

## IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES PRÉCURSEURS BIOLOGIQUES DES CARRAGHÉNANES PAR SPECTROSCOPIE DE R.M.N.-<sup>13</sup>C

CHRISTINE BELLION\*, GÉRARD BRIGAND,  
Société Ceca, F-50500 Carentan (France)

JEAN-CLAUDE PROMÉ,  
C.N.R.S., Biologie et Génétique Cellulaires, Université Paul Sabatier, F-31062 Toulouse Cedex (France)

DAVID WELTI ET STEPHEN BOCIEK  
Unilever Research, Colworth Laboratory Sharnbrook, Bedford MK44 1LQ (Angleterre)  
(Reçu le 18 mai 1982; accepté sous forme révisée le 20 janvier 1983)

### ABSTRACT

Carrageenans from the following red algae, *Eucheuma spinosum*, *Eucheuma cottonii* (Solieriaceae), *Chondrus crispus* gametophytes, and *Gigartina stellata* (Gigartinaceae) have been fractionated in order to obtain enriched fractions of carrageenan precursor(s) ( $\mu$ - and  $\nu$ -carrageenans). I.r. and <sup>13</sup>C-n.m.r. spectroscopy have been used to identify structures present in these fractions and in total extracts from *Ahnfeltia concinna* and *Ahnfeltia gigartinoides* (Phylloporaceae) and both methods are compared.  $\nu$ -Carrageenan (precursor of  $\nu$ -carrageenan) was the only precursor that could be detected in *E. spinosum*, *E. cottonii*, and the two *Ahnfeltia* species. *E. cottonii* fraction was also enriched in  $\iota$ -carrageenan; this structure was partially methylated at O-6 of the D-galactose residue (m.s. determination).  $\mu$ -Carrageenan (precursor of  $\kappa$ -carrageenan) was identified as the only precursor in the gametophyte fraction of *C. crispus*. Both structures  $\mu$  and  $\nu$  were present in *G. stellata*. <sup>13</sup>C-N.m.r. spectroscopy is shown to be a good method of characterizing these structures, giving more accurate results than i.r. spectroscopy.

### SOMMAIRE

Les carraghénanes synthétisés par les algues rouges *Eucheuma spinosum*, *Eucheuma cottonii* (Solieriaceae), les gamétophytes de *Chondrus crispus*, *Gigartina stellata* (Gigartinaceae), ont été fractionnés afin d'obtenir des fractions en-

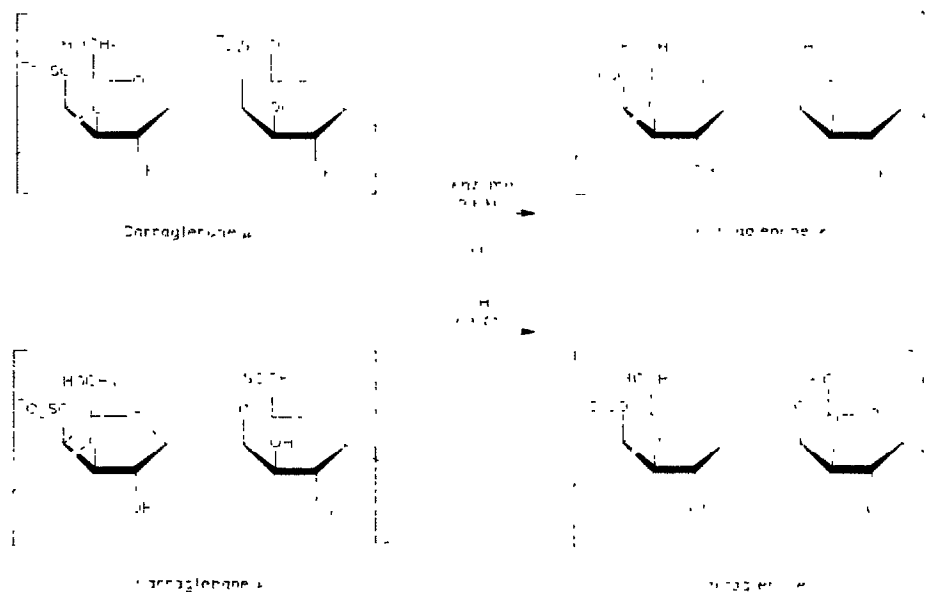
\*À qui doit être adressée la correspondance concernant cet article à l'adresse suivante: Laboratoire de Physiologie Végétale, Faculté des Sciences, F-29283 Brest, France.

richies en précurseurs (carraghénanes  $\mu$  et  $\nu$ ). Ces fractions ainsi que les extraits totaux d'*Ahnfeltia concinna* et *Ahnfeltia gigartinoides* (Phylloporaceae) ont été analysés et identifiés par spectroscopie i.r. et spectrométrie r.m.n.  $^{13}\text{C}$ ; les deux méthodes sont comparées. Chez *E. spinosum*, *E. cottonii* et les deux *Ahnfeltia*, le seul précurseur identifié est le carraghénane  $\nu$  (precursor du carraghénane  $\iota$ ). La fraction extraite d'*E. cottonii* est également enrichie en carraghénane  $\iota$  partiellement méthylé en O-6 du résidu de D-galactose (détermination par s.m.). Chez *C. crispus* (gamétophytes), le précurseur identifié est le carraghénane  $\mu$  (precursor du carraghénane  $\kappa$ ) et chez *G. stellata* les deux structures  $\mu$  et  $\nu$  ont été mises en évidence. La spectroscopie de r.m.n.  $^{13}\text{C}$  s'avère être très utile pour la détermination de ces structures et beaucoup plus précise que la spectroscopie i.r.

## INTRODUCTION

Les carraghénanes sont des D-galactanes sulfatés constituant les parois cellulaires de certaines algues rouges. Ces polymères sont des produits gélifiants ou épaississants, à haute valeur commerciale. Le schéma commun à toutes les molécules est l'alternance des liaisons  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) et  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) entre les résidus de D-galactose. Le galactose de configuration  $\alpha$  peut être sous forme 3,6-anhydro.

Ils ont été classés en deux familles<sup>1</sup> suivant leur mode de sulfatation: la famille  $\kappa$  comprenant les carraghénanes<sup>2</sup>  $\kappa$ ,  $\iota$ ,  $\mu$  et  $\nu$  et la famille  $\lambda$  comprenant les carraghénanes  $\lambda$ ,  $\xi$ <sup>2,3</sup> et  $\pi$ <sup>4</sup>. Dans la famille  $\kappa$ , les carraghénanes  $\mu$  et  $\nu$  ont été définis comme étant les précurseurs biologiques probables des carraghénanes  $\kappa$  et  $\iota$ . Lawson et Rees<sup>5</sup> ont isolé, à partir d'une algue fraîche, une enzyme capable de scinder le groupe sulfate en C-6 du résidu  $\alpha$ -D-galactose (caractéristique des frac-



tions  $\kappa$  et  $\iota$  (Schéma 1). Ces résultats ont été confirmés par Wong et Craigie<sup>6</sup>. La transformation des précurseurs  $\mu$  et  $\nu$  en  $\kappa$  et  $\iota$  est également réalisable *in vitro* par réaction en milieu alcalin (Schéma 1).

Tous les carraghénanes appartenant à la famille  $\kappa$  semblent être des hybrides  $\kappa$ - $\iota$  (après traitement alcalin pour éliminer les précurseurs). Ils peuvent être à dominante  $\kappa$ : *Eucheuma cottonii* (Solieriaceae)<sup>7</sup>, gamétophytes de *Chondrus crispus*, et *Gigartina stellata* (Gigartinaceae)<sup>8,9</sup>, ou à dominante  $\iota$ : *Eucheuma spinosum* (Solieriaceae)<sup>7</sup>, ou bien contenant des quantités égales: *Ahnfeltia concinna* (Phylloporaceae)<sup>8</sup>. Les données bibliographiques sur les précurseurs biologiques des carraghénanes extraits de *C. crispus* et *G. stellata* sont peu précises, un ou deux précurseurs pourraient être présents<sup>5,6,10</sup>. Quant à *E. cottonii* ( $\kappa$  dominant) et *E. spinosum* ( $\iota$  dominant), les résultats d'Anderson *et al.*<sup>11</sup> semblent montrer que le précurseur du premier est le carraghénane  $\mu$ , alors que le précurseur du second est le carraghénane  $\nu$ .

L'objet de nos présents travaux est d'adapter la spectroscopie r.m.n.-<sup>13</sup>C (méthode récente d'identification des carraghénanes  $\kappa$  et  $\iota$ )<sup>12-16</sup> à la caractérisation des précurseurs de carraghénanes extraits d'*E. spinosum*, *E. cottonii*, *C. crispus*, *G. stellata*, *A. concinna* et *A. gigartinoïdes*. Nous avons également utilisé la spectroscopie i.r., méthodes plus ancienne, et comparons les deux techniques.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Algues et carraghénanes.* — *Eucheuma cottonii* et *Eucheuma spinosum* sont des algues cultivées aux Philippines et importées par la Société Ceca (France); *Chondrus crispus* et *Gigartina stellata* sont des algues d'origine bretonne (France). Le carraghénane extrait d'*Ahnfeltia concinna* est un don de M. Doty et G. Santos (Université d'Hawaï, U.S.A.) et celui d'*Ahnfeltia gigartinoïdes* est un don d'E.L. McCandless (Université McMaster, Ontario, Canada).

*Préparation des fractions enrichies en précurseurs.* — Deux méthodes de fractionnement ont été utilisées. La première à partir des algues entières (*E. cottonii*, *E. spinosum*)<sup>17</sup>, la seconde à partir du carraghénane préalablement extrait de l'algue (*C. crispus*, *G. stellata*).

Les deux échantillons d'*Eucheuma* sont lavés à l'eau froide et séchés. Les algues sèches (500 g) sont placées au bain-marie dans de l'eau (7 L) à 50° (*E. cottonii*) ou 30° (*E. spinosum*) sous agitation faible. Après gonflement les algues sont coupées en petits fragments. Après 2 h de macération, la solution de trempage est filtrée sur voile de nylon. Cette solution est chauffée à 80°, clarifiée par filtration sur terre filtrante (Clarsel-flo, Ceca) et concentrée à l'étuve à 70° jusqu'à 1,5 L. La solution subit ensuite un rapide (~1 min) passage acide à pH 5,5 et à 60° par addition d'acide chlorhydrique 0,1M, afin de décarbonater la solution. Après neutralisation avec de l'hydroxyde de sodium M le polyoside est récupéré par précipitation en versant sous agitation la solution chauffée à 80° dans le 2-propanol (2 vol.). Les particules fines éventuelles sont centrifugées, ajoutées au précipité préalablement

filtré sur voile de nylon. Le tout est relavé à l'éthanol, séché et broyé. Le produit est remis en solution et filtré à chaud (80°) sur préfiltre Millipore AP 25. La solution est concentrée, précipitée avec le 2-propanol. Le précipité séché et broyé est appelé fraction enrichie en précurseurs (E.P.).

Les carraghénanes de *C. crispus* et *G. stellata* sont préalablement extraits de l'algue et ensuite fractionnés, selon la méthode suivante. Les algues (100 g) triées, lavées et séchées sont placées dans de l'eau (3 L) au bain-marie sous forte agitation. Après gonflement, elles sont broyées à l'aide d'un appareil à arbre broyeur (Ultra-Turrax). La pâte obtenue est maintenue sous agitation pendant 5 h à 90°, puis clarifiée par filtration à 80° à l'aide de terre filtrante (Clarsel-flo, Ceca). Le sirop obtenu est coagulé à 80° par le 2-propanol (2 vol.). Le carraghénane broyé et séché représente l'extrait total. L'enrichissement en précurseurs est effectuée comme suit: la poudre (10 g) est dispersée sous agitation dans une solution (1 L) à 2,5% de chlorure de potassium, à température ambiante. Après 1 h d'agitation, le mélange est centrifugé pendant 5 min à 5000g. Le culot est lavé avec une solution de chlorure de potassium à 2,5% et le liquide de lavage mélangé au surnageant. La solution obtenue est filtrée sur préfiltre Millipore AP 25 et concentrée à 80° jusqu'à 200 mL. Après avoir subi une décarbonatation suivant le procédé décrit plus haut, la solution est chauffée à 80° et le polyoside est obtenu par précipitation à l'aide de 2-propanol (2 vol.). Le précipité est séché et broyé. Cette poudre est également appelée fraction enrichie en précurseurs (E.P.).

*Traitement alcalin des fractions enrichies en précurseurs.* — Les poudres de carraghénanes sont traitées en milieu hétérogène. Elles sont dispersées à la concentration de 200 g/L dans un mélange en ébullition eau-2-propanol 1:1 (v/v) contenant 100 g/L d'hydroxyde de potassium. Le mélange est agité sous reflux pendant 5 à 6 h et du 2-propanol (1 vol.) est ajouté. Le précipité est filtré et lavé au 2-propanol et remis en solution dans l'eau (~10 g/L) à 60°. La solution est neutralisée à l'acide chlorhydrique M, chauffée à 80° et précipitée à l'aide de 2-propanol (2 vol.).

*Spectroscopie infra-rouge.* — L'appareil utilisé est un Perkin-Elmer, modèle 457. Les échantillons sont analysés sous forme de films préparés par évaporation à 60° d'une solution à 0,4% sur plaque de chlorure de polyvinyle (Afcu dur).

*Spectroscopie de r.m.n.  $^{-13}\text{C}$ .* — L'appareil utilisé est un spectromètre Bruker CXP 300 (75,44 MHz). Les spectres sont obtenus par découplage des protons. Les échantillons sont dilués dans l'eau deutérée à 20 mg/mL. Les fractions n'ayant pas subi de traitement alcalin (non transformées) sont analysées à 90°, alors que les fractions transformées sont analysées à 70°. La puissance de pulse utilisée est de 25  $\mu\text{s}$  (angle de pulse 90°) et le temps d'acquisition de 4 s. Les nombres d'accumulations et les fenêtres de fréquence varient suivant les échantillons; leur valeurs sont notées dans la légende de chaque spectre. Les déplacements chimiques sont calculés par rapport au signal du tétraméthylsilane en utilisant l'acide 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique comme étalon interne. Les spectres d'*A. concinna* et *A. gigartinoides* ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre Bruker WP-80/DS FT (20

MHz). Les conditions sont les suivantes: puissance de pulse 4  $\mu$ s (angle de pulse 60°), temps d'acquisition 0,68–0,82, 0,68–0,825, nombre d'accumulations 200 000, fenêtre de fréquence 1,5 kHz, température 90°. Les pourcentages des différentes structures présentes dans les fractions analysées sont calculés par intégration des pics correspondant aux atomes C-1 $\alpha$ , c'est-à-dire les signaux Ia, Ka et Y.

*Spectrométrie de masse.* — L'appareil utilisé est un instrument Nermag R 1010. Les spectres sont obtenus par impact électronique à 70 ev. La colonne chromatographique est une colonne capillaire en quartz de 25 m chargée de phase stationnaire SE-30; le gaz vecteur est l'hélium. L'échantillon est introduit à l'aide d'un injecteur de Ross. La température de la colonne subit une programmation linéaire à 2°/min à partir de 150°. Le chromatogramme est reconstitué par intégration des pics de  $m/z$  35 à 400, et le temps d'intégration est de 1 milliseconde/masse.

Le polyside (1 g, fraction E.P. d'*E. cottonii*) est hydrolysé à 95° pendant 16 h sous tube scellé à l'aide d'acide sulfurique à 5% (5 mL). L'hydrolysate est neutralisé à chaud par du carbonate de baryum et filtré sur verre. Le précipité est lavé trois fois à l'eau déminéralisée et les eaux de lavage sont ajoutées au premier filtrat. A cette solution on ajoute de l'inositol (200 mg) servant d'étalon interne. Le volume total du filtrat et des eaux de lavage est de 100 mL. Cette solution (10 mL) est réduite par le borohydrure de sodium (10 mg) pendant 1 h à température ambiante. Après élimination de l'excès de réactif par une goutte d'acide acétique, la solution est évaporée à l'étuve à 55° et reprise trois fois avec du méthanol (1 mL) pour éliminer le borate formé. Le résidu est acétylé en tube scellé pendant 3 heures à 120° avec l'anhydride acétique (2 mL).

## RÉSULTATS

Les carraghénanes d'*E. spinosum*, *E. cottonii*, *C. crispus* et *G. stellata* ont été

TABLEAU I

SIGNAUX EN SPECTROSCOPIE DE R M N.  $^{13}\text{C}$  CORRESPONDANT A C-1 POUR LES DIFFÉRENTES STRUCTURES DE CARRAGHÉNANES OBSERVÉES CHEZ *E. spinosum*, *E. cottonii*, *C. crispus*, *G. stellata*, *A. concinna* ET *A. gigartinoides*<sup>a</sup>

Signaux <sup>b</sup>	Algues <sup>c</sup>										
	E. spinosum		E. cottonii		C. crispus			G. stellata		A. con- cinna (a)	A. gigarti- noides (a)
	a	b	a	b	a	b	c	a	b		
X	104,5		104,5		104,5		104,5	104,5		104,5	104,5
Kg <sub>1</sub> , Ig <sub>1</sub>	102,0	101,9	102,1	102,1	102,2	102,2	102,1	102,1	102,1	102,2	102,2
Y ou Y'	98,1		98,0		97,5		97,5	97,8		98,0	98,0
Ka <sub>1</sub>			95,0	95,0	95,1	94,9	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0
Ia <sub>1</sub>	91,8	91,8	91,8	91,7			91,7	91,8	91,8	91,6	91,7

<sup>a</sup>Valeurs des déplacements chimiques par rapport au signal du tétraméthylsilane, <sup>b</sup>X, Y, Kg, Ka, Ia: voir légendes des Figs 2 et 4. <sup>c</sup>(a) Fraction enrichie en précurseurs avant traitement alcalin; (b) cette même fraction après traitement alcalin; (c) extrait total avant transformation alcaline.

fractionnés suivant les deux méthodes décrites dans les paragraphes précédents. Les pourcentages de fractions enrichies en précurseurs (F.P.) (par rapport au carraghénane total) sont approximativement les suivants: 16% (*E. spinosum*), 4% (*E. cottonii*), 6% (*C. crispus*) et 6% (*G. stellata*). Ces fractions ont été analysées avant et après transformation alcaline, par spectrométrie i.r. et par spectroscopie de r.m.n.- $^{13}\text{C}$ . Par comparaison des spectres, nous avons identifié la nature du (des) carraghénane(s) précurseur(s) dans chaque fraction. Les carraghénanes extraits d'*A. concinna* et *A. gigartinoïdes* ont été analysés sans avoir subi de fractionnement au préalable. La valeur des déplacements chimiques des principaux signaux sont consignés dans le Tableau I. X et Y sont les pics correspondant aux atomes C-1 des précurseurs (voir Discussion); les pics signalés par des flèches dans les figures sont également liés à la présence de précurseurs, ils sont visibles sur tous les spectres des fractions analysées avant traitement alcalin, sauf sur celui d'*E. cottonii* où le pourcentage de précurseurs est trop faible.

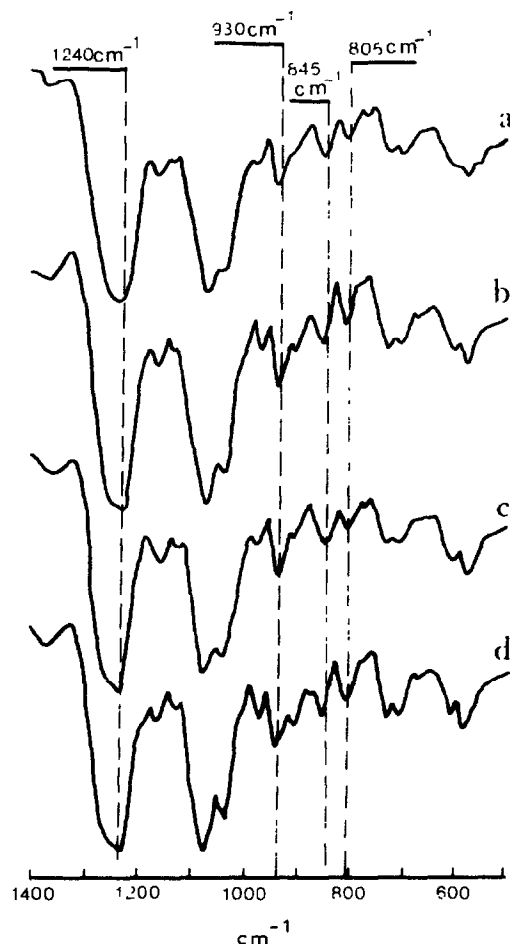


Fig. 1. Spectres i.r. de carraghénanes extraits d'*E. spinosum*: extrait total (a) avant transformation alcaline et (b) après, fraction E.P. (enrichie en précurseurs) (c) avant transformation alcaline et (d) après.

*Eucheuma spinosum*. — Les spectres i.r. de l'extrait total et de la fraction E.P. sont tous classiques d'un carraghénane<sup>18</sup>  $\iota$ ,  $\nu$  1240 (S=O de SO<sub>4</sub>), 930 (3,6-anhydro-L-galactose), 845 (C-O-S de SO<sub>4</sub>-4, axial secondaire C-4), 805 cm<sup>-1</sup> (SO<sub>4</sub>-2 de 3,6-anhydro-D-galactose). Bien que ces spectres aient un profil semblable, il est possible de les différencier;  $\nu$  805 et 1240 cm<sup>-1</sup> sont légèrement plus intenses pour la fraction E.P. que pour l'extrait total (Fig. 1, c et a), prouvant ainsi que le premier spectre correspond à un produit plus sulfaté. L'effet de la transformation alcaline sur la fraction E.P. et le carraghénane total est visible (Fig. 1d et b):  $\nu$  ~820 cm<sup>-1</sup> (entre  $\nu$  805 et 845 cm<sup>-1</sup>) est moins intense après transformation; cette différence est due à l'élimination du groupement SO<sub>4</sub>-6 (810 cm<sup>-1</sup>) qui caractérise les précurseurs.

La spectroscopie i.r. ne nous permet pas de trancher quant à la nature du (des) précurseur(s) et il est nécessaire d'utiliser la spectroscopie r.m.n.-<sup>13</sup>C (Fig. 2). Le spectre de la fraction E.P. non transformée met en évidence la présence de deux structures: la structure  $\iota$  classique, caractérisée par les signaux Ig et Ia (tous identifiés sur le spectre; Fig. 2a)<sup>13-16</sup> dont quelques valeurs de déplacements

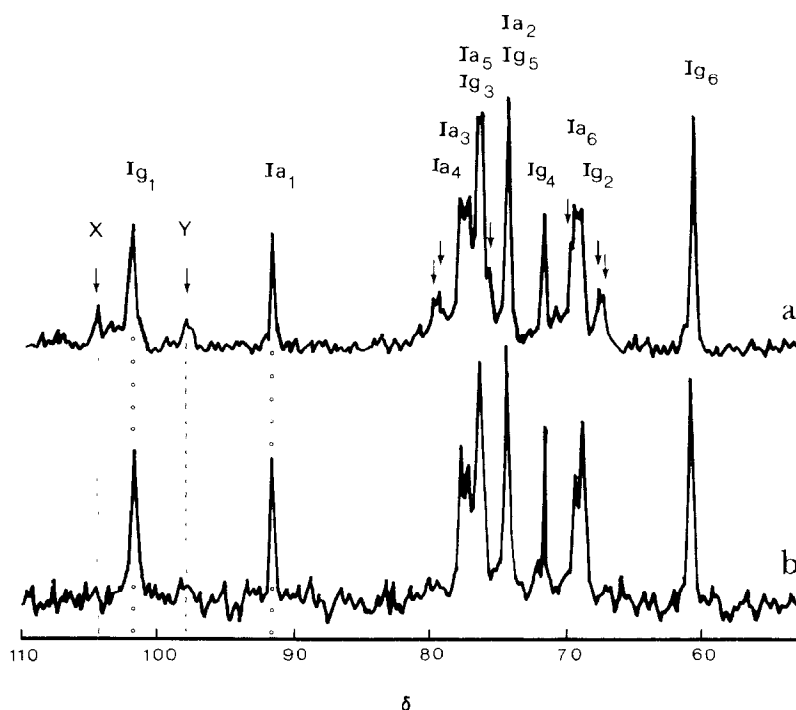


Fig. 2. Spectres de r.m.n.-<sup>13</sup>C de carraghénanes extraits d'*E. spinosum*, fraction E.P. (a) avant transformation alcaline et (b) après. Les signaux X, Y, et ceux signalés par des flèches sont relatifs au précurseur; Ig et Ia représentent les signaux correspondant aux atomes de carbone des résidus de D-galactose (g) et de 3,6-anhydro-D-galactose (I) du carraghénane  $\iota$  (I), les chiffres en indice représentent le numéro du carbone sur le cycle. Conditions d'enregistrement: nombres d'accumulations, (a) 2000, (b) 3307; fenêtres de fréquence (a) 15 kHz, (b) 20 kHz; mémoire (a) 8 K, (b) 4 K.

chimiques ont été consignées dans le Tableau I et une seconde structure caractérisée par les signaux X ( $\delta$  104,5), Y ( $\delta$  98,1) et ceux signalés par des flèches. Cette deuxième structure se transforme intégralement en carraghénane  $\iota$  après traitement alcalin (Fig. 2b); elle répond donc à la définition du carraghénane  $\nu$ , précurseur du carraghénane  $\iota$ ; sa proportion peut être estimée à environ 27% (de la fraction E.P.). Nous confirmons donc la nature du précurseur du carraghénane extrait d'*E. spinosum*<sup>11</sup>.

*Eucheuma cottonii*. — L'analyse par spectroscopie i.r. montre que la fraction E.P. (Fig. 3c) est également enrichie en carraghénane  $\iota$  ( $\nu$  805  $\text{cm}^{-1}$ ), par rapport à l'extrait total qui présente un spectre caractéristique de carraghénane  $\kappa$  (Fig. 3a) ( $\nu$  1240  $\text{cm}^{-1}$  moins intense, et absence de  $\nu$  805  $\text{cm}^{-1}$ ). L'influence du traitement alcalin ne peut être détectée sur l'extrait total, les spectres sont semblables (Fig. 3a et b). Par contre, les spectres de la fraction E.P. avant et après transformation alcaline ont des profils légèrement différents (Fig. 3c et d); on observe (de même que chez *E. spinosum*) la disparition des précurseurs par une diminution de l'absorbance entre  $\nu$  805 et 845  $\text{cm}^{-1}$ .

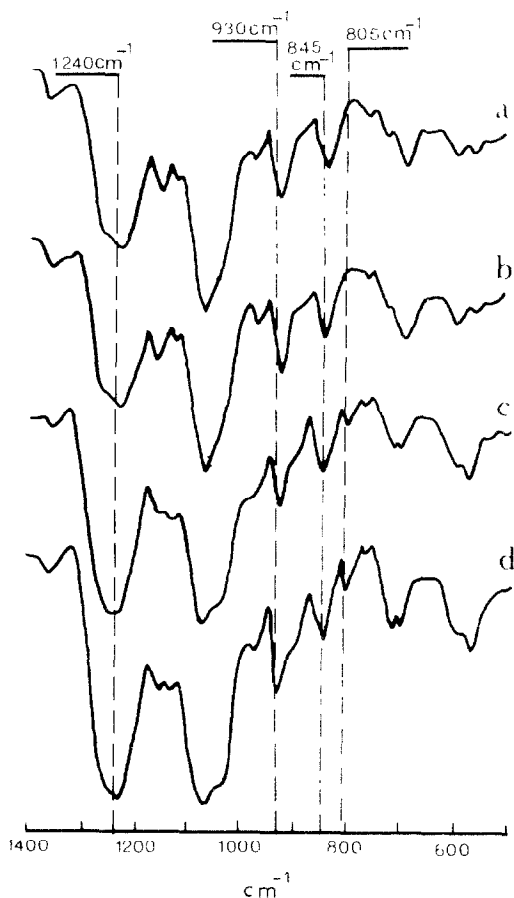


Fig. 3. Spectres i.r. de carraghénanes extraits d'*E. cottonii*, voir légende de la Fig. 1



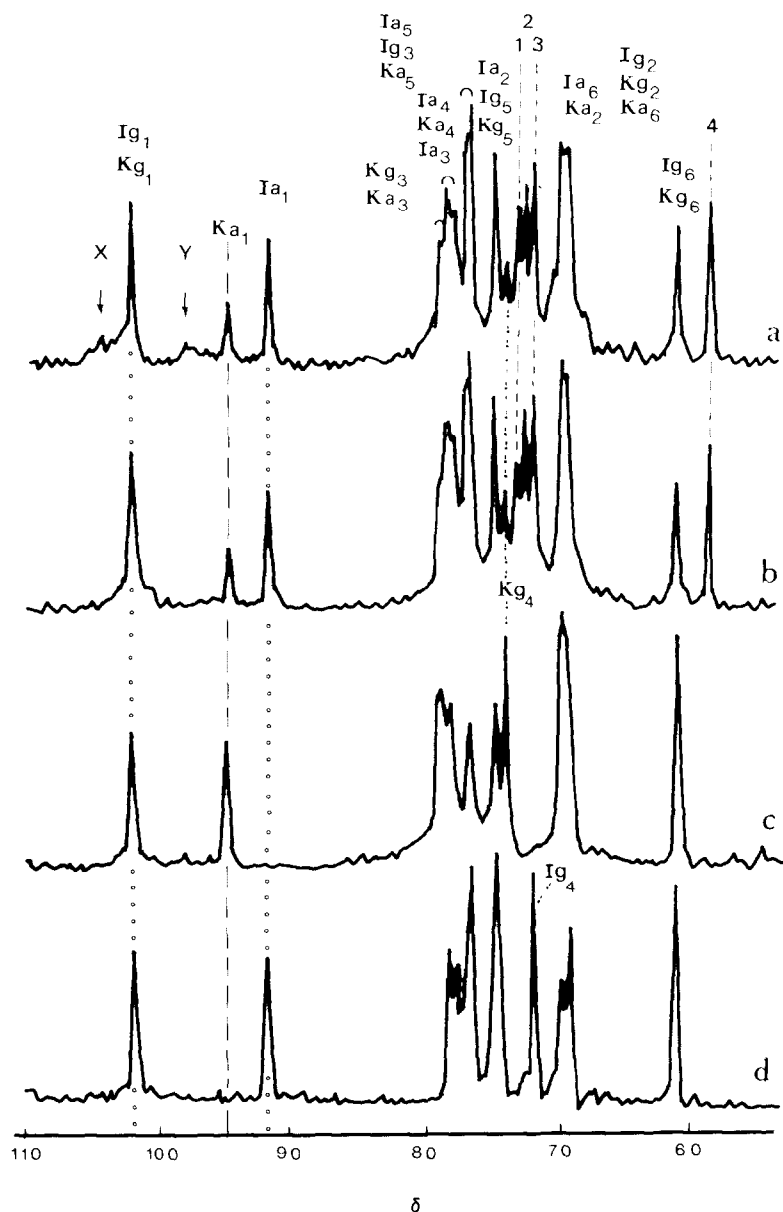


Fig. 4. Spectres de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  de carraghénanes extraits d'*E. cottonii*: fraction E.P. (a) avant transformation alcaline et (b) après; spectres de référence: (c) carraghénane  $\kappa$  extrait d'*E. cottonii*, (d) carraghénane  $\iota$  d'*E. spinosum* (extraits totaux après transformation alcaline). Les signaux Kg et Ka représentent les signaux correspondant aux atomes de carbone des résidus de D-galactose (g) et de 3,6-anhydro-D-galactose (a) du carraghénane  $\kappa$ . Pour les autres signaux, voir légende de la Fig. 2. Conditions d'enregistrement: nombre d'accumulations (a) 20 149, (b) 12 000; fenêtres de fréquence (a) 15 kHz, (b) 20 kHz; mémoire (a) 8 K, et (b) 4 K.



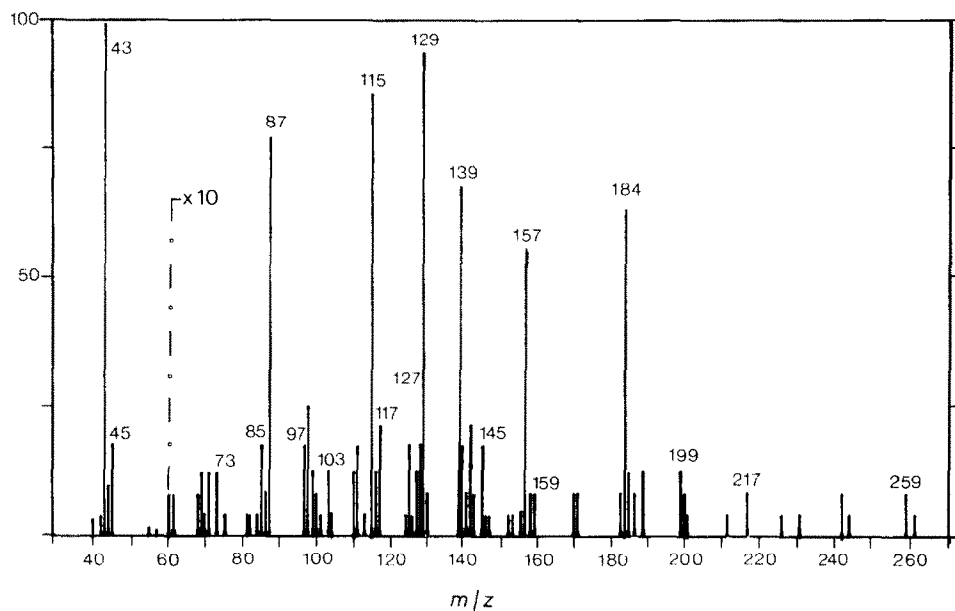


Fig. 5. Spectre de masse du 1,2,3,4,5-penta-*O*-acétyl-6-*O*-méthyl-D-galactitol présent dans la fraction E.P. d'*E. cottonii*. La sensibilité est multipliée par 10 pour les valeurs de  $m/z > 60$ .

correspond à la molécule de 6-*O*-méthylhexitol peracétate (406 u.m.) après la perte de 4  $\text{COCH}_3$ , et de  $\text{CH}_2=\text{CO}$ . Les autres ions sont issus des fragmentations C-C, suivies de pertes successives de  $\text{CH}_3\text{OH}$ , de  $\text{CH}_2=\text{CO}$ , de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  et de  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ , ce qui nous permet d'interpréter les autres pics comme indiqué dans 3.

*Chondrus crispus*. — Le spectre i.r. de l'extrait total non transformé (Fig. 6a) permet difficilement de discerner la présence de carraghénane  $\iota$  ( $\nu$  805  $\text{cm}^{-1}$ ) dans l'extrait. Par spectroscopie de r.m.n.- $^{13}\text{C}$ , on détermine cependant que la structure  $\iota$  représente 17% du polymère ( $\kappa$  73%, précurseur 10%) (Fig. 7c). Le spectre i.r. de la fraction E.P. (Fig. 6a) est caractéristique d'une fraction riche en précurseurs (faible  $\nu$  930  $\text{cm}^{-1}$  et  $\nu$  important à  $\sim 820$   $\text{cm}^{-1}$ ); après transformation alcaline, le spectre de cette fraction devient celui d'un carraghénane  $\kappa$  caractéristique (Fig. 6d). Ces résultats sont confirmés par les spectres r.m.n.- $^{13}\text{C}$  (Fig. 7). Le précurseur caractérisé par les signaux X ( $\delta$  104,5) et Y' ( $\delta$  97,5) est donc le carraghénane  $\mu$  dont le pourcentage peut être estimé à 60% de la fraction E.P. Le carraghénane  $\iota$ , qui constituait 17% de l'extrait total de *C. crispus*, n'est présent qu'à l'état de traces dans la fraction E.P. (pic Ig<sub>4</sub>,  $\delta$  71,8). Ce résultat semble prouver que les molécules riches en structure  $\iota$  n'ont pas diffusé dans la solution de chlorure de potassium et ceci parce qu'elles ne contiennent pas ou peu de carraghénane  $\mu$ . Celui-ci serait porté par les molécules à dominante  $\kappa$ . Par fractionnement, on obtient un extrait contenant 3 à 4% de précurseur (par rapport au carraghénane

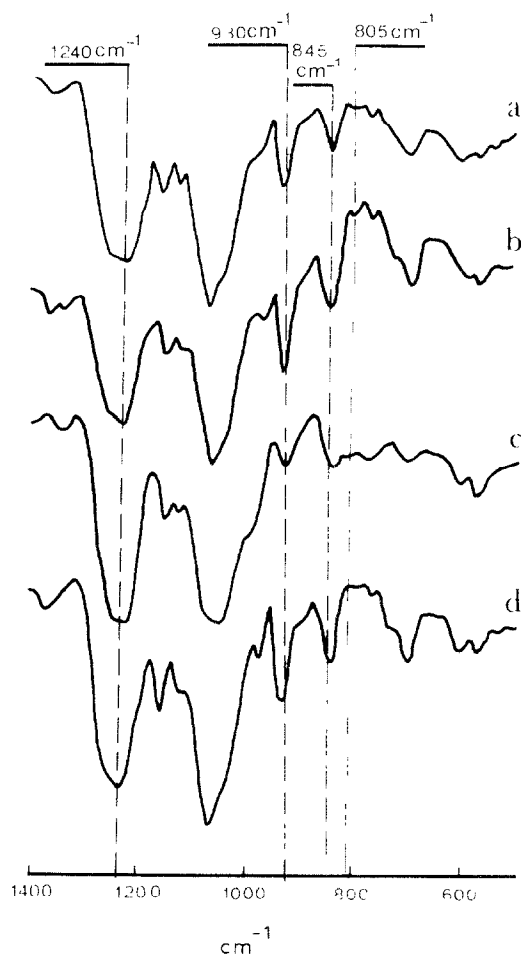


Fig. 6. Spectres i.r. de carragénanes extraits de plants gamétophytes de *C. crispus*, extrait total (a) avant transformation alcaline et (b) après, fraction F.P. (c) avant transformation alcaline et (d) après.

total), alors que l'extrait total en contient 10%. Toutes les molécules contenant des précurseurs ne diffusent donc pas, seules celles qui statistiquement possèdent ~60% de précurseurs sont solubilisées.

*Gigartina stellata*. — L'extrait total de *G. stellata* semble avoir un caractère  $\iota$  légèrement plus marqué que celui de *C. crispus* (Fig. 8a et b;  $\nu$  805  $\text{cm}^{-1}$ ). Le spectre i.r. de la fraction E.P. est très semblable à son homologue de *C. crispus* (Figs. 8 et 6c), mais la spectroscopie de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  permet de les différencier (Fig. 9). La fraction de *G. stellata* avant transformation alcaline possède 51% de structure  $\kappa$ , 5% de structure  $\iota$  et 36% de précurseur (signal X à  $\delta$  104,5 et Y à  $\delta$  97,8). Après transformation alcaline, les pourcentages deviennent 69% de structure  $\kappa$  et 31% de structure  $\iota$ , prouvant ainsi que la fraction E.P. contenait 18% de car-

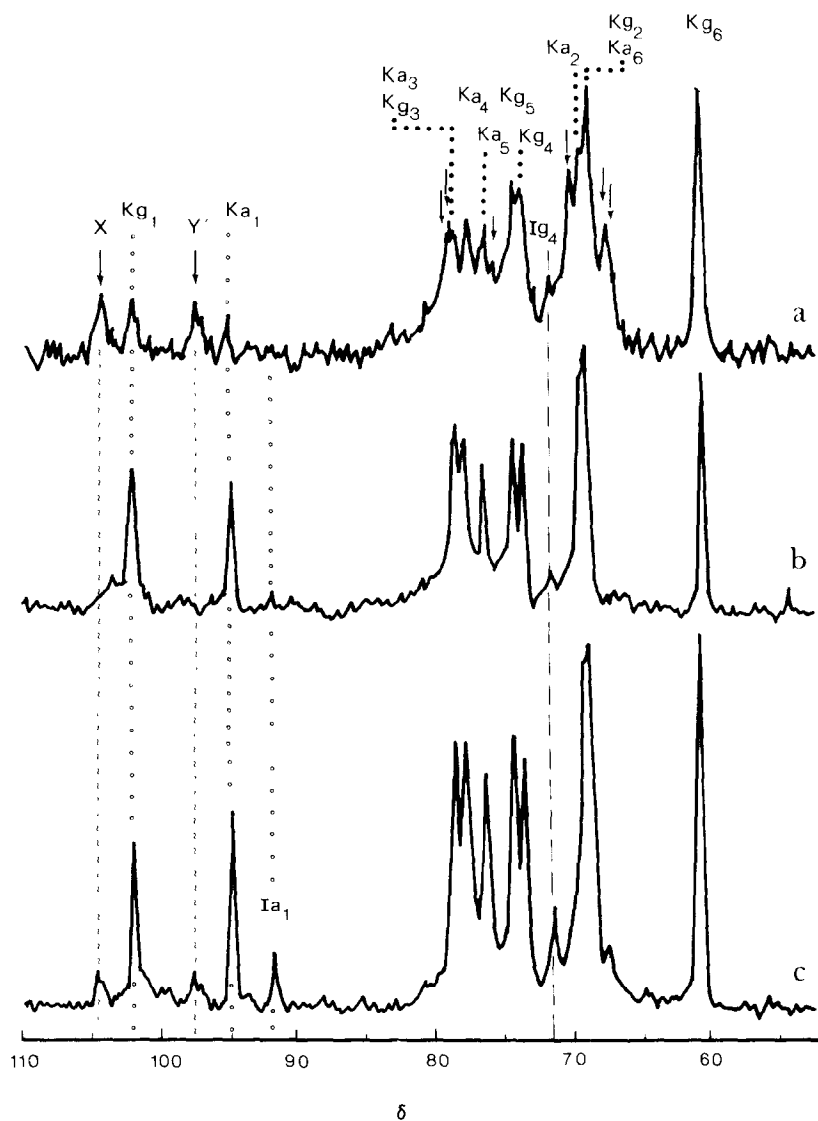


Fig. 7. Spectres de r.m.n.  $^{13}\text{C}$  de carraghénanes extraits de *C. crispus*; fraction E P. (a) avant transformation alcaline et (b) après, (c) extrait total avant transformation alcaline. Voir légendes des figures 2 et 4. Conditions d'enregistrement: nombre d'accumulations (a) 3000, (b) 1100, (c) 4713; fenêtres de fréquence (a) 15 kHz, (b) 20 kHz, (c) 20 kHz; mémoire (a) 8 K, (b) 4 K, (c) 4 K.

raghénane  $\mu$  et 26% de carraghénane  $\nu$ . Un signal non identifié apparaît sur le spectre de r.m.n.  $^{13}\text{C}$  à  $\delta$  104,2 entre X ( $\delta$  104,5) et  $\text{Kg}_1$ ,  $\text{Ig}_1$  ( $\delta$  102,1); il diminue d'intensité après traitement alcalin. Peut-être est-il lié à la présence de carraghénane  $\lambda$  qui est un constituant de la base du pied des plants de *G. stellata*<sup>21</sup>.

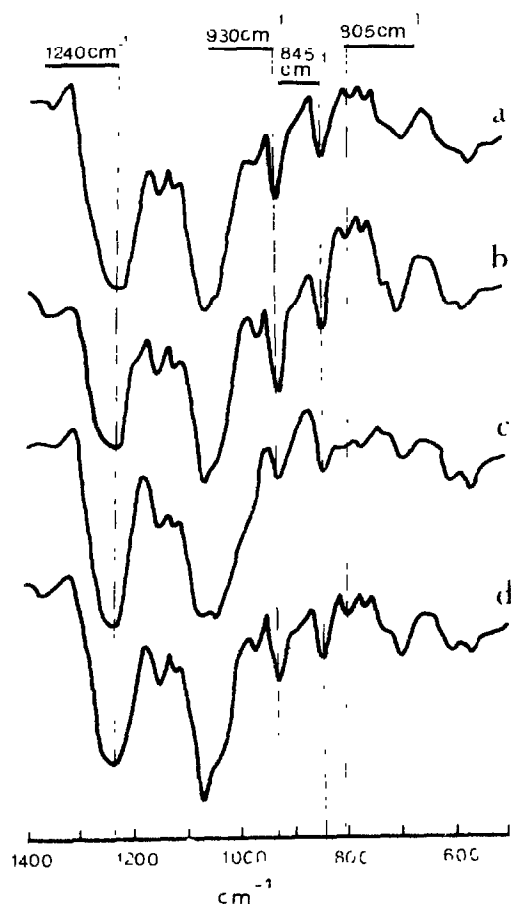


Fig. 8. Spectres i.r. de carraghénanes extraits de *G. stellata*, (a) extrait total avant transformation alcaline et (b) après fraction F.P. (c) avant transformation alcaline et (d) après.

*Ahnfeltia concinna* et *Ahnfeltia gigartinoides*. — L'échantillon d'*Ahnfeltia concinna* que nous avons utilisé a déjà été étudié<sup>22</sup> par spectroscopie i.r. et spectroscopie de r.n.m.  $^{-13}\text{C}$  avant transformation alcaline<sup>9</sup>. Nous présentons ici son spectre de r.n.m.  $^{-13}\text{C}$  avant transformation alcaline (Fig. 10). Les signaux X et Y ont un déplacement chimique identique à ceux du carraghénane  $\nu$  présent chez *E. spinosum* et *E. cottonii* (Tableau I). Les proportions des différentes structures sont de 50% ( $\kappa$ ), 32% ( $\iota$ ) et 18% (précurseur) avant transformation alcaline et deviennent 50% ( $\iota$ ) et 50% ( $\kappa$ ) après transformation<sup>9</sup>. Ce résultat confirme l'identité du carraghénane  $\nu$ . Le spectre de r.n.m.  $^{-13}\text{C}$  d'*Ahnfeltia gigartinoides*, avant transformation alcaline, a un profil identique à celui d'*A. concinna*, les proportions des différentes structures sont cependant légèrement différentes:  $\kappa$  (50%),  $\iota$  (41%) et  $\nu$  (9%). *A. gigartinoides* et *A. concinna* seraient deux espèces identiques<sup>3</sup>. L'une se développant sur les côtes californiennes et l'autre sur les côtes hawaïennes.

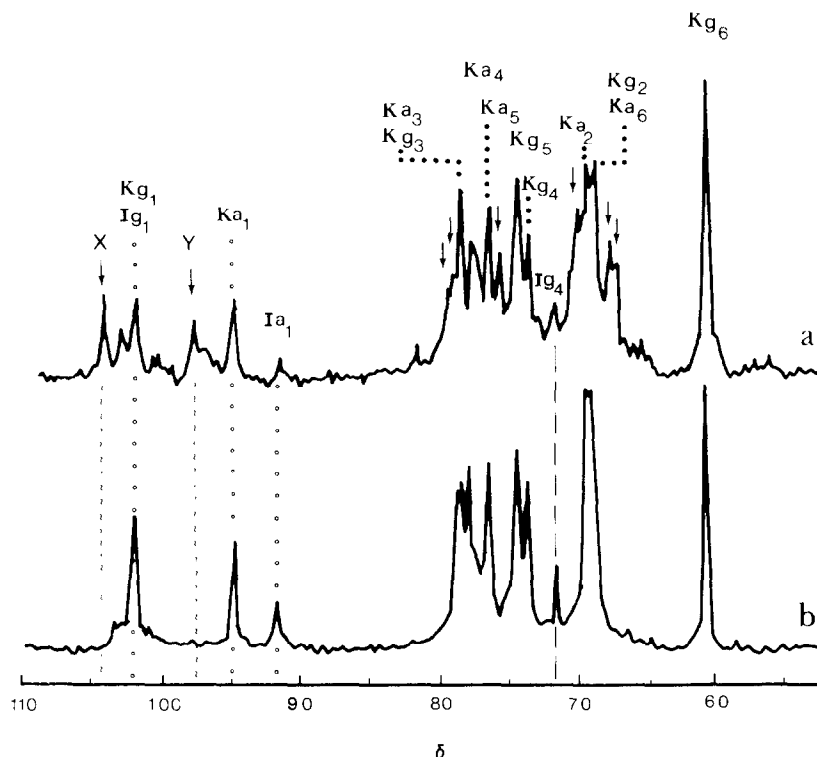


Fig. 9. Spectres de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  de carraghénanes extraits de *G. stellata*; fraction E.P. (a) avant transformation alcaline et (b) après. Voir légendes des figures 2 et 4. Conditions d'enregistrement: nombre d'accumulations (a) 10 000, (b) 12 000; fenêtres de fréquence (a) 15 kHz, (b) 20 kHz; mémoire (a) 8 K, (b) 8 K.

## DISCUSSION

À partir de ces analyses et par comparaison avec les résultats de la littérature obtenus sur agar sulfaté (avant et après transformation alcaline)<sup>24</sup>, nous déduisons que le signal X correspond à C-1 du résidu de  $\beta$ -D-galactose 4-sulfate, alors que le signal Y correspond à C-1 du résidu de  $\alpha$ -D-galactose 6-sulfate. Si ce dernier résidu ne porte qu'un groupement sulfate en C-6 (carraghénane  $\mu$ ), le déplacement chimique de C-1 est de  $\delta$  97,5; s'il porte un groupe sulfate supplémentaire en C-2 (carraghénane  $\nu$ ), le déplacement est légèrement modifié et devient  $\delta$  98,1. Si l'on se trouve en présence d'un mélange des deux précurseurs, le déplacement de Y peut être trouvé intermédiaire aux deux valeurs précitées (cas de *G. stellata*, Y =  $\delta$  97,8), en raison d'une mauvaise résolution entre les signaux.

Le fait que seul le carraghénane  $\nu$  ait été mis en évidence chez les deux *Eucheuma* et les deux *Ahnfeltia* peut signifier que ce précurseur est commun aux carraghénanes  $\iota$  et  $\kappa$  chez ces espèces d'algues. Le carraghénane  $\nu$  se désulfaterait

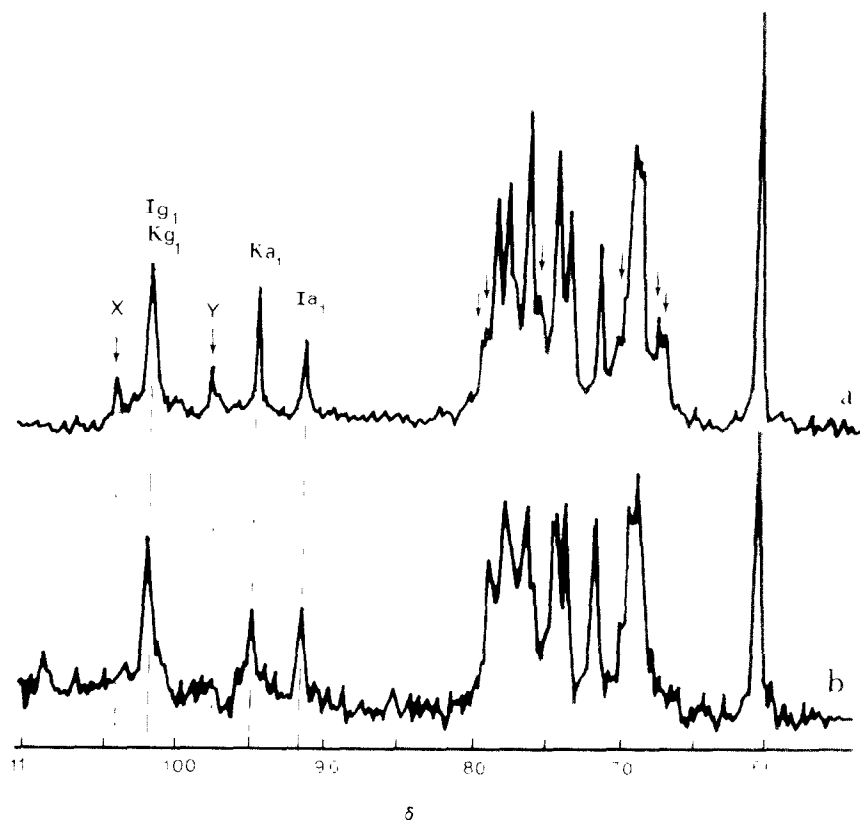


Fig. 10. Spectres de r.m.n.  $^{13}\text{C}$  de carraghénanes extraits d'*A. concinna*, extrait total (a) avant transformation alcaline et (b) après. Le spectre (b) est reproduit à partir de la référence 14 avec autorisation.

en  $\iota$  qui lui-même se désulfaterait en  $\kappa$ , le tout par l'intermédiaire d'un système enzymatique approprié. Le carraghénane  $\mu$  a été mis en évidence chez les algues de la famille des Gigartinaceae (*C. crispus* et *G. stellata*): les carraghénanes synthétisés par cette famille pourraient donc avoir une voie de biosynthèse différente. Le carraghénane  $\mu$  est le seul précurseur mis en évidence chez *C. crispus*. De précédents résultats laissent envisager la présence de ce carraghénane chez cette algue<sup>5,6</sup>, mais une étude plus récente<sup>10</sup> (par spectroscopie i.r.) suggérerait que le précurseur dominant était le carraghénane  $\nu$ . Il semble que la spectroscopie de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  permette d'identifier sans ambiguïté la nature de notre échantillon.

Les spectres i.r. des fractions E.P. non transformées de *C. crispus* et *G. stellata* sont très semblables alors que la spectroscopie de r.m.n.- $^{13}\text{C}$  montre que ces deux extraits ont des structures différentes et notamment que la seconde contient plus de structure  $\iota$  que la première. La structure  $\iota$  ( $\nu$  805  $\text{cm}^{-1}$ ), qui apparaît après transformation alcaline, peut être déjà présente dans la fraction enrichie en précur-



seurs avant transformation alcaline, sans qu'elle puisse être discernée. Bien que la spectroscopie i.r. soit peu utile dans l'interprétation des résultats présentés dans ce travail, nous avons tenu à la présenter en détail car de nombreux travaux précédemment publiés se sont basés uniquement sur l'interprétation de ces spectres.

La présence d'une faible quantité de structure  $\iota$  dans l'extrait d'*E. cottonii* (carraghénane  $\kappa$ ) a récemment été mise en évidence, et le caractère hybride des molécules a également été démontré<sup>7</sup>. Nos résultats apportent une information supplémentaire sur la distribution des résidus  $\kappa$  et  $\iota$  dans les chaînes moléculaires de l'extrait d'*E. cottonii*. Le carraghénane est constitué d'un spectre de molécules hybrides partant de molécules très faiblement hybrides (à forte dominante  $\kappa$ ), allant jusqu'à des molécules plus riches en structure  $\iota$ . Il est important de souligner que ces dernières sont partiellement méthylées. Ce carraghénane méthylé correspond à ~2% du carraghénane total et joue peut être un rôle au niveau de la biosynthèse. Jamais un carraghénane méthylé n'a été mis en évidence chez les Gigartinaceae (Gigartinales); la présence d'un tel groupement est cependant courante chez les Grateloupiaceae (Cryptonemiales)<sup>25-28</sup>.

Nous avons identifié le carraghénane  $\nu$  comme étant le seul précurseur chez *E. cottonii*; ce résultat contredit les résultats précédents<sup>16</sup> qui l'avaient identifié comme carraghénane  $\mu$ . Pour la première fois, carraghénanes  $\mu$  et  $\nu$  sont caractérisés sans ambiguïté, et ce, par la spectroscopie de r.m.n.-<sup>13</sup>C. Jusqu'à présent, seuls les carraghénanes  $\kappa$ ,  $\iota$  et carraghénane partiellement désulfaté (furcellarane) avaient été identifiés par cette méthode<sup>13,14</sup>. L'analyse par spectroscopie de r.m.n.-<sup>13</sup>C apporte plus de renseignements sur la structure des carraghénanes que la spectroscopie i.r. qui est cependant une bonne méthode d'approche. La spectroscopie de r.m.n.-<sup>13</sup>C a ses limites puisqu'une structure dont la proportion est <10% dans le polymère ne peut être détectée. Il est alors important d'utiliser des techniques de fractionnement qui permettent d'obtenir des fractions enrichies en structure présente en faible proportion dans l'extrait total. Il faut être conscient que les méthodes de fractionnement que nous avons utilisées ne permettent pas de concentrer la totalité de ces structures, elles permettent donc une analyse qualitative et non quantitative.

## RÉFÉRENCES

- 1 E. L. McCANDLESS ET J. S. CRAIGIE, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 30 (1979) 41-53.
- 2 D. A. REES, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 24 (1969) 267-332.
- 3 A. PENMAN ET D. A. REES, *J. Chem. Soc., Perkin Trans., 1*, (1983) 2182-2187.
- 4 V. L. DiNINNO, Ph. D. Thesis, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada, 1978
- 5 C. J. LAWSON ET D. A. REES, *Nature (London)*, 227 (1970) 392-393.
- 6 K. F. WONG ET J. S. CRAIGIE, *Plant Physiol.*, 61 (1978) 663-666.
- 7 C. BELLION, W. YAPHE ET G. K. HAMER, *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 10th, (1981) 379-384.
- 8 S. S. BHATTACHARJEE, W. YAPHE ET G. K. HAMER, *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 9th (1979) 379-385.
- 9 N. S. ANDERSON, T. C. S. DOLAN, A. PENMAN, D. A. REES, G. P. MUELLER, D. J. STANCIOFF ET N. F. STANLEY, *J. Chem. Soc., C*, (1968) 602-606.
- 10 J. S. CRAIGIE ET K. F. WONG, *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 9th (1979) 369-377

- 11 N. S. ANDERSON, T. C. S. DOLE AND D. A. REES, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, (1979) 2173-2176.
- 12 S. V. YARITSKY, A. S. SHASKOV ET A. I. USOV, *Bioorg. Khim.*, 4 (1977) 745-751.
- 13 A. I. USOV, S. V. YARITSKY ET A. S. SHASKOV, *Biopolymers*, 19 (1980) 977-990.
- 14 S. S. BHATTACHARJEE ET W. YAPPE, *Carbohydr. Res.*, 60 (1978) C1-C3.
- 15 C. ROCHAS, M. RINAUDO ET M. VINCENDON, *Biopolymers*, 19 (1980) 2165-2175.
- 16 D. WELTI communication personnelle.
- 17 S. L. TJOA, U.S. Pat. 2 811 451, 1957.
- 18 D. J. STANCIOFF ET N. F. STANLEY, *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 6th (1969) 595-609.
- 19 F. M. NICOLAISEN, I. MEYLAND ET K. SCHAUMLERG, *Acta Chem. Scand., Ser. B*, 34 (1980) 103-107.
- 20 E. B. RATHBONE, A. M. STEPHEN ET G. R. WOODARD, *S. Afr. Med. J.*, 42 (1968) 793.
- 21 L. C. M. CHENE ET J. S. CRAIGIE, *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 10th (1981) 391-396.
- 22 G. A. SANTOS ET M. S. DOTY, *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 1704-1706.
- 23 I. ABBOTT, communication personnelle.
- 24 A. I. USOV, S. V. YARITSKY ET M. L. ESTEVES, *Bioorg. Khim.*, 4 (1978) 66-73.
- 25 A. J. R. ALLSOBROOK, I. R. NUNN ET H. PAROLIS, *Carbohydr. Res.*, 16 (1971) 71-78.
- 26 P. BAEZA ET B. MATSUHIRO, *Bot. Mar.*, 20 (1977) 355-357.
- 27 S. HIRASE, C. ARAKI ET K. WATANABE, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 40 (1967) 1445-1448.
- 28 J. R. NUNN ET H. PAROLIS, *Carbohydr. Res.*, 6 (1968) 1-11.