.

La procédure de méthylation classique est ensuite appliquée pour former des acétates d'alditols partiellement méthylés séparés et identifiés par CG/SM (figure 75).

Précisons que la méthode de désulfatation employée est la même que dans le cas de la méthylation classique de la fraction $F > 100$ ou que pour les polysaccharides natifs. Cependant, le produit subissant la désulfatation étant légèrement différent des polysaccharides natifs, car déjà perméthylé, la désulfatation n'est plus totale et 2,6% de groupements sulfate sont encore présents sur la chaîne saccharidique après désulfatation.

Les pourcentages respectifs des différents types d'oses obtenus par cette méthode sont résumés dans le tableau 21. Un doute peut cependant être émis au sujet des résidus osidiques dont le pourcentage est inférieur à 1%, alors exprimés sous forme de traces.

On peut noter que l'identification de la plupart des oses réalisée au cours de la première méthode de perméthylation est confirmée, mais que les proportions relatives de ces derniers sont différents d'une méthode à l'autre.

De plus, certains oses identifiés formellement lors de la première méthylation n'apparaissent plus ici. C'est le cas par exemple des 4% de 4-galactoses sulfatés en position 2, des 5% de 3-galactoses sulfatés en position 6, ou encore des 2% de 3-galactoses sulfatés en positions 2 et 6.

Le fait est que l'analyse par CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés engendrés par cette nouvelle méthode génère des pics sous lesquels différents types d'oses sont représentés. Il est donc difficile de les identifier et de les distinguer clairement les uns par rapport aux autres, et donc de les doser séparément.

C'est pourquoi cette nouvelle méthode de perméthylation ayant été mise au point pour identifier sans ambiguïté les 3-galactoses substitués en position 4 des 4-galactoses substitués en position 3, seuls les résultats concernant ces types d'oses seront tirés des analyses des acétates d'alditols partiellement méthylés obtenus dans ces conditions modifiées.

A l'issue de l'étape de perméthylation classique, des incertitudes portaient sur les faits suivant :

- 3-galactoses ou 4-galactoses sulfatés en 4 ou 3 (15,1%) + 3% de substitution sur ces mêmes positions

Acétates d'alditols partiellement méthylés	Temps de rétention (min) ^a	Fragments primaires (m/z)	Résidu substitué correspondant	Réponse du détecteur (%)
2,3,4-Me ₃ Xyl ^b	1,41	117, 118, 161, 162	Xylp-(1→	3,5
2,3,4,6-Me ₄ Gal	4,34	118, 161, 162, 205	Galp-(1→	2,36
2,3,4-Me ₃ -6 CD ₃ Gal	4,318	118, 162, 164, 208	Galp-6 SO ₃ ⁻ (1→	4,46
2,3,6-Me ₃ Gal	5,87	118, 233	→4)-Galp-(1→	8,5
2,6-Me ₂ -3 CD ₃ Gal	5,79	118, 165, 236	→4)-Galp-3 SO ₃ ⁻ (1→	31,3
2,3-Me ₂ -6 CD ₃ Gal	5,707	118, 162, 236	→4)-Galp-6 SO ₃ ⁻ (1→	2,5
6-Me-3,2 CD ₃ Gal	5,673	121, 236	→4)-Galp-3,2 SO ₃ ⁻ (1→	0,9
2,4,6-Me ₃ Gal	6,13	118, 161, 234, 277	→3)-Galp-(1→	21,9
4,6-Me ₂ -2 CD ₃ Gal	6,045	121, 161, 237, 280	→3)-Galp-2 SO ₃ ⁻ (1→	16,9
2,6-Me ₂ Gal	7,11	118, 305	→3,4)-Galp-(1→	1,9
6-Me-2 CD ₃ Gal	7,05	121, 308	→3,4)-Galp-2 SO ₃ ⁻ (1→	0,8
4,6-Me ₂ Gal	7,46	161, 262	→2,3)-Galp-(1→	0,4
3,6-Me ₂ Gal	7,55	190, 233	→2,4)-Galp-(1→	0,2
6-Me-3 CD ₃ Gal	7,5	193, 236	→2,4)-Galp-3 SO ₃ ⁻ (1→	0,5
2,3-Me ₂ Gal	8,34	118, 261	→4,6)-Galp-(1→	0,1
2-Me-3 CD ₃ Gal	8,31	118, 165, 264	→4,6)-Galp-3 SO ₃ ⁻ (1→	0,15
2,4-Me ₂ Gal	8,828	118, 189, 234, 305	→3,6)-Galp-(1→	2,7

^aTr = Temps de rétention de l'acétate d'alditol relatif à celui du tétraacétate d'érythritol (Tr = 1,00)

^b2,3,4-Me₃Xyl = 1,5-di-O-acétyl-2,3,4-tri-O-méthyl-xylitol

Tableau 21 : Identification par CG/SM des acétates d'alditols partiellement deutérés et méthylés produits par la fraction F > 100.

- 3-galactoses ou 4-galactoses sulfatés en 4 ou 3 et en 2 (4,8%)
- 3-galactoses ou 4-galactoses sulfatés en 4 ou 3 et en 6 (4,9%)

A partir de l'analyse par CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés obtenus au cours de la deuxième méthode de perméthylation, nous pouvons voir qu'il n'existe que des unités 4-galactose sulfatées en 3 et pas d'unités 3-galactose sulfatées en 4.

Les 15,1% trouvés lors de la première étape seraient donc exclusivement des unités 4-galactose sulfatées en 3.

De même, seules les unités 4-galactose sulfatées en position 3 et 2 d'une part, et 3 et 6 d'autre part sont visibles lors du deuxième volet de notre étude. Aucune unité 3-galactose 4,2-sulfatée ou 4,6-sulfatée n'a pu être détectée. C'est pourquoi nous pouvons conclure que notre structure comporte également 4,8% d'unités 4-galactose sulfatées en position 3 et 2 et 4,9% d'unités 4-galactose sulfatées en position 3 et 6.

La seule ambiguïté de structure qui ne pourra être levée par comparaison des acétates d'alditols partiellement méthylés formés au cours des deux méthodes de méthylation est liée aux 3% d'unités 3-galactose (ou 4-galactose) substituées en 4 (ou en 3).

En effet, les positions substituées par des ramifications apparaissent sous la même forme acétylée que les liaisons glycosidiques de la chaîne saccharidique au sein des acétates d'alditols partiellement méthylés. Il n'est donc pas possible de distinguer la position engagée dans une liaison de celle portant une ramification.

Enfin, un doute résidait également quant aux unités 3- β -D-galactopyranose seules (22,1%) et 4- α -D/L-galactopyranose seules (11,5%).

En effet, nous ne savions pas s'il s'agissait d'unités appartenant à la chaîne saccharidique telles quelles (sans substituants) ou si une partie d'entre elles était en réalité des galactoses terminaux sulfatés ou substitués sur ces positions précises 3 ou 4.

La deuxième méthode de méthylation nous permet de trancher, car si tel était le cas, des galactoses terminaux porteurs de groupements sulfate en 3 ou 4 seraient identifiés distinctement en tant que tels. En fait, on peut remarquer sous le pic correspondant au galactose terminal sulfaté en 6, la présence de galactose terminal sulfaté en 3. Au cours des hypothèses structurales établies dans la première étape au sujet des galactoses terminaux, nous avons vu que 1,3% de ces galactoses terminaux étaient sulfatés en position 6 et 1,6% en

position 2, 3 ou 4. Il semblerait donc que notre structure comporte également 1,6% de galactoses terminaux sulfatés en position 3, qui sont des ramifications de la chaîne principale. Par contre, aucune confirmation/infirmation ne peut être émise concernant la substitution de ces résidus galactose terminaux en position 3 ou 4. Enfin, notre chaîne saccharidique ne comporterait pas à priori de galactoses terminaux sulfatés en 4.

En conclusion, et par comparaison des résultats des analyses des acétates d'alditols partiellement méthylés formés dans différentes conditions à partir de la fraction $F > 100$ KDa native et désulfatée par CG/SM, la structure de cette fraction particulière peut être assimilée à un enchaînement régulier d'unités 3- β -D-galactopyranose et 4- α -D/L-galactopyranose (50%-50%), substituées de la manière suivante :

◆ **Unités 3- β -D-galactopyranose**

- 20,5% (22,1%–1,6% de galactoses terminaux sulfatés en 3) existent telles qu'elles (une partie existe éventuellement sous forme de galactose terminal 3-substitué : ramification ramifiée)
- Sulfatation de ces unités
 - ✓ 10,7% en position 2
 - ✓ 5% en position 6
 - ✓ 2,3% en position 2 et 6
- Substitution de ces unités
 - ✓ 3,5% en position 6
 - ✓ Traces en position 2

◆ **Unités 4- α -D/L-galactopyranose**

- 11,5% existent telles qu'elles (une partie existe éventuellement sous forme de galactose terminal 4-substitué)
- Sulfatation de ces unités
 - ✓ 4% en position 2
 - ✓ 4% en position 6
 - ✓ 15,1% en position 3
 - ✓ 4,8% en position 3 et 2

Acétates d'alditols partiellement méthylés	Temps de rétention (min) ^a	Fragments primaires (m/z)	Résidu substitué correspondant	Réponse du détecteur (%)	
				I	II
2,3,4-Me ₃ Xyl ^b	1,4	117, 118, 161, 162	Xylp-(1→	2,42	1,61
2,3-Me ₂ Xyl	3,15	118, 189	→4)-Xylp-(1→	0,348	-
2,3,4,6-Me ₄ Gal	4,36	118, 161, 162, 205	Galp-(1→	1,37	7,405
2,3,6-Me ₃ Gal	5,84	118, 233	→4)-Galp-(1→	5,597	43,79
2,4,6-Me ₃ Gal	6,18	118, 161, 234, 277	→3)-Galp-(1→	18,69	37,015
2,3,4-Me ₃ Gal	7,01	118, 162, 189, 233	→6)-Galp-(1→	1,17	0,511
2,6-Me ₂ Gal	7,2	118, 305	→3,4)-Galp-(1→	21,89	1,79
4,6-Me ₂ Gal	7,53	161, 262	→2,3)-Galp-(1→	16,74	0,29
3,6-Me ₂ Gal	7,6	190, 233	→2,4)-Galp-(1→	2,8	0,57
2,3-Me ₂ Gal	8,36	118, 261	→4,6)-Galp-(1→	2,54	1,16
2,4-Me ₂ Gal	8,88	118, 189, 234, 305	→3,6)-Galp-(1→	7,46	3,27
6-MeGal	8,47	-	→2,3,4)-Galp-(1→	9,15	-
2-MeGal	9,56	118, 333	→3,4,6)-Galp-(1→	5,76	2,59
4-MeGal	10,22	189, 262	→2,3,6)-Galp-(1→	4,05	-

^aTr = Temps de rétention de l'acétate d'alditol relatif à celui du tétraacétate d'érythritol (Tr = 1,00)

^b2,3,4-Me₃Xyl = 1,5-di-O-acétyl-2,3,4-tri-O-méthyl-xylitol

Tableau 22 : Identification par CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés produits par la fraction F 10 - 100 KDa native (I) et désulfatée (II).

- ✓ 4,9% en position 3 et 6
- Substitution de ces unités
 - ✓ Traces en position 2
 - ✓ Traces en position 6

- ◆ **Unités galactose terminal**
 - 2,1% existent tel quel
 - Sulfatation de ces unités
 - ✓ 1,3% en position 6
 - ✓ 1,6% en position 2,3 ou 4

- ◆ **Xylose**
 - 3,6% de xylose terminal

2.2 – F 10 – 100

Comme dans le cas de la fraction de masse supérieure à 100 kDa, cette fraction de masse comprise entre 10 et 100 kDa va subir les deux méthodes de perméthylation, dans le but de lever les ambiguïtés structurales la concernant.

La méthode de perméthylation « classique » va donc être appliquée dans un premier temps sur cette fraction native et désulfatée. Cependant, et pour les raisons déjà évoquées auparavant, la méthode de désulfatation mise au point sur les polysaccharides natifs est moins efficace sur cette fraction, probablement en raison de sa structure légèrement différente par rapport à ceux-ci (masse plus petite). C'est ainsi que notre fraction désulfatée F 10 – 100 comporte encore 2,4% de groupements sulfate.

Le profil des spectres CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés obtenus à partir de la fraction 10 – 100 native et désulfatée sont identiques à ceux de la fraction F > 100 (figure 74). Les pourcentages des différents oses perméthylés de ces deux cas sont résumés dans le tableau 22.

Un raisonnement identique à celui appliqué au cas de la fraction F > 100 permet de tirer les conclusions suivantes concernant la fraction F 10 – 100 :

◆ **Unités 3- β -D-galactopyranose**

- 18,7% existent telles qu'elles (une partie peut éventuellement exister sous forme de galactose terminal 3-sulfaté ou 3-substitué)
- Sulfatation de ces unités
 - ✓ 16,45% en position 2
 - ✓ 4,2% en position 6
 - ✓ 4% en position 2 et 6
- Substitution de ces unités
 - ✓ 3,3% en position 6
 - ✓ Traces en position 2

◆ **Unités 4- α -D/L-galactopyranose**

- 5,6% existent telles qu'elles (éventuellement une partie existe sous forme de galactose terminal 4-sulfaté ou 4-substitué)
- Sulfatation de ces unités
 - ✓ 2,23% en position 2
 - ✓ 1,4% en position 6
- Substitution de ces unités
 - ✓ 1,16% en position 6
 - ✓ Traces en position 2

◆ **Galactose terminal**

- 1,4% existent tel quel
- Sulfatation de ces unités (6,03%)
 - ✓ 5,33% en position 2,3 ou 4
 - ✓ Traces en position 6
- Substitution de ces unités
 - ✓ Traces en position 6

◆ **Xylose**

- 2,4% de xylose terminal

Acétates d'alditols partiellement méthylés	Temps de rétention (min) ^a	Fragments primaires (m/z)	Résidu substitué correspondant	Réponse du détecteur (%)
2,3,4-Me ₃ Xyl ^b	1,41	117, 118, 161, 162	Xylp-(1→	2,897
2,3,4,6-Me ₄ Gal	4,34	118, 161, 162, 205	Galp-(1→	0,06
2,3,4-Me ₃ -6 CD ₃ Gal	4,318	118, 162, 164, 208	Galp-6 SO ₃ ⁻ (1→	0
2,3,6-Me ₃ Gal	5,87	118, 233	→4)-Galp-(1→	12,08
2,6-Me ₂ -3 CD ₃ Gal	5,79	118, 165, 236	→4)-Galp-3 SO ₃ ⁻ (1→	41,05
2,3-Me ₂ -6 CD ₃ Gal	5,707	118, 162, 236	→4)-Galp-6 SO ₃ ⁻ (1→	3,9
6-Me-3,2 CD ₃ Gal	5,673	121, 236	→4)-Galp-3,2 SO ₃ ⁻ (1→	1,78
2,4,6-Me ₃ Gal	6,13	118, 161, 234, 277	→3)-Galp-(1→	16,11
4,6-Me ₂ -2 CD ₃ Gal	6,045	121, 161, 237, 280	→3)-Galp-2 SO ₃ ⁻ (1→	11,03
2,6-Me ₂ Gal	7,11	118, 305	→3,4)-Galp-(1→	1,52
6-Me-2 CD ₃ Gal	7,05	121, 308	→3,4)-Galp-2 SO ₃ ⁻ (1→	0,69
4,6-Me ₂ Gal	7,46	161, 262	→2,3)-Galp-(1→	1,22
3,6-Me ₂ Gal	7,55	190, 233	→2,4)-Galp-(1→	0,82
6-Me-3 CD ₃ Gal	7,5	193, 236	→2,4)-Galp-3 SO ₃ ⁻ (1→	0,82
2,3-Me ₂ Gal	8,34	118, 261	→4,6)-Galp-(1→	0,18
2-Me-3 CD ₃ Gal	8,31	118, 165, 264	→4,6)-Galp-3 SO ₃ ⁻ (1→	0,17
2,4-Me ₂ Gal	8,828	118, 189, 234, 305	→3,6)-Galp-(1→	2,68

^aTr = Temps de rétention de l'acétate d'alditol relatif à celui du tétraacétate d'érythritol (Tr = 1,00)

^b2,3,4-Me₃Xyl = 1,5-di-O-acétyl-2,3,4-tri-O-méthyl-xylitol

Tableau 23 : Identification par CG/SM des acétates d'alditols partiellement deutérés et méthylés produits par la fraction F 10 - 100.

◆ **Incertitudes (unités 3-galactopyranose ou 4-galactopyranose)**

- 20,1% sulfatées en 4 (pour le 3-gal) ou en 3 (pour le 4-gal)
+ 1,8% substituées sur ces mêmes positions
- 9,1% sulfatées en 4 (pour le 3-gal) ou en 3 (pour le 4-gal) et en 2
- 3,2% sulfatées en 4 (pour le 3-gal) ou en 3 (pour le 4-gal) et en 6
+ 2,6% substituées sur ces mêmes positions

Nous pouvons de nouveau noter que les incertitudes au sujet de la structure de la fraction F 10 – 100 concernent les unités galactose liées en 3 et en 4, impossibles à distinguer dans ces conditions.

D'où l'application à cette fraction de la méthode de perméthylation modifiée, où les mêmes conditions que pour la fraction F > 100 kDa sont employées.

Il est cependant nécessaire de préciser que la méthode de désulfatation appliquée aux oses préalablement perméthylés est encore moins efficace, et 13% de groupements sulfate sont encore présents après désulfatation.

La raison de cette efficacité moindre de la méthode de désulfatation en est toujours la même, les oses de la fraction F 10 – 100 ainsi désulfatés étant différents des polysaccharides natifs, car de masse différente, et déjà perméthylés.

Les résultats obtenus par le biais de cette méthode de méthylation modifiée ne seront donc qu'« indicatifs », puisque 50% de leurs groupements sulfate (soit environ 14%) se trouvent encore sur la chaîne saccharidique. Ils sont résumés dans le tableau 23, des spectres CG/SM identiques à ceux de la fraction F > 100 (figure 75) ayant été obtenus.

C'est pourquoi, outre les raisons déjà évoquées dans le cadre de la fraction F > 100 (pourcentage respectif de chaque ose différent, oses préalablement identifiés absents par cette méthode, ...) et le fait que les résultats obtenus ne soient pas représentatifs à 100% de notre fraction, seule la distinction entre les 3-galactoses substitués en 4 et les 4-galactoses substitués en 3 sera effectuée.

Les incertitudes étaient liées aux unités :

- 3-galactoses ou 4-galactoses sulfatés en 4 ou 3 (20,1%) + 1,8% de substitution sur ces mêmes positions
- 3-galactoses ou 4-galactoses sulfatés en 4 ou 3 et en 2 (9,1%)

- 3-galactoses ou 4-galactoses sulfatés en 4 ou 3 et en 6 (3,2%) + 2,6% de substitution sur ces mêmes positions

Au regard des spectres obtenus par CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés générés par la méthode de perméthylation modifiée, les unités 3-galactose sont soit telles quelles, soit sulfatées en 2.

Par contre, les unités 4-galactose s'avèrent exister sous cette forme seule, ainsi qu'être sulfatées en 3, en 6 (et en 3,6), ainsi qu'en 3,2.

Nous pouvons donc en déduire que 20,1% des unités 4-galactose sont sulfatées en position 3, que 9,1% de ces mêmes unités portent des groupements sulfate en position 3 et 2, et 3,2% en position 3 et 6.

Par contre, il n'est pas possible de distinguer les unités 3-galactose substituées en position 4 des unités 4-galactose substituées en position 3 (1,8%), puisque ces deux positions apparaissent dans les deux cas sous la même forme acétylée. Il en est de même pour les unités 3-galactose substituées en 4 et 6 des unités 4-galactose substituées en 3 et 6 (3,2%).

Enfin, les conditions de méthylation sont telles qu'il est impossible de préciser en quelles positions les galactoses terminaux sont sulfatés, les galactoses terminaux-6-sulfate n'étant même pas visibles sur les spectres obtenus.

La synthèse des différents résultats obtenus pour la fraction F 10 – 100 permet de préciser sa structure. Elle est basée sur un enchaînement régulier en alternance d'unités 3-galactopyranose et 4-galactopyranose (50%– 50%) tel que :

◆ **Unités 3-β-D-galactopyranose**

- 18,7% existent telles qu'elles (une partie de ces unités peut exister sous forme de galactose terminal substitué en position 3 par d'autres oses)
- Sulfatation de ces unités
 - ✓ 16,45% en position 2
 - ✓ 4,2% en position 6
 - ✓ 4% en position 2 et 6
- Substitution de ces unités
 - ✓ 3,3% en position 6

	F > 100 KDa	F 10 - 100
Unités 3-β-D gal p		
<i>Seules</i>	20,5%	18,7%
<i>Sulfatées</i>		
2	10,7%	16,45%
6	5%	4,2%
2,6	2,3%	4%
<i>Substituées</i>		
2	Traces	3,3%
6	3,5%	Traces
Unités 4-α-D/L gal p		
<i>Seules</i>	11,5%	5,6%
<i>Sulfatées</i>		
3	15,1%	20,1%
2	4%	2,23%
6	4%	1,4%
3,2	4,8%	9,1%
3,6	4,9%	3,2%
<i>Substituées</i>		
2	Traces	Traces
6	Traces	1,16%
Galactose terminal		
<i>Seul</i>	2,1%	1,4%
<i>Sulfaté</i>		
6	1,3%	Traces
3	1,6%	-
2, 3 ou 4	-	5,3%
<i>Substitué</i>		
6	-	Traces
Xylose terminal		
<i>Seul</i>	3,6%	2,4%

Traces : < à 1%

Tableau 24 : Comparaison des résultats de perméthylations pour les fractions F > 100 KDa et F 10 - 100 KDa

✓ Traces en position 2

◆ **Unités 4- α -D/L-galactopyranose**

- 5,6% existent telles qu'elles (une partie existe éventuellement sous forme de galactose terminal 4-substitué)
- Sulfatation de ces unités
 - ✓ 20,1% en position 3
 - ✓ 1,4% en position 6
 - ✓ 2,23% en position 2
 - ✓ 9,1% en position 3 et 2
 - ✓ 3,2% en position 3 et 6
- Substitution de ces unités
 - ✓ 1,16% en position 6
 - ✓ Traces en position 2

◆ **Unités galactose terminal**

- 1,4% existent telles quelles
- Sulfatation de ces unités
 - ✓ 5,3% en position 2,3 ou 4
 - ✓ Traces en position 6
- Substitution de ces unités
 - ✓ Traces en position 6

◆ **Xylose**

- 2,4% de xylose terminal

Des incertitudes reposent encore sur des unités 3-galactose ramifiées en 4 ou réciproquement (1,8%), et des unités 3-galactose substituées en 4 et 6 ou 4-galactose substituées en 3 et 6 (3,2%).

Les résultats concernant la structure des deux fractions $F > 100$ et $F 10 - 100$ sont résumés et comparés dans le tableau 24.

3 – Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) des différentes fractions

L'élucidation de la structure par résonance magnétique nucléaire (RMN) de nos deux fractions purifiées par chromatographie échangeuse d'ions F > 100 kDa et F 10-100 nécessite une désulfatation préliminaire de celles-ci, les groupements sulfate étant à l'origine de perturbations pour les spectres de RMN (élargissement des signaux à la base, modification des valeurs des déplacements chimiques des carbones et des protons à proximité de ces groupements, etc...).

Différents types de spectres de RMN, homo- et hétéronucléaires, sont acquis dans le but d'obtenir des informations structurales relatives aux fractions polysaccharidiques : la nature des oses qui les constituent, leur anomérie respective (α ou β), leur séquence ainsi que la position des liaisons glycosidiques qui les unissent. La présence et la position de substituants peut également être mise en évidence par le biais de cette technique spectroscopique.

C'est ainsi que des spectres en mode homonucléaire COSY (Correlation Observed SpectroscopY) et TOCSY (Total Observed Correlation SpectroscopY) sont réalisés, les premiers permettant de visualiser le couplage 3J entre deux protons vicinaux, et les seconds d'établir, dans le meilleur des cas, les corrélations existant entre tous les protons d'un même résidu.

Des spectres en mode hétéronucléaire sont également acquis. En particulier, le spectre HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) permet de visualiser la corrélation qui existe entre un carbone et le proton qui lui est directement lié (1J), et donc de déterminer la valeur du déplacement chimique des carbones correspondant aux protons de chaque ose. Quant à la séquence HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) permet quant à elle d'établir les informations relatives aux enchaînements des résidus, par le biais des couplages 2J et 3J entre les atomes situés de part et d'autre de la liaison glycosidique.

Enfin, les analyses en mode homonucléaire NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY) et ROESY (Roasting-frame Overhauser Enhancement Spetroscopy) permettant d'établir les corrélations entre les protons d'un même résidu, ainsi qu'entre les protons situés de part et d'autre de la liaison glycosidique, permettent ainsi de compléter et de confirmer les résultats obtenus.

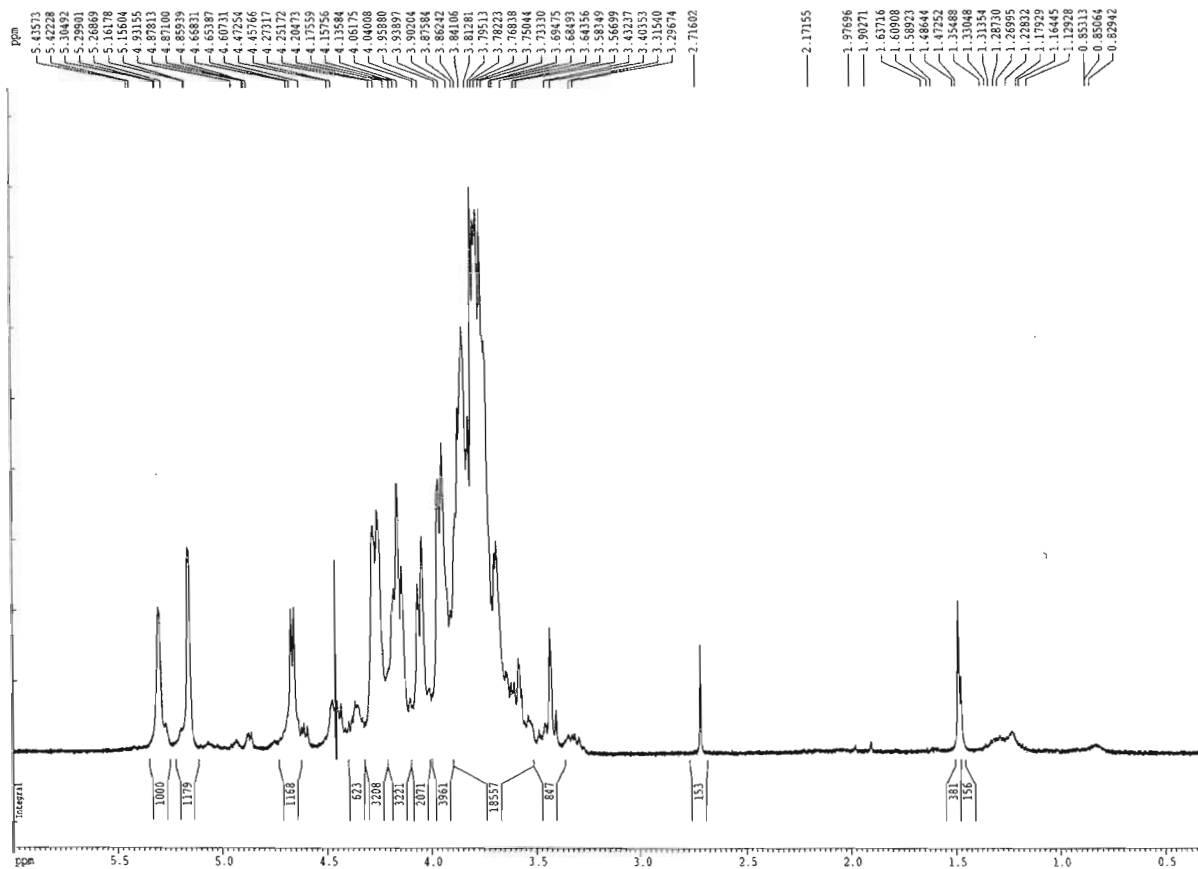


Figure 76 : Spectre de RMN ¹H de la fraction F > 100 kDa (328 K, 500 MHz)

3.1 – F > 100

Tous les spectres de RMN, 1D et 2D, homo- et hétéronucléaires sont acquis sur la fraction F > 100 totalement désulfatée (Taux de sulfate résiduel inférieur à 0,74%, cf. paragraphe 2.1).

3.1.1 – Configuration des liaisons glycosidiques

Rappelons que les déplacements chimiques des signaux correspondant aux carbones et protons anomériques sont généralement séparés des autres signaux en raison de leurs déplacements vers les champs faibles. C'est ainsi qu'ils se situent entre 95 et 105 ppm pour les carbones, et entre 4,5 et 5,5 ppm pour les protons. En particulier, les protons anomériques de configuration α se situent au-delà de 5 ppm, alors que ceux de configuration β se trouvent entre 4,5 et 4,8 ppm.

De plus, la valeur exacte du déplacement chimique en ^{13}C du carbone anomérique permet, dans le cas de résidus galactose appartenant à la famille des carraghénanes ou des agarocolloïdes, de déterminer leur configuration absolue, D ou L (Usov *et al.*, 1980). C'est pourquoi, dans notre cas, cela s'avère être un renseignement de grande utilité.

En effet, à l'issue des analyses structurales préalables effectuées sur les polysaccharides bruts, nous avons conclu que nous étions en présence d'un carragar, mélange de structures de type carraghénanes et agaroides. Toutes deux sont basées sur une alternance régulière d'unités 3- β -D-galactopyranose et 4- α -galactopyranose, cette dernière étant de configuration D pour les carraghénanes, et sous la forme L chez les agaroides. La détermination de la configuration D ou L pour les galactoses d'anomérie α au sein de notre fraction saccharidique permet ainsi l'apport d'une information supplémentaire sur sa structure. Par synthèse des données bibliographiques sur le sujet (Falshaw *et al.*, 2003b; Usov *et al.*, 1980; Van de Velde *et al.*, 2002), les galactoses d'anomérie α liés en 4 appartiennent à la série D lorsque le déplacement chimique de leur carbone anomérique en ^{13}C est compris entre 94 et 98 ppm, et à la série L lorsqu'il est compris entre 100 et 108 ppm.

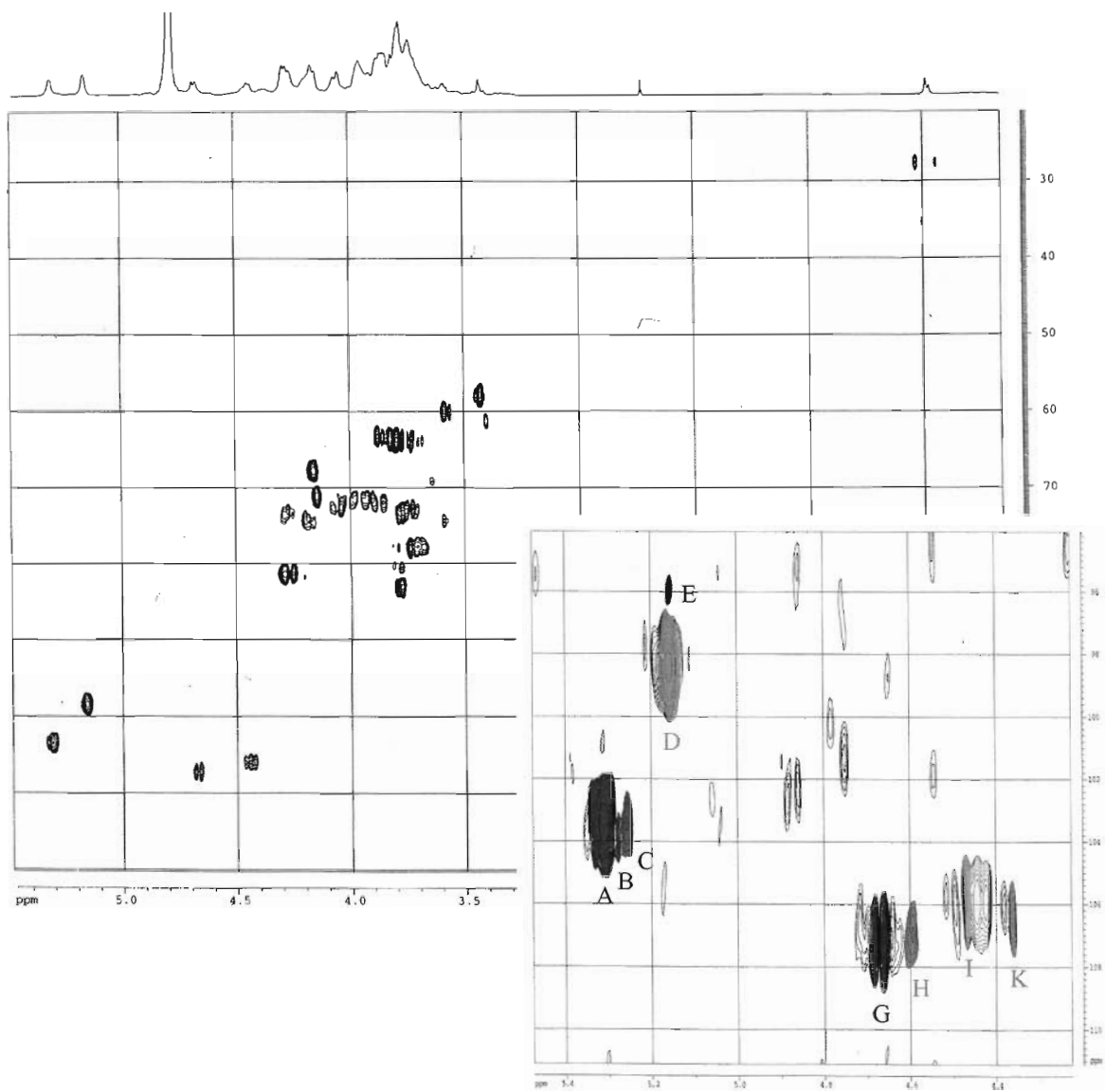


Figure 77 : Spectre de RMN HMQC de la fraction $F > 100$ kDa (298 K, 500 MHz), et agrandissement de sa zone anomérique (4,2 - 5,4 ppm).

Le spectre ^1H de la fraction $F > 100$ désulfatée réalisé à 328 K est représenté sur la figure 76. Cette température permet de déplacer le signal correspondant à l'eau résiduelle hors de la zone des protons anomériques. Tous les autres spectres sont acquis à 298 K.

Ce spectre de RMN ^1H met en évidence deux signaux à bas champs (déplacements chimiques supérieurs à 5 ppm) qui peuvent être attribués à des protons anomériques de configuration α . Quant à la région située entre 4,5 et 4,8 ppm, elle comporte un signal majoritaire, accompagné d'autres signaux présentant des recouvrements, donc difficiles à distinguer. Il s'agit de protons anomériques de configuration β qui peuvent être confondus avec les signaux correspondant aux protons du squelette osidique déplacés vers les bas champs.

Les différents signaux correspondant aux carbones et aux protons anomériques sont cependant extraits sans ambiguïté à partir des spectres en mode hétéronucléaire HMQC (figure 77) et homonucléaire COSY (figure 78). L'analyse de la région spectrale fortement déblindée 95 – 110 ppm sur le spectre HMQC permet de mettre en évidence la présence de 11 signaux C-1/H-1. Six d'entre eux correspondent à des résidus d'anométrie α (5,31/103,371 ; 5,307/103,331 ; 5,256/103,49 ; 5,156/98,396 ; 5,148/99,98 et 5,140/ ?), et cinq à des résidus d'anométrie β (4,671/107,151 ; 4,594/106,833 ; 4,464/106,037 ; 4,434/105,87 et 4,363/106,395).

Parmi les six résidus d'anométrie α , trois sont de configuration L (car de déplacement chimique pour le carbone anomérique de l'ordre de 103 ppm), et au moins deux sont de configuration D (déplacement chimique pour le carbone anomérique de l'ordre de 98-99 ppm).

Les 11 résidus mis en évidence sont nommés de **A** à **K** dans l'ordre décroissant des déplacements chimiques de leurs protons anomériques.

3.1.2 – Attribution des signaux

A partir des études chimiques préliminaires réalisées sur cette fraction saccharidique, et en particulier l'analyse par CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés, nous pouvons dans un premier temps considérer que celle-ci n'est constituée que de résidus galactose, la proportion de résidus xylose y étant très faible.

L'affectation des signaux aux différents protons de nos 11 résidus glycosidiques est réalisée grâce à une interprétation des spectres en mode homonucléaire COSY (couplage ^3J entre deux

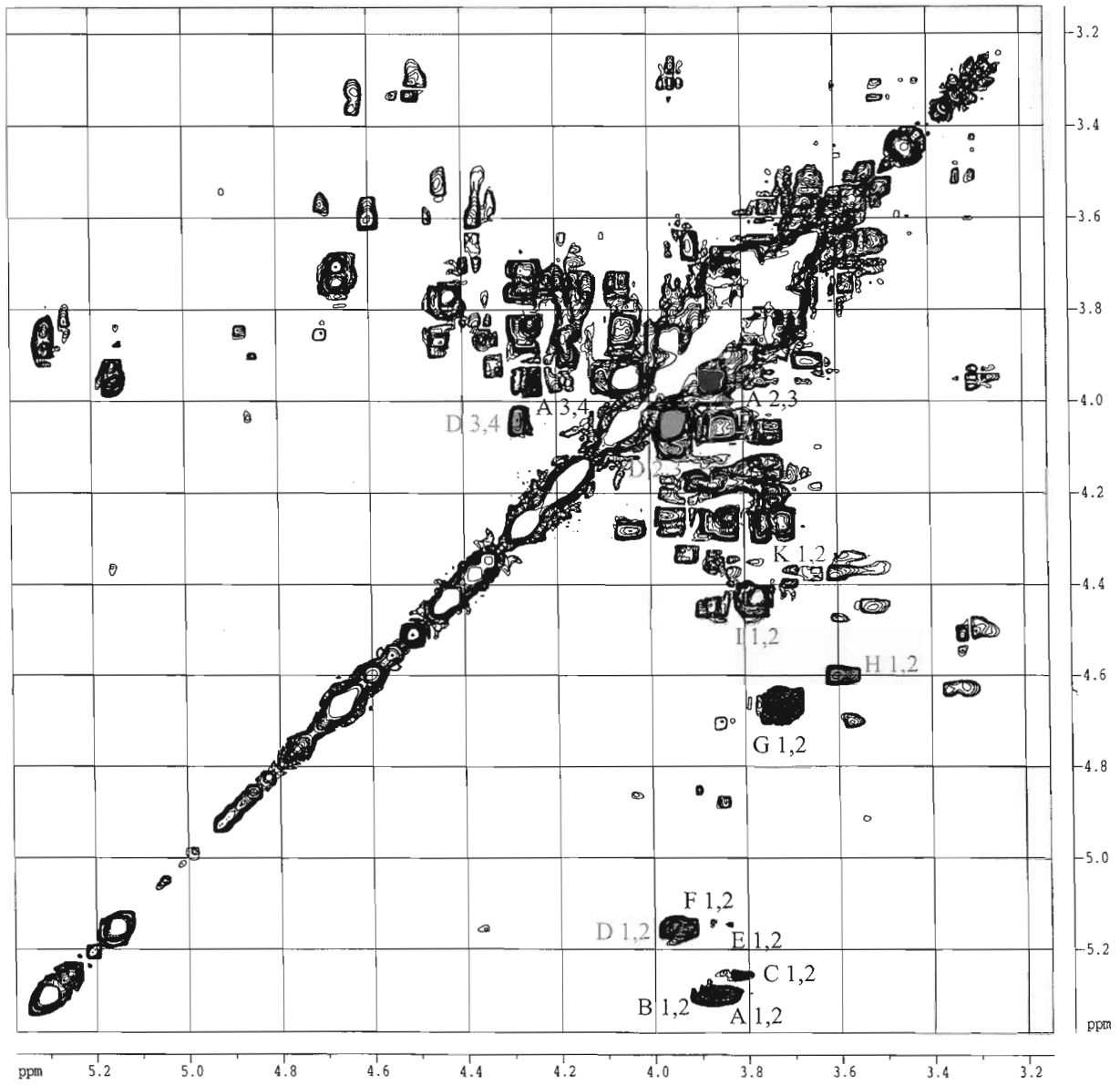


Figure 78 : Spectre de RMN COSY de la fraction F > 100 kDa (298 K, 500 MHz)

protons vicinaux) et TOCSY (corrélation entre tous les protons d'un même résidu) (figure 79). L'analyse du spectre en mode hétéronucléaire HMQC permet dans un deuxième temps de déterminer le déplacement chimique des carbones correspondants.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 25. Il est cependant nécessaire de préciser que la faible résolution de certains spectres et surtout la présence de nombreux recouvrements en raison de la multitude des signaux ont rendu difficile l'attribution complète de la totalité de ces derniers.

De plus, il est connu (Falshaw *et al.*, 1996) que les couplages entre les protons H-4 et H-5 sont faibles chez les résidus de type β -D-galactopyranose. C'est pourquoi les taches de corrélation correspondantes H-4/H-5 sont difficiles à détecter sur les spectres de type COSY ou TOCSY.

Deux types de substituants sont également mis en évidence lors de l'analyse du spectre HMQC. Le premier est un groupement pyruvate. Il présente une tache de corrélation caractéristique entre les protons de son groupement méthyle et le carbone de celui-ci (1,49/28,138 ppm). Le deuxième est un groupement O-méthyle caractérisé par la tache de corrélation (3,43/57,8).

La présence de ces substituants est confirmée par le spectre en mode hétéronucléaire HMBC (figure 80). Ainsi, le groupement pyruvate présente sur ce spectre les taches de corrélation correspondant au carbone du groupement acétalique (carbone quaternaire) placé à 104,255 ppm, ainsi qu'au carbone du groupement carboxylique à 178,613 ppm.

Le fait que le carbone du groupement méthyle appartenant au pyruvate soit à 28,138 ppm permet d'affirmer que le carbone quaternaire acétalique de ce dernier est de configuration R. En effet, s'il était de configuration S, il se trouverait plutôt dans la région spectrale des 15-18 ppm (Goncalves *et al.*, 2002).

Quant au groupement méthyle placé sur un résidu osidique, il présente sur le spectre HMBC plusieurs taches de corrélation à 102,481 et 111,487 ppm, ce qui permet d'obtenir des indications sur sa position d'attache.

Enfin, le signal à 2,71 ppm sur le spectre ^1H correspond aux protons du diméthylsulfoxyde (DMSO) résiduel de l'étape de désulfatation.

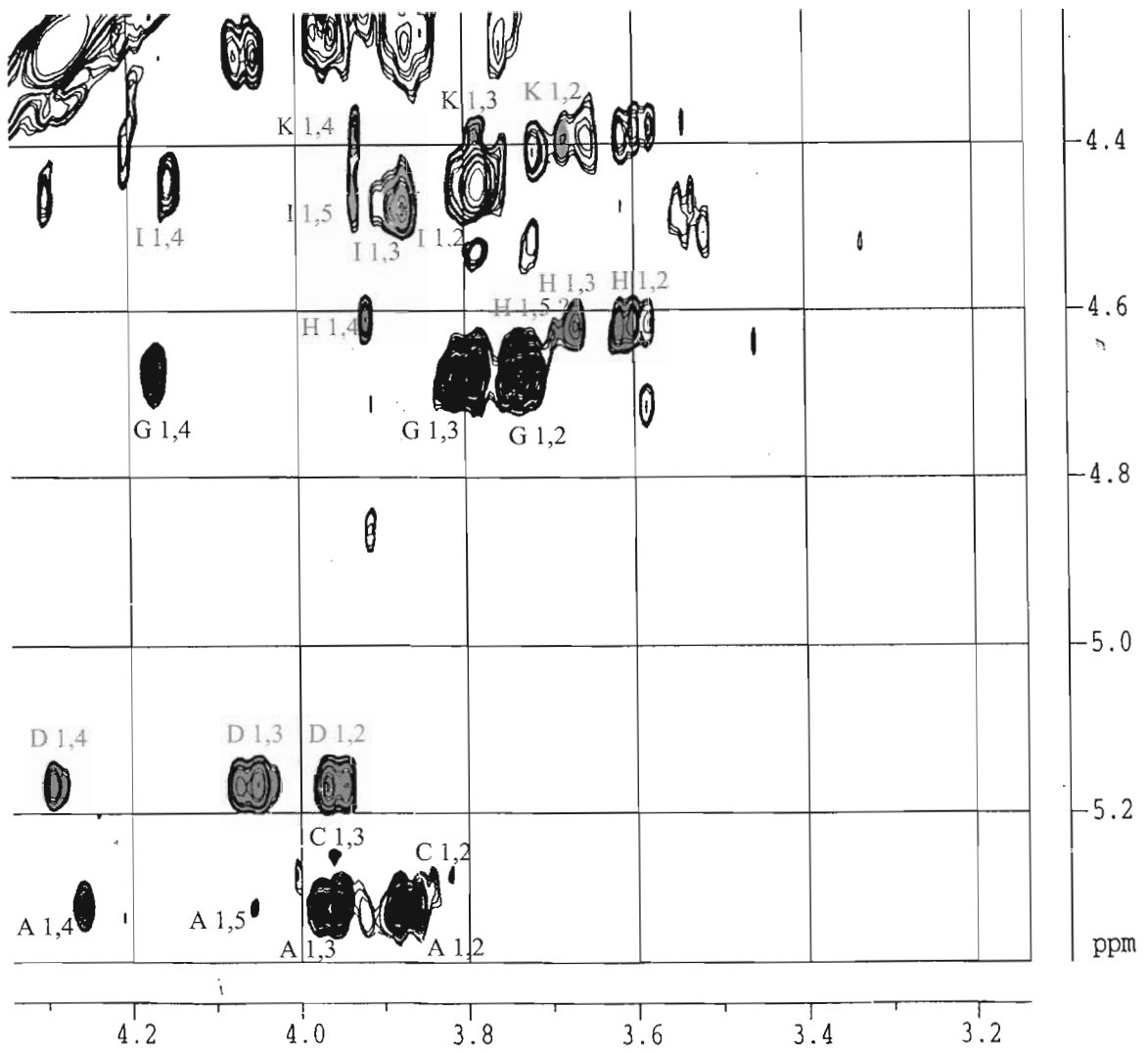


Figure 79 : Spectre de RMN TOCSY de la fraction F > 100 kDa (298 K, 500 MHz)

3.1.3 – Enchaînement des résidus osidiques

Des informations sur la séquence glycosidique de notre fraction $F > 100$ sont obtenues grâce à l'interprétation du spectre en mode homonucléaire ROESY (figure 81).

En effet, outre les corrélations entre les protons d'un même résidu, il permet également de déterminer les corrélations entre les protons situés de part et d'autre d'une liaison glycosidique. Par comparaison avec les résultats obtenus à partir de l'interprétation du spectre TOCSY, les corrélations inter-résidus peuvent alors être mises en évidence. Ces corrélations sont ensuite confirmées par analyse du spectre en mode hétéronucléaire HMBC.

Nous savons que la chaîne saccharidique est principalement constituée d'une alternance régulière entre les unités 3- β -D-galactopyranose et les unités de type 4- α -D/L-galactopyranose. Nous nous sommes donc basés sur ce postulat dans un premier temps pour identifier les corrélations inter-résidus existantes.

Cependant, l'attribution de ces dernières n'est pas si aisée. En effet, la nature des oses constitutifs de notre chaîne saccharidique étant identique, ils présentent des déplacements chimiques extrêmement proches les uns des autres, et il est par conséquent difficile d'affirmer avec certitude leur enchaînement.

C'est pourquoi chaque résidu est traité individuellement afin de poser clairement les incertitudes éventuelles le concernant.

Résidu D

L'analyse du spectre ROESY nous permet de mettre en évidence une corrélation entre le proton anomérique de D ($H-1 = 5,156$ ppm) et le H-3 du résidu G.

Les corrélations inter-résidus de plus faible intensité entre H-1 de D et H-2 et H-4 de G confirment le site d'attache du résidu D en position 3 du résidu G. Cette liaison entre les résidus D et G est également confirmée sur le spectre HMBC où des taches de corrélation entre le proton anomérique de D et différents carbones du résidu G sont visibles, d'où :

D – 3G

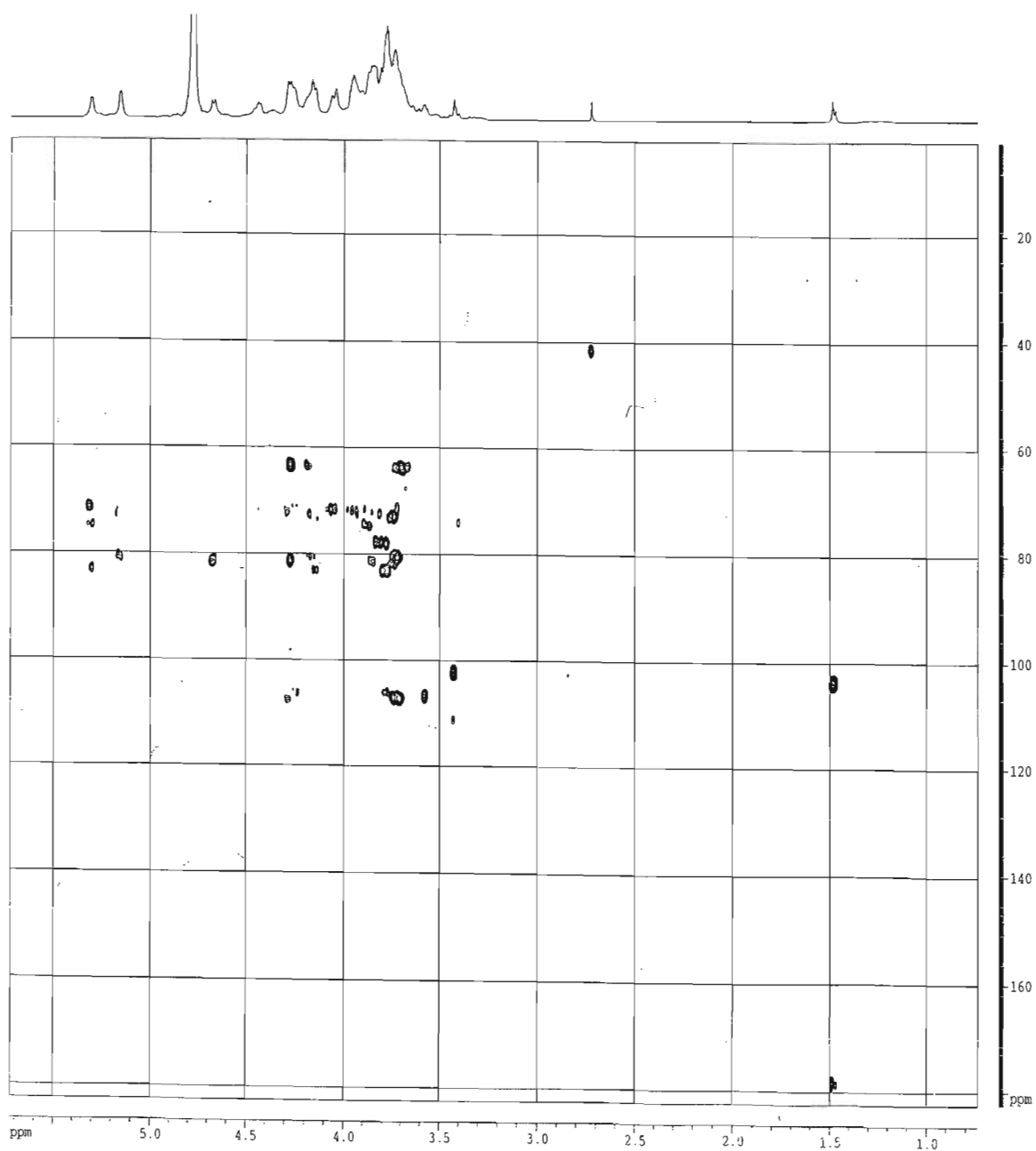


Figure 80 : Spectre de RMN HMBC de la fraction $F > 100$ kDa (298 K, 500 MHz)

Le résidu D présente également d'autres taches de corrélation, plus faibles et plus difficiles à attribuer, entre H-1 de D et deux protons placés à 3,863 et 4,192 ppm. De plus, le spectre HMBC montre l'existence de corrélations entre le carbone anomérique de D et deux protons dont les déplacements chimiques sont situés à 4,273 et 4,155 ppm.

C'est pourquoi nous pensons que le résidu D est dans une moindre mesure également lié au résidu J en position 3 de ce dernier.

D – 3J

Résidus G

Des taches de corrélation sont visibles entre H-1 de G et H-4 de D sur le spectre de ROESY, confirmées sur le spectre HMBC.

Le résidu G est donc lié au résidu D sur la position 4 de celui-ci :

G – 4D

Le spectre de ROESY présente également une autre tache de corrélation non négligeable entre H-1 de G et un proton situé à 3,7 ppm. Il ne peut s'agir de H-2 de G, celui-ci étant déjà clairement identifié à 3,73 ppm, ni d'une corrélation avec un proton de D autre que H-4 (H-3 ou H-5), ces derniers étant dans une région située entre 4,06 et 4,240 ppm.

Il y a peu de chance pour que cette tache de corrélation représente une jonction entre le résidu G et un autre résidu de type 4- α -D/L-galactopyranose. En effet, les H-4 de ces résidus sont tous situés vers les 4,05-4,3 ppm, donc loin de 3,7 ppm.

La seule possibilité envisageable serait que le résidu G soit également présent sous forme d'une ramification de la chaîne saccharidique principale.

D'après les informations obtenues à l'issue des analyses par CG/SM des acétates d'alditols partiellement méthylés de la fraction F > 100, les seules ramifications à envisager sont soit en position 6 des unités 3- β -D-galactopyranose, soit en position 3 (ou 4) des unités 4- α -D/L-galactopyranose (ou 3- β -D-galactopyranose).

Un tel déplacement chimique pour notre corrélation (3,7 ppm) ne correspond ni à des H-4 d'unités 3- β -D-galactopyranose, ni à des H-3 d'unités 4- α -D/L-galactopyranose. Il pourrait

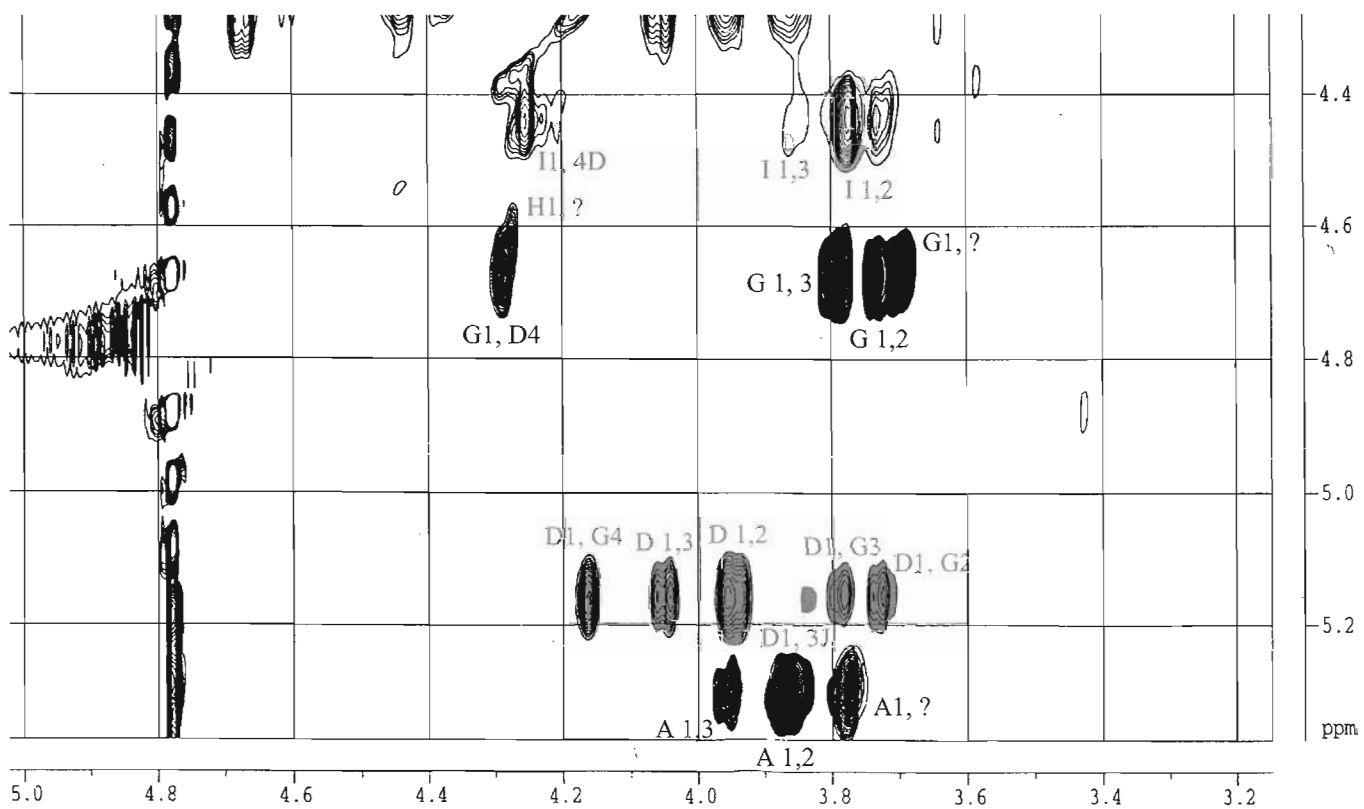


Figure 81 : Spectre de RMN ROESY de la fraction F > 100 kDa (298 K, 500 MHz)

éventuellement s'agir de protons de type H-6, dont la valeur des déplacements chimiques est placée dans cette région. Cependant, la plupart des déplacements chimiques pour les positions 6 de nos résidus n'ont pu être attribuées, d'où l'impossibilité de confirmer ou d'infirmier le fait que le résidu G serait un substituant en position 6 d'un autre résidu osidique.

Résidus J

Ce type de résidu présente sur le spectre ROESY une tache de corrélation entre son proton anomérique et H-4 de A. Une corrélation entre C-1 de J et H-4 de A confirme cet enchaînement osidique.

J-4A

Trois taches de corrélation supplémentaires sont visibles entre H-1 de J et trois protons situés à 4,23 ; 3,729 et 3,851 ppm.

En regardant les déplacements chimiques attribués au résidu osidique J, on peut constater que la valeur du déplacement chimique pour son carbone 4 est situé dans les champs faibles (71,114 ppm) par rapport aux autres C-4 des résidus du même type (3- β -D-galactopyranose), généralement placés vers 68 ppm. Le fait que le C-4 de J soit fortement déblindé suggère que notre résidu soit substitué en position 4.

Cependant, en raison de la distance entre le proton anomérique de J et le substituant porté par celui-ci en position 4, il y a peu de chance pour que les taches de corrélation entre H-1 de J et les protons du substituant soient visibles. Les 3 taches de corrélation concernant les déplacements chimiques à 4,23 ; 3,729 et 3,851 ppm restent ainsi non attribuées.

Résidus A

Le proton anomérique de ce résidu présente trois taches de corrélation avec des protons de déplacements chimiques à 3,779 ; 3,911 et 4,046 ppm. L'analyse du spectre HMBC peut laisser entrevoir le fait qu'il existe une liaison entre le résidu A et le résidu I ou le résidu K, substitués alors en position 3.

A – 3I ou A – 3K

Cependant, il est difficile d'affirmer que le résidu A est formellement lié à l'un ou l'autre de ces résidus, les valeurs des déplacements chimiques n'étant pas exactement les mêmes, et aucune information complémentaire permettant de trancher entre l'un ou l'autre n'ayant été trouvée.

Résidu I

Une tache de corrélation entre H-1 de I et H-4 de D est visible sur les spectre ROESY, accompagnée d'une tache de plus faible intensité entre H-1 de I et H-5 de D. Cette corrélation inter-résidus est confirmée par analyse du spectre HMBC.

I – 4D

Une tache de corrélation reste toutefois non attribuée, située à 3,64 ppm.

Résidu H

Le cas du résidu H est plus complexe. En effet, celui-ci présente des déplacements chimiques atypiques qui laissent penser qu'il peut s'agir d'un ose non réduit (terminal). D'après les résultats obtenus à partir des étapes de perméthylations de notre fraction, il ne peut s'agir que de galactose terminal ou de xylose terminal.

Une autre hypothèse serait que ce résidu H porte un groupement pyruvate, à l'origine d'un déblindage pour les carbones 4 et 6 qui le portent, et d'un blindage pour les carbones 3 et 5 adjacents, les carbones de l'ose les plus marqués par ces effets nommés α et β du pyruvate étant les carbones 5 et 6, passant respectivement de 75 à 66 ppm et de 60 à 65 ppm (Falshaw *et al.*, 2003b).

Nous ne sommes pas en mesure de trancher en ce qui concerne la nature du résidu H. En effet, les trois hypothèses (galactose porteur d'un groupement pyruvate, ou oses terminaux,

galactoses ou xyloses) pourraient être toutes trois vérifiées. Ceci est principalement lié au fait que tous les déplacements chimiques pour ce résidu n'ont pu être attribués, et en particulier la vérification de l'existence ou non de carbone et de protons en position 6 permettant de distinguer les galactoses des xyloses.

Ainsi, des déplacements chimiques déblindé pour C-4 et blindé pour C-3 sont remarquables, ce qui pourrait corroborer l'hypothèse d'un galactose portant un groupement pyruvate. Cependant, les déplacements chimiques des autres carbones et protons pour ce même résidu sont également cohérents avec un galactose ou un xylose terminal engagé dans une liaison glycosidique (Errea & Matulewicz, 2003).

Un moyen de distinguer le galactose terminal du xylose terminal serait la détermination de la constante de couplage 3J existant entre les protons 3 et 4 de chaque résidu. En effet, la constante de couplage $^3J_{3,4}$ pour le xylose est plus élevée (de l'ordre de 8 Hz) que celle du galactose (1 Hz) pour des raisons de conformation.

L'analyse du spectre COSY permet bien de détecter la tache de corrélation H-3/H-4 du résidu H, mais aucun doublet permettant le calcul d'une constante de couplage n'est visible, ne nous autorisant ainsi pas à faire la distinction entre un résidu galactose et un résidu xylose.

En résumé, le résidu H est particulier, puisqu'il s'agit soit de xylose ou de galactose terminal, soit de galactose substitué par un groupement pyruvate. Quoiqu'il en soit, ce résidu H présente sur le spectre de ROESY une tache de corrélation entre son proton anomérique et un proton placé à 4,29 ppm. De même, le spectre HMBC présente une corrélation entre H-1 de H et un carbone situé vers 81 ppm. Il pourrait donc s'agir d'un 3- β -D-galactopyranose classique, bien que pyruvaté, inclus dans la chaîne principale et lié à la position 4 d'une unité 4- α -D/L-galactopyranose (peut-être D ?).

L'hypothèse d'un galactose ou xylose terminal, substituant la chaîne saccharidique principale en position 6 ou en position 3 d'un 4-galactose (ou 4 d'un 3-galactose), ne peut être exclue. Ces positions ont été déterminées à partir des résultats de perméthylations de notre fraction. Une substitution en position 6 est peu vraisemblable. En effet, les protons portés par les C-6 sont généralement situés vers 3,7-3,9 ppm, et non, vers 4,3 ppm. Dans le cas d'une ramification de la chaîne principale par le résidu H, celle-ci se ferait donc soit en position 3 d'une unité 4- α -D/L-galactopyranose, soit en position 4 d'une unité 3- β -D-galactopyranose. Cependant, aucun H-3 des résidus galactopyranose liés en 4, ni H-4 des résidus

galactopyranose liés en 3 décrits ici ne présente ce type de déplacements chimiques (4,269 ppm et 80,859 ppm).

Le résidu H serait donc vraisemblablement un galactose pyruvaté inclus dans la chaîne saccharidique principale.

Les résidus restants (**K**, **B**, **C** et **E**) ne présentent pas de taches de corrélation évidentes sur le spectre ROESY. En effet, le déplacement chimique de leurs protons anomériques étant très proche de ceux de résidus dont les taches sont importantes, il est impossible de les identifier sans ambiguïté.

Quelques taches de corrélation peuvent toutefois leur être attribuées par analyse du spectre HMBC, en particulier celles entre le proton H-1 de ces résidus et le carbone C-X du résidu auquel ils sont liés. Cependant, ces taches ne correspondent pas exactement aux déplacements chimiques de résidus déjà identifiés, bien qu'en étant proches. C'est pourquoi, ces résultats sont à considérer avec prudence.

Ainsi, le résidu **C** pourrait corrélérer avec le résidu **J** (**C-3J**). Le résidu **E** avec **3J** également, et le résidu **K** avec le résidu **A** ou **C**. Quant à la tache de corrélation trouvée pour le résidu **B**, elle n'est pas suffisamment pertinente pour pouvoir se prononcer sur une éventuelle substitution.

Cependant, ces corrélations étant probables mais loin d'être certaines, mieux vaut considérer ces résultats avec circonspection.

En conclusion, à partir des spectres obtenus en mode homonucléaire et hétéronucléaire COSY, TOCSY, HMQC, HMBC et ROESY, il a été démontré que la fraction F > 100 était constituée majoritairement de 11 résidus galactose sous forme pyranosique, nommés de A à K, dont 6 sont d'anomérie α (3 de configuration L et 2 de configuration D), et 5 d'anomérie β . Il a également été démontré que ces résidus étaient liés entre eux de la manière suivante :

D – 3G

D – 3J

G – 4D

J – 4A

Résidu	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$					
	1	2	3	4	5	6
A	5,31 103,371	3,868 72,046	3,969 71,549	4,257 81,249	4,054 72,73	3,92 63,648
B	5,307 103,331	3,918 -	4,056 -			
C	5,256 103,49	3,824 -	3,962 -	4,048 81,178	4,006 72,828	
D	5,156 98,396	3,945 71,707	4,06 72,81	4,28 81,471	4,24 74,468	3,91 -
E	5,148 98,988	3,876 71,753				
F	5,140 ?	3,837				
G	4,671 107,151	3,729 72,828	3,804 80,299	4,167 67,945	4,069 74,961	
H	4,594 106,833	3,603 74,39	3,668 77,920	3,90 69,69	3,58 ?	
I	4,46 106,037	3,783 73,511	3,871 80,139	4,148 67,76	3,901 76,391	
J	4,44 105,87	3,787 73,462	3,93 -	4,146 71,114		
K	4,363 106,395	3,697 73,023	3,784 80,689	3,925 67 ?		

Tableau 25 : Déplacements chimiques en ppm des signaux de la fraction désulfatée purifiée F > 100, obtenus à partir des spectres RMN ^1H et ^{13}C .

--- : incertitudes quant à l'attribution de la valeur des déplacements chimiques

Résidu	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$					
	1	2	3	4	5	6
A	5,337 103,049	3,977	4,125			
B	5,302 103,438	3,878 71,809	3,95 71,459	4,24 81,379	4,05 72,743	
C	5,259 103,352	3,824 -	3,988 -			
D	5,152 98,339	3,955 71,634	4,042 72,451	4,277 81,437	4,217 ? 73,852	
E	5,145 94,968	3,870 -	4,014			
F	5,31 100,024	3,919				
G	4,865 106,247	3,846 -				
H	4,675 107,154	3,733 73,151	3,772 83,013	4,148 67,783	3,789 ? 78,403 ?	
I	4,593 106,031	3,59	3,654 83,188	3,906		
J	4,461 105,944	3,778 73,385	3,85 79,803	4,278	3,911 ?	3,86 ?
K	4,426 102,185	3,775 73,385	3,85 79,803	4,136 71,226		
L	4,366 107,37	3,586 74,318	3,65 75,310	3,912 ? 71,167 ?		

Tableau 26 : Déplacements chimiques en ppm des signaux de la fraction désulfatée purifiée F 10 - 100, obtenus à partir des spectres RMN ^1H et ^{13}C .

--- : incertitudes quant à l'attribution de la valeur des déplacements chimiques

A – 3I ou 3K

I – 4D

H – 4D ?

Et que le résidu J était substitué en position 4.

Par extrapolation, une hypothèse d'enchaînement pourrait être par exemple :

I – 4D – 3G – 4D – 3J – 4A – 3I

Tous ces résidus sont donc à priori des unités galactose intégrées à la chaîne principale de notre fraction saccharidique, sauf peut-être le résidu H dont la nature exacte n'a pu être déterminée, mais qui est probablement un 3-β-D-galactopyranose portant un groupement pyruvate en positions 4 et 6, inclus dans la chaîne principale.

Un autre substituant, le groupement O-méthyle, a également été mis en évidence par analyse des spectres de RMN, sans toutefois pouvoir établir son site d'attache.

Il semblerait néanmoins qu'en raison de la valeur de son déplacement chimique (3,43 ppm), il soit attaché à la position 6 des unités galactopyranose (Usov, 1984). La majorité des déplacements chimiques pour la position 6 des résidus identifiés n'ayant pu être déterminée, il est donc impossible de définir sur quel(s) résidu(s) osidique(s) ce groupement méthyle est attaché.

Il est cependant notable qu'il est difficile de déterminer un enchaînement précis pour nos résidus osidiques correspondant ainsi à une « unité répétitive » pour notre fraction saccharidique.

Le fait que la nature de nos monosaccharides soit identique, la seule différence étant leur environnement chimique qui leur confère des déplacements chimiques différents, leur permet de se lier entre eux de manière multiple du moment que l'enchaînement 3-β-D-galactopyranose / 4-α-D/L-galactopyranose soit respecté. C'est ainsi qu'un même résidu peut être lié à plusieurs types d'oses de même nature, d'où la difficulté à établir un enchaînement régulier définitif.

Mais l'enseignement principal qui peut être tiré de l'interprétation des spectres de RMN est que nos résidus sont bien soumis à un enchaînement régulier de type 3-β-D-

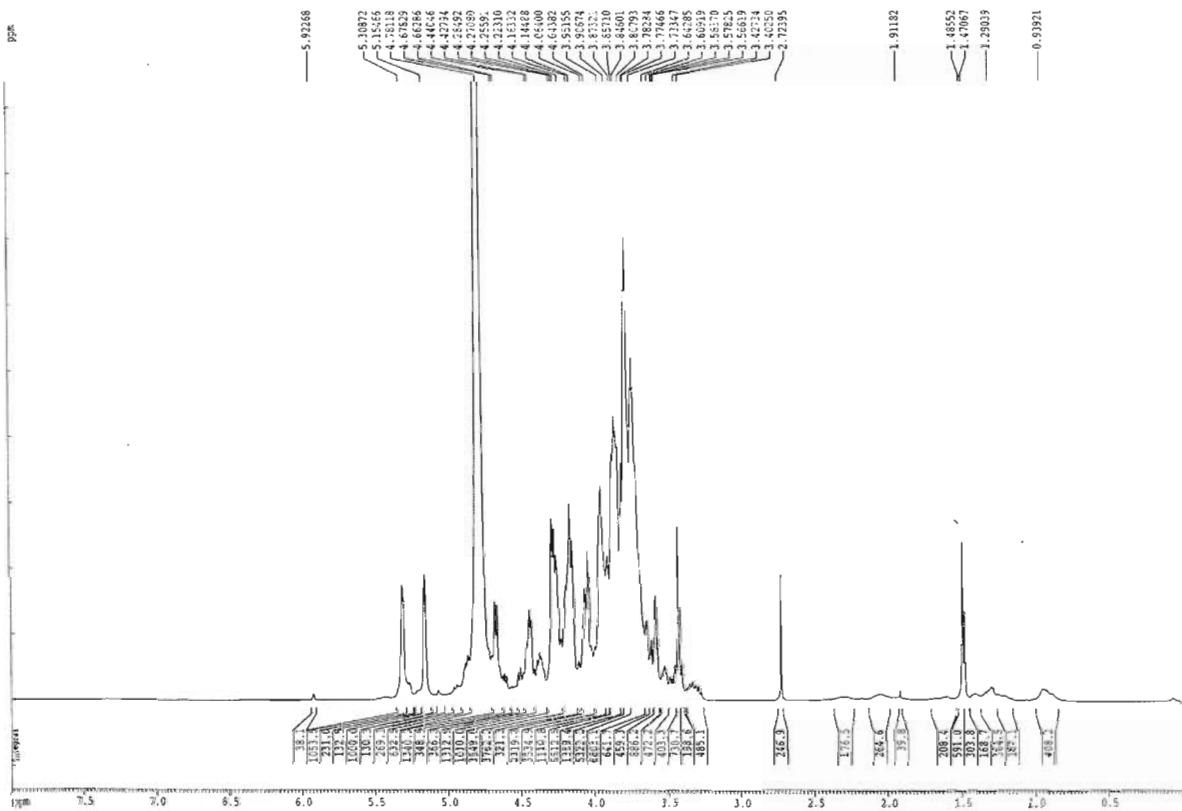


Figure 82 : Spectre de RMN ¹H de la fraction F 10 - 100 kDa (298 K, 500 MHz)

galactopyranose / 4- α -D/L-galactopyranose, conformément aux descriptions de la littérature concernant les polysaccharides pariétaux d'algues rouges. La présence des unités 4- α -galactopyranose à la fois sous la forme D et L confirme le fait que nous soyons en présence d'un carragar, polysaccharide hybride comportant à la fois des unités saccharidiques de type carraghénane et agarocolloïde.

Dans le cadre de l'analyse structurale des polysaccharides natifs, nous n'avons pu préciser s'il s'agissait d'un seul polysaccharide hybride (comportant au sein d'une même chaîne saccharidique les deux types de polysaccharides), ou de deux chaînes de polysaccharides distinctes, concomitantes. L'analyse des spectres RMN montrant clairement l'existence d'enchaînements osidiques entre ces deux types de polysaccharides (liaison entre unités disaccharidiques de type carraghénane avec des unités disaccharidiques de type agarocolloïde), notre fraction saccharidique $F > 100$ serait donc constituée d'un seul polysaccharide hybride comportant au sein de sa chaîne principale les deux types de polysaccharides.

3.2 – F 10 – 100

Pour les mêmes raisons que dans le cas de la fraction $F > 100$, tous les spectres de RMN 1D et 2D, homo- et hétéronucléaires sont acquis sur la fraction F 10 – 100 désulfatée (comportant toutefois encore 2,4% de groupements sulfate, *cf.* paragraphe 2.2).

3.2.1 – Configuration des liaisons glycosidiques

Il est nécessaire de préciser à nouveau que la région spectrale dans laquelle se trouvent les carbones et protons anomériques se situe respectivement entre 95 et 105 ppm, et 4,5 et 5,5 ppm. Rappelons également que de manière générale, les protons anomériques de configuration α se situent au-delà de 5 ppm, et ceux de configuration β entre 4,5 et 4,8 ppm. De plus, comme il a été précisé pour la fraction $F > 100$, les galactoses d'anométrie α sont de configuration absolue D si le déplacement chimique de leur carbone anomérique est compris entre 94 et 98 ppm, et de configuration L s'il est compris entre 100 et 108 ppm.

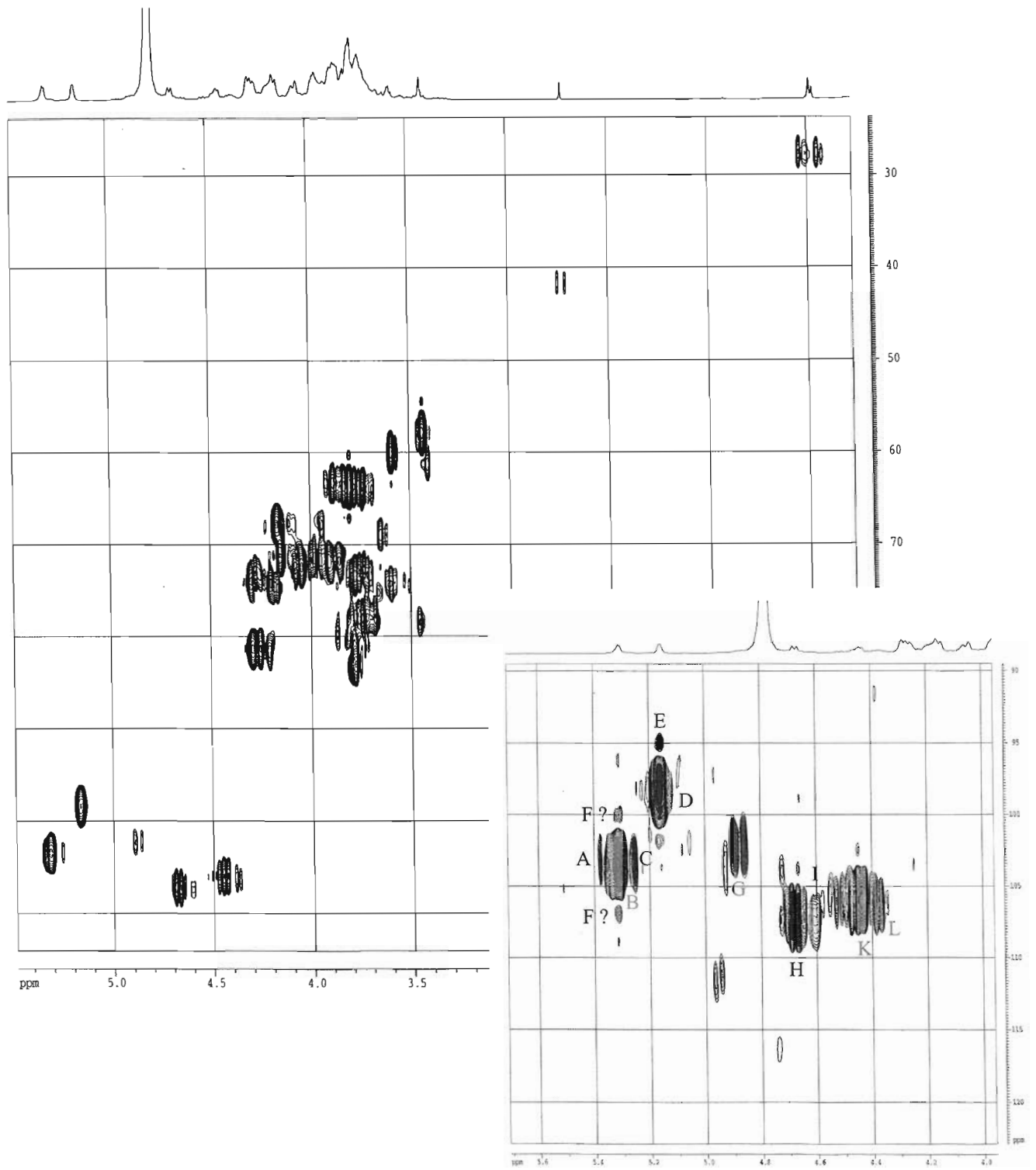


Figure 83 : Spectre de RMN HMQC de la fraction F 10 - 100 kDa (298 K, 500 MHz), et agrandissement de sa zone anomérique (4,0 – 5,6 ppm)

Le spectre ^1H de la fraction F 10 – 100 désulfatée réalisé à 298 K (figure 82) montre clairement la présence de deux signaux à bas champs correspondant à des protons anomériques de configuration α , ainsi qu'un signal majoritaire placé dans la région 4,5 - 4,8 ppm accompagné de plusieurs signaux difficiles à distinguer en raison des nombreux recouvrements correspondant aux protons d'anomérie β .

L'attribution des différents signaux des carbones et protons anomériques est cependant réalisée sans ambiguïté à partir des spectres HMQC (figure 83) et COSY (figure 84).

12 taches de corrélation C-1/H-1 sont ainsi mises en évidence à partir du spectre HMQC, correspondant à 6 résidus osidiques d'anomérie α (5,337/103,049 ; 5,302/103,438 ; 5,259/103,352 ; 5,152/98,339 ; 5,145/94,968 et 5,31/100,024), dont 4 sont de configuration L et 2 de configuration D, et 6 résidus d'anomérie β (4,865/106,247 ; 4,67/107,154 ; 4,593/106,031 ; 4,461/105,944 ; 4,426/102,185 et 4,366/107,37). Ces 12 résidus sont nommés de A à L dans l'ordre décroissant des déplacements chimiques de leurs protons anomériques.

3.2.2 – Attribution des signaux

Nous pouvons noter que la plupart des spectres de RMN de la fraction F 10 – 100 présente de fortes similitudes avec ceux de la fraction F > 100. C'est pourquoi un raisonnement identique à celui appliqué dans le cas de la fraction F > 100 est suivi pour l'étude de la fraction F 10 – 100.

Nous allons donc considérer dans un premier temps que les signaux observés en RMN pour notre fraction saccharidique F 10 – 100 ne correspondent qu'à des résidus de type galactose.

L'analyse des spectres en mode homonucléaire COSY et TOCSY (figure 85) va alors permettre d'effectuer l'attribution des signaux aux différents protons de nos 12 résidus galactose. Cette affectation est ensuite complétée par l'analyse du spectre HMQC qui permet de déterminer le déplacement chimique des carbones correspondants.

Les déplacements chimiques des carbones et protons de nos 12 résidus galactosidiques ainsi obtenus sont résumés dans le tableau 26.

La plupart des ces déplacements identifiés sont effectivement très proches de ceux trouvés pour la fraction F > 100, et comme dans le cas de cette fraction, l'attribution de tous les signaux n'a pu être réalisée, notamment en raison de nombreux recouvrements, mais aussi de

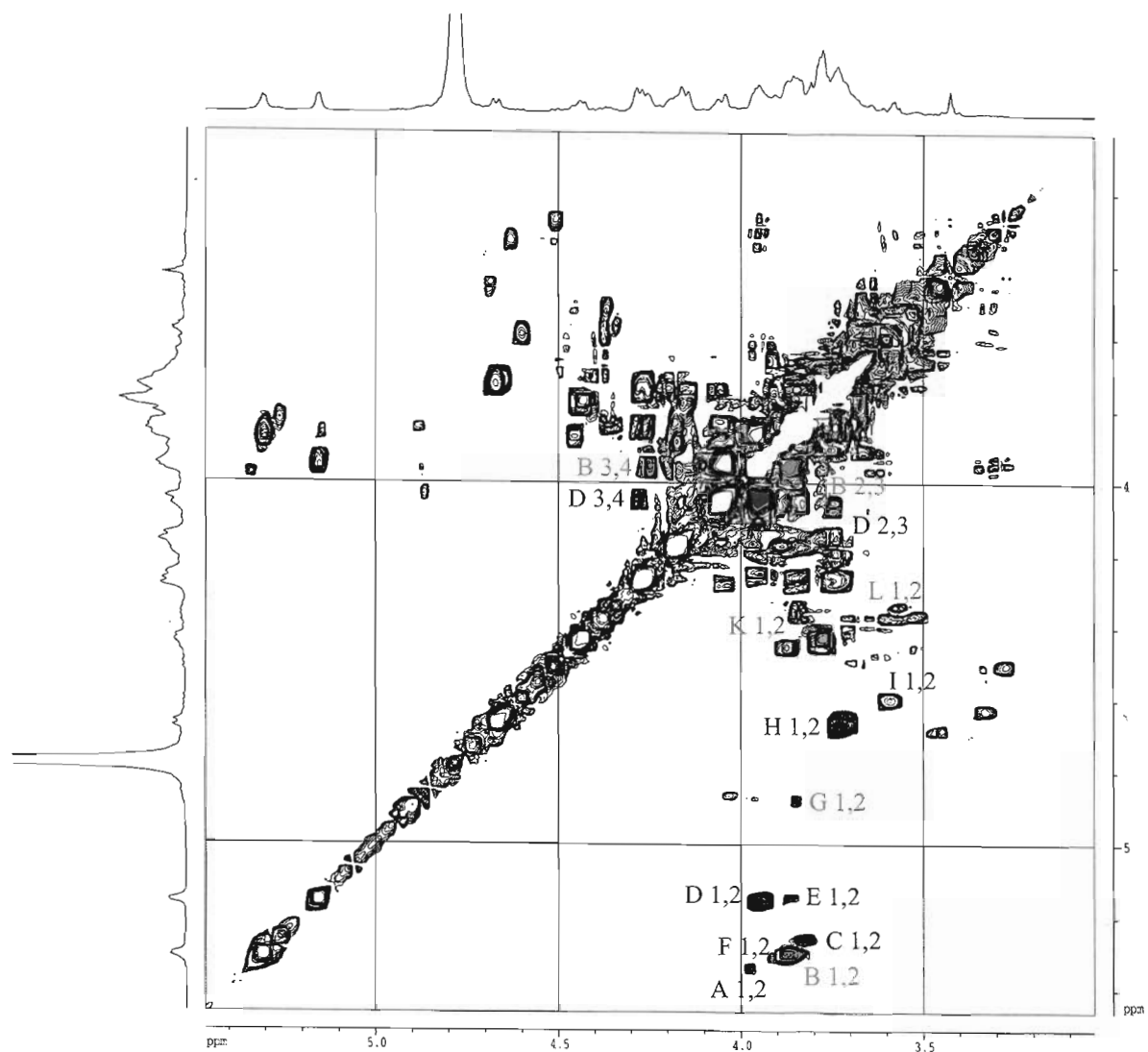


Figure 84 : Spectre de RMN COSY de la fraction F 10 - 100 kDa (298 K, 500 MHz)

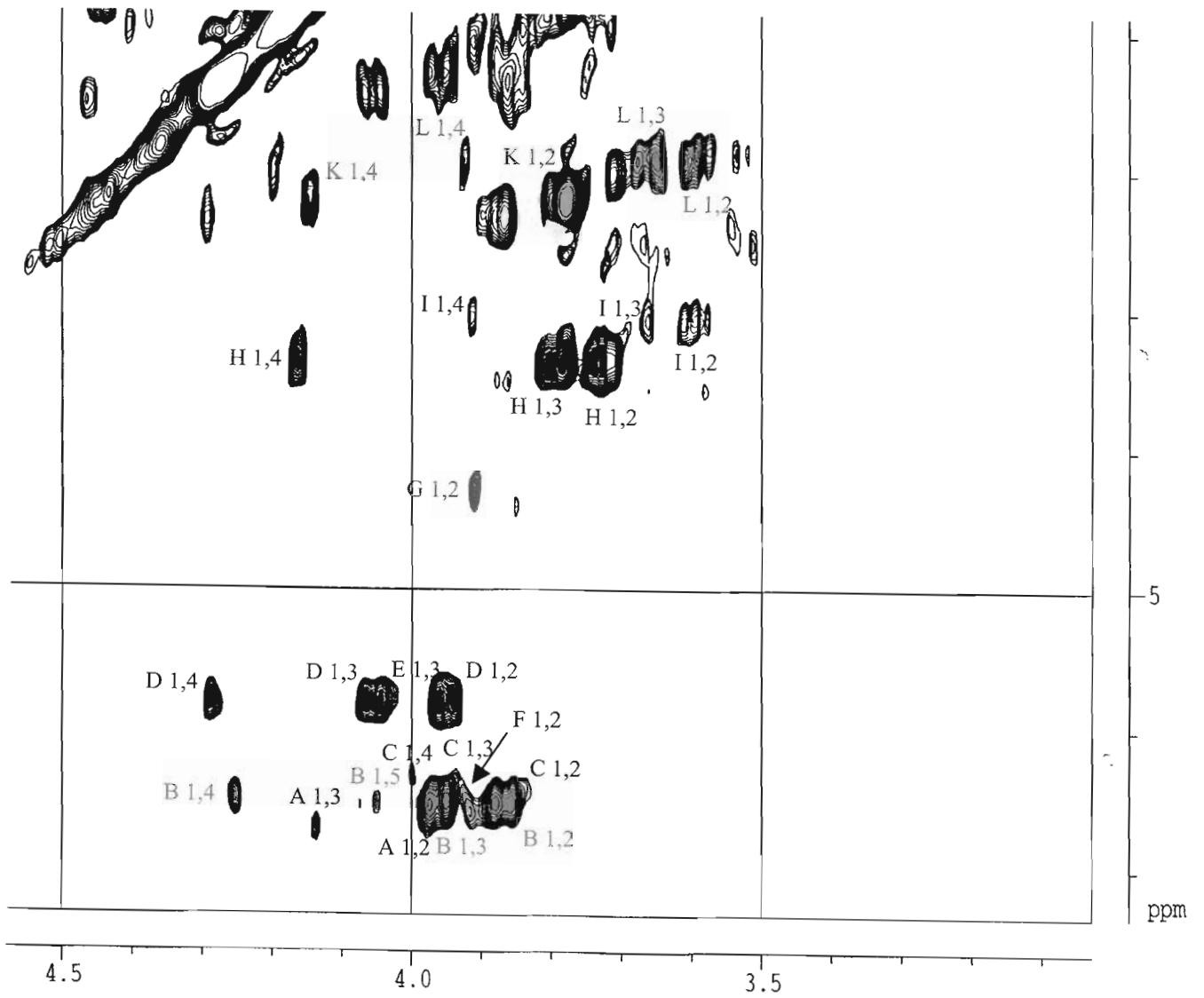


Figure 85 : Spectre de RMN TOCSY de la fraction F 10 - 100 kDa (298 K, 500 MHz)

la faible résolution de certains spectres. De plus, les taches de corrélations H-4/H-5 étant difficiles à détecter, nous nous trouvons généralement face à l'impossibilité d'attribuer de manière de manière complète tous les signaux d'un même résidu.

L'analyse du spectre HMQC a également permis de mettre en évidence la présence de deux types de substituants, à savoir des groupements pyruvate ainsi que des groupements méthyle.

3.2.3 – Enchaînement des résidus osidiques

Les informations concernant la séquence glycosidique des résidus au sein de notre fraction F 10 – 100 sont établies par l'interprétation des spectres en mode homonucléaire NOESY (figure 86) d'une part, et celle du spectre en mode hétéronucléaire HMBC (figure 87) d'autre part qui permet de confirmer les corrélations inter-résidus suspectées.

Comme dans le cas de la fraction F > 100, nous partons du postulat que notre chaîne saccharidique est constituée d'un enchaînement régulier entre les unités 3-β-D-galactopyranose et les unités 4-α-D/L-galactopyranose. Cependant, en raison de la faible résolution de certains spectres déjà précisée, nous pouvons remarquer que l'attribution des déplacements chimiques des différents résidus est encore moins complète que dans le cas de la fraction F > 100, ce qui rend encore plus difficile la caractérisation des enchaînements osidiques entre eux et augmente le nombre d'incertitudes.

C'est la raison pour laquelle une étude moins poussée que dans le cas de la fraction F > 100 est réalisée, par manque d'informations concernant les déplacements chimiques des résidus identifiés.

Il reste encore de nombreuses incertitudes au niveau de la caractérisation des enchaînements de ces oses, certains ont toutefois pu être mise en évidence :

D – 3H

D – 3K ou 3J

H – 4D ou 4B

K – 4B

L – 4B ?

B – 3H ou 3J

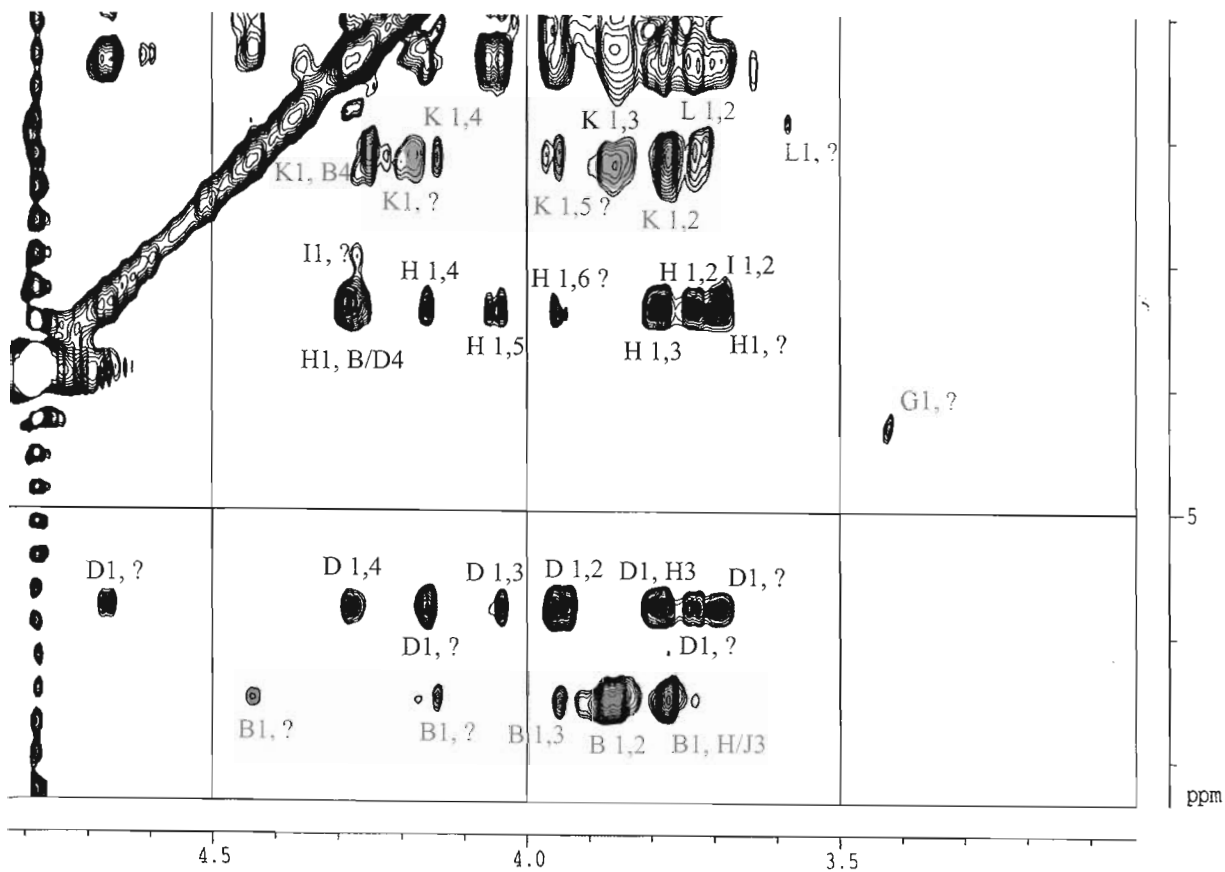


Figure 86 : Spectre de RMN NOESY de la fraction F 10 - 100 kDa (298 K, 500 MHz)

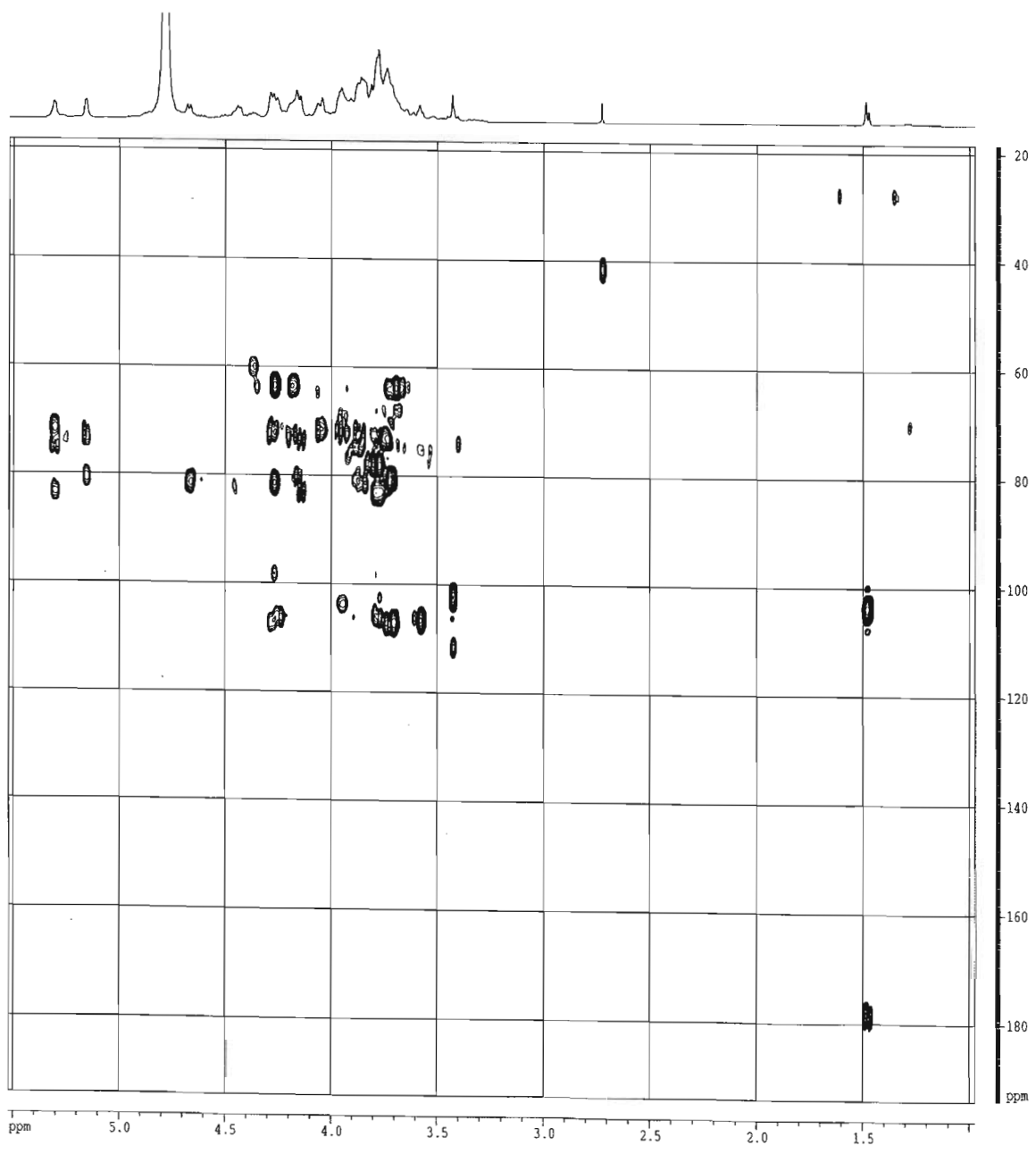


Figure 87 : Spectre de RMN HMBC de la fraction F 10 - 100 kDa (298 K, 500 MHz)

Le résidu L pourrait être le galactose porteur du groupement pyruvate, et le résidu K est substitué en 4. On peut également noter qu'un même ose peut être lié à différents types de résidus.

Par extrapolation, une hypothèse d'enchaînement pourrait être par exemple :



Cependant, comme dans le cas de la fraction $F > 100$, l'information principale à retenir est l'enchaînement régulier entre les unités 3- β -D-galactopyranose et 4- α -D/L-galactopyranose, ainsi que la présence concomitante d'unités 4- α -galactopyranose de configuration absolue D et L, confirmant ainsi la structure de type carragar de notre polysaccharide.

Les enchaînements des résidus entre eux sont moins bien définis que dans le cas de la fraction $F > 100$. Cependant, les informations tirées des spectres de RMN concernant la séquence de nos oses tend à suggérer l'existence d'un seul polysaccharide hybride comportant au sein de sa chaîne principale des unités à la fois de type carraghénane et à la fois de type agarocolloïde.

IV – CONCLUSION

La nouvelle méthode de purification mise en place pour les polysaccharides sulfatés de l'algue *Asparagopsis armata* a permis de résoudre la plupart des incertitudes qui avaient été soulevées lors de l'étude structurale des polysaccharides natifs de cette algue.

En effet, la séparation des différentes chaînes saccharidiques par chromatographie échangeuse d'ions DEAE après une séparation préliminaire basée sur leur masse, a confirmé l'hétérogénéité de la répartition des groupements sulfate le long des chaînes, et a ainsi permis l'obtention de fractions beaucoup plus homogènes soumises à la caractérisation structurale.

La mise en place d'une nouvelle méthode de modification chimique de nos fractions saccharidiques a également permis de résoudre certaines ambiguïtés structurales concernant la nature des oses et de leurs sites de substitution.

Enfin, l'interprétation des spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) de ces fractions purifiées (désulfatées) est à l'origine d'informations structurales complémentaires, permettant la mise en évidence de la nature hybride de celles-ci.

Les deux fractions purifiées isolées sont relativement proches d'un point de vue structural. Généralement, seuls les pourcentages de sites substitués varient, mais l'ossature de la chaîne saccharidique principale est la même.

C'est ainsi que nous pouvons affirmer que nos fractions sont constituées d'un enchaînement régulier d'unités 3- β -D-galactopyranose et 4- α -D/L-galactopyranose. Ces unités peuvent exister telles quelles au sein de la chaîne saccharidique, mais peuvent également porter des substituants sur leurs positions libres, qui sont généralement des groupements sulfate, voire des résidus osidiques.

Nous avons ainsi pu établir que lorsque les unités 3- β -D-galactopyranose étaient sulfatées, les groupements sulfate étaient principalement situés sur les positions 2 ou 6 de ces unités, voire sur ces deux positions en même temps. Lorsqu'elles sont substituées par un groupement autre qu'un sulfate, cette substitution se fait principalement en position 6.

Concernant les unités 4- α -D/L-galactopyranose, leurs sites de sulfatation sont principalement en position 3, puis dans une moindre mesure en position 3 et 6, 3 et 2, et 2 ou 6. Quant à leur substitution, faible, elle s'effectue en position 2 ou 6.



La nature des substituants non sulfatés de ces unités saccharidiques est multiple. Il peut s'agir d'oses terminaux tels que le galactose ou le xylose, eux-mêmes éventuellement sulfatés, ou de groupements pyruvate ou méthyle.

En ce qui concerne les groupements pyruvate, mis en évidence lors de l'analyse de nos fractions par RMN, ils sont vraisemblablement placés sur des unités 3- β -D-galactopyranose incluses dans la chaîne principale. Quant aux groupements méthyle, ils seraient à priori placés en position 6 des résidus galactose, sans pouvoir toutefois déterminer à quel type d'unités (3- β -D-galactopyranose ou 4- α -D/L-galactopyranose) ils sont rattachés.

Il a également été clairement démontré par RMN que certains des résidus 3- β -D-galactopyranose étaient ramifiés en position 4 par des substituants autres que des groupements sulfate.

A l'issue de l'analyse structurale des polysaccharides natifs d'*Asparagopsis armata*, deux incertitudes avaient été soulevées.

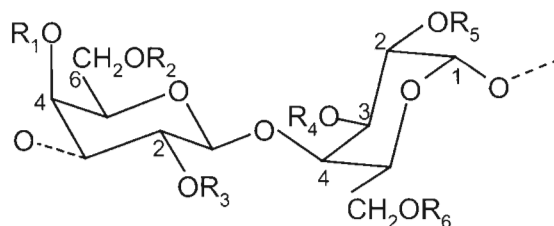
La première concernait la proportion de résidus 3- β -D-galactopyranose sulfatés en position 4 par rapport aux unités 4- α -D/L-galactopyranose sulfatées en position 3.

La méthode de modification chimique décrite au cours de ce deuxième chapitre a permis d'établir que seuls les résidus 4- α -D/L-galactopyranose étaient porteurs de groupements sulfate en position 3.

La deuxième incertitude était liée à la présence simultanée d'unités 4- α -D-galactopyranose et 4- α -L-galactopyranose au sein des polysaccharides natifs, démontrant ainsi la nature mixte ou hybride de ces derniers, les unités saccharidiques étant à la fois de type carraghénane et agarocolloïde. Aucun élément n'avait alors permis de déterminer si nous étions en présence d'un seul type de polysaccharide portant au sein de sa chaîne principale les deux types de structure, ou s'il s'agissait de deux polysaccharides distincts, proches au niveau des masses moléculaires, de leur sulfatation, etc...

L'analyse des spectres de RMN des deux fractions sélectionnées permet désormais d'affirmer que ces deux types de galactanes (carraghénanes et agarocolloïdes) coexistent au sein de la même structure, structure que l'on peut qualifier d'hybride.

Nous pouvons donc nous permettre de penser que puisque ces fractions, qui sont obtenues après plusieurs étapes de purification, sont des structures hybrides, à fortiori les polysaccharides natifs à partir desquels elles sont engendrées, le sont également.



3-β-D-galactopyranose

4-α-L-galactopyranose
(également présent sous la forme D)

	F > 100	F 10 - 100
Unités 3-β-D-galactopyranose		
R ₁ = R ₂ = R ₃ = H	20,5%	18,7%
R ₃ = SO ₃ ⁻	10,7%	16,45%
R ₂ = SO ₃ ⁻	5%	4,2%
R ₂ = R ₃ = SO ₃ ⁻	2,3%	4%
R ₂ = Substituant	3,5%	-
R ₃ = Substituant	Traces	3,3%
R ₁ = Substituant	? (RMN)	? (RMN)
Unités 4-α-D/L-galactopyranose		
R ₄ = R ₅ = R ₆ = H	11,5%	5,6%
R ₄ = SO ₃ ⁻	15,1%	20,1%
R ₅ = SO ₃ ⁻	4%	2,23%
R ₆ = SO ₃ ⁻	4%	1,4%
R ₄ = R ₅ = SO ₃ ⁻	4,8%	9,1%
R ₄ = R ₆ = SO ₃ ⁻	4,9%	3,2%
R ₅ = Substituant	Traces	Traces
R ₆ = Substituant	Traces	1,16%

Tableau 27 : Pourcentages massiques des différents types d'oses constitutifs des fractions F > 100 et F 10 – 100

D'où les structures proposées pour les polysaccharides des fractions $F > 100$ et $F 10 - 100$ (tableau 27).

La nature des substituants est multiple, il peut s'agir d'unités saccharidiques terminales de type galactose ou xylose, elles-mêmes éventuellement sulfatées, mais aussi de groupements pyruvate ou encore méthyle.

Certaines unités 3- β -D-galactopyranose sont également substituées en position 4, la réciproque (4- α -D/L-galactopyranose substitué en position 3) n'a pu être démontrée par RMN.

Au final, seule la proportion exacte d'unités 4- α -D-galactopyranose par rapport aux unités 4- α -L-galactopyranose au sein de nos polysaccharides hybrides n'a pu être établie de manière précise.

Si les dosages colorimétriques effectués sur les polysaccharides natifs laissent présager une majorité d'unités de configuration D (chapitre 1, paragraphe III-2.2.2), générant ainsi une structure à 60% de type carraghénane et à 40% de type agarocolloïde, ce sont surtout les résidus de configuration L qui ont été identifiés et caractérisés par RMN pour nos fractions purifiées, ce qui ne veut pas dire que les proportions de D- et de L-galactose déterminées pour les polysaccharides natifs ne soient plus valables dans le cas des fractions purifiées.

En effet, toutes les unités saccharidiques présentes au sein de nos fractions n'ont pu être distinctement identifiées lors de l'analyse des spectres de RMN, le fait qu'elles soient de nature identique les dotant de déplacements chimiques extrêmement proches. Ainsi, seuls les signaux les plus importants ont été pris en compte, mais ne remettent pas forcément en cause les réalités structurales établies au préalable.

En ce qui concerne la répartition de nos polysaccharides entre les différentes familles de carraghénanes et d'agarocolloïdes décrites dans la littérature, nous pouvons penser que ces derniers, outre le fait d'être de structure hybride, appartiennent également à différentes familles.

Pour la structure de type carraghénane, la présence de groupements pyruvate sur des unités 3- β -D-galactopyranose associée à la présence de groupements sulfate en position 2, ainsi que dans une moindre mesure en position 6 des unités 4- α -D/L-galactopyranose suggère la

présence d'unités saccharidiques appartenant à la famille des lambda-carraghénanes, et en particulier aux xi- et aux pi-carraghénanes.

Quant à l'attribution des autres unités saccharidiques aux différentes familles de carraghénanes, elle n'est pas possible, en raison notamment du taux important de groupements sulfate portés par les unités 4- α -D/L-galactopyranose en position 3, ce qui ne correspond à aucune famille décrite jusqu'à présent. La position de certains groupements sulfate associé au faible pourcentage de résidus 3,6-anhydrogalactose laisse toutefois supposer la présence d'unités saccharidiques de type gamma-carraghénanes ou psi-carraghénanes, elles-mêmes sulfatées de manière hétérogènes.

Nos polysaccharides ne comportent donc pas tel ou tel type de carraghénanes, mais sont plutôt construits sur la base de ces carraghénanes, qui portent en plus des groupements sulfates supplémentaires sur les positions libres restantes.

Quant à la structure de type agarocolloïde, le faible pourcentage d'unités 3,6-anhydrogalactose accompagné du fort taux de groupements sulfate oriente cette structure vers les agaroides, et en particulier vers les porphyranes, bien que la proportion d'unités 3,6-anhydrogalactose au sein de notre structure soit relativement faible pour ce type de molécules.

La structure de nos polysaccharides hybrides est donc elle-même constituée de différentes familles de carraghénanes et d'agaroides, corroborant ainsi la complexité structurale de ces derniers.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Asparagopsis armata est une algue rouge de l'ordre des Bonnemaisoniales cultivée au large de l'île d'Ouessant dans le but d'en réaliser un extrait commercial aux propriétés antibactériennes et antifongiques.

La valorisation du co-produit de fabrication de cet extrait, constitué majoritairement des parois cellulaires de l'algue, est basée sur l'exploitation des polysaccharides sulfatés contenus dans ses parois. Ce travail avait donc pour objectif la caractérisation structurale des polysaccharides pariétaux de cette algue afin de pouvoir établir une relation entre leur structure et leurs activités potentielles.

L'analyse des polysaccharides natifs de l'algue *Asparagopsis armata* a dans un premier temps apporté de nombreuses informations sur la structure de ces derniers. Il a en effet été démontré que ces polysaccharides hydrosolubles étaient constitués principalement de galactoses (majoritairement de configuration absolue D), de xyloses et d'esters sulfates.

Les techniques de modifications spécifiques telles que la méthylation ont permis de montrer que la chaîne saccharidique principale de ces polysaccharides natifs était constituée par un enchaînement régulier d'unités 3- β -D-galactopyranose liées à des unités 4- α -D/L-galactopyranose, plus ou moins substituées par des groupements sulfate ou des oses terminaux. La proportion d'unités 4- α -galactopyranose de configuration D par rapport à celles de configuration L suggère que nous soyons en présence de polysaccharides dont la structure repose à 60% sur une structure de type carraghénane, et à 40% sur une structure de type agarocolloïde. Toutefois, il n'a pas été possible de déterminer si ces deux types de structures coexistaient au sein d'une même chaîne ou sous forme de chaînes distinctes.

L'analyse des spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) a confirmé la présence de substituants de type pyruvate sur les chaînes saccharidiques, mais a également mis en évidence la complexité structurale de nos polysaccharides où de nombreuses incertitudes, notamment liées à la position des substituants, n'ont pu être élucidées par les méthodes de caractérisations structurales classiques. Nos recherches ont alors été orientées vers une purification des polysaccharides étudiés dans le but d'en simplifier l'étude structurale.

C'est ainsi que des polysaccharides de faibles masses molaires ont été préparés par dépolymérisation radicalaire. Leur caractérisation structurale réalisée après purification n'a cependant pas permis de résoudre les incertitudes soulevées lors de l'analyse des polysaccharides natifs. En effet, même si la méthode de dépolymérisation employée a engendré des oligosaccharides relativement homogènes en masse et dont la structure globale des chaînes semble conservée tant au niveau de la sulfatation que par la présence de ramifications, les études réalisées ont démontré qu'ils étaient présents sous forme d'un mélange hétérogène, et donc que les informations structurales apportées par ces oligosaccharides n'étaient pas le reflet de la structure des polysaccharides natifs.

C'est pourquoi une deuxième voie de purification des polysaccharides natifs a été envisagée. Cette dernière, basée sur la répartition hétérogène des groupements sulfate le long de la chaîne saccharidique principale couplée à une séparation préliminaire en masse des chaînes osidiques, a permis d'isoler deux fractions sur lesquelles les études structurales ont été réalisées. Les résultats obtenus pour ces deux fractions purifiées sont par extension considérés comme valables pour les polysaccharides natifs, même si ces derniers comportent éventuellement d'autres fractions saccharidiques supplémentaires.

Cette deuxième méthode de purification a permis de confirmer l'hétérogénéité des polysaccharides natifs, notamment en raison de la répartition irrégulière des groupements sulfate le long de leur chaîne saccharidique. Elle a également permis de lever la plupart des incertitudes concernant la structure de ces polysaccharides. En particulier, il a été démontré que nos chaînes saccharidiques étaient constituées d'un enchaînement régulier d'unités 3- β -D-galactopyranose et 4- α -D/L-galactopyranose. Les premières sont éventuellement sulfatées en position 2 et/ou 6, et les secondes principalement en position 3.

L'analyse de ces fractions par spectroscopie de RMN a permis de démontrer la présence simultanée d'unités 4- α -galactopyranose de configuration D et L, ce qui confirme la nature hybride de nos polysaccharides dont les unités saccharidiques de type carraghénane et agarocolloïde coexistent au sein de la même structure. La présence de substituants a également été mise en évidence par RMN. En particulier, la présence de groupements pyruvate sur les unités galactose appartenant à la chaîne osidique principale, ainsi que la présence de groupements méthyle portés probablement sur la position 6 des résidus galactose ont été clairement établies.

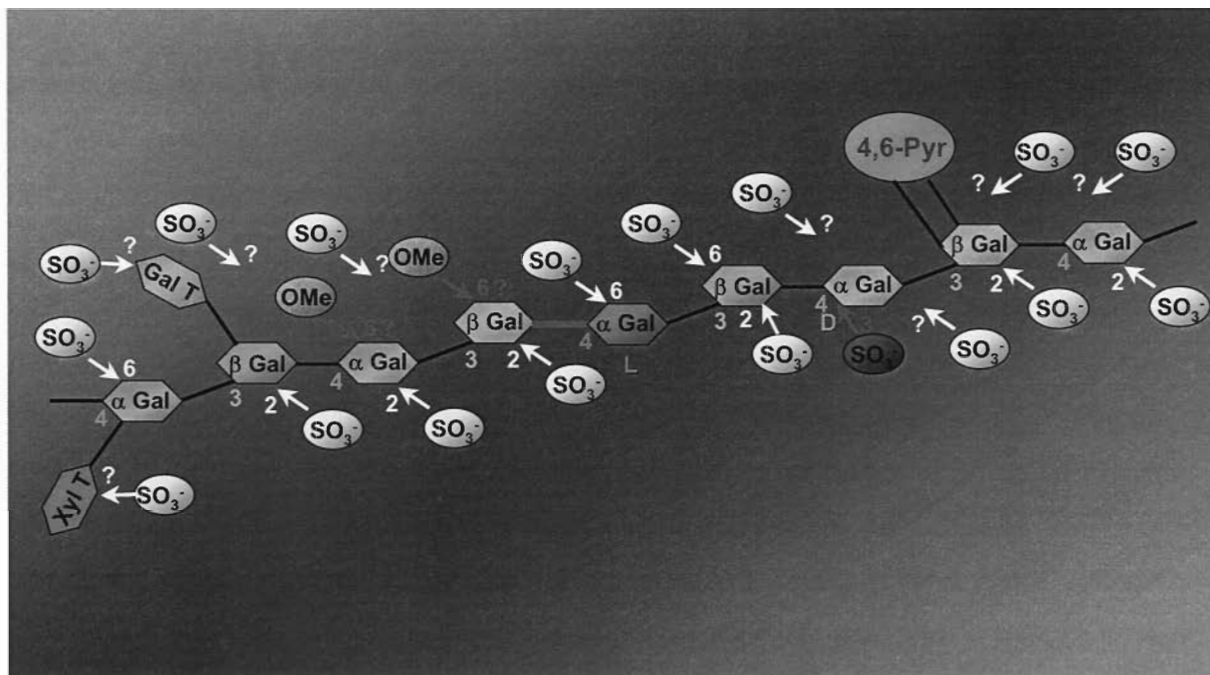


Schéma 2 : Hypothèse de structure des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata*

Enfin, la présence d'oses terminaux, galactoses ou xyloses éventuellement sulfatés, est également démontrée sans ambiguïté, confirmant la présence de ramifications sur la chaîne principale.

Les polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* sont donc des galactanes sulfatés hydrosolubles, polysaccharides hybrides comportant à la fois des structures de type agarocolloïde et carraghénane (schéma 2).

En raison du faible pourcentage des résidus 3,6-anhydrogalactose, ainsi que de la forte proportion de groupements sulfate présents, la structure de la partie agarocolloïde de ces polysaccharides est assimilée à celle des agaroides. En particulier, elle est relativement proche de celle des porphyranes.

Quant à la structure de type carraghénane, elle est constituée de différentes familles. La présence de groupements pyruvate sur les unités 3- β -D-galactopyranose de la chaîne principale associée à la présence de groupements sulfate sur leur position 2 évoque l'existence au sein de nos chaînes saccharidiques d'unités appartenant à la famille des lambda-carraghénanes, et tout particulièrement de xi- et pi-carraghénanes. Mais l'attribution des autres unités saccharidiques aux différentes familles de carraghénanes est difficile en raison de la sulfatation multiple et aléatoire de ces unités. En effet, la présence importante d'unités 4- α -D/L-galactopyranose fortement sulfatées en position 3 ne permet pas d'établir l'appartenance de nos polysaccharides à une famille de carraghénanes particulière. La présence d'unités de type gamma-carraghénanes ou psi-carraghénanes sulfatées de manière hétérogène sur les positions libres restantes doit néanmoins être envisagée.

Les résultats obtenus au cours de la caractérisation des polysaccharides pariétaux d'*Asparagopsis armata* nous permettent donc d'affirmer que la structure de ces polysaccharides hybrides est elle-même constituée d'agaroides et de carraghénanes de différentes familles, ce qui corrobore l'hypothèse de polysaccharides hétérogènes au niveau structural.

Si les informations apportées par cette première caractérisation structurale sont importantes, elles restent néanmoins incomplètes. En effet, la question qui peut être posée à l'issue de nos recherches est l'existence ou non d'une unité de répétition pour nos polysaccharides. Ainsi, aucune information n'a été obtenue en ce qui concerne l'agencement des différentes familles de carraghénanes et d'agaroides au sein des chaînes de ces

polysaccharides hybrides. En particulier, rien ne nous indique que nous ne sommes pas en présence d'une chaîne saccharidique principale de type carraghénane, et que la structure de type agaroïde soit présente exclusivement sous forme de ramifications.

Pour répondre à cette question, il serait nécessaire d'obtenir des informations structurales complémentaires. D'autres méthodes de purification devront ainsi être envisagées dans le but d'approfondir cette analyse structurale et de réaliser des fractions saccharidiques plus homogènes dans le cas d'applications industrielles éventuelles.

L'étude de la voie de biosynthèse de ces polysaccharides pourrait également nous apporter des informations sur l'origine d'une telle complexité et peut-être même nous permettre à terme l'isolement d'enzymes spécifiques à nos polysaccharides, permettant ainsi de poursuivre leur caractérisation structurale. C'est pourquoi, l'utilisation d'enzymes spécifiques de ces familles associée à des méthodes de purification adaptées pourrait permettre de conclure quant à la répartition de ces différentes familles en fonction des fractions engendrées. En particulier, elle permettrait de déterminer si elles sont présentes sous forme de « blocs » de copolymères au sein de notre structure, séparées par des zones de jonction, ou si elles sont situées de manière polydispersée le long de la chaîne saccharidique. Les fractions engendrées par le biais de cette méthode étant a priori plus homogènes, leur caractérisation par spectroscopie de RMN permettrait ainsi de compléter les données structurales obtenues jusqu'à présent.

Des informations structurales complémentaires pourraient également être obtenues à partir des fractions purifiées générées dans le cadre de la deuxième méthode de purification exploitée. L'utilisation d'une méthode de dépolymérisation à définir, conservant l'intégrité de la structure pourrait être appliquée à ces fractions. Après une séparation préliminaire des oligosaccharides engendrés basée sur leurs masses par chromatographie de filtration sur gel par exemple, une seconde purification plus spécifique pourrait alors être envisagée. En particulier, une séparation des oligosaccharides basée sur leur différence de pKa par chromatographie ionique de type Dionex pourrait constituer une excellente voie de purification, et permettrait ainsi la séparation des différents produits d'un même degré de polymérisation. L'analyse des spectres de RMN de ces fractions purifiées pourrait également apporter des informations structurales, complémentaires des données déjà collectées.

Quant aux applications potentielles des polysaccharides pariétaux de l'algue *Asparagopsis armata*, les molécules natives et dépolymérisées ont été testées, ou sont en cours de tests dans les deux principaux domaines que sont la cosmétologie et la pharmacologie. Aucune évaluation concernant d'éventuelles propriétés texturantes en agro-alimentaire n'a été réalisée. En effet, ce domaine est déjà largement couvert par l'exploitation massive de certaines algues rouges pour leurs carraghénanes aux propriétés rhéologiques.

Nous nous sommes donc orientés vers des domaines de plus haute valeur ajoutée, notamment afin de compenser les coûts générés par d'éventuelles purifications ou modifications structurales. En effet, il a été précisé au sein de la synthèse bibliographique que les polysaccharides natifs de haut poids moléculaire devaient être dépolymérisés afin de perdre leur propriétés texturantes, et en particulier leur viscosité, pour pouvoir agir en tant que principe actif sous forme d'oligosaccharides alors diffusibles au sein de l'organisme et des tissus. La dépolymérisation par voie radicalaire ayant engendré des oligosaccharides dont la structure globale est conservée par rapport aux polysaccharides natifs, ce sont ces derniers qui ont été envoyés dans les phases d'évaluation.

L'évaluation de l'activité anti-tumorale des polysaccharides natifs a été effectuée *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines hématologiques de type lymphoïdes B (Daudi, Raji) et T (Jurkat). Aucune inhibition de prolifération cellulaire n'a été détectée en présence de ces polysaccharides. L'activité anti-tumorale des oligosaccharides correspondants est en cours d'évaluation.

De manière identique, certaines fractions dépolymérisées ont été testées dans le domaine des anticoagulants sans qu'une activité plus importante que celle engendrée par l'héparine ou tout autre polysaccharide d'origines algale (fucanes) ou bactérienne connu ait été observée.

Dans le domaine de la cosmétologie, et en particulier de la dermo-cosmétique, ces mêmes polysaccharides natifs et modifiés sont en cours d'évaluation pour des applications dans les domaines de la couperose (micro-activation de la circulation sanguine) et des activités anti-inflammatoires. Des résultats sont attendus pour la fin du premier semestre 2004.

Enfin, des études ont également été réalisées dans les domaines des anti-oxydants et anti-âge, sans résultats probants à ce jour.

De nombreux domaines d'application peuvent encore être envisagés pour les polysaccharides natifs d'*Asparagopsis armata* ainsi que pour leurs oligosaccharides générés par dépolymérisation radicalaire.

Toutefois, les connaissances structurales acquises au cours de ce travail permettent d'ores et déjà d'envisager des modifications chimiques afin de purifier ces polymères, voire considérer l'introduction de groupements fonctionnels tels que les sulfates ou les phosphates dans le but d'exacerber leurs activités potentielles, la connaissance de la relation structure/fonction d'un polysaccharide étant une étape clé pour sa valorisation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akari, C. (1966).** Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes. *Proceedings of the international seaweed symposium* **5**, 3-17.
- Anderson, N. S. & Rees, D. A. (1965).** *Journal of Chemical Society*, 5880-5887.
- Anderson, N. S. & Rees, D. A. (1966).** The repeating structure of some polysaccharide sulfates from red seaweeds. In *Proceedings of the Vth International Seaweed Symposium*, pp. 243-249. Edited by M. Gordon Young E., J. L. Halifax: Pergamon Press.
- Anderson, N. S., Dolan, T. C. S. & Rees, D. A. (1973).** Carrageenans. Part VII. Polysaccharides from *Euचेuma spinosum* and *Euचेuma cottonii*. The covalent structure of iota-carrageenan. *J. Chem. Soc.*, 2173-2176.
- Anderson, N. S., Dolan, T. C. S., Lawson, C. J., Penman, A. & Rees, D. A. (1968).** Carrageenans. Part V. The masked repeating structures of lambda and mu-carrageenans. *Carbohydrate Research* **7**, 468-473.
- Aspinall, G. O. (1982).** Chemical characterization and structure determination of polysaccharides. In *The Polysaccharides*, pp. 35-131. Edited by A. G. O. (ed). Orlando: Academic Press Inc.
- Atkins, E. D. & Parker, K. D. (1969).** The helical structure of a beta-1,3 xylan. *J. Polymer Sci.* **C28**, 69-81.
- Baba, M., Schols, D., Pauwels, R., Nakashima, H. & De Clercq, E. (1990).** Sulfated polysaccharides as potent inhibitors of HIV-induced syncytium formation: a new strategy towards AIDS chemotherapy. *J. Acquir Immune Defic Syndr.* **3**, 493-499.
- Barber, G. A. (1971).** The synthesis of L-galactose by plant enzyme systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 619-623.
- Barker, S. A., Hurst, R. E., Settine, J., Fish, F. P. & Settine, R. L. (1984).** *Carbohydrate Research* **125**, 291-300.
- Beck, G. M., Neau, S. H., Holder, A. J. & Hemenway, J. N. (2000).** Evaluation of quantitative structure property relationships necessary for enantioresolution with lambda- and sulfobutylether lambda-carrageenan in capillary electrophoresis. *Chirality* **12**, 688-696.
- Bellion, C., Hamer, G. K. & Yaphe, W. (1982).** The degradation of *Euचेuma spinosum* and *Euचेuma cottonii* carrageenans by iota-carrageenase and kappa-carrageenase from marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **28**, 874-880.

- Biard, J. F., Verbist, J. F., Le Boterff, J., Ragas, G. & Lecocq, M. (1980).** Algues fixées de la côte atlantique française contenant des substances antibactériennes et antifongiques. *Planta medica*, 136-151.
- Bixler, H. J. (1996).** Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan. *Hydrobiologia* **326-327**, 35-57.
- Blakeney, A. B. & Stone, B. A. (1985).** Methylation of carbohydrates with lithium methylsulfinyl carbanion. *Carbohydrate Research* **140**, 319-324.
- Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G. (1973).** New methods for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* **54**, 484-489.
- Bonin, D. R. & Hawkes, M. W. (1987).** Systematics and life histories of New Zealand Bonnemaisoniaceae (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) : I. The genus *Asparagopsis*. *N. Z. J. Bot.* **25**, 577-590.
- Braun, M., Carporiccio, B., Vendrell, J. P., Vignaud, M., Chalet, M., Codomier, L., Teste, J. & Catayee, G. (1983).** Action d'un polysaccharide sulfaté acide, "l'armatan", sur la stimulation lymphocytaire. *C. R. Soc. Biol.* **177**, 646-652.
- Bruneau, Y. (1977).** Contribution à l'étude chimique des constituants d'une algue rouge : *Asparagopsis armata* (Harv.) et de son tétrasporophyte *Falkenbergia rufolanosa* (Harv.) Schmitz. Thèse. In *Université des Sciences et Techniques du Languedoc. Centre Universitaire de Perpignan*, pp. 137. Perpignan.
- Bruneau, Y., Codomier, L., Combaut, G. & Teste, J. (1978).** Etude comparative des composés halogénés du *Falkenbergia rufolanosa* (Harv.) Schmitz et de l'*Asparagopsis armata* (Harv.) : Rhodophycées bonnemaisoniales. *C. R. Acad. Sc. Paris* **286**, 603-605.
- Cabioc'h, J., Floch, J.-Y., Le Toquin, a., Boudouresque, C.-F., Meinesz, A. & Verlaque, M. (1992).** *Guide des algues des mers d'europe*: Delachaux et Niestlé. pp.232.
- Caceres, P. J., Carlucci, M. J., Damonte, E. B., Matsuhira, B. & Zuniga, E. A. (2000).** Carrageenans from chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phylloporaceae): structural analysis and biological activity. *Phytochemistry* **53**, 81-86.
- Carlucci, M. J., Ciancia, M., Matulewicz, M. C., Cerezo, A. S. & Damonte, E. B. (1999).** Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. *Antiviral Research* **43**, 93-102.
- Carlucci, M. J., Pujol, C. A., Ciancia, M., Nosedá, M. D., Matulewicz, M. C., Damonte, E. B. & Cerezo, A. S. (1997).** Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *Int J Biol Macromol.* **20**, 97-105.
- Carpita, N. C. & McCann, M. (2000).** The cell wall. In *Biochemistry and Molecular Biology of plants.*, pp. 52-108. Edited by B. Buchanan, Gruissem, W., Jones, R. Eds: American Society of Plant Physiologists.

- Carporiccio, B., Braun, M., Vignaud, M., Chalet, M., Teste, J., Codomier, L. & Catayee, G. (1983).** Particularités de l'action d'un polysaccharide sulfaté acide sur la coagulation globale du sang *in vitro*. Etude préliminaire chez différentes espèces de Mammifères dont l'Homme. *C. R. Soc. Biol.* **177**, 412-420.
- Carporiccio, B., Braun, M., Vignaud, M., Chalet, M., Codomier, L., Teste, J. & Catayee, G. (1984).** Action d'un polysaccharide sulfaté sur la coagulabilité globale du sang. Etude *in vivo* chez le rat. *C. R. Soc. Biol.* **178**, 691-696.
- Cassab, G. I. (1998).** Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 281-309.
- Chanzy, H. (1990).** Aspects of cellulose structure. In *Cellulose Sources and Exploitation*, pp. 3-12. Edited by P. G. O. W. P. A. Kennedy J.F. New York: Ellis Harwood Ltd.
- Chen, L. C. M., McLachlan, J., Neish, A. L. & Shacklok, P. F. (1973).** The ratio of kappa- to lambda-carrageenan in nuclear phases of rhodophycean algae, *Chondrus crispus* and *Gigartina stellata*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* **53**, 11-16.
- Chevolot, L., Mulloy, B., Ratiskol, J., Foucault, A. & Collic-Jouault, S. (2001).** A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydrate Research* **330**, 529-535.
- Chiovitti, A., Bacic, A., Craik, D. J., Munro, S. L. A., Kraft, G. T. & Liao, M.-L. (1997).** Cell-wall polysaccharides from Australian red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): novel, highly pyruvated carrageenans from the genus *Callophycus*. *Carbohydrate Research* **299**, 229-243.
- Ciancia, M., Matulewicz, M. C. & Cerezo, A. S. (1993).** L-galactose containing galactans from the carrageenophyte *Gigartina skottsbergii*. *Phytochemistry* **34**, 1541-1543.
- Ciancia, M., Matulewicz, M. C. & Cerezo, A. S. (1997).** A L-galactose-containing carrageenan from the cystocarpic *Gigartina skottsbergii*. *Phytochemistry* **45**, 1009-1013.
- Codomier, L., Bruneau, Y., Combaut, G. & Teste, J. (1977).** Etude biologique et chimique d'*Asparagopsis armata* et de *Falkenbergia rufolanosa* (Rhodophycées bonnemaisoniales). *C. R. Acad. Sc. Paris* **284**, 1163-1165.
- Codomier, L., Chevalier, S., Jupin, H., Francisco, C. & Banaigs, B. (1983).** Rhodophycées à ioduques et Rhodophycées à bromuques. Etude réalisée à la microsonde électronique. *Biol. Cell.* **48**, 75-80.
- Combaut, G., Bruneau, Y., Teste, J. & Codomier, L. (1978).** Composés halogénés d'une algue rouge, *Falkenbergia rufolanosa* tetrasporophyte d'*Asparagopsis armata*. *Phytochemistry* **17**, 1661-1663.
- Cosson, J., Deslandes, E., Zinoun, M. & Mouradi-Givernaud, A. (1995).** Carrageenans and agars, red algal polysaccharides. *Progress in phycological Research* **11**, 269-324.

- Craigie, J. S. (1990).** Cell walls. In *Biology of the Red Algae*, pp. 221-257. Edited by K. M. Cole & R. G. Sheath. Cambridge: University Press.
- Craigie, J. S., Wen, Z. C. & Van der Meer, J. P. (1984).** Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the composition of agars from *Gracilaria* spp. *Botanica Marina* **27**, 55-61.
- Craigie, J. S. & Wong, H. (1978).** *Proceedings of the international seaweed symposium* **9**, 369-377.
- Damonte, E. B., Matulewicz, M. C., Cerezo, A. S. & Coto, C. E. (1996).** Herpes simplex Virus-Inhibitory sulfated xylogalactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. *Chemotherapy* **42**, 57-64.
- David, S. (1995).** *Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres*. pp. 300. Edited by InterEditions & CNRS Editions. Paris.
- Dawes, C. J., Stanley, N. I. & Stancioff, D. J. (1977).** Seasonal and reproductive aspects of plant chemistry, and iota-carrageenan from floridian *Eucheuma* (Rhodophyta, Gigartinales). *Botanica Marina* **20**, 137-147.
- De Reviere, B. (2002).** Biologie et phylogénie des algues. pp. 352. Edited by BELIN. Paris: Belin Sup.
- De Ruiter, G. A. & Rudolph, B. (1997).** Carrageenan biotechnology. *Trends in Food Science & Technology* **8**, 389-395.
- De Valéra, M. (1942).** A red alga new to Ireland : *Asparagopsis armata* Harvey on the west coast. *Irish Naturalists' Journal* **8**, 30-33.
- Dea, I. C. M. & Morrison, A. (1975).** Chemistry and interactions of seed galactomannans. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, pp. 241-312. Edited by R. S. Tipson, Horton, D. New York: Academic Press.
- Deacon-Smith, R. A., Lee-Potter, J. P. & Rodgers, D. J. (1985).** Anticoagulant activity in Extracts of British Marine Algae. *Botanica Marina* **28**, 333-338.
- Dininno, V. L., McCandless, E. L. & Bell, R. A. (1979).** Pyruvic acid derivative of a carrageenan from a marine red alga (*Petrocelis* sp.). *Carbohydrate Research* **71**, C1-C4.
- Dische, Z. (1962).** Color Reactions of Carbohydrates. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Vol. 1. Edited by R. L. Whistler, Wolfrom, M. L. eds. New York: Academic Press Inc.
- Doares, S. H., Albersheim, P. & Darvill, A. G. (1991).** An improved method for the preparation of standards for glycosyl-linkage analysis of complex carbohydrates. *Carbohydrate Research* **210**, 311-317.

- Doty, M. S. & Santos, G. A. (1978).** Carrageenans from the tetrasporic and cystocarpic *Eucheuma* species. *Aquat. Bot.* **4**, 143-149.
- Duarte, M. E., Cardoso, M. A., Nosedá, M. D. & Cerezo, A. S. (2001).** Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydrate Research* **333**, 281-293.
- Duarte, M. E. R., Nosedá, M. D., Cardoso, M. A., Tulio, S. & Cerezo, A. S. (2002).** The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. *Carbohydrate Research* **337**, 1137-1144.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956).** *Analytical Chemistry* **28**, 350-356.
- Errea, M. I. & Matulewicz, M. C. (2003).** Unusual structures in the polysaccharides from the red seaweed *Pterocliadiella capillacea* (Gelidiaceae, Gelidiales). *Carbohydrate Research* **338**, 943-953.
- Estevez, J. M., Ciancia, M. & Cerezo, A. S. (2000).** The system of low-molecular-weight carrageenans and agaroids from the room-temperature-extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. *Carbohydrate Research* **325**, 287-299.
- Exsymol, S., Algues et Mer, S. & Océalys, S. (1995).** Extraction de composés organiques de silicium biologiquement actifs d'origine algale: Brevet : 9503577.
- Falshaw, R. & Furneaux, R. H. (1994).** Carrageenan from the tetrasporic stage of *Gigartina decipiens* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Carbohydrate Research* **252**, 171-182.
- Falshaw, R. & Furneaux, R. H. (1995).** Carrageenans from the tetrasporic stages of *Gigartina clavifera* and *Gigartina alveata* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Carbohydrate Research* **276**, 155-165.
- Falshaw, R. & Furneaux, R. H. (1998).** Structural analysis of carrageenans from the tetrasporic stages of the red algae, *Gigartina lanceata* and *Gigartina chapmanii* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Carbohydrate Research* **307**, 325-331.
- Falshaw, R., Bixler, H. J. & Johndro, K. (2001).** Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts, I - Structure analysis. *Food Hydrocolloids* **15**, 441-452.
- Falshaw, R., Bixler, H. J. & Johndro, K. (2003a).** Structure and performance of commercial -2 carrageenan extracts. Part III. Structure analysis and performance in two dairy applications of extracts from the New Zealand red seaweed, *Gigartina atropurpurea*. *Food Hydrocolloids* **17**, 129-139.
- Falshaw, R., Furneaux, R. H. & Wong, H. (2003b).** Analysis of pyruvylated -carrageenan by 2D NMR spectroscopy and reductive partial hydrolysis. *Carbohydrate Research* **338**, 1403-1414.

- Falshaw, R., Furneaux, R. H., Wong, H., Liao, M.-L., Bacic, A. & Chandkrachang, S. (1996). Structural analysis of carrageenans from Burmese and Thai samples of *Catenella nipae* Zanardini. *Carbohydrate Research* **285**, 81-98.
- Farias, W. R. L., Valente, A. P., Pereira, M. S. & Mourao, P. A. S. (2000). Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 29299-29307.
- Feldmann, J. & Feldmann, G. (1939). Sur la structure des cellules axiales de *Asparagopsis armata* Harvey. *C. R. Acad. Sc.* **208**, 1743-1745.
- Feldmann, J. & Feldmann, G. (1942). Recherches sur les Bonnemaisoniacées et leur alternance de générations. *Ann. Sc. Nat.* **11**, 76-175.
- Filali-Mouhim, R. & Hours, M. (1995). Les activités antivirales des polysaccharides sulfatés. *Acta bot. Gallica* **142**, 125-130.
- Filisetti-Cozzi, T. M. C. C. & Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* **197**, 157-162.
- Foord, S. A. & Atkins, E. D. (1989). New X-ray diffraction results from agarose : extended single helix structures and implications for gelation mechanism. *Biopolymers* **28**, 1345-1365.
- Franz, G. & Blaschek, W. (1990). Cellulose. In *Methods in Plant Biochemistry*, pp. 291-322. Edited by P. M. Dey, Harbone, J. B.,: Academic Press.
- Furneaux, R. H. & Stevenson, T. T. (1990). The xylogalactan sulfate from *Chondria macrocarpa* (Ceramiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* **204/205**, 615-620.
- Garon, S. (1999). DESS. Valorisation cosmétique et pharmaceutique d'une algue marine cultivée : *Asparagopsis armata*. pp. 27. In *Laboratoire de Pharmacognosie*. Reims: UFR Pharmacie.
- Gerwig, G. J., Kamerling, J. P. & Vliegenhart, J. F. G. (1978). Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary G.L.C. *Carbohydrate Research* **62**, 349-357.
- Girond, S., Crance, J. M., Van Cuyck-Gandre, H., Renaudet, J. & Deloince, R. (1991). Antiviral activity of carrageenan on hepatitis A virus replication in cell culture. *Res. Virol.* **142**, 261-270.
- Goldstein, I. J., Hay, G. W., Lewis, B. A. & Smith, F. (1965). Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction, and hydrolysis. *Meth. Carbohydr. Chem.* **5**, 361-370.
- Goncalves, A. G., Ducatti, D. R. B., Duarte, M. E. R. & Nosedá, M. D. (2002). Sulfated and pyruvylated disaccharide alditols obtained from a red seaweed galactan: ESIMS and NMR approaches. *Carbohydrate Research* **337**, 2443-2453.

- Goulard, F., Diouris, M., Deslandes, E. & Floch, J.-Y. (1999).** Nucleotides, nucleoside sugars and UDP-glucose-4-epimerase activity in the iota-carrageenophytes *Soliera chordalis* and *Calliblepharis jubata* (Rhodophyceae). *Eur. J. Phycol.* **34**, 21-25.
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C. & Thom, D. (1973).** Biological interactions between polysaccharides and divalent cations : the egg-box model. *FEBS Letters* **32**, 195-198.
- Greer, C. W. & Yaphe, W. (1984).** Characterization of hybrid (beta-kappa-gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatinae* J. Agardh (Rhodophyta, Solieriaceae) using carrageenases, infrared and ¹³C N.M.R. spectroscopy. *Botanica Marina* **27**, 473-478.
- Gretz, M. R., Sommerfeld, M. R. & Aronson, J. M. (1982).** Cell wall composition of the generic phase of *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta). *Botanica Marina* **25**, 529-535.
- Guenet, J.-M., Rochas, C. & Brûlet, A. (1993).** Molecular structures in biopolymers sols and gels. *Journal de Physique* **3**, 99-102.
- Hakomori, S. (1964).** A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **55**, 205-208.
- Hamel, G. (1927).** Quelques algues rares ou nouvelles pour la flore méditerranéenne. *Bull. du Muséum* **32**, 420.
- Harding, S. E., Hill, S. E. & Mitchell, J. R. (1995).** Biopolymer mixtures. Edited by N. U. Press. Nottingham.
- Harris, P. J., Henry, R. J., Blakeney, A. B. & Stone, B. A. (1984).** An improved method for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydrate Research* **127**, 59-73.
- Harvey, W. H. (1855).** Some account of the marine botany of the colony of Western Australia. *Transactions of the Royal Irish Academy* **22**, 525-566.
- Haslin, C., Lahaye, M. & Pellegrini, M. (2000).** Chemical composition and structure of sulphated water-soluble cell-wall polysaccharides from the gametic, carposporic and tetrasporic stages of *Asparagopsis armata* Harvey (Rhodophyta, Bonnemaisoniaceae). *Botanica Marina* **43**, 475-482.
- Haslin, C., Lahaye, M., Pellegrini, M. & Chermann, J.-C. (2001).** In vitro anti-HIV activity of sulphated cell-wall polysaccharides from gametic, carposporic and tetrasporic stages of the mediterranean red alga *Asparagopsis armata*. *Planta medica* **67**, 301-305.
- Hayashi, K., Hamada, J. & Hayashi, T. (1996).** A screening strategy for selection of anti-HSV-1 and anti-HIV extracts from algae. *Phytotherapy Research* **10**, 233-237.
- Hellerqvist, C. G. (1990).** Linkage analysis using Lindberg method. *Methods in Enzymology* **193**, 554-573.

- Hirase, S. & Watanabe, K. (1972a).** Fractionation and structural investigation of funoran. In *Proceedings of the VIIth International Seaweed Symposium*, pp. 451-454. Edited by K. Nisizawa. Sapporo: University of Tokyo Press.
- Hirase, S. & Watanabe, J. (1972b).** The presence of pyruvate residues in carrageenan and a similar polysaccharide. *Bulletin of the Institute of Chemical Research* **50**, 332-336.
- Hoffman, R. (1993).** Carrageenans inhibit growth factor binding. *Biochem. J.* **289**, 331-334.
- Hoffman, R. & Paper, D. H. (1995).** Selective inhibition of cell proliferation and DNA synthesis by the polysulfated carbohydrate iota-carrageenan. *Canc. Chemother. Pharmacol.* **36**, 325-334.
- Hosford, S. P. C. & McCandless, E. L. (1975).** Immunochemistry of carrageenans from gametophytes and sporophytes of certain red algae. *Can. J. Bot.* **53**, 2835-2841.
- Inoue, Y. & Nagasawa, K. (1976).** Selective *n*-desulfation of heparin with dimethyl sulfoxide containing water or methanol. *Carbohydrate Research* **46**, 87-95.
- Iriki, Y., Suzuki, T., Nisizawa, K. & Miwa, T. (1960).** Xylan of siphonaceous green algae. *Nature* **187**, 82-83.
- Jacques, L. B., Ballieux, R. E., Dietrich, C. P. & Kavanagh, L. W. (1968).** A microelectrophoresis method for heparin. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **46**, 351-360.
- Kamerling, J. P., Gerwig, G. J., Vliegenhart, J. F. G. & Clamp, J. R. (1975).** Characterization by gas-liquid chromatography mass spectrometry of permethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids. *Biochemical Journal* **151**, 491-495.
- Kano, N., Sato, M. & Sato, Y. (1990).** Purification and properties of adenosine 5'-phosphosulfate kinase from the marine red macroalga *Porphyra yezoensis* Ueda. *Botanica Marina* **33**, 369-374.
- Kloareg, B. & Quatrano, R. S. (1988).** Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* **26**, 259-315.
- Knutsen, S. H. & Grasdalen, H. (1987).** Characterization of water-extractable polysaccharides from norwegian *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour. (Gigartinales, Rhodophyceae) by IR and NMR spectroscopy. *Botanica Marina* **30**, 497-505.
- Knutsen, S. H., Myslabodski, D. E., Larsen, B. & Usov, A. I. (1994).** A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica Marina* **37**, 163-169.
- Kolender, A. A. & Matulewicz, M. C. (2002).** Sulfated polysaccharides from the red seaweed *Georgiella confluens*. *Carbohydrate Research* **337**, 57-68.

- Kovensky, J., Covian, J. A. & Fernandez Cirelli, A. (1990).** A suitable method for a rapid estimation of sulphated positions in polysaccharides of pharmacological interest. *Carbohydrate Polymers* **12**, 307-314.
- Kvernheim, A. L. (1987).** Methylation analysis of polysaccharides with butyllithium in dimethyl sulfoxide. *Acta Chemica Scandinavia* **B41**, 150-152.
- Lahaye, M. (2001a).** Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *Journal of Applied Phycology* **13**, 173-184.
- Lahaye, M. (2001b).** Chemistry and physico-chemistry of phycocolloids. *Cah. Biol. Mar.* **42**, 137-157.
- Lawson, C. J. & Rees, D. A. (1970).** An enzyme for the metabolic control of polysaccharide conformation and function. *Nature* **227**, 392-393.
- Lawson, C. J., Rees, D. A., Stancioff, D. J. & Stanley, N. I. (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.*, 2177-2182.
- Leloir, L. F. (1964).** Nucleoside diphosphate sugars and saccharide synthesis. *Biochem. J.* **91**, 1-8.
- Leloir, L. F. (1971).** Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. *Science* **172**, 1299-1303.
- Leontein, K., Lindberg, B. & Lönnngren, J. (1978).** Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols. *Carbohydrate Research* **62**, 359-362.
- Liao, M.-L., Chiovitti, A., Munro, S. L. A., Craik, D. J., Kraft, G. T. & Bacic, A. (1996).** Sulfated galactans from Australian specimens of the red alga *Phacelocarpus peperocarpus* (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydrate Research* **296**, 237-247.
- Lindberg, B. (1972).** Methylation analysis of polysaccharides. *Methods in Enzymology* **28**, 178-195.
- Lloyd, A. G., Dogson, K. S., Price, R. G. & Rose, F. A. (1961).** Infrared studies on sulphate esters. I. Polysaccharide sulphates. *Biochem. Biophys. Acta* **46**, 108-115.
- Maeda, M., Uehara, T., Harada, N., Sekiguchi, M. & Hiraoka, A. (1991).** Heparinoid-active sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their distribution in the Chlorophyta. *Phytochemistry* **30**, 3611-3614.

- Manley, S. & Burns, D. J. (1991).** Formation of nucleoside diphosphate monosaccharides (NDP-sugars) by the agarophyte *Pterocladia capillacea* (Rhodophyceae). *J. Phycol.* **27**, 702-709.
- Matsuhiro, B. & Urzua, C. C. (1992).** Heterogeneity of carrageenans from *Chondrus crispus*. *Phytochemistry* **31**, 531-534.
- Matulewicz, M. C., Ciancia, M., Nosedá, M. D. & Cerezo, A. S. (1989).** Carrageenan systems from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. *Phytochemistry* **28**, 2937-2941.
- Matulewicz, M. C., Ciancia, M., Nosedá, M. D. & Cerezo, A. S. (1990).** Methylation analysis of carrageenan from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. *Phytochemistry* **29**, 3407-3410.
- Mauray, S., Sternberg, C., Theveniaux, J., Millet, J., Siquin, C., Tapon-Brethaudiere, J. & Fischer, A. (1995).** Venous antithrombotic and anticoagulant activities of a fucoidan fraction. *Thrombosis and haemostasis* **74**, 1280-1285.
- McCandless, E. L. (1978).** Modern approaches to the taxonomy of red and brown Algae. pp. 63-85. Edited by D. E. G. I. J. H. Price. New York: Academic Press.
- McCandless, E. L. & Craigie, J. S. (1974).** Reevaluation of seasonal factors involved in carrageenan production by *Chondrus crispus* : carrageenans of carpospororic plants. *Botanica Marina* **27**, 125-129.
- McCandless, E. L., Craigie, J. S. & Walter, J. A. (1973).** Carrageenans in the gametophytic and sporophytic stages of *Chondrus crispus*. *Planta medica* **112**, 201-212.
- McCandless, E. L., Craigie, J. S. & Hansen, J. E. (1975).** Carrageenans of gametangial and tetraspororangial stages of *Iridaea cordata* (Gigartinaceae). *Can. J. Bot.* **53**, 2315-2318.
- McCandless, E. L., West, J. A. & Guiry, M. D. (1982).** Carrageenan pattern in the Phylloporaceae. *Biochem. Syst. Biol.* **10**, 275-284.
- McCandless, E. L., West, J. A. & Guiry, M. D. (1983).** Carrageenan patterns in the Gigartinaceae. *Biochem. Syst. Biol.* **11**, 175-182.
- McConnell, O. & Fenical, W. (1977).** Halogen chemistry of the red alga *Asparagopsis*. *Phytochemistry* **16**, 367-374.
- Melo, M. R. S., Feitosa, J. P. A., Freitas, A. L. P. & de Paula, R. C. M. (2002).** Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydrate Polymers* **49**, 491-498.
- Miller, I. J. (2001).** The Structure of the Carrageenan Extracted from the Tetrasporophytic Form of *Stenogramme interrupta* as Determined by ¹³C NMR Spectroscopy. *Botanica Marina* **44**, 583-587.

- Miller, I. J. & Blunt, J. W. (1998).** Desulfation of algal galactans. *Carbohydrate Research* **309**, 39-43.
- Miller, I. J., Falshaw, R. & Furneaux, R. H. (1995).** Structural analysis of the polysaccharide from *Pachymenia lusoria* (Cryptonemiaceae, Rhodophyta). *Carbohydrate Research* **268**, 219-232.
- Miller, J. G. & Fry, S. C. (2001).** Characteristics of xyloglucan after attack by hydroxyl radicals. *Carbohydrate Research* **332**, 389-403.
- Moigne, J.-Y. (1996).** Extrait d'algues, composition cosmétiques comportant un tel extrait et utilisation de cet extrait en tant qu'agent antibactérien et/ou antifongique: Brevet n° FR 2 753 101.
- Mollion, J., Moreau, S. & Christiaen, D. (1986).** Isolation of a new type of carrageenan from *Rissoella verruculosa* (Bert.) J. Ag. (Rhodophyta, Gigartinales). *Botanica Marina* **29**, 549-552.
- Montreuil, J. & Spik, G. (1963).** Microdosage des glucides. Fascicule 1 : Méthodes colorimétrique de dosage des glucides totaux. *Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences et Techniques*.
- Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G. & Strecker, G. (1986).** Glycoproteins. In *Carbohydrate analysis, a practical approach*, pp. 143-204. Edited by C. M. F. a. K. J. F. (eds). Oxford: IRL Press.
- Morris, E. R., Rees, D. A. & Robinson, G. (1980).** Cation-specific aggregation of carrageenan helices : domain model for polymer gel structure. *J. Mol. Biol.* **138**, 349-362.
- Mulloy, B., Gee, C., Wheeler, S. F., Wait, R., Gray, E. & Barrowcliffe, T. W. (1997).** Molecular weight measurements of low molecular weight heparins by gel permeation chromatography. *Thrombosis and Haemostasis* **77**, 668-674.
- Myslabodski, D. E. (1990).** Red-algae galactans : Isolation and recovery procedures-effects on the structure and rheology, pp. 225. Trondheim: Norway.
- Nagasawa, K., Inoue, Y. & Kamata, T. (1977).** Solvolytic desulfation of glycosaminoglycuronan sulfates with dimethyl sulfoxide containing water or methanol. *Carbohydrate Research* **58**, 47-55.
- Nakashima, H., Hido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M. & Yamamoto, N. (1987).** Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. *Antimicrob. Agents chemother.* **31**, 1524-1528.
- Nardella, A., Chaubet, F., Boisson-Vidal, C., Blondin, C., Durand, P. & Jozefonvicz, J. (1996).** Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate Research* **289**, 201-208.

- Neushul, M. (1990). Antiviral carbohydrates from marine red algae. *Hydrobiologia* **204/205**, 99-104.
- Nosedá, M. D., Tulio, S. & Duarte, M. E. R. (1999). Polysaccharides from the red seaweed *Bostrychia montagnei*: chemical characterization. *Journal of Applied Phycology* **11**, 35-40.
- Nunn, J. R., Parolis, H. & Russell, I. (1971). Sulphated polysaccharides of the Solieriaceae family: Part I. A polysaccharide from *Anatheca dentata*. *Carbohydrate Research* **20**, 205-215.
- O'Neill, A. N. (1955a). 3,6-anhydro-D-galactose as a constituent of kappa-carrageenin. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2837-2839.
- O'Neill, A. N. (1955b). Derivatives of 4-O-beta-D-galactopyranosyl-3,6-anhydro-D-galactose from kappa carrageenin. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 6324-6326.
- Painter, T. J. (1982). Algal polysaccharides. In *The polysaccharides*, pp. 195-285. Edited by A. G. O. (ed.): Academic Press.
- Paoletti, S., Smidsrod, O. & Grasdalen, H. (1984). Thermodynamic stability of the ordered conformation of carrageenan polyelectrolytes. *Biopolymers* **23**, 1771-1794.
- Parolis, H. (1978). The structure of the polysaccharide of *Pachymenia carnosa*. *Carbohydrate Research* **62**, 313-320.
- Penman, A. & Rees, D. A. (1973). 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 xi-carrageenan. *J. Chem. Soc.*, 2182-2187.
- Percival, E. (1979). The polysaccharides of green, red and brown seaweed: Their basic structures, Biosynthesis and function. *British Phycological Journal* **14**, 103-117.
- Pérez, R. (1997). Ces algues qui nous entourent. Conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisations, culture. pp. 272. Edited by E. IFREMER. Plouzané.
- Phillips, D., Pierce-Pratt, R., Elias, C. & Waldman, S. (1994). Carrageenan to combat HIV virus. *Hydrocolloid Review* **2**.
- Pickmere, S. E., Parsons, M. J. & Bailey, R. W. (1973). Composition of *Gigartina* carrageenan in relation to sporophyte and gametophyte stages of the life cycle. *Phytochemistry* **12**, 2441-2444.
- Ponce, N. M. A., Pujol, C. A., Damonte, E. B., Flores, M. L. & Stortz, C. A. (2003). Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydrate Research* **338**, 153-165.

- Preston, R. D. (1974).** Physical Biology of Plant Cell Walls. pp. 491. Edited by C. Hall. London.
- Prosselkov, P. V., Gross, W., Igamberdiev, A. U. & Schnarrenberger, C. (1996).** Purification and characterization of UDP-D-galactose-4-epimerase from the red alga *Galdiera sulphuraria*. *Physiol. Plant* **98**, 753-758.
- Pujol, C. A., Errea, M. I., Matulewicz, M. C. & Damonte, E. B. (1996).** Antiherpetic activity of S1, an algal derived sulphated galactan. *Phytotherapy Research* **10**, 410-413.
- Raven, J. A., Johnston, A. M. & Mc Farlan, J. J. (1990).** Carbon metabolism. *Biology of red algae*. pp. 171-202. Edited by K. M. Cole & R. G. Sheath. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rees, D. A. (1961a).** Estimation of the relative amounts of isomeric sulphate esters in some sulphated polysaccharides. *Journal of Chemical Society*, 5168-5171.
- Rees, D. A. (1961b).** Enzymatic synthesis of the 3,6-anhydro-L-galactose within porphyran from L-galactose-6-sulphate units. *Biochem. J.* **81**, 347-352.
- Rees, D. A. (1969).** Structure, conformation and mechanism in the formation of polysaccharides gels and networks. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **24**, 267-332.
- Rees, D. A. (1972).** Polysaccharide gels. A molecular view. *Chem. and Ind.*, 630-636.
- Rees, D. A., Morris, E. R., Thom, D. & Madden, J. K. (1982).** Shapes and interactions of carbohydrates chains. In *The Polysaccharides*, pp. 195-290. Edited by G. O. Aspinall. New York London: Academic Press.
- Rimington, C. (1931).** The carbohydrate complex of serum protein. II : Improved method of isolation and redetermination of structure. Isolation of glucosaminodimannose from protein of ox blood. *Biochemical Journal* **25**, 1062-1071.
- Robyt, J. F. (1998).** Essentials of carbohydrate chemistry. pp. 399. Edited by C. R. Cantor: Springer.
- Rochas, C., Lahaye, M. & Yaphe, W. (1986).** Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. *Botanica Marina* **29**, 335-340.
- Roger, O., Collic-Jouault, S., Ratiskol, J., Sinquin, C., Guezennec, J., Fischer, A. M. & Chevotot, L. (2002).** Polysaccharide labelling: impact on structural and biological properties. *Carbohydrate Polymers* **50**, 273-278.
- Ross, A. G. (1953).** Some typical analyses of red seaweeds. *J. Sci. Food Agric.* **4**, 333-335.
- Rudolph, B. (1998).** Seaweed products : red algae of economic significance. In *Marine Freshwater Products Handbook*, pp. 515-529. Edited by R. E. Martin, Paine Carter, E., Flick, G. J., Davis, L. M.: Chapman & Hall.

- Sauvageau, C. (1925).** Sur quelques algues floridées renfermant de l'iode à l'état libre. In *Bulletin de la station biologique d'Arcachon*. pp. 45. Bordeaux.
- Schaeffer, D. J. & Krylov, V. S. (2000).** Anti-HIV Activity of Extracts and Compounds from Algae and Cyanobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **45**, 208-227.
- Shanmugan, M. & Mody, K. H. (2000).** Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current Science* **79**, 1672-1683.
- Sloneker, J. H. & Orentas, D. G. (1962).** Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide. *Nature* **194**, 478-479.
- Smidsrod, O. & Grasdalen, H. (1984a).** Polyelectrolytes from seaweeds. *Hydrobiologia* **116/117**, 19-28.
- Smidsrod, O. & Grasdalen, H. (1984b).** Conformations of xi-carrageenan in solution. *Hydrobiologia* **116/117**.
- Smidsrod, O., Andresen, I.-L., Grasdalen, H., Larsen, B. & Painter, T. J. (1980).** Evidence for a salt-promoted "freeze-out" of linkage conformations in carrageenans as a prerequisite for gel-formation. *Carbohydrate Research* **80**, C11-C16.
- Smith, D. B. & Cook, W. H. (1953).** Fractionation of carrageenin. *Arch. Biochem. Biophys.* **45**, 232-233.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76-85.
- Stancioff, D. J. & Stanley, N. I. (1969).** Infrared and chemical studies on algal polysaccharides. In *Proceeding of the 6th International Seaweed Symposium*, pp. 595-609. Edited by R. Margalef.
- Stevenson, T. T. & Furneaux, R. H. (1991).** Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. *Carbohydrate Research* **210**, 277-298.
- Stortz, C. A. & Cerezo, A. S. (2000).** Novel findings in carrageenans, agaroids and "hybrid" red seaweed galactans. *Current Topics in Phytochemistry* **4**, 121-133.
- Sutherland, I. W. (1990).** Biotechnology of microbial exopolysaccharides. In *Cambridge studies in biotechnology*, pp. 1-37. Edited by C. U. Press. Cambridge.
- Takano, R., Nose, Y., Hayashi, K., Hara, S. & Hirase, S. (1994).** Agarose-carrageenan hybrid polysaccharides from *Lomentaria catenata*. *Phytochemistry* **37**, 1615-1619.
- Takano, R., Iwane-Sakata, H., Hayashi, K., Hara, S. & Hirase, S. (1998).** Concurrence of agaroid and carrageenan chains in funoran from the red seaweed *Gloiopeltis furcata* post. et ruprecht (Cryptonemiales, Rhodophyta). *Carbohydrate Polymers* **35**, 81-87.

- Takano, R., Yokoi, T., Kamli, K., Hara, S. & Hirase, S. (1999).** Coexistence of agaroid and carrageenan structures in a polysaccharide from the red seaweed *Rhodomela larix* (Turner). *Ag. Bot. Mar.* **42**, 183-188.
- Tako, M. & Nakamura, S. (1986).** Indicative evidence for a conformational transition in kappa-carrageenan from studies of viscosity-shear rate dependence. *Carbohydrate Research* **155**, 200-205.
- Therkelsen, G. H. (1993).** Carrageenan. In *Industrial Gums. Polysaccharides and their Derivatives. Third Edition*. pp. 146-180. Edited by R. L. WHISTLER, BeMILLER, J. N.: Academic Press.
- Tillmans, J. & Philippi, K. (1929).** Über den Gehalt der wichtigsten Proteine des Nahrungsmittel an Kohlehydraten und über ein Kolorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von stickstofffreien Zucker in Eiweiß. *Biochem. Z.* **215**, 36-60.
- Usov, A. I. (1984).** NMR spectroscopy of red seaweed polysaccharides : Agars, Carrageenans, and Xylans. *Botanica Marina* **27**, 189-202.
- Usov, A. I. (1992).** Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. *Food Hydrocolloids* **6**, 9-23.
- Usov, A. I. (1998).** Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. *Food Hydrocolloids* **12**, 301-308.
- Usov, A. I. & Barbakadze, V. V. (1978).** Polysaccharides of algae. Partial acetolysis of the sulphated galactan from the red seaweed *Grateloupia divaricata* Okam. *Bioorg. Khim.* **4**, 1107-1115 (en russe).
- Usov, A. I., Yarotsky, S. V. & Shashkov, A. S. (1980).** ¹³C-NMR spectroscopy of red algal galactans. *Biopolymers* **19**, 977-990.
- Van de Velde, F. & De Ruiter, G. A. (2002).** Carrageenan. *Biopolymers* **6**, 245-273.
- Van de Velde, F., Peppelman, H. A., Rollema, H. S. & Tromp, R. H. (2001).** On the structure of kappa/iota-hybrid carrageenans. *Carbohydrate Research*, 271-283.
- Van de Velde, F., Knutsen, S. H., Usov, A. I., Rollema, H. S. & Cerezo, A. S. (2002).** ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans : application in research and industry. *Trends in Food Science & Technology* **13**, 73-92.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G. & Jahns, H. M. (1995).** *Algae : An introduction to Phycology*.: Cambridge University Press. pp. 623.
- Volpi, G. (1993).** *J. Chromatography* **622**, 13-20.
- Volpi, G., Mascellani, G. & Bianchini, P. (1992).** *Analytical Biochemistry* **200**, 100-107.

- Von Sonntag, C. (1980).** Free-radical reactions of carbohydrates as studied by radiation techniques. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **37**, 7-77.
- Waeghe, T. J., Darvill, A. G., McNeil, M. & Albersheim, P. (1983).** Determination, by methylation analysis, of the glycosyl-linkage compositions of microgram quantities of complex carbohydrates. *Carbohydrate Research* **123**, 281-304.
- Weigl, J. & Yaphe, W. (1966).** The enzymatic hydrolysis of kappa-carrageenan with kappa-carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora*. In *Proceeding 5th International Seaweed Symposium*, pp. 329-332. Edited by E. G. Y. a. J. L. Lachalan: Pergamon Press.
- Witvrouw, M. & De Clercq, E. (1997).** Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen. Pharmac.* **29**, 497-511.
- Womersley, H. B. S. (1996).** The marine benthic flora of Southern Australia. Rhodophyta. In *Flora of Australia, suppl. series 5. Part IIIB*, pp. 392. Canberra: Australian Biological Resources Study Publication.
- Yamada, T., Ogamo, A., Saito, T., Watanabe, J., Uchiyama, H. & Nakagawa, Y. (1997).** Preparation and anti-HIV activity of low-molecular-weight carrageenans and their sulfated derivatives. *Carbohydrate Polymers* **32**, 51-55.
- Yaphe, W. & Arsenault, G. P. (1965).** Improved resorcinol reagent for the determination of Fructose, and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. *Analytical Biochemistry* **13**, 143-148.
- York, W. S., Darvill, A. G., McNeil, M., Stevenson, T. T. & Albersheim, P. (1985).** Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Methods in Enzymologie* **118**, 3-40.
- Zablackis, E. & Santos, G. A. (1986).** The carrageenan of *Catánella nipa*e Zanard, a marine red alga. *Botanica Marina* **29**, 319-322.
- Zemke-White, W. L. & Ohno, M. (1999).** World seaweed utilisation: An end-of-century summary. *Journal of Applied Phycology* **11**, 369-376.
- Zinoun, M., Diouris, M., Potin, P., Floch, J.-Y. & Deslandes, E. (1997).** Evidence of sulfohydrolase activity in the red alga *Calliblepharis jubata*. *Botanica Marina* **40**, 49-53.